

**Charakterisierung des Genclusters *pkaH-pkaJ*
bezüglich der Wirkung auf die Sporenwandsynthese
in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Nils Ladwig (geb. Schmalschläger)

aus München

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 26.09.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Peschel

2. Berichterstatter: Dr. Günther Muth

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung.....	2
1.1 Bakterielle Zellform und Peptidoglycansynthese.....	2
1.2 Biologie der Streptomyceten.....	6
1.2.1 Lebenszyklus/Differentierung	6
1.2.2 Besonderheiten der Zellwandsynthese bei Aktinobakterien	9
1.2.3 Der SSSC.....	11
1.3 Ser/Thr/Tyr Phosphorylierung.....	14
1.3.1 Kinasen in Bakterien.....	15
1.3.2 Serin/Threonin/Tyrosinkinase in Bakterien	15
1.3.3 Rolle der Ser/Thr Kinasen in der Regulation von Zellteilung/ Zellwandsynthese.....	18
1.3.4 Die eSTPK Pka1 aus <i>S. coelicolor</i>	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Bakterienstämme.....	22
2.1.2 Plasmide.....	23
2.1.3 Oligonukleotide.....	25
2.1.4 Medien.....	27
2.1.5 Zusätze.....	29
2.1.6 Puffer und Lösungen	30
2.2 Chemikalien und andere Materialien.....	39
2.3 Die Kultivierung von Bakterien	42
2.3.1 Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	42
2.3.2 Die Herstellung einer Glycerinkultur	42
2.3.3 Kulturbedingungen für Streptomyceten	42
2.3.4 Die Herstellung einer Sporensuspension von Streptomyceten.....	42

2.3 DNA-Aufnahme durch Bakterien.....	43
2.3.1 Die Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	43
2.3.1.1 Die CaCl ₂ -Methode.....	43
2.3.1.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode (Cohen, Chang et al. 1972).....	43
2.3.1.1.2 Die Transformation	43
2.3.1.2 Die Elektroporation.....	44
2.3.1.2.1 Die Herstellung kompetenter Zellen	44
2.3.1.2.2 Die Elektroporation	44
2.3.2 Die Protoplastentransformation bei Streptomyceten (Kieser <i>et al.</i> , 1982) 45	
2.3.2.1 Die Herstellung von Protoplasten	45
2.3.2.2 Die PEG-induzierte Protoplastentransformation.....	45
2.3.2.3 Konjugation zwischen <i>E. coli</i> und <i>Streptomyceten</i>	45
2.4 Die Plasmidisolierung.....	46
2.4.1 Die alkalische Lyse (Minipräparation).....	47
2.4.2 Die Qiagen- Lyse (Maxipräparation).....	47
2.4.3 Die Lyse nach Eckhardt.....	48
2.5 Vom PCR-Produkt zum Plasmid	48
2.5.1 Die PCR (polymerase chain reaction)	49
2.5.2 Die Agarose- Gelelektrophorese	49
2.5.3 Die Aufreinigung von PCR- Produkten	50
2.5.4 Der Restriktionsverdau	51
2.5.5 Die Ligation.....	51
2.6 Methoden zur Transkriptionsanalyse	52
2.6.1. RNA-Isolierung mit Modified Kirby Mix	52
2.6.2 DNase-Verdau und Test-PCR	53
2.6.3 cDNA-Generierung mittels RT-PCR	53

2.6.4 PCR zur Bestimmung der Transkription	54
2.7 Die Erzeugung und der Nachweis von Deletionsmutanten	54
2.7.1 Die Erzeugung der Mutanten.....	54
2.7.2 Die Kolonie-PCR	55
2.7.3 Der Nachweis einer Deletionsmutanten mittels Southern Blot	55
2.7.3.1 Die Herstellung der Sonde.....	55
2.7.3.2 Die Isolierung von genomischer DNA aus Streptomyceten	56
2.7.3.3 Verdau, Auftrennung und Denaturierung der genomischen DNA	57
2.7.3.4 Der Kapillarblot.....	57
2.7.3.5 Die Hybridisierung	58
2.7.3.6 Lumineszenznachweis der markierten DNA mittels Antikörper	58
2.8 Phänotypische Untersuchungen von Deletionsmutanten.....	58
2.8.1 Mikroskopie und Sporenmessungen	58
2.8.2 Lebend/Tot-Färbung.....	59
2.9 Die physiologische Charakterisierung der Mutanten	59
2.9.1 Sporenproduktionsassay	59
2.9.2 Der Salzstress	60
2.9.3 Vancomycin- & Lysozymresistenztests	60
2.9.4 Die TEM- Mikroskopie	60
2.10 Heterologe Expression von <i>S. coelicolor</i> Proteinen in <i>E.coli</i> BL21 (DE3) (Novagen)	61
2.10.1 Test auf Löslichkeit der exprimierten Proteine.....	61
2.10.1 Expression und Aufreinigung von His-Pkal aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	61
2.10.2 Expression und Aufreinigung von MreC-S-Tag und PBP2-S-Tag aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	62
2.10.3 Expression und Aufreinigung von CRP-Strep aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3)....	63
2.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gele.....	64

2.10.5 Coomassie-Färbung	65
2.10.6 Qualitative Phospho-Serin/Threonin/Tyrosin-Detektion im SDS-Gel	65
2.10.7 Protein-Blots	65
2.10.7.1 Elektroblobt.....	65
2.10.7.2 Immunoblot (Westernblot)	66
2.11 Die Suche nach Interaktionspartnern mit dem BTH unter Einfluss der eSTPK Pkal.....	66
2.12 Massenpektrometrische Analyse der Modifikationen von MreC und PBP2 und des Phosphoproteoms von <i>S. coelicolor</i>	67
2.12.1 Phosphoproteomanalyse.....	67
2.12.1.1 Proteomisolation.....	67
2.12.1.2 Proteinverdau	68
2.12.1.3 Phosphopeptidanreicherung.....	68
2.12.1.4 Massenspektrometrie für die Phosphoproteomanalyse.....	68
2.12.1.5 MS Datenverarbeitung.....	69
2.12.2 Massenspektrometrische Analyse der Modifikationen von MreC und PBP2	70
3. Ergebnisse.....	71
3.1 <i>in silico</i> Analyse des Gens <i>pkaI</i> und des Genclusters <i>pkaH-pkaJ</i> aus <i>S. coelicolor</i>	71
3.1.1 Das Gen <i>pkaI</i> und das daraus abgeleitete Protein Pkal.....	71
3.1.2 Das Gencluster <i>pkaH-pkaJ</i> aus <i>S. coelicolor</i> im Vergleich mit anderen Streptomyceten	72
3.2 Untersuchung des Expressionsprofils von <i>pkaI</i> und des eSTPK Clusters <i>pkaH-pkaJ</i>	74
3.2.1 Untersuchung des Expressionsprofils von <i>pkaI</i> und des eSTPK Clusters <i>sco4775-4779</i> im Wildtyp M145 mittels semiquantitativer RT-PCR	74
3.2.2 Untersuchung der Operonstruktur des eSTPK Clusters <i>pkaH-pkaJ</i>	76

3.3 Konstruktion der Deletionsmutanten NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779	77
3.3.1 Konstruktion der Deletionsmutante NL Δ PkaI.....	77
3.3.2 Konstruktion der Deletionsmutante NL Δ 4775-4779.....	82
3.3.3 Untersuchung der Mutante NL Δ PkaI auf polare Effekte auf die Gene <i>pkaD</i> und <i>pkaJ</i> mittels semiquantitativer RT-PCR	85
3.4 Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 im Vergleich mit dem Wildtyp M145	86
3.4.1 Untersuchung der morphologischen Entwicklung von NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779	86
3.4.2 Quantitative Bestimmung der Sporenproduktion nach drei Tagen und nach sieben Tagen.....	88
3.4.3 Morphologie der Sporen von NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 im Vergleich zum Wildtyp M145.....	89
3.4.3.1 Quantitativer Vergleich der Sporenlängen der Sporen von NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 im Vergleich zum Wildtyp M145	90
3.4.3.2 Untersuchung der Sporenmorphologie von M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 durch Transmissionselektronenmikroskopie.....	92
3.4.4 Morphologie der Sporenketten von M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 mit einer integrierten eSTPK als pSET-Konstrukt	94
3.4.5 Lebensfähigkeit der Sporen in Sporenketten.....	97
3.4.5.1 Lebensfähigkeit der Sporen von M145 und M145 mit zusätzlicher Kopie eines der Gene <i>pkaH-pkaJ</i>	99
3.4.5.2 Lebensfähigkeit der Sporen von NL Δ PkaI und NL Δ PkaI mit zusätzlicher Kopie eines der Gene <i>pkaH-pkaJ</i>	101
3.4.5.3 Lebensfähigkeit der Sporen von NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit zusätzlicher Kopie eines der Gene <i>pkaH-pkaJ</i>	102
3.4.6 Einfluss von osmotischem Stress und wachstumshemmenden Stoffen auf das Auskeimen der Sporen	105
3.4.6.1 Einfluss von osmotischem Stress auf das Auskeimen der Sporen.....	106

3.4.6.2 Empfindlichkeit auskeimender Sporen gegen Vancomycin und Lysozym	108
3.4.6.3 Vergleich der Empfindlichkeit keimender Sporen und Substratmyzels von M145, NLΔPkal und NLΔ4775-4779 gegenüber Vancomycin und Lysozym ...	112
3.4.6.4 Einfluss von MgCl ₂ auf die Sensitivität der Sporen gegen Vancomycin und Lysozym während des Auskeimens	113
3.5 Untersuchung der Phosphorylierung der SSSC-Proteine MreC und PBP2 durch die eSTPK Pkal.....	116
3.5.1 Proteine der Zellwandynthese im Phosphoproteom von <i>S. coelicolor</i> ..	116
3.5.2 Untersuchung der Phosphorylierung von MreC durch die Koexpression mit Pkal in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	120
3.5.2 Untersuchung der Interaktion von Pkal mit PBP2 durch Koexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	124
3.5.3 Bestimmung der phosphorylierten Aminosäuren in His-Pkal, MreC-S-Tag und PBP2-S-Tag	126
3.5.4 Nachweis der Substratspezifität von Pkal	132
3.6 Untersuchung des Einflusses von Pkal auf die Protein-Protein-Interaktionen des SSSC	134
4. Diskussion	137
4.1 Die molekularen Mechanismen der morphologischen Differenzierung von <i>S. coelicolor</i> sind weitgehend unverstanden	137
4.2 Pkal interagiert mit zentralen Komponenten des SSSC sowie der Differenzierung.....	138
4.3 <i>pkal</i> ist Teil eines eSTPK Genclusters	139
4.4 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten NLΔPkal und NLΔ4775-4779 und der Stämme mit einem zusätzlichen eSTPK-Gen	140
4.4.1 Der Phänotyp der Mutante NLΔPkal.....	140
4.4.2 Der Phänotyp der Mutante NLΔ4775-4779.....	141

4.4.3 Eine einzelne eSTPK reicht nicht aus um den korrekten Ablauf der Sporulation zu gewährleisten	142
4.4.4 Störung des Gleichgewichts des eSTPK-Netzwerks in M145 und NL Δ Pkal	144
4.5 Pkal phosphoryliert die SSSC Proteine MreC und PBP2.....	146
4.6 Modell zur Kontrolle des SSSC durch Phosphorylierung	148
5. Anhang	155
5.1 Plasmidkarten	155
5.1.1 pCDF-Duet-1-Konstrukte	155
5.1.2 pSet152-Konstrukte	157
5.1.3 Plasmide zur Generierung der Deletionsmutanten NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779	160
5.2 Rohdaten der Lebend/Tot-Färbung.....	161
5.3 identifizierte Phosphoproteine.....	162
5.4 Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von Pkal, MreC und PBP2	174
5.4.1 Pkal	174
5.4.2 MreC.....	175
5.4.3 PBP2	177
5.5 Publikation	179
5.6 Verwendete Abkürzungen.....	218
6. Literatur	22020

Zusammenfassung

Die Sporulation von *Streptomyces coelicolor* A3(2) erfolgt durch die simultane Septierung der Lufthyphen und die darauffolgende Verdickung der Sporenwand. Diese Verdickung erfolgt durch den Multi-Protein-Komplex SSSC. Bisher war es nicht bekannt wie die Funktion des SSSC reguliert wird, aber es konnte die Interaktion mehrerer essentieller Proteine mit der eSTPK PkaI nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der eSTPK PkaI und der, im Genom in einem Cluster zusammengefassten, eSTPKs PkaH, SCO4776, PkaD und PkaJ während der Sporulation und der Aktivität des SSSCs zu charakterisieren. Eine Deletionsmutante im Gen *pkaI* (NLΔPkaI), sowie im Cluster *pkaH-pkaJ* (NLΔ4775-4779) wurde hergestellt. Bei der phänotypischen Charakterisierung der Mutante NLΔPkaI konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *pkaI* zu leichten Veränderungen bei der Sporenbildung und der Form der Sporen führt. Keimende Sporen der Mutante NLΔ4775-4779 dagegen waren so anfällig gegen zellwandschädigende Agenzien wie Deletionsmutanten in anderen für den SSSC essentiellen Genen. Durch die Einführung der einzelnen eSTPK-Gene konnte dieser Phänotyp nicht aufgehoben werden. Die Einführung einer zusätzlichen, einzelnen Kopie eines der eSTPK-Gene in den Wildtyp M145 führte zur gleichen Anfälligkeit der keimenden Sporen gegen zellwandschädigende Agenzien wie in NLΔ4775-4779. Durch eine lebend/tot-Färbung der Sporen der Deletionsmutanten NLΔPkaI und NLΔ4775-4779, sowie aller Stämme mit zusätzlichem, einzelnen eSTPK-Gen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl toter Sporen und Sporen welche keine DNA enthielten deutlich erhöht war. Durch duale Expression von PkaI mit MreC oder PBP2 konnte nachgewiesen werden, dass PkaI diese phosphoryliert und die phosphorylierten Aminosäuren wurden bestimmt. Außerdem konnte die Substratspezifität von PkaI für MreC oder PBP2 gezeigt werden. Ein inhibierender Einfluss von PkaI auf die Interaktion von MreC mit sich selbst und von MreC mit PBP2 konnte nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurden abschließend in einem Modell zusammengefasst, welches eine Antwort auf die Frage liefert wie eSTPKs den SSSC regulieren können.

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Zellform und Peptidoglycansynthese

Die Zellwand der Bakterien dient der Zelle als Exoskelett, welches dem osmotischen Druck im Innern Stand halten muss und der Zelle ihre charakteristische Form gibt. Sie besteht aus Peptidoglycan (PG), einem linearen Polymer aus β -1-4-glykosidisch verknüpftem N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Über kurze Peptide, welche an die Laktylgruppe der Muraminsäure angefügt werden, können die Stränge kovalent miteinander verknüpft werden (Holtje 1998). Die Peptide können zwischen verschiedenen Bakterienarten variieren (Schleifer K.H. 1972). Gram-negative Bakterien besitzen nur eine PG-Einzelschicht, während Gram-positive Bakterien über viele PG-Schichten verfügen. An die Gram-positive Zellwand werden außerdem noch die Wandteichonsäuren (Wall Teichoic Acids, WTAs), negativ geladene Polymere, geknüpft. Sie bestehen aus wiederkehrenden Einheiten von Zuckern, welche durch Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Häufig werden die WTAs noch durch zusätzliche Glycosylierungen oder D-Alanylierungen modifiziert (Brown, Santa Maria et al. 2013).

Zellwandsynthese findet in Bakterien während der Zellteilung und während des Streckungswachstums statt. Der Ort der Zellwandsynthese bestimmt auch die Zellform. Während kokkenförmige (kugelförmige) Bakterien wie *Staphylococcus aureus* neue Zellwand nur während der Zellteilung bilden (Abb1, Links), wird bei stäbchenförmigen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oder *Caulobacter crescentus* auch neue Zellwand an den seitlichen Wänden eingebaut (Abb1, Mitte) (Szwedziak and Lowe 2013). So kommt es zu einer Streckung, und die Zelle erhält ihre charakteristische Form. Einzellige Organismen aus dem Phylum der Aktinobakterien, wie z. B. *Corynebacterium diphtheriae*, *C. glutamicum* oder *Mycobacterium tuberculosis* erhalten die Stäbchenform durch die Einlagerung von PG an den Zellpolen (Abb 1 rechts).

1. Einleitung

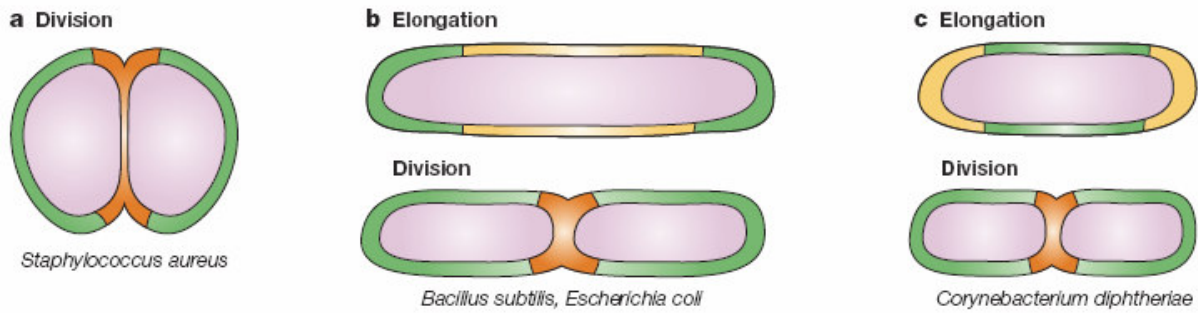


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Orte der Peptidoglycansynthese in verschiedenen Bakterien, während der Zellteilung (Division, rot) und während des Streckungswachstums (Elongation, gelb); aus Cabeen and Jacobs-Wagner (2005): a) kokkenförmige *S. aureus* Zellen nur während der Zellteilung in der Teilungsebene; b) Stäbchenförmige wie z.B. *E. coli* oder *B. subtilis* während Zellteilung in der Teilungsebene und im Streckungswachstum an den lateralen Wänden und c) stäbchenförmiges Aktinobakterium *Corynebacterium diphtheriae* während der Zellteilung in der Teilungsebene und im Streckungswachstum an den Zellpolen.

Die hierfür verantwortlichen Proteinkomplexe (Abb.2.) werden Divisom (während der Zellteilung) und Elongasom (während des Streckungswachstums) genannt (Szwedziak and Lowe 2013).

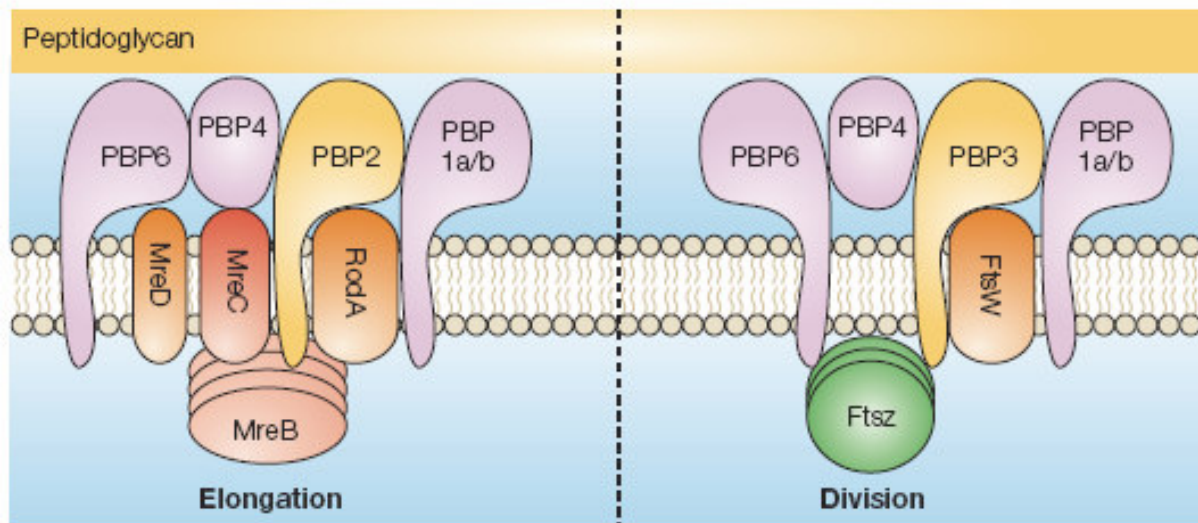


Abbildung 2: Modell der Informationsverarbeitung zur Erlangung der Zellform; aus Cabeen and Jacobs-Wagner (2005): Dieses spekulative Modell zeigt wie ausschlaggebende Informationen über die Zellform von den konservierten Cytoskelettelementen MreB (linke Seite, während des Streckungswachstums = Elongation) und FtsZ (rechte Seite, während der Zellteilung = Division) durch die spezifische Lokalisation von morphogenen Proteinen (links: MreCD, PBP2, RodA; rechts: PBP3, FtsW) vermittelt werden.

Die Kernproteine des Divisoms sind in fast allen Bakterien hochkonserviert (Szwedziak and Lowe 2013). Es sind die Fts-Proteine, welche von den

gleichnamigen Genen kodiert werden. Der Name leitet sich vom Phänotyp der *E. coli* Mutanten ab und bedeutet filamentöse, temperatursensitive Mutanten. Da die Zellteilung in diesen Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur defekt ist, wachsen sie filamentös (Slater and Schaechter 1974). Mit fortschreitender Technik in der Molekularbiologie konnten den Mutanten einzelne Gene zugeordnet werden. Die wichtigsten Proteine im Divisom umfassen: FtsZ (bakterielles Tubulinhomolog, welches einen filamentösen Ring an der Teilungsebene ausbildet, den sogenannten Z-Ring (Margolin 2005)), FtsA und ZipA (lokalisieren FtsZ an der Membran und sind essentiell um weitere Fts-Proteine zu rekrutieren (Pichoff, Shen et al. 2012)), FtsK (pumpt aktiv das replizierte Chromosom in die Tochterzelle (Steiner, Liu et al. 1999)), FtsQ (bildet einen Komplex mit FtsL und FtsB, rekrutiert und lokalisiert andere Fts-Proteine (Grenga, Rizzo et al. 2013)), FtsL (vermutliches Strukturprotein, welches an der Verengung des Z-Rings beteiligt ist (Tsang and Bernhardt 2014)), FtsB (kleines Membranprotein, rekrutiert weitere Fts-Proteine (Gonzalez and Beckwith 2009)), FtsW (Lipid II-Flippase (Mohammadi, van Dam et al. 2011)), FtsN (stabilisiert und demontiert das Divisom teilweise wieder, rekrutiert Amidasen und Hydrolasen (Rico, Garcia-Ovalle et al. 2010)), FtsI (ein monofunktionelles Penicillinbindeprotein mit Transpeptidaseaktivität (Donachie 2001)) und FtsE und FtsX (sind an der Aktivierung der Hydrolasen beteiligt (Yang, Peters et al. 2011)).

Das Elongasom besteht im Kern aus den sogenannten Mre-Proteinen (Kruse, Bork-Jensen et al. 2005). Diese umfassen MreB, MreC, MreD, PBP2 und RodA. Sie sind essentiell für das zu Stande kommen der Stäbchenform von *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus*.

Große Bedeutung kommt dem Aktinohomolog MreB (van den Ent, Amos et al. 2001) zu. Gram-negative Bakterien besitzen in der Regel nur eine Version des MreB Proteins, während der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* nicht nur MreB, sondern auch zwei weitere Homologe, Mbl und MreBH, besitzt. Die Aktivität aller drei ist essentiell für das normale Streckungswachstum in *B. subtilis* (Kawai, Asai et al. 2009). Der kugelförmige Phänotyp von Deletionsmutanten des *mreB* Gens in *E. coli* (Wachi and Matsubishi 1989) und von Deletionsmutanten aller drei Homologe in *B. subtilis* (Kawai, Asai et al. 2009) legten die Vermutung nahe, dass das Elongasom durch MreB und seine Homologe an der Zellmembran lokalisiert wird und es so den

Ort der Zellwandsynthese koordiniert. Lange wurde davon ausgegangen, dass MreB und seine Homologe spiralförmige Filamente bilden, welche an der Zellmembran entlang wandern (Defeu Soufo and Graumann 2004). *Dominguez-Escobar, Chastanet et al.* (2011) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen und zeigten, dass MreB zu Plaques assembliert, welche in helikalen Bahnen an der Zellmembran in eine Richtung wandern. Neueste Erkenntnisse vereinigen beide Konzepte. MreB bildet helikale Filamente an der Zellmembran, welche in eine bestimmte Richtung wachsen. Außerdem bewegt sich das Elongasom nur in einer Richtung an diesen Filamenten (Errington 2015).

Über die Funktion der beiden Membranproteine MreC und MreD ist noch nicht viel bekannt (Carballido-López and Errington 2003). Eine Deletionsmutante des *mre*-Operons *mreBCD* in *E. coli* zeigt den gleichen kugelförmigen Phänotyp wie die Deletion von *mreB* (Wachi, Doi et al. 1989). In *B. subtilis* hingegen ist die Deletion von MreC oder MreD letal (Leaver and Errington 2005). Interaktionsstudien mittels Bacterial Two Hybrid-Assays (BTH) der *mre*-Gene von *C. crescentus* zeigten, dass sie miteinander und mit den anderen Mre-Proteinen interagieren. Möglicherweise sind es Strukturproteine, welche durch die Interaktion mit anderen Proteinen den Komplex stabilisieren (White, Kitich et al. 2010).

Das Penicillinbindeprotein PBP2 ist eine monofunktionelle Transpeptidase (Vinella, D'Ari et al. 1992), durch welche die Peptidoglycanstränge über die angehängten Peptide quervernetzt werden. Die Deletion des Gens *pbpA* (PBP2) in *E. coli* oder die Inaktivierung von PBP2 durch das Antibiotikum Mecillinam führen zu einem kugelförmigen Phänotyp (Vinella, D'Ari et al. 1992). BTH-Interaktionsstudien mit PBP2 von *C. crescentus* zeigten unter anderem Selbstinteraktion und Interaktion mit MreC (White, Kitich et al. 2010). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass PBP2 essentiell für das Streckungswachstum ist und ein Bestandteil des Elongasoms.

RodA gehört zur sogenannten SEDS-Proteinfamilie (**S**hape, **E**longation, **D**ivision and **S**porulation; Form, Streckung, Teilung und Sporulation) (Cabeen and Jacobs-Wagner 2005) und ist ein Homolog der LipidII-Flippase FtsW (Mohammadi, van Dam et al. 2011). Vermutlich transportiert RodA also Zellwandvorstufen aus dem

Cytoplasma über die Zellmembran. *rodA* von *B. subtilis* ist sowohl für die Lebensfähigkeit als auch für die Erhaltung der Zellform notwendig (Cabeen and Jacobs-Wagner 2005). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Gene *rodA* und *pbpA* (PBP2) ein Operon bilden und dass PBP2 RodA für die korrekte Lokalisation benötigt.

1.2 Biologie der Streptomyceten

Streptomyceten sind Gram-positive Bakterien und gehören zum Phylum der Aktinobakterien. Ihr Wachstum ist filamentös mit unregelmäßiger Septierung. Die Filamente, genannt Hyphen, können verzweigen und bilden das so genannte Substratmyzel.

Die meisten Arten leben im Boden, aber es sind auch marine Stämme bekannt. Bis auf wenige Ausnahmen haben sie eine saprophytische Lebensweise und ernähren sich hauptsächlich von totem Pflanzenmaterial. Eine Besonderheit der Streptomyceten ist ihre Fähigkeit, eine große Vielfalt an Sekundärmetaboliten zu produzieren. Dazu gehören viele kommerziell erhältliche Antibiotika, wie z. B. Kanamycin (*Streptomyces. kanamyceticus*) oder Chloramphenicol (*S. venezuelae*). Ein Hinweis auf die Verbreitung der Streptomyceten im Ökosystem vieler Böden ist die Produktion von Geosmin, welches den charakteristischen Waldbodengeruch erzeugt.

Der Modellorganismus der Streptomyceten ist *S. coelicolor*.

1.2.1 Lebenszyklus/Differentierung

Im Gegensatz zu anderen Bakterien, welche Peptidoglykan an der lateralen Zellwand (z.B. *B. subtilis* (Daniel and Errington 2003)) oder in der Teilungsebene synthetisieren (Kokkenförmige, z.B. *Staphylococcus aureus* (Pinho, Kjos et al. 2013)), wird Peptidoglykan in Streptomyceten während des vegetativen Wachstums nur an den der Hyphenspitze synthetisiert (Flärdh 2003a). Ihr filamentöser Habitus und ihr apikales Spitzenwachstum erinnert an das Wachstum von filamentösen Pilzen.

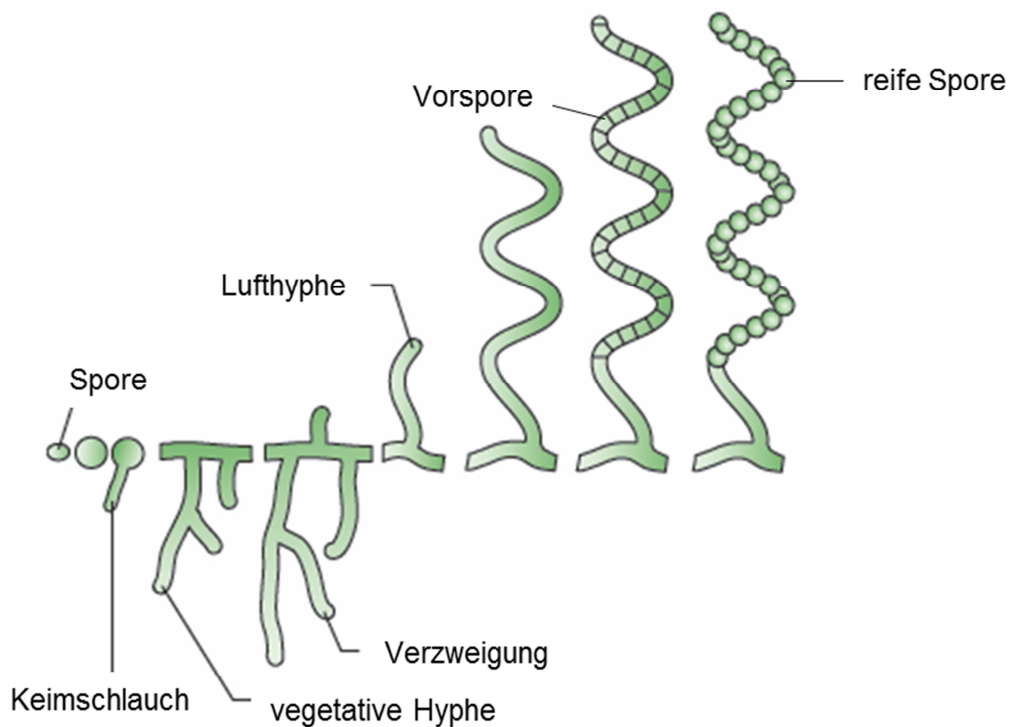


Abbildung 3: schematische Darstellung des Lebenszyklus von *S. coelicolor*; verändert nach Flårdh and Buttner (2009): Aus einer einzelnen Spore wächst zunächst der Keimschlauch aus, dieser verzweigt sich, und so wird ein dichtes Substratmyzel aus vegetativen Hyphe gebildet. Zur Verbreitung wachsen hydrophobe Lufthyphen nach oben. Diese werden nach einer bestimmten Zeit regelmäßig septiert und bilden so die Vorsporen. Durch die Verdickung der Zellwand und die Trennung von den benachbarten Sporen werden aus den Vorsporen die reifen Sporen, welche verbreitet und auskeimen können.

Streptomyceten sind darüber hinaus in der Lage, sich morphologisch zu differenzieren und Exosporen zu bilden (Abb. 3). Diese dienen der Verbreitung und der Überdauerung widriger äußerlicher Umstände. Nährstoffmangel oder Stress können die morphologische Differenzierung auslösen. Mit der Differenzierung wird auch die Produktion von Sekundärmetaboliten (z.B. Antibiotika) angeregt.

Diese Differenzierung wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Gene koordiniert (Abb. 4). Diese Gene werden unterteilt in die sogenannten *bld* Gene (*bld* kurz für bald; englisch für kahl) und die *whi* Gene (*whi* steht für white; englisch für weiß). Diese Gene wurden aufgrund desselben Phänotyps von Mutanten in den entsprechenden Genen benannt. Inaktivierung der *bld* Gene führt dazu, dass kein Luftmyzel ausgebildet werden kann. Die Kolonien bleiben also "kahl". Mutanten

in den *whi* Genen können zwar Luftmyzel ausbilden, sind aber in verschiedenen Stadien der Sporenbildung gehemmt. Dadurch bleibt das Luftmyzel, bzw. die Vorsporen weiß (Chater 2001, Claessen, de Jong et al. 2006).

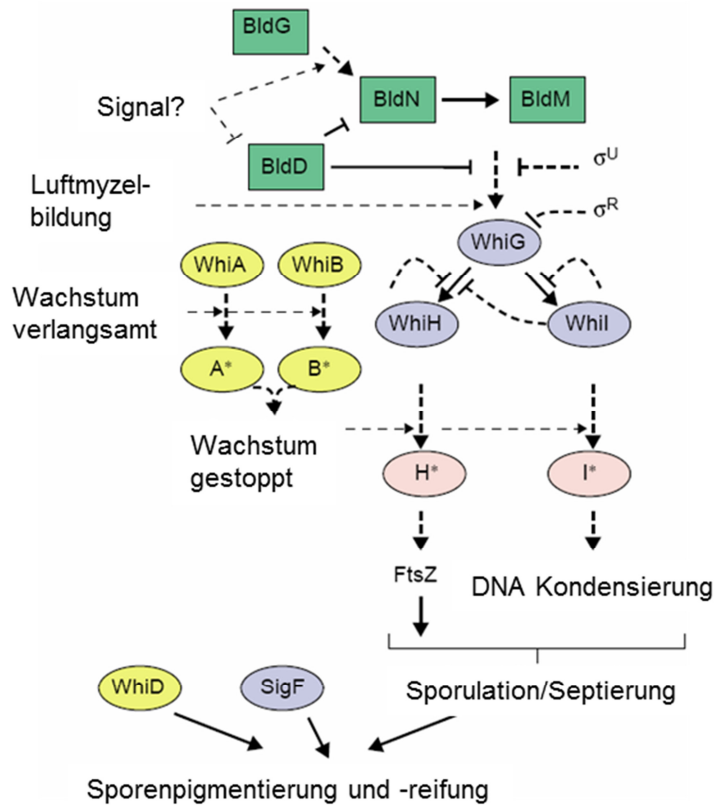


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bld/Whi Kaskade in *S. coelicolor*, verändert nach Chater (2001): Interaktionen zwischen den verschiedenen Bld- und Whi-Proteinen. Mit * modifizierte Proteine zeigen eine Konformationsänderung des Proteins an (z.B. WhiA → A*). Pfeile zeigen eine aktivierende Interaktion an, während T-Endungen eine inhibierende Wirkung anzeigen. Durchgängige Linien weisen auf gut etablierte Interaktionen hin, unterbrochene auf weniger experimentell fundierte. Horizontale gestrichelte Linien zeigen putative Kontrollpunkte in der Regulation an.

Im ersten Schritt der morphologischen Differenzierung wird das so genannte Luftmyzel gebildet. Dieses sind unverzweigte Hyphen, welche von einer hydrophoben Protein Schicht (Rodlet-layer) umhüllt werden. Für die Rodlet-Schicht werden neben Rodlinien auch Chapline und das Lantipeptid SapB benötigt (Elliot and Talbot 2004).

Ist das Luftmyzel größtenteils ausgebildet, beginnt die Septierung der Hyphe. Diese wird durch das Tubulinomolog FtsZ koordiniert (Jakimowicz and van Wezel 2012). FtsZ wird dabei durch das Protein SsgB rekrutiert und in regelmäßigen Abständen

positioniert (Willemse, Borst et al. 2011). Der Mechanismus, welcher SsgB positioniert, ist im Detail noch unbekannt.

An der Septierung sind die bekannten Fts-Proteine beteiligt, welche in *E. coli* und *B. subtilis* gut charakterisiert sind (Egan and Vollmer 2013). FtsZ, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsW, FtsI und DivIC (Bennett, Aimino et al. 2007, Flärdh and Buttner 2009) konnten sowohl experimentell als auch aufgrund Untersuchungen des Genoms von *S. coelicolor* identifiziert werden (Flärdh and Buttner 2009). Die Verteilung der DNA erfolgt über das ParAB-System und die am Z-Ring lokalisierte DNA-Pumpe FtsK. Jede so aufgeteilte Vorspore enthält je eine Kopie des Chromosoms (Flärdh and Buttner 2009).

Hat das Divisom die Vorsporen vollständig voneinander getrennt, wird die Zellwand der Spore verstärkt, um die Langlebigkeit und Resistenz der Spore gegen äußere Einflüsse (z. B. Trockenheit oder hohe Salzkonzentration) zu erhöhen (Ensign 1978). Der Synthesepapparat für diese Aufgabe ähnelt stark dem Elongasom aus stäbchenförmigen Bakterien, z.B. *E. coli*, *B. subtilis* oder *C. crescentus* (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Da in Bacterial-Two-Hybrid- (BTH) Interaktionsstudien auch Interaktionen mit klassischen Divisomproteinen (Fts-Proteine) und bis dahin unbeschriebenen streptomycetenspezifischen Proteinen gezeigt werden konnten, erhielt der Synthesekomplex den Namen **Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex** (**Streptomyces sporenwandsynthesekomplex**) oder kurz **SSSC** (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011).

Den letzten Schritt in der Differenzierung der Sporen ist die Bildung des jeweiligen artspezifischen Sporenpigments (Davis and Chater 1990).

Die Sporen können nun durch Wind oder Wasser verbreitet werden und bei geeigneten Umweltbedingungen auskeimen. Aus einer einzelnen Spore entsteht nun wieder ein Substratmyzel.

1.2.2 Besonderheiten der Zellwandsynthese bei Aktinobakterien

Aktinobakterien besitzen eine andere Form des Streckungswachstums als die für *E. coli* oder *B. subtilis* beschriebene. Die Zellwand wird nur an den Zellpolen

synthetisiert. Bei einzelligen stäbchenförmigen Aktinobakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Corynebacterium glutamicum* wird dabei an beiden Zellpolen Zellwand eingebaut (Flärdh 2010).

Da die Hyphen der Streptomyceten nur einen Pol an der Hyphenspitze haben, wird nur hier Zellwand eingebaut. Durch entstehende Verzeigungen der Hyphen werden neue Zellpole gebildet (Flärdh 2010).

Essentiell für das polare Wachstum in Streptomyceten ist das coiled-coil Protein DivIVA (Flärdh 2003b). Das Pendant zu DivIVA in *M. tuberculosis* heißt Wag31, in *C. glutamicum* heißt es NCgl2070. DivIVA scheint bevorzugt an Membranen mit negativer Krümmung zu binden. Außerdem ist es vermutlich ein Faktor, welcher andere Proteine an diese Stellen rekrutiert und den entstehenden Komplex stabilisiert (Flärdh, Richards et al. 2012). Die Funktion von DivIVA wird durch die eukaryonten-ähnliche Serin/Threonin Protein Kinase (eucaryotic-like serine/threonine protein kinase, eSTPK) AfsK reguliert (Hempel, Cantlay et al. 2012).

Andere Cytoskelettelemente an der Hyphenspitze sind Scy und FilP. Scy ist ein coiled-coil Protein, welches nur in filamentösen Actinomyceten vorkommt. Es interagiert mit DivIVA und lokalisiert wie DivIVA auch an der Hyphenspitze und an zukünftigen Verzweigungspunkten (Holmes, Walshaw et al. 2013). Das Homolog der eukaryontischen Intermediärfilamente FilP interagiert ebenfalls mit Scy (Holmes, Walshaw et al. 2013). Es kolokalisiert auch mit DivIVA sowohl an wachsenden Hyphenspitzen als auch an zukünftigen Verzweigungen (Fuchino, Bagchi et al. 2013). *In vitro* polymerisiert FilP zu einem 3-dimensionalen Netzwerk aus Wabenstrukturen, ohne dass Kofaktoren benötigt werden. Vermutlich dienen FilP-Filamente als Endoskelett an der Hyphenspitze, um diese mechanisch gegen externen wie internen Stress zu schützen (Fuchino, Bagchi et al. 2013).

Zusammen bilden die Cytoskelettelemente DivIVA, Scy und FilP das sogenannte Polarisom oder das Tip Organizing Center (TIPOC) der Streptomyceten (Fuchino, Bagchi et al. 2013).

1.2.3 Der SSSC

Im Gegensatz zu einzelligen Aktinobakterien wie *M. tuberculosis* oder *C. glutamicum* besitzen die Streptomyceten eine Kopie der *mre*-Gene *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr* (*rodA* Homolog) (Burger, Sichler et al. 2000). Phänotypische Charakterisierungen von Deletionsmutanten dieser Gene in *S. coelicolor* zeigten keinerlei Einfluss auf das Wachstum des Substratmyzels. Deutliche Defekte sind allerdings in den Sporen zu erkennen. Lichtmikroskopische Bilder zeigen unförmige Sporen. Keimende Sporen haben eine erhöhte Sensibilität gegen Vancomycin und Lysozym (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011).

Interaktionsstudien mit dem BTH zeigen, dass die Mre-Proteine in einem ähnlichen Muster interagieren, wie in Experimenten für die Mre-Proteine von *E. coli*, *B. subtilis* oder *C. crescentus* gezeigt (Kruse, Bork-Jensen et al. 2005, Carballido-Lopez and Formstone 2007, White, Kitich et al. 2010, Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011).

Ein BTH-Screening der Mre-Proteine gegen andere Schlüsselenzyme der Zellwandsynthese sowie ein Screening dieser Proteine gegen eine genomische Bibliothek von *S. coelicolor* zeigen, dass sie nicht nur miteinander, sondern auch bisher nicht charakterisierte Interaktionen mit neuen morphogenen Proteinen und Streptomyceten-spezifischen Proteinen eingehen. Aufgrund dieser besonderen Interaktionen der Mre-Proteine in *S. coelicolor* wurde der Komplex **Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex** (Streptomycessporenwandsynthesekomplex) oder kurz SSSC benannt (Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011); Abb. 5).

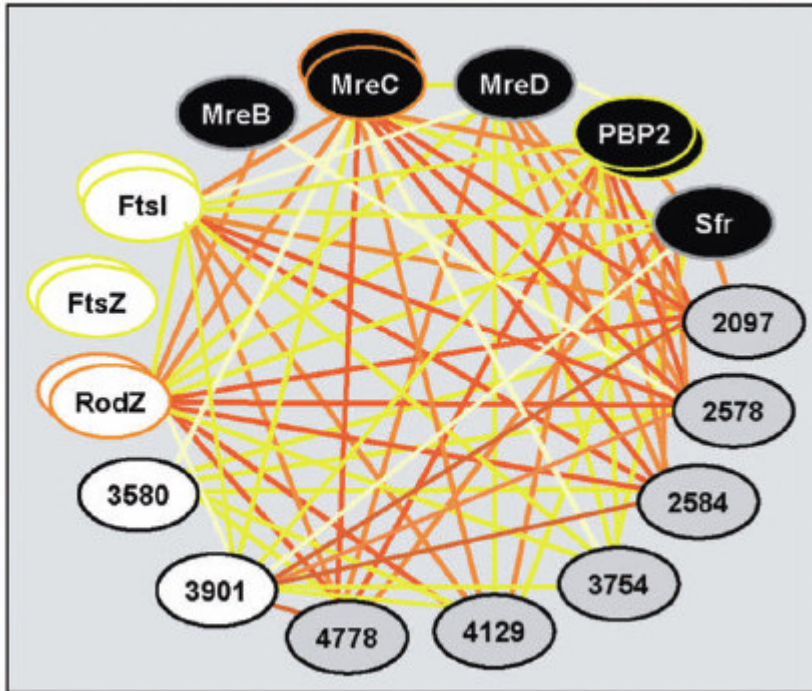


Abbildung 5: Der Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex (SSSC); aus Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011): Interaktionsstärken sind durch die Farben gekennzeichnet: Rot = starke Interaktion bis Gelb = schwache Interaktion. Die Mre-Proteine sind in schwarz unterlegt, getestete Proteine aus dem *dcw*-Cluster weiß unterlegt und die mittels Genbankscreening gefundenen Interaktionspartner mit grau unterlegt.

Besonders häufig wurde bei dem Screening der Genbibliothek SCO2097 gefunden, das unabhängig voneinander mit MreC, MreD, Sfr und RodZ als Köderprotein gefischt wurde. Homologe des Gens *sco2097* existieren nicht nur in Streptomyceten, sondern auch in den einzelligen Aktinobakterien *M. tuberculosis* und *C. glutamicum*. Sie liegen immer nahe dem *dcw*-Cluster (**D**ivision and **C**ell **W**all synthesis, Zellteilung und Zellwandsynthese). In *E. coli* oder *B. subtilis* gibt es kein Gen, das starke Ähnlichkeiten aufweist. Eine Deletionsmutante des Gens *sco2097* zeigt den gleichen Phänotyp wie Deletionsmutanten der *mre*-Gene, unförmige Sporen im Lichtmikroskop und Sensitivität der keimenden Sporen gegen Lysozym und Vancomycin (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011).

SCO2578 besitzt Sequenzähnlichkeit zu TagV, dass in *B. subtilis* an der kovalenten Verknüpfung von Wandteichonsäuren mit dem Peptidoglycangerüst beteiligt ist (Brown, Santa Maria et al. 2013).

SCO2584, eine putative ATPase für den Phospholipid Transport, interagiert mit mehreren der getesteten Köderproteine. Das Gen *sco2584* ist Teil eines Gencluster, welches vermutlich in die Synthese von Wandteichonsäuren involviert ist.

Für die Trennung der Sporen voneinander könnte der Interaktionspartner SCO3754 (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011) verantwortlich sein. Das Gen *sco3754* ist als FtsX-ähnlich annotiert und somit vermutlich mit einem anderen Protein (FtsE) zuständig für die Aktivierung von Hydrolasen (siehe Kapitel 1. Zellform und Peptidoglycansynthese).

Auch das Protein CmdD (SCO4129) ist Bestandteil des SSSC (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Es ist an der Unterdrückung von Verzweigungen im Luftmyzel beteiligt. Untersuchungen der Deletionsmutante der Gene *cmdA-F* (*sco4126-sco4131*) zeigten Verzweigungen in den Sporenketten (Xie, Zeng et al. 2009).

Die eSTPK PkaI (SCO4778) interagiert im Genbank-Screening mit den Mre-Proteinen MreC, MreD, PBP2, Sfr und RodZ. Darüber hinaus konnten auch Interaktionen den Penicillinbindeproteinen (PBPs) FtsI, SCO3580 und SCO3901 gezeigt werden (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Es ist bekannt, dass Serin/Threonin Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Zellwandsynthese von Bakterien spielt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die eSTPK PknB aus *M. tuberculosis* GlnU (eine N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase, wichtig für die Bereitstellung von Zellwandvorstufen) phosphoryliert und so dessen Aktivität inhibiert (Parikh, Verma et al. 2009). In *C. glutamicum* wird die Muropeptidligase MurC von der eSTPK PknA ebenfalls negativ reguliert (Fiuza, Canova et al. 2008). In Streptomyceten reguliert die eSTPK AfsK die Funktion von DivIVA. Wird DivIVA phosphoryliert, disassembliert es an der apikalen Spitze und assembliert wieder an zukünftigen Verzweigungspunkten (Hempel, Cantlay et al. 2012).

1.3 Ser/Thr/Tyr Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Aminosäureresten ist ein weit verbreiteter posttranslationaler Modifikationsmechanismus von Proteinen in allen drei Domänen des Lebens, den Eukaria, den Bacteria und den Archaea (Deutscher and Saier 2005, Kennelly 2014). Er wird verwendet, um kurzfristig auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können (Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012)

Bei der Phosphorylierung findet eine Übertragung des γ -Phosphats von ATP an die Seitengruppe einer Aminosäure statt. Die Proteine, welche diese Reaktion katalysieren, heißen Kinasen. Je nach Spezifität der Kinase für den Aminosäurerest kann dabei zwischen einer O- (Serin, Threonin und Tyrosin), N- (Arginin, Histidin und Lysin) und Acyl-Phosphorylierung (Aspartat und Glutamat) unterschieden werden. Die O-Phosphorylierung ist eine unter physiologischen Bedingungen sehr stabile Esterbindung und zerfällt nicht spontan. Um diese Bindung wieder zu lösen, wird ein weiteres Enzym benötigt. Dieses Enzym wird Phosphatase genannt und ist in der Lage, das Phosphat von der Aminosäure zu trennen. Phosphatasen kommen für alle bekannten Phosphorylierungen vor und sind deren Gegenspieler.

In Eukaryoten treten vornehmlich Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen auf. Eukaryotische Proteinextrakte enthalten ca. 0,8mol Phosphat/ 1mol Protein. In Bakterien liegt der Phosphatanteil etwa 80 mal niedriger (Kruger, Kubler et al. 2006). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl der Phosphorylierungen und der schwierigen Detektion dieser wurde lange davon ausgegangen, dass diese Form der Phosphorylierung in Bakterien nur sehr selten vorkommt und deswegen keine wichtige Rolle spielt (Deutscher and Saier 2005). Durch die weiterentwickelte Technik zur Detektion von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen durch empfindlichere Massenspektrometer sind in vielen Studien die Phosphoproteome verschiedener Bakterien wie z.B. *M. tuberculosis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* oder auch *S. coelicolor* charakterisiert worden. Die hohe Anzahl an gefundenen Phosphorylierungen widerlegt diese These (Manteca, Ye et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012, Soares, Spat et al. 2013, Ravikumar, Shi et al. 2014).

Histidin- und Aspartat-Phosphorylierungen kennt man vornehmlich aus Bakterien (Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012). Diese spielen bei Zweikomponenten Regulationssystemen eine wichtige Rolle.

1.3.1 Kinasen in Bakterien

Lange Zeit war man der Meinung, dass sich Kinasen als Mittel der Signaltransduktion konvergent in Eukaryoten und Prokaryoten entwickelt haben. Man war der Ansicht, dass Eukaryoten Signaltransduktion durch Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen vermitteln, während Bakterien Signale fast ausschließlich durch Sensorhistidinkinasen aus Zweikomponentensystemen (Two component systems, TCS) oder Histidinkinasen aus dem Phosphotransferasesystem (PTS) übertragen (Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012). Dennoch konnten schon in den frühen Jahren der Molekularbiologie erste Proteine in Bakterien identifiziert werden, welche an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert sind (Cozzzone 1988). Heute kennt man eine höhere Diversität an Serin/Threonin/Tyrosinkinasen in Bakterien als in Eukaryoten (Deutscher and Saier 2005).

Sofern nicht explizit anders beschrieben, sind in den folgenden Kapiteln Serin-, Threonin- oder Tyrosinphosphorylierungen gemeint, wenn von Phosphorylierungen die Rede ist!

1.3.2 Serin/Threonin/Tyrosinkinasen in Bakterien

Die bedeutendste Proteinfamilie unter den Serin/Threonin/Tyrosinkinasen (Ser/Thr/Tyr Kinasen) sind die sogenannten Hanks-type Kinasen (nach ihrem Erstbeschreiber S.K. Hanks in Hanks, Quinn et al. (1988)). In Bakterien werden sie auch als eSTPK-Familie (für eukaryotenähnliche Serin/Threonin Protein Kinasen) bezeichnet, da Hanks, Quinn et al. (1988) sie in Eukaryoten beschrieben und charakterisierten. Zudem konnte durch die Kristallstrukturanalyse der Kinasedomäne von PknB aus *M. tuberculosis* und den Vergleich mit bekannten Kristallstrukturen eukaryontischer Hanks-type Serin/Threonin Kinasen auch eine sehr große strukturelle Homologie auf Proteinebene nachgewiesen werden (Young, Delagoutte et al. (2003), Abb. 6). Die Anwesenheit von eSTPKs in Bakterien wurde auch aus dem Grund erst spät wahrgenommen, dass *E. coli*, der am besten untersuchte und

frühzeitig sequenzierte Modellorganismus der Bakterien keine eSTPKs besitzt. Die Wahrnehmung für eSTPKs in Bakterien stieg erst mit der schnellen und unkomplizierten Verfügbarkeit von annotierten Genomen (Pereira, Goss et al. 2011). Mittlerweile können Vertreter dieser Kinasefamilie in nahezu jedem Phylum auf genetischer Ebene identifiziert werden (Deutscher and Saier 2005, Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012).

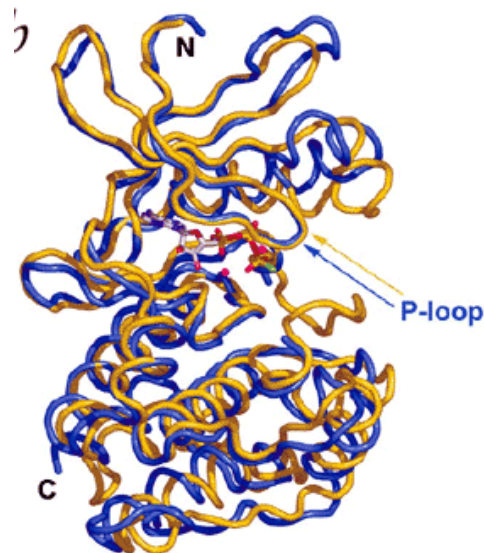


Abbildung 6: Ähnlichkeit der PknB-Kinasedomäne (*M. tuberculosis*) mit aktivierten eukaryotischen Kinasedomänen; aus Young, Delagoutte et al. (2003): Überlagerungen der Kristallstrukturen von PknB-I-ATP- γ -S (blau) mit cAPK-ADP-AIF₃-Peptidsubstratkomplex aus Maus (gelb). Die cAPK-Struktur repräsentiert die aktive Form.

Viele charakterisierte eSTPKs haben mehr als ein Zielprotein, welches sie phosphorylieren (Pereira, Goss et al. 2011). So wird beispielsweise der Regulator Odhl aus *C. glutamicum* von mindestens 4 eSTPKs an zum Teil verschiedenen Stellen phosphoryliert (Schultz, Niebisch et al. 2009). Zusätzlich scheint es auch bei den eSTPKs aus *M. tuberculosis* eine Hierarchie zu geben, wie aus Eukaryoten bekannt ist (Baer, Iavarone et al. 2014). Der schwache Phänotyp von Deletionsmutanten der eSTPKs Pkn1 und Pkn2 aus *Myxococcus xanthus* ist ein Hinweis auf weitere Kinasen mit redundanter Funktion (Pereira, Goss et al. 2011). Aus diesen Tatsachen ergibt sich ein komplexes Netzwerk an möglichen

Regulationen, an welchen eine einzelne eSTPK beteiligt sein kann (Abb. 7).

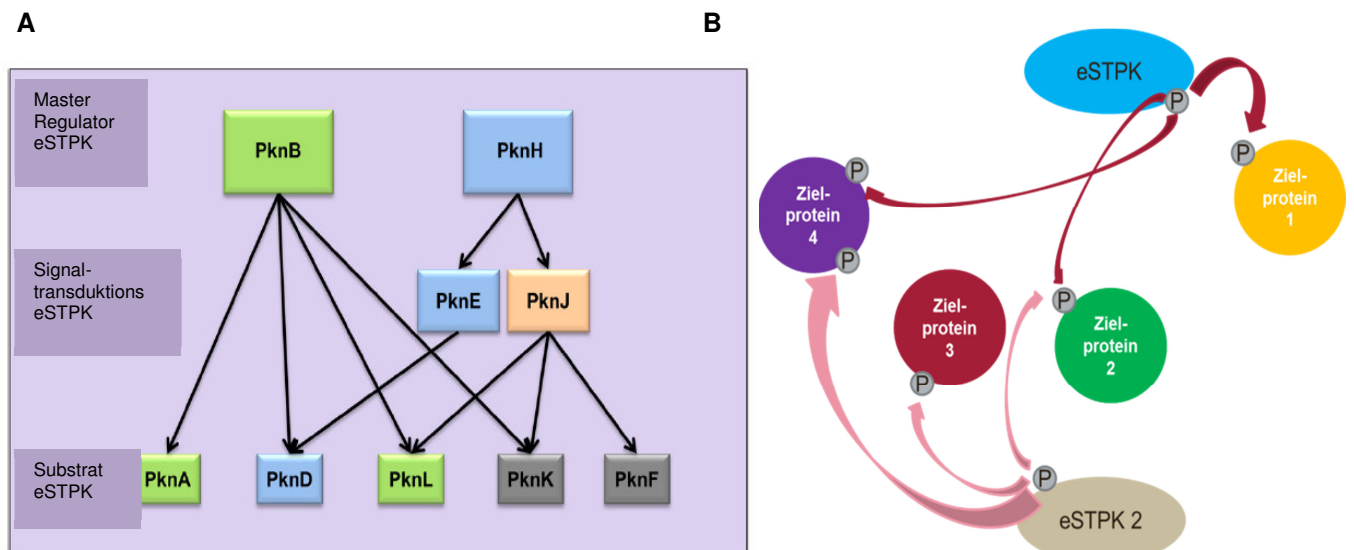


Abbildung 7: Interaktionen von eSTPKs untereinander (A) und mit ihren Zielproteinen (B):
A: Interaktionsnetzwerk der eSTPKs aus *M. tuberculosis*; verändert nach Baer, Iavarone et al. (2014): Die Master Regulator eSTPKs PknB und PknH autophosphorylieren sich durch einen externen Reiz und phosphorylieren dann ihrerseits die ihnen untergeordneten eSTPKs. Die Signaltransduktions eSTPKs PknE und PknJ sind im phosphorylierten Zustand in der Lage, die Substrat eSTPKs PknD, PknL, PknK und PknF zu phosphorylieren. Die Substrat eSTPKs PknD, PknL und PknK können unabhängig über beide Master Regulator eSTPKs phosphoryliert werden.
B: Schema möglicher Phosphorylierungsereignisse: eSTPK kann die Zielproteine 1, 2 und 4 phosphorylieren. eSTPK 2 phosphoryliert das Zielprotein 2 an der gleichen Stelle wie eSTPK. Zielprotein 4 wird auch von eSTPK2 phosphoryliert, aber an einer Stelle als von eSTPK. Zielprotein 3 wird nur von eSTPK 2 phosphoryliert.

Die zweite wichtige und in Bakterien weitverbreitete Proteinfamilie sind die BY-Tyrosinkinassen (Mijakovic and Macek 2012). Im Gegensatz zu eukaryotischen Tyrosinkinassen gehören die BY-Tyrosinkinassen nicht zur Superfamilie der Hanks-type Kinassen, sondern stellen eine eigene Proteinfamilie da.

In Bakterien sind noch mindestens 5 weitere Kinasetypen bekannt. Sie werden unter dem Begriff "ungewöhnliche Kinassen" zusammengefasst (Mijakovic and Macek 2012). Sie umfassen Kinassen, welche zum Teil nur in einem einzigen Organismus vorkommen und welche bisher nur wenig experimentell charakterisiert sind. Durch die automatische Annotation der Genome sind diese Kinassen anderen Proteinfamilien, wie z.B. Kinassen für niedermolekulare Stoffe oder Histidinkinassen,

zugeordnet (Deutscher and Saier 2005). Aufgrund der schwierigen Annotation ist ihre physiologische Bedeutung durch genomische Analysen nicht zu beurteilen.

1.3.3 Rolle der Ser/Thr Kinasen in der Regulation von Zellteilung/ Zellwandsynthese

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, dienen Proteinkinasen jeden Typs zur schnellen Signaltransduktion durch Modifizierung ihres Ziels. Neuere phosphoproteomische Studien (Soares, Spat et al. 2013, Basell, Otto et al. 2014, Mikkat, Fulda et al. 2014, Parandhaman, Sharma et al. 2014, Ravikumar, Shi et al. 2014) sowie Einträge in Datenbanken wie PhosSite (geschlossen seit 01.01.2015) oder Phosida (www.phosida.com) zeigten die große Bandbreite an Prozessen, welche durch Ser/Thr/Tyr Phosphorylierung reguliert werden. Zu den Wichtigsten gehören der zentrale Kohlenstoffmetabolismus, Proteinbiosynthese, Virulenz, Zellhüllensynthese und Zellteilungsprozesse.

Die Bedeutung der Kontrolle durch Phosphorylierung bei der Zellhüllensynthese ist besonders bei den Aktinobakterien *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* gut untersucht, nicht aber bei myzelbildenden Streptomycceten. Die an der Synthese der Zellwandvorstufen beteiligten Proteine MurC-F aus *M. tuberculosis* interagieren ausnahmslos im BTH mit den eSTPKs PknA und PknB (Munshi, Gupta et al. 2013). Die Phosphorylierung von MurD durch PknA in *M. tuberculosis* ist experimentell bestätigt (Thakur and Chakraborti 2008). Die regulatorische Rolle dieser Modifikation ist allerdings noch nicht untersucht. Für MurC aus *C. glutamicum* ist ein inhibitorischer Effekt der Phosphorylierung durch PknA experimentell bestätigt (Fiuza, Canova et al. 2008). Ein weiteres Enzym in der Zellwandvorstufensynthese, die N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase GlmU aus *M. tuberculosis* wird durch die Phosphorylierung durch PknB ebenfalls negativ reguliert (Parikh, Verma et al. 2009). Auch die Synthese der Mycolsäuren (modifizierten C₆₀-C₉₀ Fettsäuren, welche an die Zellwand angehängt werden) von *M. tuberculosis* wird vermutlich durch Ser/Thr Phosphorylierung reguliert. Die Enzyme KasA und KasB werden *in vivo* stark phosphoryliert. Während die Aktivität von KasA dadurch stark reduziert wird, aktiviert die Phosphorylierung die Aktivität von KasB (Molle and Kremer 2010). Auch ein Schlüsselenzym der Mycolsäuresynthese, FabH, wird

phosphoryliert. Vermutlich wirkt die Phosphorylierung inhibierend auf die Aktivität, da die Phosphorylierung an einem Threoninrest in der Substratbindetasche stattfindet. Eine Phosphomimikri durch den Aminosäureaustausch von Threonin zu Glutamat ist weniger aktiv als das wildtyp Protein (Molle and Kremer 2010).

Wie für *S. coelicolor* ist auch für *M. tuberculosis* gezeigt, dass das DivIVA-Homolog Wag31 phosphoryliert werden kann. In *M. tuberculosis* übernimmt PknA diese Aufgabe. Ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Glutamat an der Stelle der nativen Phosphorylierung, welcher eine Phosphorylierung imitiert, führt bei Überexpression zum gleichen Phänotyp wie die Überexpression des Wildtyp-Proteins. Die Zellen werden unförmig und verändern ihren Phänotyp stark. Ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin, welches nicht phosphoryliert werden kann und anschließende Überexpression zeigen keinen besonderen Phänotyp. (Kang, Abbott et al. 2005).

Auch die Überexpression der beiden eSTPKs PknA und PknB aus *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* führt zu einem stark unförmigen, verlängertem Phänotyp. Außerdem führt die Überexpression der beiden essentiellen eSTPKs zu verlangsamtem Wachstum und schließlich zum Tod der Zellen (Kang, Abbott et al. 2005). Diese Ergebnisse belegen, dass die Regulierung der Zellwandsynthese durch Phosphorylierung einen starken Effekt hat.

Die Zellteilung wird durch die Phosphorylierung von FtsZ durch PknA reguliert. Die GTP-getriebene Polymerisation von FtsZ wird durch die Phosphorylierung durch PknA in *M. tuberculosis* verhindert (Kang, Abbott et al. 2005). Dadurch kann der Z-Ring nicht korrekt ausgebildet werden, und die Septenbildung ist gestört. In *C. glutamicum* ist die Phosphorylierung von FtsZ in vitro durch die drei eSTPK PknA, PknB und PknL charakterisiert (Schultz, Niebisch et al. 2009).

Bei der Untersuchung der Phosphoproteome von z.B. *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* fiel auf, dass mindestens ein phosphoryliertes PBP identifiziert worden ist (www.phosida.com, Soares, Spat et al. (2013), Ravikumar, Shi et al. (2014), Fortuin, Tomazella et al. (2015)). Das einzige PBP, das hinsichtlich seiner Phosphorylierung charakterisiert worden ist, ist PBPA aus *M. tuberculosis*. Es liegt in einem konservierten Gencluster der Aktinobakterien, in welchem auch ein bis zwei

eSTPKs und eine Ser/Thr Phosphatase liegen. Die Deletion des Gens *pbpA* in *Mycobacterium smegmatis* (sehr nahe mit *M. tuberculosis* verwandt, aber nicht pathogen) führt zu langsamerem Wachstum und deutlich verlängerten Zellen (3,5-4fach) im Vergleich zum Wildtyp. Komplementationen mit mutierten Versionen des Proteins PBPA zeigen, dass die Phosphorylierung für die Aktivität des Proteins notwendig ist (Dasgupta, Datta et al. 2006). Es ist zweifelhaft, ob dieser Mechanismus auf alle phosphorylierten PBPs übertragbar ist. Auch die Inaktivierung von PBPs durch Phosphorylierung ist vorstellbar.

1.3.4 Die eSTPK PkaI aus *S. coelicolor*

Wie im vorherigen Kapitel 1.3.3 beschrieben, können eSTPKs in Bakterien einen großen Einfluss auf die Zellform und die Zellteilung haben. Die Anzahl der vorhergesagten eSTPKs in *S. coelicolor* schwankt zwischen verschiedenen Publikationen zwischen 34 (Hempel, Cantlay et al. 2012) und 47 (Manteca, Ye et al. 2011). Eine BLAST-Analyse mit der HMM Konsensussequenz der eSTPK Domäne PF00069.20 kommt auf 37 putative eSTPKs. Dies ist eine hohe Anzahl an eSTPK Genen. Zum Vergleich besitzen, nach BLAST-Analysen mit der HMM Konsensussequenz der eSTPK Domäne PF00069.20, die Modelstämme *E. coli* K12 keine, *B. subtilis* 168 vier und *M. tuberculosis* H37Rv elf eSTPKs. Bis jetzt wurden allerdings erst sieben der eSTPKs aus *S. coelicolor* charakterisiert (Urabe, Ogawara et al. 2015) und nur eine, AfsK, auf ihren Einfluss auf die Morphogenese (Hempel, Cantlay et al. 2012). Bei den Charakterisierungen der übrigen eSTPKs lag der Fokus stets auf der Antibiotikaproduktion (Urabe, Aoyagi et al. 2008, Urabe, Ogawara et al. 2015).

Die BTH-Experimente von Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011) deuten darauf hin, dass auch die putative eSTPK PkaI (SCO4778) einen Einfluss auf die Sporenwandsynthese haben kann.

Das Gen *pkaI* (*sco4778*) liegt in einem Cluster von fünf eSTPKs. Die Gene heißen *pkaH* (*sco4775*), *sco4776* (wurde bei der ursprünglichen Annotation nicht als eSTPK vorhergesagt und hat deshalb keinen *pka*-Namen), *pkaD* (*sco4777*), *pkaI* (*sco4778*) und *pkaJ* (*sco4779*). PkaD hat einen starken Einfluss auf die Produktion von

Aktinorhodin. PkaD ist die einzige Kinase aus dem Cluster *sco4775-sco4779*, die bisher untersucht wurde (Urabe, Aoyagi et al. 2008).

Das annotierte Gen *pkaI* ist 1142bp lang. Es codiert für ein Protein aus 380 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 40kDa.

Besonders die hohe vorhergesagte Identität mit der gut untersuchten eSTPK PknB verstärkt die Vermutung, dass die annotierte Funktion als eSTPK korrekt ist.

Ziel der Arbeit war die Rolle der Phosphorylierung, im Allgemeinen und die Rolle Pkals im Speziellen, innerhalb des SSSCs in *S. coelicolor* zu untersuchen.

2. Material und Methoden**2.1 Materialien****2.1.1 Bakterienstämme**

Tabelle 2.1 verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
XI1 blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, ΔlacZM15, F':: proA⁺B⁺, lacI^q, tet^R</i>	Bullock, Fernandez et al. (1987)
BL21 (DE3)	<i>F⁻, ompT, hsdFB (rb⁻mb⁻), gal dcm (DE3)</i>	Studier and Moffatt (1986)
Duet-MreC	BL21 (DE3) mit pDuet-MreC	diese Arbeit
Duet-PBP2	BL21 (DE3) mit pDuet-PBP2	diese Arbeit
Duet-Pkal-MreC	BL21 (DE3) mit pDuet-Pkal-MreC	diese Arbeit
Duet-Pkal-PBP2	BL21 (DE3) mit pDuet-Pkal-PBP2	diese Arbeit
Duet-Pkal/CRP	BL21 (DE3) mit pDuet-Pkal und pYT9-Crp	diese Arbeit
Duet-Pkal-MreC/CRP	BL21 (DE3) mit pDuet-Pkal-MreC und pYT9-Crp	diese Arbeit
BL21 (DE3) Δ <i>cya</i>	Δ <i>cya</i> , met, trp	Hantke, persönliche Mitteilung
ET12567	<i>F⁻, dam, 13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, lacY1</i>	MacNeil, Occi et al. (1992)
ET12567 (pUZ8002)	<i>F⁻, dam, 13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, lacY1</i>	MacNeil, Occi et al. (1992)
<i>Streptomyces</i>		
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145	prototroph, SCP1-, SCP2-	Kieser, Bibb et al. (2000)
NL Δ Pkal	<i>pkaI</i> - Deletionsmutante von M145	diese Arbeit
NL Δ 4775-4779	<i>sco4775-4779</i> -Deletionsmutante von M145	diese Arbeit
M145::pSET- <i>pkaH</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaH</i>	diese Arbeit
M145::pSET- <i>sco4776</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie	diese Arbeit

2. Material und Methoden

	von <i>sco4776</i>	
M145::pSET- <i>pkaD</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaD</i>	diese Arbeit
M145::pSET- <i>pkaI</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaI</i>	diese Arbeit
M145::pSET- <i>pkaJ</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaJ</i>	diese Arbeit
NLΔPkaI::pSET- <i>pkaH</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaH</i>	diese Arbeit
NLΔPkaI::pSET- <i>sco4776</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>sco4776</i>	diese Arbeit
NLΔPkaI::pSET- <i>pkaD</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaD</i>	diese Arbeit
NLΔPkaI::pSET- <i>pkaI</i>	<i>aac(3)IV</i> , Komplementation von Δ <i>pkaI</i>	diese Arbeit
NLΔPkaI::pSET- <i>pkaJ</i>	<i>aac(3)IV</i> , zusätzliche Kopie von <i>pkaJ</i>	diese Arbeit
NLΔ4775-4779::pSET- <i>pkaH</i>	<i>aac(3)IV</i> , einzelne Kopie von <i>pkaH</i>	diese Arbeit
NLΔ4775-4779::pSET- <i>sco4776</i>	<i>aac(3)IV</i> , einzelne Kopie von <i>sco4776</i>	diese Arbeit
NLΔ4775-4779::pSET- <i>pkaD</i>	<i>aac(3)IV</i> , einzelne Kopie von <i>pkaD</i>	diese Arbeit
NLΔ4775-4779::pSET- <i>pkaI</i>	<i>aac(3)IV</i> , einzelne Kopie von <i>pkaI</i>	diese Arbeit
NLΔ4775-4779::pSET- <i>pkaJ</i>	<i>aac(3)IV</i> , einzelne Kopie von <i>pkaJ</i>	diese Arbeit

2.1.2 Plasmide

Tabelle 2.2 verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> -Plasmide		
pDrive	Klonierungsvektor <i>Plac</i> , <i>lacZ'</i> , <i>aphII</i> , <i>bla</i>	QIAGEN
pCDF-Duet1	2x P _{T7} , <i>aad</i> , gleichzeitige Expression von zwei Proteinen	Novagen
pDuet-PkaI	pCDF-Duet1-Derivat, <i>pkaI</i> N-terminaler His-tag	diese Arbeit
pDuet-PkaI-MreC	pCDF-Duet1-Derivat, <i>pkaI</i> N-terminaler His-tag, <i>mreC</i> C-terminaler S-tag	diese Arbeit
pDuet-MreC	pCDF-Duet1-Derivat,	diese Arbeit

2. Material und Methoden

	<i>mreC</i> C-terminaler S-tag	
pDuet-PBP2	pCDF-Duet1-Derivat, <i>pbp2</i> C-terminaler S-tag	diese Arbeit
pDuet-PkaI-PBP2	pCDF-Duet1-Derivat, <i>pkaI</i> N -terminaler His-tag, <i>pbp2</i> C -terminaler S-tag	diese Arbeit
pYT9-Crp	STSU_15619 N-terminaler Strep-tag II, P _{Rham} , <i>bla</i>	Kocadinc, persönliche Mitteilung
pUT18c	<i>bla</i> , <i>cya</i> -T18	Karimova, Pidoux et al. (1998)
pKT25	<i>aphII</i> , <i>cya</i> -T25	Karimova, Pidoux et al. (1998)
pUT18c-zip	pUT18c-Derivat, Leucinzipper GCN4	Karimova, Pidoux et al. (1998)
pKT25-zip	pKT25-Derivat, Leucinzipper GCN4	Karimova, Pidoux et al. (1998)
pUT18c-MreC	pUT18c-Derivat, <i>mrec</i> aus <i>S.</i> <i>coelicolor</i>	Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011)
pKT25-MreC	pKT25-Derivat, <i>mrec</i> aus <i>S.</i> <i>coelicolor</i>	Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011)
pKT25-PBP2	pKT25-Derivat, <i>pbp2</i> aus <i>S.</i> <i>coelicolor</i>	Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011)
Streptomycetenplasmide		
pA18	Kloniervector, <i>aac(3)IV</i>	Weber, unveröffentlicht
pK18	Kloniervector, <i>aphII</i>	Pridmore (1987)
pGUS21	Kloniervector, <i>aac(3)IV</i> , <i>gusA</i>	Muth, unveröffentlicht
pKO4778	pA18-Derivat, Deletionsvektor für <i>sco4778</i> , <i>aac(3)IV</i>	diese Arbeit
pGus-KO4775-4779	pGus21-Derivat, Deletionsvektor für <i>sco4775-4779</i> , <i>aac(3)IV</i>	diese Arbeit
pSET152	Klonierungsvektor, <i>aac(3)IV</i> , integrativ, Φ C31 <i>attP</i>	Bierman, Logan et al. (1992)
pSET- <i>pkaH</i>	<i>pkaH</i> Komplementationsplasmid	diese Arbeit
pSET- <i>sco4776</i>	<i>sco4776</i> Komplementationsplasmid	diese Arbeit
pSET- <i>pkaD</i>	<i>pkaD</i> Komplementationsplasmid	diese Arbeit
pSET- <i>pkaI</i>	<i>pkaI</i> Komplementationsplasmid	diese Arbeit
pSET- <i>pkaJ</i>	<i>pkaJ</i> Komplementationsplasmid	diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide**Tabelle 2.3** Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
	Deletionsplasmide und Kontrolle	
Intern4778f	TCATCGTTCGTGCACGA	Kontrollprimer für <i>pkaI</i> Deletion (internes Fragment)
Intern4778r	ATCTCCTCGGTGACCA	
Up4778K416	CTCTACCTGCCCGAGAACTG	Kontrollprimer für <i>pkaI</i> Deletion (externes Fragment)
Lo4778K2240	GGTTGCAGGTCAAACACTCGT	
Up4778fwE	CCGAATTTCGATTGTGATGGAGCTG	<i>pkaI</i> Deletion
Up4778revB	AAGGATCCCATCATGCCCCACCGG	
lo4778fwB	GCGGATCCTAAACGGGAGATAAGC	
lo4778revH	GGAAGCTTAGACGACCGTGTTCTC	
c4775-79fw	TCGGGTGAGGGACAATGAAG	Kontrollprimer für <i>sco4775-4779</i> Deletion (externes Fragment)
c4775-79rev	AGCACGACCTGGAAGACCTC	
Up4775Ef	AAGAATTCGGACTGCTTCTGGAAC	<i>sco4775-4779</i> Deletion
Up4775Br	CCGGATCCCATGCGTCCCCTCAT	
Lo4779Bf	GGGGATCCAATCTGGACATCGACG	
Lo4779Hr	AAAAGCTTCTCGTTGATGTTGACG	
	pDuet-Konstrukte	
4778DuUpBg	CCAGATCTGATGGGGCGCATGGTGA	Expression von PkaI
4778DuLoH	GGAAGCTTGACGCACGATGCCGC	
PBP2DuUpN	AACATATGACCAACATCCCCGAGAC	Expression von PBP2
PBP2DuLoX	AACTCGAGTACGCGTGCCCTCCG	
MreCDuUpN	GGCATATGAGGGACACGAAAGAGAG C	Expression von MreC
MreCDuLoK	AAGGTACCCGGCTCGGGCTGCTCGT TCT	
	pSET152-Konstrukte	
pSet4775fwXbal	GGTCTAGAGAGATCGAGCACTACGAG	Expression von <i>pkaH</i> in

2. Material und Methoden

	AAG	M145, NLΔPkal und
pSet4775revEco	TTGAATTCCCGCAACCACTCACGATAC C	NLΔ4775-4779
pSet4776fwXbal	GGTCTAGACTTCGAACCCAAGTCCTG AG	Expression von <i>sco4776</i> in M145, NLΔPkal und NLΔ4775-4779
pSet4776revEco	TTGAATTCCTTGTCAGGGTCAGACTA GG	
pSet4777fwXbal	GGTCTAGATCGGCCACCTACCAGTAC AC	Expression von <i>pkaD</i> in M145, NLΔPkal und NLΔ4775-4779
pSet4777revEco	TTGAATTCGTTTCAGCCGGTCTCCTCC T	
Up4778XSet	GGTCTAGAGTACGCCCTCAACATGAC	Expression of <i>pkaI</i> in M145 und NLΔ4775-4779, Komplementation of NLΔPkal
Lo4778ESet	GGGAATTCATGCCGCTTATCTCCC	
pSet4779fwXbal	GGTCTAGACGGTACGCCGACCAGTTC	Expression von <i>pkaJ</i> in M145, NLΔPkal und NLΔ4775-4779
pSet4779revEco	TTGAATTCTGAGCCGCAGGGTATGAC	
	Nachweisprimer für RT-PCR	
RT4775fw	ACATCCCGTACGGACAAGAG	RT-PCR
RT4775re	GACGAGTTCCATCACGATCC	
RT4776fw	CGAGTACGAACTCACCGAGA	RT-PCR
RT4776re	CGAAGACGTCAAGACCTG	
RT4777fw	GGATTGTGATGGAGCTGGTC	RT-PCR
RT4777re	GATGCCGAAGTCGGTGAG	
RT4778fw	GCGTACATGGTCATGGAAC	RT-PCR
RT4778re	GGTGTACTCGGGGGAACC	
RT4779fw	TGGATCGTGATGGAAC	RT-PCR
RT4779re	GTGTCCGGTCAGGCTGGTC	
RT-in75+76.fw	CTTCGAACCCAAGTCCTGAG	RT-PCR
RT-in75+76.rev	GGGTCTCGGTGAGTTCGTA	
RT-in76+77.fw	TCGGCCACCTACCAGTACAC	RT-PCR

2. Material und Methoden

RT-in76+77.rev	GCGGTCAACTCCTTGATGG	
RT-in77+78.fw	GTCGAGTACGCCCTCAACAT	RT-PCR
RT-in77+78.rev	GCTCATGGAGCCGGTAAC	
RT-in78+79.fw	GGCACCTAAACGGGAGATAA	RT-PCR
RT-in78+79.rev	GTACGACCTGGGTCGGTGT	

2.1.4 Medien

Alle Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf ein Volumen von 1l.
Für Festmedium werden 16 g/l Agar zugegeben.

Tabelle 2.4 verwendete Medien

	Bestandteil	Menge
LB-Medium nach Sambrook and Russel (2001)	Trypton	10g
	Hefe-Extrakt	5g
	NaCl	5g
	Alternativ: Fertigmedium (Roth)	
LB ⁺ -Medium nach Sambrook and Russel (2001)	LB-Medium	1l
	Glucose	1g
M63/Maltose- Minimalmedium modifiziert nach Miller (1992)	(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
	KH ₂ PO ₄	13,6g
	pH 7,0 mit KOH auf 990ml mit H ₂ O	
	nach dem Autoklavieren zugeben:	
	20% Maltose (0,2 %)	10ml
	1M MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1ml
	0,1% Vitamin B1 (Thiamin)	1ml
1g/l FeSO ₄ • 7 H ₂ O	500µl	

2. Material und Methoden

	<p style="text-align: center;">IPTG (Endkonzentration 0,5mM)</p> <p style="text-align: center;">X-Gal 40mg/ml</p> <p style="text-align: center;">Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Spectinomycin) nur in halber Konzentration einsetzen</p>	<p style="text-align: center;">500µl</p> <p style="text-align: center;">1ml</p> <p style="text-align: center;">500µl</p>
<p style="text-align: center;">S-Medium modifiziert nach Okanishi, Suzuki et al. (1974)</p>	<p style="text-align: center;">Pepton Hefeextrakt K₂HPO₄ KH₂PO₄ Glycin auf 800ml mit H₂O</p> <p style="text-align: center;">nach dem Autoklavieren zugeben: Glucose MgSO₄ · 7 H₂O auf 200ml H₂O</p>	<p style="text-align: center;">4g 4g 4g 2g 10g</p> <p style="text-align: center;">10g 0,5g</p>
<p style="text-align: center;">Mannitol-Soja (MS, auch Cullum) (Hobbs, Frazer et al. 1989)</p>	<p style="text-align: center;">Mannitol Sojamehl (halbfett)</p>	<p style="text-align: center;">20g 20g</p>
<p style="text-align: center;">R5-Medium (Kieser, Bibb et al. 2000)</p>	<p style="text-align: center;">Saccharose K₂SO₄ MgCl₂ · 6 H₂O Glucose Casaminosäuren Spurenelementlösung (s.u.) Hefeextrakt TES auf 955 ml mit H₂O</p>	<p style="text-align: center;">103g 0,25g 10,12g 10g 0,1g 2ml 5g 5,73g</p>

2. Material und Methoden

	<p>pH 7,2 mit NaOH einstellen nach dem Autoklavieren zugeben:</p> <p>1M CaCl₂ · 2 H₂O 0,5 % KH₂PO₄ 20 % L-Prolin</p>	<p>20ml 10ml 15ml</p>
<p>2YT-Medium (Kieser, Bibb et al. 2000)</p>	<p>Trypton Hefeextrakt NaCl</p>	<p>32g 20g 10g</p>

2.1.5 Zusätze

Tabelle 2.5 verwendete Zusätze für Medien

Zusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
	Antibiotika	
Ampicillin	150mg/ml in H ₂ O	150µg/ml
Apramycin	100mg/ml in H ₂ O	100µg/ml
Kanamycin	50mg/ml in H ₂ O	50µg/ml
Naldixinsäure	50mg/ml in 0,2M NaOH	50µg/ml
Spectinomycin	100mg/ml in H ₂ O	100µg/ml
	Sonstiges	
<p>Spurenelementlösung (Kieser, Bibb et al. 2000)</p>	<p>200mg/l FeCl₃ · 6 H₂O 40mg/l ZnCl₂ · 4 H₂O 10mg/l MnCl₂ · 4 H₂O 10mg/l CuCl₂ · 2 H₂O 10mg/l (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4 H₂O 10mg/l Na₂B₄O₇ · 10 H₂O</p>	
<p>IPTG (Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid)</p>	1M in H ₂ O	0,5mM

2. Material und Methoden

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	40mg/ml in Dimethylformamid (DMSO)	40 μ g/ml
X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure)	50mg/ml in DMSO	80 μ g/ml

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.6 50x TAE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

	Bestandteile	Menge	Konzentration
50x TAE-Puffer pH 7,8 (Tris- Acetat- EDTA- Puffer)	Tris	242,2g	2M
	Na-Acetat	41g	500mM
	EDTA	18,6g	50mM
	Essigsäure	ca. 70ml	pH 7,8
	H ₂ O ad 1000ml		

Die Agarose für Agarosegele wird aus 1x TAE-Puffer mit 1% Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle hergestellt. Die aufgekochte Agarose kann bei 60°C gelagert werden.

Als Laufpuffer für die Agarosegele wird 1x TAE-Puffer verwendet. Der Ladepuffer besteht aus 50%igem Glycerin mit 0,04% (w/v) Bromphenolblau.

Tabelle 2.7 E-1-F-Puffer für Eckardtgele

	Bestandteile	Menge/Konzentration
E-1-F-Puffer	Saccharose	25g
	Ficoll-400	3g
		ad 100 ml 1x TAE, autoklavieren
	Lysozym	50mg
	RNAse	10mg
	Bromphenolblau	0,04%

Für das Gel wird eine 1%ige Agarose- Lösung (siehe DNA- Gelelektrophorese) mit 0,25% SDS versetzt. Als Ladepuffer wird E-1-F-Puffer verwendet.

Tabelle 2.8 Puffer für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der CaCl₂-Methode

	Bestandteil	Menge/Konzentration
CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂	50mM
CaCl ₂ -Lösung mit 15% Glycerin	CaCl ₂ Glycerin	50mM 15% (v/v)

Für die Herstellung elektrokompeter Zellen wird eine 10%ige (v/v) Glycerin- Lösung verwendet.

Tabelle 2.9 P-Puffer zur Herstellung und T-Puffer zur Transformation von Protoplasten

	Bestandteil	Menge für 200ml	Menge für 1l
P-Puffer	Saccharose	20,6g in 172ml H ₂ O	103g in 860ml H ₂ O
	Spurenelementlösung (s. 2.1.5 Zusätze)	400µl	2ml
	250mM TES pH 7,2	20ml	100ml
	140mM K ₂ SO ₄	2ml	10ml

2. Material und Methoden

	40mM KH ₂ PO ₄	2ml	10ml
	250mM MgCl ₂	2ml	10ml
	250mM CaCl ₂	2ml	10ml

	Bestandteil	Menge
T-Puffer	PEG-2000	1g
	P-Puffer	3ml

Die Bestandteile des P-Puffers (Thompson, Ward et al. 1982) werden einzeln eingewogen und autoklaviert. Anschließend werden sie steril zusammengegeben. Der T-Puffer besteht aus autoklaviertem, bei 60°C verflüssigtem PEG-2000 und P-Puffer.

Tabelle 2.10 Puffer für die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse

	Bestandteile	Menge/Konzentration
Puffer1, bei 4°C lagern	Glucose	50mM
	Tris/HCl pH 8	25mM
	EDTA	10mM
	RNase nach Autoklavieren zugeben	100µg/ml
Puffer2	NaOH	0,2N
	SDS (w/v)	1%
Puffer3	5M Kaliumacetat	60ml
	Eisessig	11,5ml
	H ₂ O	28,5ml

Tabelle 2.11 Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Streptomyceten

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Puffer1	Puffer1 (alkalische Lyse) +	5ml
	Lysozym	50mg

2. Material und Methoden

5% SDS (w/v)	SDS H ₂ O	5g ad 100ml
Natriumacetat 3M pH 5,2	Natriumacetat Essigsäure	3M bis pH 5,2

Tabelle 2.12 Lösungen für den Southern Blot

	Bestandteil	Konzentration
Denaturierungslösung	NaOH	0,5M
	NaCl	1,5M
Neutralisierungslösung	Tris/HCl pH 8	0,5M
	NaCl	1,5M
20x SSC	NaCl	3M
	Natriumcitrat	0,3M
	NaOH	bis pH 7

Tabelle 2.13 Lösungen für die Nachweisreaktion des Southern Blots

	Bestandteil	Menge/Konzentration
2x SSC 0,1% SDS	20x SSC	100ml
	10% SDS	10ml
	H ₂ O	890ml
0,1x SSC 0,1% SDS	20x SSC	5ml
	10% SDS	10ml
	H ₂ O	985ml
Puffer A	Tris/HCl pH 7,5	100mM
	NaCl	150mM
Puffer B	Puffer A Blocking Reagenz (Milchpulver)	1%
Puffer C	Tris	100mM
	NaCl	100mM
	MgCl ₂	50mM

2. Material und Methoden

Antikörperlösung	Puffer A Antikörper Anti-Dig-FAB	20ml 4µl
Detektionspuffer	Tris pH 9,5 NaCl	100mM 100mM
CSPD-Arbeitslösung	Detektionspuffer CSPD-Lösung	1ml 10µl

Tabelle 2.14 Lösungen für die RNA-Isolierung

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Kirby-Mix nach (Kirby, Fox-Carter et al. 1967)	N-Laurosylsarcosine	1% (w/v)
	p-Aminosalicylsäure	6% (w/v)
	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	6% (v/v)
	Tris/HCl pH 8,3	50mM
	Natriumacetat	Natriumacetat

Tabelle 2.15 Puffer zur Aufreinigung von His-getagten Proteinen

	Bestandteil	Konzentration
Lysepuffer ^{His}	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
	Imidazol	20mM
	Protease Inhibitor (Roche)	1 Tablette
Waschpuffer ^{His}	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
	Imidazol	20mM
Elutionspuffer	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)

2. Material und Methoden

	Imidazol	250mM
--	----------	-------

Tabelle 2.16 Puffer zur Aufreinigung von S-Tag-getagten Proteinen

	Bestandteil	Konzentration
Lysepuffer ^{S-Tag}	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
	Protease Inhibitor (Roche)	1 Tablette
Waschpuffer	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
Elutionslösung	MgCl ₂	3M

Tabelle 2.17 Puffer zur Aufreinigung von Strep-Tag-getagten Proteinen mit Äkta Purifier (GE Healthcare)

	Bestandteil	Konzentration
Lysepuffer ^{Strep-Tag}	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	150mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
	Protease Inhibitor (Roche)	1 Tablette
Puffer A	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	300mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
Puffer B	Tris/HCl pH 7,5	20mM
	NaCl	300mM
	Triton X100	0,1% (v/v)
	Desthiobiotin	5mM

2. Material und Methoden

Tabelle 2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für vier Gele im Gießstand (Hofer)

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Trenngel (12,5%)	TEMED	19µl
	Acrylamid-Mix (30% Acrylamid 0,8%Bisacrylamid, Roth)	13,8ml
	1,25M Tris/HCl pH 8,8	8,3ml
	H ₂ O	10,7ml
	10% SDS	330µl
	10% APS	90µl
	Jedes Gel mit 330µl Isopropanol überschichten und fest werden lassen	
Sammelgel (6%)	TEMED	7,5µl
	Acrylamid-Mix (30% Acrylamid 0,8%Bisacrylamid, Roth)	1,7µl
	1,25M Tris/HCl pH 6,8	1ml
	H ₂ O	6,5ml
	10% SDS	100µl
	10% APS	75µl
	4x Probenpuffer (100ml)	Tris/HCl pH 6,8
SDS		10g
β-Mercaptoethanol		1%
Glycerin		30ml
Bromphenolblau		0,02%
10x SDS-Laufpuffer (1l)	Glycin	144,2g
	Tris Base	30,3g
	SDS	10g

2. Material und Methoden

Tabelle 2.19 Lösungen für Coomassiefärbung von SDS-Gelen

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Coomassiefärbelösung (Puffer A)	Coomassie brilliant blue R250	0,5g
	Eisessig	10%
	Isopropanol	25%
Entfärbelösung (Puffer D)	Eisessig	10%

Tabelle 2.20 Lösungen für ProQ Diamondfärbung (Molecular Probes)

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Fixierungslösung	Methanol	50%
	Eisessig	10%
Entfärbelösung	Acetonitril	20%
	Natriumacetat pH 4	50mM

Tabelle 2.21 Lösungen für Elektrobplot

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Elektrobplotpuffer	Tris	25mM
	Glycin	192mM
	Methanol	20%

Tabelle 2.22 Lösungen für Immunoblot (Westernblot)

	Bestandteil	Menge/Konzentration
TBS-T-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	10mM
	NaCl	150mM
	Tween20	0,05% (v/v)
Blocking Reagenz	TBS-T-Puffer Milchpulver	5%

2. Material und Methoden

Inkubationslösung	Antikörper	1-3µl
	TBS-T-Puffer Milchpulver	1%
Waschpuffer1	TBS-T-Puffer Milchpulver	1%
	Waschpuffer2	Tris/HCl pH 7,5

Tabelle 2.23 Lösungen für Bacterial Two Hybrid (BTH) Assay

	Bestandteil	Menge/Konzentration
PBS (1l)	NaCl	8g
	KCl	0,2g
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1,42g
	KH ₂ PO ₄	0,27g
	pH 7,4 einstellen mit KOH	

Tabelle 2.24 Lösungen für Phosphoproteomanalyse

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Lysepuffer ^{Proteom}	SDS	2% (m/v)
	Tris/HCl pH 7,5	50mM
	NaCl	150mM
	MgCl ₂	10mM
	EDTA	1mM
	PMSF	0,5mM
	β-Mercaptoethanol	7mM
	NaF	5mM
	Natriumorthovanadat	1mM
	β-Glycerolphosphat	5mM

2.2 Chemikalien und andere Materialien

Tabelle 2.25 Chemikalien und Materialien

Chemikalie	Anbieter
3MM Papier	Whatman
Aceton	Sigma Aldrich
Acetonitril	J.T. Baker
Acrylamid 30% (37,5:1)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Gibco
Anti- Digoxigenin-Antikörper-Konjugat	Roche
APS	Serva
ATP	Fermentas
Bromphenolblau	Riedel-de Haën
CaCl ₂ · H ₂ O	Merck
Casaminosäuren	BD
Coomassie brilliant blue R250	Fluka
CSPD	Roche
CuCl ₂ · 2H ₂ O	Merck
Desoxynukleotide	Boehringer
Desthiobiotin	Sigma Aldrich
DIG DNA labeling mix	Roche
Dimethylformamid (DMSO)	Merck
EDTA (Triplex III)	Merck
Eisessig	Roth
Ethidiumbromid	Serva
EtOH	Roth
FeCl ₃ · 6H ₂ O	Merck
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Merck
Ficoll400	Serva
Glasperlen ø 0,45- 5 mm	Roth
Glasperlen ø 0,75- 1 mm	Roth
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
β-Glycerolphosphat	Sigma Aldrich
Glycin	Roth
HCl	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Sigma Aldrich
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
K ₂ HPO ₄	Merck
K ₂ SO ₄	Riedel-de Haën
Kaliumacetat	Merck

2. Material und Methoden

KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck
L-Prolin	Fluka
LB-Agar/LB-Medium	Roth
Maltose	Roth
Mannitol	Merck
Methanol	Fisher
β-Mercaptoethanol	Roth
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck
Milchpulver	Lasana
MnCl ₂ · 4H ₂ O	Merck
N-Laurosylsarkosin-Natrium-Salz	Sigma Aldrich
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	Applichem
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	Merck
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Roth
NaCl	Riedel-de Haën
NaF	Sigma Aldrich
NaOH	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Nylonmembran (Hybond N)	Amersham
ONPG	Serva
p-Aminosalicylsäure	Merck
PEG- 2000	Merck
Pepton	BD
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH neutral (25:24:1)	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Rhamnose	Sigma Aldrich
Saccharose	Roth
SDS	Serva
Sojamehl fettarm	Henselwerk GmbH
TEMED	Roth
TES	Sigma Aldrich
Thiamin	Merck
Tris	Roth
Tris Base	Sigma Aldrich
Triton X100	Roche
Tween20	Sigma Aldrich
X-Gal	Roth

2. Material und Methoden

X-Gluc	Sigma Aldrich
ZnCl ₂	Merck

Tabelle 2.26 Kits

Kit	Anbieter
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Microspin TM S-400 HR Columns	GE Healthcare
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE-Healthcare

Tabelle 2.27 Enzyme

Enzym	Anbieter
DNAse	Sigma Aldrich
Lysozym	Serva
Restriktionsendonukleasen	ThermoFisher, NEB
RNAse	Fermentas
T4-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Qiagen, Genaxxon

Tabelle 2.28 Größenmarker

Marker	Größen	Anbieter
GeneRuler 1kb DNA Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp	Fermentas
Digoxigenin (DIG) markierter Längenstandard VII	8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1412, 1164, 992, 718, 710, 492, 359, 81 bp	Roche
PageRuler Prestained Protein Ladder	~180, ~130, ~100, ~ 70, ~55, ~40, ~35, ~25, ~15, ~10 kDa	ThermoFisher

2.3 Die Kultivierung von Bakterien

2.3.1 Kulturbedingungen für *E. coli*

E. coli werden, soweit nicht anders beschrieben, auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und im 37°-Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Platten können anschließend für einige Wochen bei 4°C gelagert werden. Flüssigkulturen werden aus einer Einzelkolonie von Platte oder mit 10µl einer Glycerinkultur je nach gewünschtem Volumen im Reagenzglas oder Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht in LB⁺-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum im Luftschüttler (Infors Multitron, 180 rpm, 37°C) inkubiert. Die Kulturen können anschließend noch einige Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und bei Bedarf überimpft werden.

2.2.2 Die Herstellung einer Glycerinkultur

Zur langfristigen Aufbewahrung von *E. coli* werden zwei Mal 1,5ml einer 5ml Übernachtkultur im selben Eppendorf Reaktionsgefäß abzentrifugiert, das Pellet in 500µl LB⁺-Medium resuspendiert und mit 500µl 50%iger Glycerin-Lösung verdünnt. So können die Kulturen bei -80°C dauerhaft gelagert werden.

2.2.3 Kulturbedingungen für Streptomyceten

Streptomyceten werden, soweit nicht anders beschrieben, auf MS-Agar-Platten bei 30°C inkubiert. Für Flüssigkulturen werden ca. 10µl Sporensuspension oder 500µl homogenisiertes Myzel in S-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane, Spirale (sorgt für ein disperses Wachstum) und Silikonschaumstopfen (zur besseren Versorgung mit Sauerstoff) angeimpft. Die Kulturen werden bei 28°C oder 30°C im Luftschüttler 2 bis 4 Tage lang inkubiert.

2.2.4 Die Herstellung einer Sporensuspension von Streptomyceten

Zur Gewinnung von Sporen werden Streptomyceten auf MS-Agarplatten ausplattiert und für die Dauer von 7 Tagen bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Sporen mit 1ml H₂O pro Platte und einem sterilen Wattebausch abgeschwemmt, mit einer

2ml-Spritze durch die Watte aufgezogen und pelletiert. Das Pellet wird je nach Größe in 0,5- 1,0ml 50%iger Glycerin-Lösung resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.3 DNA-Aufnahme durch Bakterien

2.3.1 Die Transformation von *E. coli*-Stämmen

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien. Durch die Behandlung mit z.B. CaCl₂ erhalten *E. coli*- Stämme diese Fähigkeit. Außerdem gibt es die Möglichkeit der Elektroporation.

2.3.1.1 Die CaCl₂-Methode

2.3.1.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode (Cohen, Chang et al. 1972)

Ein 1l-Kolben mit 400ml LB⁺-Medium sowie 400µl Selektionsantibiotikum versetzt, wird mit Zellen einer Übernachtskultur beimpft (OD₅₇₈ ca. 0,1). Die Kulturen werden bei 37°C im Luftschüttler inkubiert und in regelmäßigen Abständen die OD₅₇₈ gemessen, bis diese zwischen 0,4-0,8 liegt. Daraufhin werden die Zellen für 10min zentrifugiert (4°C, 4600rpm, Heraeus Multifuge). Der Überstand wird verworfen und die Pellets in eiskalter 50mM CaCl₂- Lösung resuspendiert. Die Zellen werden abermals zentrifugiert und in kaltem CaCl₂ resuspendiert, 30min auf Eis inkubiert und nochmals pelletiert. Das Pellet wird in ca. 5ml eiskalter 50mM CaCl₂- Lösung + 15% Glycerin gelöst, für weitere 15min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (je 100µl). Die Aliquots werden im Ethanolbad bei -80°C schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.1.1.2 Die Transformation

Die kompetenten Zellen (100µl) langsam auf Eis auftauen lassen und ca. 10µl Ligationsansatz (inaktiviert bzw. nachgespalten) oder 1-10µl Plasmidlösung zugeben. Die Zellen weitere 30min auf Eis inkubieren. Es folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 2min. Anschließend wird 1ml LB⁺- Medium zugegeben und für mindestens weitere 30min bei 37°C inkubiert. Dies ist zur Expression der Resistenzgene erforderlich.

Danach werden die Zellen pelletiert (1 min, 14000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wird verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert, in zwei verschiedenen Konzentrationen auf je eine LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.1.2 Die Elektroporation

Wird eine höhere Transformationseffizienz benötigt, z.B. bei gleichzeitiger Aufnahme von zwei oder mehr Plasmiden ist die Elektroporation geeigneter als die CaCl₂-Methode.

2.3.1.2.1 Die Herstellung kompetenter Zellen

100ml LB⁺- Medium werden mit Zellen einer Übernachtskultur auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Nach ca. zwei bis drei Stunden ist eine OD₅₇₈ von ca. 0,6 erreicht. Die Zellsuspension wird in zwei 50ml Falcontubes gefüllt und für 5min bei 4600rpm 4°C (Heraeus Multifuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10ml eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung (v/v) resuspendiert und mit H₂O auf 50ml aufgefüllt. Die Zellen werden wiederum mit 4600rpm für 5min bei 4°C pelletiert und anschließend in ca. 100- 200µl 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert. 50µl Aliquots können nun sofort zur Elektroporation eingesetzt oder schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.3.1.2.2 Die Elektroporation

Zu den elektrokompetenten Zellen wird 1µl Plasmid-DNA gegeben und die Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gefüllt. Die Küvette wird in den Biorad Micropulser gestellt, das Program EC2 (2,5kV, 25µF, 200Ω) für 50µl *E. coli* in einer Küvette mit Durchmesser 2mm gewählt, der Puls gegeben und die Zellen anschließend unverzüglich in ein mit 1ml LB⁺-Medium vorbereitetes ERG überführt. Anschließend werden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert, im Rücklauf resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.3.2 Die Protoplastentransformation bei Streptomycceten (Kieser *et al.*, 1982)

2.3.2.1 Die Herstellung von Protoplasten

Eine 50ml Streptomycceten-Kultur, welche für die Dauer von zwei bis drei Tagen im Schüttler bei 30°C gewachsenen ist, wird 10min lang bei 4600rpm in der Heraeus Multifuge bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 20ml P-Puffer, welcher frisch mit 1mg/ml Lysozym versetzt und steril filtriert wird, gelöst. Nach einer Inkubation von ca. 10min bei 37°C im Luftschüttler, wird der Abbau der Zellwand mikroskopisch kontrolliert, die Zellen werden ohne das formgebende Peptidoglykan rund. Eventuell wird länger (bis zu 40min) bei 37°C inkubiert. Um die Protoplastierung zu beenden, wird mit kaltem P-Puffer auf 50ml aufgefüllt. Anschließend lässt man die Zellsuspension durch eine mit steriler Watte gefüllten Spritze in ein neues Falcontube laufen, um das nicht protoplastierte Myzel abzutrennen. Der Durchfluss wird für 10min bei 3500rpm zentrifugiert und das Pellet in 1-2ml P-Puffer gelöst. Aliquots von 200µl werden auf Eis direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.3.2.2 Die PEG-induzierte Protoplastentransformation

Polyethylenglykol vermittelt die Aufnahme von DNA in Streptomycceten. Für die Transformation wird aus *E. coli* ET12567 isolierte unmethylierte DNA verwendet. 1-10µl DNA-haltiger Lösung werden zu 200µl Protoplasten gegeben, unverzüglich mit 500µl T-Puffer vermischt und sofort auf zwei bis drei R5-Platten ausplattiert. Die Platten werden für einen Zeitraum von ca. 16 Stunden bei 30°C inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren können, und dann mit dem entsprechendem Selektionsantibiotikum (25µl Stammlösung in 1ml H₂O pro Platte) überschichtet. Wenn die Platten getrocknet sind, werden sie weiter bei 30°C für eine Dauer von zwei bis fünf Tagen inkubiert.

2.3.2.3 Konjugation zwischen *E. coli* und Streptomycceten

Diese Methode beruht auf einem intergenerischen Plasmid-Transfer, wofür keine Protoplasten benötigt werden (Flett, Mersinias *et al.* 1997). Die Wahrscheinlichkeit, dass es zum Transfer kommt, ist höher als bei der Protoplastentransformation. Der

für die Konjugation verwendete *E. coli*-Stamm ET12567 (MacNeil, Occi et al. 1992, Kieser, Bibb et al. 2000) ist methylierungsdefizient und daher mutationsanfällig. Es sollte deshalb jede Konjugation mit einer neuen Transformation von ET12567 (pUZ8002) begonnen werden. pUZ8002 ist das Plasmid, das den *E. coli* Stamm zur Übertragung von DNA befähigt.

Zunächst werden CaCl₂-kompetente Zellen von ET12567 (pUZ8002) mit dem zu transferierenden Plasmid transformiert und auf die Resistenz (i.d.R. Apramycin) dieses Plasmids selektioniert. Gepickte Klone werden dann in 5ml LB⁺-Medium mit Kanamycin und dem Selektionsantibiotikum des zu transferierenden Plasmids über Nacht bei 37°C inkubiert. 2ml dieser Kultur werden bei 5000rpm für 3min abzentrifugiert und anschließend zweimal mit LB⁺-Medium ohne Antibiotika, bei gleichen Bedingungen, gewaschen. Währenddessen werden 10µl einer Sporensuspension des Streptomyceten, der das Plasmid empfangen soll, in 500µl 2YT-Medium aufgenommen und für 10min bei 50°C inkubiert. 500µl der gewaschenen ET12567 pUZ8002 mit dem zu transferierenden Plasmid und 500µl der Streptomycetensporen werden gemischt und für 5min bei 5000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird im Rücklauf resuspendiert und auf zwei MS-Agarplatten mit 10mM MgCl₂ ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 30°C inkubiert und am nächsten Tag mit 25µl Nalidixinsäure (50µg/ml; tötet *E. coli*, aber nicht Streptomyceten) und 25µl der Stammlösung des Selektionsantibiotikums des zu transferierenden Plasmids in 1ml H₂O überschichtet. Nach drei bis vier Tagen können einzelne Kolonien gepickt werden und zur Kontrolle auf LB-Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum des zu transferierenden Plasmids ausgestrichen werden.

2.4 Die Plasmidisolierung

Bei der Plasmidisolierung müssen die genomische DNA, Proteine und andere Zellbestandteile von der Plasmid- DNA abgetrennt werden. Dabei macht man sich zu nutzen, dass die Plasmid- DNA nach dem Neutralisieren der alkalischen Lösung schnell wieder hybridisiert, wohingegen die größere oft durch Scherkräfte zerbrochene chromosomale DNA ausfällt.

2.4.1 Die alkalische Lyse (Minipräparation)

Die alkalische Lyse (Bimboim and Doly 1979) wird angewendet, wenn man aus möglichst vielen Klonen relativ schnell DNA isolieren möchte.

Für die alkalische Lyse wird eine Einzelkolonie in 5ml LB⁺-Medium mit Selektionsantibiotikum in einem 20ml-Reagenzglas angeimpft und bei 37°C im Luftschüttler über Nacht inkubiert. Von der Übernachtskultur werden 1,5ml 14000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen. Das Pellet kann nun bei -20°C gelagert oder gleich aufgeschlossen werden.

Zunächst löst man das Pellet in 300µl Puffer1 und gibt 300µl Puffer2 zu. Nach mehrmaligem Invertieren und 5min bei RT, wird die Lösung viskos und die Zellen sind lysiert. Es werden nun 300µl Puffer3 zugegeben gut durchmischen und 10min auf Eis inkubiert. Aufgrund der pH-Änderung fallen weiße Flocken aus, welche aus Proteinen, SDS und genomischer DNA bestehen. Diese werden anschließend 15min bei 14000rpm abzentrifugiert. Den Überstand gibt man in ein neues ERG, versetzt ihn mit gleichem Volumen Isopropanol, inkubiert 20min bei -20°C und zentrifugiert 20min bei 14000rpm. Das Pellet wird mit 500µl 70%igem EtOH gewaschen um Salze zu entfernen, bei 60°C für 5min getrocknet und in 50µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

2.4.2 Die Qiagen- Lyse (Maxipräparation)

Die Qiagen-Lyse wird angewendet, wenn man eine möglichst große Menge sehr sauberer DNA erhalten will. Es handelt sich ebenfalls um eine alkalische Lyse mit anschließender Anionen-Austauschchromatographie.

Eine Einzelkolonie wird in 50ml LB⁺- Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Zunächst wird die Zellsuspension für 10min bei 4600rpm abzentrifugiert, der Überstand restlos verworfen. Das Zellpellet wird in 1,6ml Puffer1 gelöst und auf vier ERGs à 400µl verteilt. Anschließend werden je 400µl Puffer2 zugegeben, die ERGs mehrfach invertiert und 5min bei RT inkubiert. Danach werden 400µl Puffer3 zugegeben, ebenfalls invertiert, 10min auf Eis inkubiert und 10min bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues ERG überführt und abermals zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die Säulchen mit je 1ml QBT-

Puffer äquilibriert und der Überstand zweier ERGs auf eine Säule gegeben. Jede Säule wird vier Mal mit je 1ml QC- Puffer gewaschen. Vor dem Elutionsschritt wird ein neues beschriftetes ERG unter die Säule gestellt, jede Säule wird zwei Mal (jeweils in ein neues ERG) mit 0,8ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wird mit 560µl Isopropanol bei -20°C für die Dauer von 20min gefällt. Danach geht es weiter wie bei der alkalischen Lyse.

2.4.3 Die Lyse nach Eckhardt

Ein Eckhardt-Gel (Eckhardt 1978) ermöglicht es, ohne vorher die Plasmide aufzureinigen zu müssen, unterschiedliche Plasmidgrößen mehrerer Klone im Agarosegel sichtbar zu machen. So kann man relativ schnell viele Klone auf Aufnahme eines Plasmids mit Insert testen, da diese langsamer in das Gel einlaufen als der leere Vektor. Es wird hierfür ein 1%iges Agarosegel mit 0,25% SDS gegossen. Die Kolonien werden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in die E-1-F-Lösung eingerieben und auf das Gel aufgetragen. Wichtig ist hierbei sich die Reihenfolge zu notieren, damit man hinterher die Klone zuordnen kann. Am einfachsten geht das, wenn man die Klone vorher auf einer Platte mit Selektionsantibiotika in einem Raster ausgestrichen hat. Zunächst wird für die Dauer von 10min eine Spannung von 10V angelegt, während dessen die Lyse der Zellen durch das SDS erfolgt. Anschließend wird die Spannung auf 90V erhöht. Das Gel wird schließlich mindestens 10min lang in H₂O gewaschen um SDS-Reste zu entfernen, welche die Visualisierung der Plasmide mit Ethidiumbromid unter UV-Licht stören.

2.5 Vom PCR-Produkt zum Plasmid

Vektor und PCR-Produkt werden so verdaut, dass kompatible Enden entstehen, eventuell aufgereinigt, ligiert und transformiert. Anschließend wird auf den gewünschten Klon selektiert und das Plasmid isoliert.

2.5.1 Die PCR (polymerase chain reaction)

Die PCR (Mullis, Faloona et al. 1986) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, z.B. zur Klonierung oder als Nachweis für das Vorhandensein eines Gens.

Tabelle 2.29 PCR- Pipettierschema und Programm

Bestandteil					
0,5µl	Primer forward	Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
0,5µl	Primer reverse	1	Denaturierung	95	2
5µl	10x Puffer	2	Denaturierung	95	1
10µl	Q-Solution	3	Annealing	primerabhängig	1
0,5µl	dNTP-Mix	4	Elongation	72	fragmentlängenabhängig
1µl	Template	5	Elongation	72	5
0,5µl	Taq-Polymerase	6	Kühlen	4	30
32µl	H ₂ O				

Die PCR-Reaktion wird in einem Volumen von 50µl durchgeführt: Nach einem ersten zweiminütigen Denaturierungsschritt, kommt es zu einer Abfolge von Denaturierung (Aufschmelzen der Doppelstränge), Annealing (Anlagerung der Primer) und Elongation (Verlängerung der 3'-Enden der angelagerten Primer), welche 29 Mal wiederholt wird.

Dabei hängt die Annealingtemperatur von den Schmelztemperaturen der Primer ab, die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Die Taq-Polymerase erreicht eine Geschwindigkeit von ca. 1kb/min.

Anschließend wird ein weiterer Elongationsschritt von 8min angehängt, um alle „angefangenen“ Fragmente fertig zu amplifizieren. Die vervielfältigten Fragmente werden im Agarosegel analysiert und gegebenenfalls für die Klonierung auf gereinigt. Es wird der PCR-Cycler MJ Mini (Biorad) benutzt.

2.5.2 Die Agarose- Gelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA- Fragmente nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats unter den gegebenen Bedingungen negativ geladen und wandert daher

zum Pluspol. Ihre Laufstrecke im Gel ist bei linearen Fragmenten umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Mit Hilfe eines Längenstandards kann so die Größe unbekannter DNA-Fragmente bestimmt werden.

Die Agarose wird als 1%ige Lösung in einfach TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine Gelkammer gegossen. Ein Kamm für die Taschen wird eingefügt. Wenn das Gel erstarrt ist, wird der Kamm entnommen und die Gelkammer mit Laufpuffer (einfach TAE) gefüllt. Die Taschen werden mit bis zu 20µl Probe, welche zuvor mit 3µl Bromphenolblau-Ladepuffer vermischt wurde, befüllt. Als Längenstandard wird die GeneRuler 1kB DNA ladder verwendet. Es wird eine Spannung von 90-100V angelegt. Das Gel läuft ca. 40 Minuten bis die Bromphenolblau-Bande ungefähr 1cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist. Anschließend wird das Gel im Ethidiumbromidbad für eine Zeitspanne von zehn bis 30min gefärbt und unter UV-Licht mit der Geldokumentationsanlage von Nippon Genetics Europe photographiert.

2.5.3 Die Aufreinigung von PCR- Produkten

Um Primer und DNA-Fragmente falscher Länge zu entfernen, wendet man die Gelelution an. Wenn nur eine Bande in der richtigen Größe vorhanden ist, kann man PCR-Produkte schnell und einfach über spin columns (Microspin S-400 HR columns) aufreinigen.

Die Gelelution mit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

Auf ein Agarosegel wird in mehreren Taschen nebeneinander das gesamte, mit Ladepuffer versetzte PCR- Produkt aufgetragen und eine Spannung von 90-100V angelegt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, was zu Mutationen führen kann, werden die präparative Gele nur so kurz wie nötig im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die gewünschte Bande wird mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und laut Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wird der Erfolg der Aufreinigung mittels eines weiteren Agarosegels kontrolliert, auf welches je nach Ausgangskonzentration und -menge 3-5µl Probe aufgetragen werden.

2.5.4 Der Restriktionsverdau

Für Spaltungen wird die DNA gewöhnlich in einem Gesamtvolumen von 20µl gespalten. Spaltet man mehrere Proben mit denselben Enzymen empfiehlt es sich einen Mastermix anzusetzen, bei dem für fünf Proben eine Enzymmenge von 2µl pro Enzym eingesetzt wird.

Tabelle 2.30 Pipettierschema für den Restriktionsverdau.

	Einfache Spaltung	Doppelspaltung
DNA	5-10µl	5-10µl
10fach Puffer	2µl	2µl
Restriktionsenzym 1	1µl	1µl
Restriktionsenzym 2	---	1µl
H ₂ O	7-12µl	6-11µl

2.5.5 Die Ligation

Tabelle 2.31 Ligationsansatz.

Menge	Bestandteil
12 µl	gespaltenes PCR- Produkt
5 µl	gespaltener Vektor
2 µl	Ligasepuffer + ATP
1 µl	T4-Ligase

Das ERG mit dem Ligationsansatz wird in einem Styroporschwimmer in einem mit lauwarmem Wasser gefüllten Becherglas über Nacht oder länger in den Kühlschrank gestellt. Anschließend 10min bei 65°C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren. 10µl des Ligationsansatzes können nun direkt zur Transformation nach *E. coli* eingesetzt werden.

Nach Möglichkeit jedoch wird die Ligation vor der Transformation eine Stunde lang bei 37°C nachgespalten um zu verhindern, dass Plasmide ohne Insert transformiert werden. Zum Nachspalten wird ein Enzym verwendet, das nur in dem

herausgeschnittenen Stück der „multiple cloning site“ und nicht im restlichen Vektor oder Insert spaltet.

2.6 Methoden zur Transkriptionsanalyse

2.6.1. RNA-Isolierung mit Modified Kirby Mix

Die Modified Kirby-Mix-Methode wurde ursprünglich entwickelt für die Aufreinigung von Gesamtnukleinsäure (Kirby, Fox-Carter et al. 1967). Durch DNaseI-Behandlung kann die RNA von der genomischen DNA befreit werden. Die Isolierung der RNA erfolgt mittels Phenol/Chloroform-Extraktion.

Hierfür werden ca. 3×10^7 Sporen des zu untersuchenden Stammes auf mit Cellophanscheiben beschichteten MS-Agarplatten ausgestrichen und bis zum zu untersuchenden Zeitpunkt bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation können die Zellen vom Cellophan mit einem Spatel heruntergekratzt werden und in FastPrep-Gefäße mit Glasperlen überführt werden. 500µL Kirby-Mix werden zu den Zellen gegeben. Der Aufschluss erfolgt mit dem Precellys-Homogenisator (peqlab). Hierfür werden die Proben zweimal mit dem Programm 2 (6500rpm, 2x20s) behandelt. Die Proben werden auf Eis gekühlt und 500µL Phenol/Chloroform hinzugegeben. Es erfolgen zwei weitere Aufschlüsse (6500rpm, 2x20s). Zwischen den Läufen werden die Proben erneut auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer und ausgefallenen Proteine bei 10000rpm für 15min bei 4°C (Eppendorf Zentrifuge 54R) abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein 2ml-ERGs überführt und zur Extraktion von Proteinen mit 1ml Phenol/Chloroform versetzt. Anschließend werden die Proben für 30s durch Vortexen gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird erneut in ein frisches ERG überführt. Die Extraktion wird zwei bis dreimal bis zu einer sauberen Interphase wiederholt. Die Nukleinsäuren werden nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und 1/10 Volumen Na-Acetat für eine Stunde bei -20°C gefällt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation gesammelt (20 min, 14800rpm, 4°C) und das Pellet zweimal mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird kurz getrocknet und dann in 50 bis 100µl RNase-freiem H₂O gelöst. Zur Lagerung werden die Proben bei -80°C eingefroren.

2.6.2 DNase-Verdau und Test-PCR

Die DNA der Proben wird mit RNase-freier DNase verdaut. Hierfür werden zu 100µl Nukleinsäuren 12µl 10x DNase-Puffer und 8 µl DNase I (Fermentas) gegeben und der Ansatz bei 37°C inkubiert. Um den Fortschritt der Restriktion zu verfolgen, werden nach einer Stunde 5µl der Probe in einem 1%igen Agarosegel analysiert und die Proben, abhängig vom Fortschritt der Restriktion, weiter inkubiert. Ist keine deutliche Bande der genomischen DNA mehr im Gel sichtbar, so wird die Nukleinsäurekonzentration mit Hilfe eines NanoDrop 1000 Spektrofotometers (peqlab) bestimmt. Für den anschließenden zweiten DNase-Verdau werden 60µg Nukleinsäuren, 8µl DNase I und 8µl Dnase-Puffer eingesetzt. Die Proben werden erneut für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. 0,5µl Probe werden für eine Test-PCR mit *hrdB* oder *16s rRNA* Primern eingesetzt, um damit auf eine mögliche DNA-Kontamination zu testen. Sofern im anschließenden Agarosegel keine PCR-Produkt-Bande sichtbar ist, wird die DNase-Reaktion endgültig durch Zugabe von 1/10 Volumen EDTA und Inkubation für 10min bei 65°C gestoppt. Abschließend wird die Konzentration der RNA bestimmt und jeweils 3µg in einem 1%igen Agarosegel analysiert, um die Qualität zu überprüfen. Die RNA wird weiter verwendet, wenn sie im Agarosegel keine Degradation zeigt.

2.6.3 cDNA-Generierung mittels RT-PCR

Für die cDNA-Synthese werden 3µg RNA in einem Volumen von 10µl eingesetzt. Der Ansatz erfolgt in PCR-Tubes. Es wird 1µl Random Nonamers (Sigma) zu der RNA gegeben, der Ansatz für 5min bei 70°C im Thermocycler (Biorad) inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Währenddessen wird der Puffer-Mastermix hergestellt und jeweils 9µl zu dem gekühlten RNA-Primer-Gemisch gegeben. Es folgt eine erneute Inkubation im Thermocycler für 5min bei 25°C. Anschließend wird zu jedem Ansatz 1µl RevertAid Reverse Transkriptase (Fermentas) gegeben. Die RT-Reaktion läuft während der Inkubation bei 25°C für 10min und anschließend 42°C für 60min ab. Die gewonnene cDNA wird abschließend mit 19µl H₂O auf 40µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.6.4 PCR zur Bestimmung der Transkription

Die Amplifikation der cDNA erfolgt durch PCR. Hierfür werden spezifische Primer für die nachzuweisende RNA eingesetzt. Als Referenz dient das *S. coelicolor* M145 Gen das die 16s rRNA kodiert und welches konstitutiv transkribiert wird. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion wird genomische DNA von *S. coelicolor* M145 als Template eingesetzt.

2.7 Die Erzeugung und der Nachweis von Deletionsmutanten

2.7.1 Die Erzeugung der Mutanten

Ein ca. 1600bp großes upstream und ein ebenso großes downstream Fragment des zu deletierenden Gens werden mittels PCR amplifiziert und in den pK18-Vektor, pA18-Vektor oder pGus21-Vektor kloniert. Bei pGus21 handelt es sich um ein pA18-Derivat, welches das für eine β -Glucuronidase kodierende *gusA* Gen trägt. Diese ist in der Lage, das Substrat X-Gluc zu spalten. Der pK18-Vektor wird mittels Protoplastentransformation in die Protoplasten von *S. coelicolor* überführt und auf single-crossover (Kanamycin-Resistenz) selektiert. Die Vektoren pA18 und pGus21 werden mittels Konjugation mit dem *E. coli* Stamm ET12567 (pUZ8002) nach *S. coelicolor* transferiert. Die Kolonien mit single-crossover sind Apramycin resistent. Von Klonen, die eine single-crossover Insertion tragen, werden ohne Selektionsdruck Sporen hergestellt, welche ebenfalls ohne Selektionsdruck zu Einzelkolonien ausgestrichen werden. Für Klone die ein pK18- oder pA18-Konstrukt tragen wird nun klassisch auf den Verlust der Kanamycin- bzw. Apramycin-Resistenz selektiert.

Klone die ein pGus21-Konstrukt tragen können durch blau/weiß-Selektion untersucht werden. Hierfür werden Agarplatten mit Einzelkolonien mit 40 μ l X-Gluc (50mg/ml in DMSO) in 1ml H₂O überschichtet. Ist die, auf pGus21 kodierte, β -Glucuronidase GusA vorhanden, so spaltet das Substrat X-Gluc und die Kolonie bekommt einen blauen Hof. Kolonien ohne Farbumschlag sind doppel-crossover. Dies kann entweder Reversion zum WT oder doppel-crossover (Deletionsmutante) bedeuten. Zur Unterscheidung wird eine Kolonie-PCR durchgeführt (Kapitel 3.8.3).

2.7.2 Die Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein schneller Nachweis für Mutanten. Hierfür wird eine Streptomycceten-Kolonie von einer Agar-Platte mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und an den Wänden des zu benutzenden PCR-Reaktionsgefäßes verrieben. Sie dient so als Template für die PCR.

Tabelle 2.32 Die Kolonie- PCR Reaktionsansatz und Programm

Bestandteil		Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
0,5µl	Primer forward	1	Denaturierung	95	2
0,5µl	Primer reverse	2	Denaturierung	95	1
5µl	10x Puffer	3	Annealing	primerabhängig	1
10µl	Q-Solution	4	Elongation	72	fragmentlängenabhängig
0,5µl	dNTP-Mix	5	Elongation	72	5
0,5µl	Taq-Polymerase	6	Kühlen	4	30
33µl	H ₂ O				

2.7.3 Der Nachweis einer Deletionsmutanten mittels Southern Blot

Die Southern Hybridisierung (Southern 1975) nutzt die Eigenschaft, dass sich zwei komplementäre DNA-Stränge über spezifische Basenpaarungen aneinander anlagern. Hierfür wird die genomische DNA von WT und Mutante mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und die Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel zu Einzelsträngen denaturiert. Die Einzelstränge werden auf eine Nylonmembran geblottet und fixiert. Die markierte DNA- Sonde hybridisiert mit der komplementären Sequenz auf dem Filter. Diese Sequenz wird über eine für die Markierung der Sonde spezifische Nachweisreaktion sichtbar gemacht.

2.7.3.1 Die Herstellung der Sonde

Die Primer für die Herstellung der Sonde werden so gewählt, dass nach dem Restriktionsverdau der genomischen DNA mit einem geeigneten Enzym das durch die Sonde markierte Fragment bei Mutante und WT unterschiedlich groß ist.

Tabelle 2.33 Die Labeling- PCR für den Southern Blot

Bestandteil	Menge	Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Primer forward	0,5µl	1	Denaturierung	95	2
Primer reverse	0,5µl	2	Denaturierung	95	1
10x Puffer	5µl	3	Annealing	primerabhängig	1
PCR-Dig-labeling -Mix	5µl	4	Elongation	72	fragmentlängenabhängig
Taq-Polymerase	0,5µl	5	Elongation	72	8
Q-Solution	10µl	6	Kühlen	4	30
Template	1µl				
H ₂ O	27,5µl				

Da die markierten Fragmente im Gel etwas größer erscheinen, wird zur Kontrolle der Größe des Produktes eine PCR mit unmarkiertem Fragment parallel hergestellt. Die Sonde wird aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Nach einem Kontrollgel wird der Rest der Sonde in 10ml Vorhybridisierungslösung gelöst und bei -20°C eingefroren. Sie kann bis zu zehn Mal wieder verwendet werden.

2.7.3.2 Die Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten

Das Pellet einer 50ml Streptomycceten Kultur wird in 5ml Puffer1 (siehe alkalische Lyse) versetzt mit 10mg/ml Lysozym resuspendiert. Man gibt ein paar Glasperlen hinzu und inkubiert eine Stunde im Luftschüttler bei 30°C. Anschließend werden 3ml einer 5%igen SDS-Lösung zugefügt und kräftig gevortext. Die Proben werden für die Dauer von mindestens 10min bei 60°C inkubiert, zwischendurch gevortext, bis sich eine homogene, zähe Lösung bildet. Danach wird die Probe 5min auf Eis abgekühlt. 2ml Phenol-Chloroform werden zugegeben und gut gemischt. Für 10min wird bei 10000rpm und 4°C (Sorvall RC6 plus) zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen, und ein Zehntel des Volumens an 3M Na-Acetat zugegeben und gemischt. Danach wird ein Volumen Isopropanol zugegeben und abermals gut durchmischt. Der DNA-Faden kann nun mit einer Pippettenspitzen aus der Lösung herausgefischt werden. Anschließend wird die DNA in 70%igem Ethanol gewaschen, kurz bei RT getrocknet und in 300-500µl H₂O über Nacht im Kühlschrank gelöst.

2.7.3.3 Verdau, Auftrennung und Denaturierung der genomischen DNA

Zunächst wird aus WT und Mutante genomische DNA isoliert, welche dann mit einem Enzym verdaut wird, das so schneidet, dass das Fragment, an welches die Sonde bindet, in WT und Mutante unterscheidbar unterschiedlich groß ist.

Tabelle 2.34 Der Restriktionsverdau für den Southern Blot

Bestandteil	Menge
genomische DNA	10 µl
10X Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H ₂ O	7 µl

Die genomische DNA aus WT und vermeintlicher Mutante wird bei 37°C mindestens für die Dauer von vier Stunden oder über Nacht verdaut. Anschließend werden die Fragmente im Agarosegel bei 70V aufgetrennt. In Vorversuchen wird die Konzentration der einzelnen DNA-Proben bestimmt, so dass vergleichbare Konzentrationen eingesetzt werden können. Als Marker verwendet man den Digoxigenin markierter Längenstandard VII. Nach der Elektrophorese wird das Gel kurz (2min) im Ethidiumbromidbad gefärbt, um den Verdau zu kontrollieren. Anschließend wird 10min in H₂O gewaschen, zwei Mal 20min in Denaturierungslösung und zwei Mal 20min in Neutralisierungslösung inkubiert.

2.7.3.4 Der Kapillarblot

Der Kapillarblot wird bei RT über Nacht durchgeführt. Über ein Pufferreservoir gefüllt mit 20X SSC-Puffer wird eine Glasplatte gelegt. Auf diese Glasplatte werden vier 3MM-Filterpapiere so gelegt, dass sie mit dem Puffer im Gefäß darunter in Verbindung sind. Als nächstes kommt das Gel, dann eine Nylonmembran, dann nochmals vier 3MM-Papiere und ein Stapel mit Papiertüchern sowie eine weitere Glasplatte auf die ein Gewicht (z. B. eine gefüllte 2l-Flasche) gestellt wird. Es ist wichtig, die Lagen luftblasenfrei übereinander zu legen, damit die Kapillarkräfte wirken können. Nach ca. 16 Stunden wird die Membran getrocknet und die DNA durch eine dreiminütige Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 360 \text{ nm}$) fixiert.

2.7.3.5 Die Hybridisierung

Die Nylonmembran wird mit der Oberseite nach innen in ein Glasrohr gegeben und mit 25 ml Vorhybridisierungslösung 30min bei 68°C im Hybridisierungssofen gerollert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. In der Zwischenzeit wird die in Vorhybridisierungslösung gelöste Sonde (Hybridisierungslösung) bei 95°C im Wasserbad 10min lang denaturiert und anschließend im Eis-Ethanol-Bad abgekühlt. Die Vorhybridisierungslösung wird entfernt und 10ml Hybridisierungslösung zugegeben. Es wird drei Stunden bei 68°C im Ofen gerollt.

2.7.3.6 Lumineszenznachweis der markierten DNA mittels Antikörper

Um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wird die Membran unter verschiedenen Bedingungen gewaschen. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen im Hybridisierungssofen unter Rollern. Zunächst wird für zwei Mal 10min bei RT mit je 25ml 2x SSC mit 0,1% SDS, anschließend für zwei Mal mit je 25ml 15min mit 0,1x SSC mit 0,1% SDS bei 68°C und dann mit 25ml PufferA bei RT für 1min gewaschen. Daraufhin wird für 30min bei RT mit 20ml PufferB blockiert und wieder für 2min mit PufferA gewaschen. Danach wird 30min mit Antikörperlösung (PufferA 20ml + 4µl Anti-Dig-Fab-Fragment-Lösung) bei RT inkubiert. Es wird nochmals zwei Mal für 15min mit je 25ml PufferA bei RT gewaschen. Anschließend wird die Membran für 2-5min in Detektionspuffer inkubiert, mit der DNA-haltigen Seite nach oben auf eine Plastikfolie gelegt, 1ml CSPD working solution zugegeben, die Folie verschlossen und Luftblasen ausgestrichen. Es wird für die Dauer von 5min im Dunkeln bei RT anschließend für 10min bei 37°C inkubiert. Zum Schluß wird das Ergebnis mit der Geldoku (ChemidocXRS Biorad) dokumentiert.

2.8 Phänotypische Untersuchungen von Deletionsmutanten

2.8.1 Mikroskopie und Sporenmessungen

In eine MS-Agarplatte werden in einem Winkel von ca. 45° sterile Deckgläschen gesteckt. An den unteren Rand der Deckgläschen werden 2-3µl einer

Sporensuspension getropft. Die Platten werden für fünf bis sieben Tage bei 30°C inkubiert. Man gibt ca. 1ml in PBPs gelöste 1%ige Agarose auf einen Objektträger und lässt die Agarose eintrocknen. Das Deckgläschen kann vorsichtig auf einer Seite mit EtOH abgerieben werden. Anschließend wird der Objektträger mit 10-15µl H₂O befeuchtet und das Deckgläschen wird darauf gelegt. Die Präparate werden mit dem Olympus System Microscope BX60 mikroskopiert und mit der F-view II Kamera photographiert. Die Sporenlänge wird mit dem Programm AnalySYS von Olympus gemessen und ausgewertet.

2.8.2 Lebend/Tot-Färbung

In eine MS-Agarplatte werden in einem Winkel von ca. 45° sterile Deckgläschen gesteckt. An den unteren Rand der Deckgläschen werden 2-3µl einer Sporensuspension getropft. Die Platten werden für fünf bis sieben Tage bei 30°C inkubiert. Für die Herstellung der Färbelösung werden, gemäß der Vorschrift aus dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, je 1,5µl der Komponenten A und B in 1ml H₂O gelöst. Für die Färbung der Sporen werden nun je 20µl Färbelösung an den bewachsenen Rand der Deckgläser einer Agarplatte pipettiert. Diese wird nun für 20min abgedunkelt inkubiert. Anschließend wird eine Seite eines Deckgläschens mit EtOH abgerieben und auf einen mit 10-15µl H₂O befeuchteten mit eingetrockneter, 1%iger Agarose beschichteten Objektträger gelegt (vergleiche Mikroskopie und Sporenmessungen). Die Präparate werden mit dem Olympus System Microscope BX60 mikroskopiert und mit der F-view II Kamera photographiert. Um die Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar zu machen wurden die Filtersets für TxRed und eGFP benutzt. Die Bildbearbeitung erfolgt mit dem Programm Fiji 1.49b und die Sporen werden mit dessen Cell Counter Plugin ausgezählt.

2.9 Die physiologische Charakterisierung der Mutanten

2.9.1 Sporenproduktionsassay

Ca. 3×10^7 Sporen eines Stammes werden auf einer MS-Agarplatte ausplattiert. Die Platten werden bis zum Zeitpunkt der Untersuchung (in dieser Arbeit drei und sieben Tage) bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Sporen, wie in Kapitel 2.2.4

beschrieben, geerntet. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe der geernteten Sporen auf LB-Agarplatten ausplattiert, ausgezählt und der Titer bestimmt.

2.9.2 Der Salzstress

Sporen vergleichbarer Konzentration werden LB⁺- Agarplatten mit einem Gradienten von +0% bis +6% NaCl aufgetropft, für 2- 3 Tage bei 30°C inkubiert, beobachtet und photographiert.

2.9.3 Vancomycin- & Lysozymresistenztests

Sporen vergleichbarer Konzentration werden auf LB⁺- Platten ausplattiert. Entweder werden direkt nach dem Ausplattieren Filterplättchen mit entweder 50µg Lysozym oder 5µg Vancomycin auf die Sporen gelegt oder es wird eine Verdünnungsreihe von Lysozym oder Vancomycin auf die Sporen aufgetropft. Die Platten werden für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert und anschließend photographiert.

2.9.4 Die TEM- Mikroskopie

WT- und Mutantensporen werden auf MS-Agarplatten bei 30°C für sieben Tage inkubiert und die Sporen geerntet (siehe Herstellung einer Sporensuspension). Die Sporensuspension wird Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5%) fixiert. Anschließend werden die Sporen dreimal in HEPES-Puffer pH=8 gewaschen. Das Pellet wird in 2%ige KMnO₄-Lösung aufgenommen und über Nacht darin inkubiert. Nach fünf bis achtmaligem Waschen wird das KMnO₄ vollständig abgenommen. Die Sporen werden in 1%iger Agarose eingebettet. Dann werden die Proben mit ansteigenden Konzentrationen von Ethanol entwässert. Die entwässerten Agarblöckchen werden Propylenoxid und EPON eingebettet. Dünnschnitte werden mit einem Ultramicrotom EM UC6 Ultracut (Leica) angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Proben werden mit einem Phillips Tecnai Elektronenmikroskop bei 80kV betrachtet und fotografiert.

2.10 Heterologe Expression von *S. coelicolor* Proteinen in *E.coli* BL21 (DE3) (Novagen)

Die Expression, Aufreinigung und Untersuchung von His-Pkal, MreC-S-Tag und PBP2-S-Tag basiert auf der Methode von Molle, Leiba et al. (2010) mit einem leicht veränderten Protokoll.

2.10.1 Test auf Löslichkeit der exprimierten Proteine

Zweimal 50ml einer *E. coli* Kultur, mit dem jeweiligen Plasmid zur Expression des zu untersuchenden Proteins, werden bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,6–0,8 inkubiert. IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5mM wird zugegeben um die Expression des T7-Polymerasegens zu induzieren. Dieses kann die Gene der zu untersuchenden Proteine induzieren, welche durch einen T7-Promotor kontrolliert werden. Nach 30min wird die eine Kultur geerntet, die zweite nach 120min. Die Zellen werden bei 4600rpm und 4°C (Heraeus Multifuge) abzentrifugiert und in 5 ml Waschpuffer zur Proteinaufreinigung gelöst. Es wird Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 100µg/ml und 0,5ml 1% TritonX100 zugegeben. Die Zellen werden für 15min bei 30°C in einem Schüttler (Infors Multitron, 180 rpm) inkubiert. Anschließend wird die ausgetretene DNA kurz mit dem Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls HD 2070, Bandelin) geschert um die Viskosität zu verringern. Die Proben werden abzentrifugiert (Sorvall RC6 plus, 5000G, 5min, 4°C). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird abgenommen und das Pellet mit den Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen wieder in 5ml Waschpuffer resuspendiert. Die Proben können nun mittels SDS-PAGE weiter untersucht werden.

2.10.1 Expression und Aufreinigung von His-Pkal aus *E. coli* BL21 (DE3)

His-Pkal wird mit N-terminalem His-Tag in den *E. coli* Stämmen Duet-Pkal, Duet-Pkal-MreC und Duet-Pkal-PBP2 exprimiert. Um His-PKal aus einem der Stämme aufzureinigen, wird eine Kolonie des jeweiligen Stammes in 50ml LB⁺-Medium mit Spectinomycin über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag werden 2ml der Übernachtskultur in 400ml LB⁺-Medium mit Spectinomycin überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,6–0,8 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,5mM wird die Expression des T7-

Polymerasegens induziert. Wird dieses exprimiert, wird auch *his-pkal* exprimiert, da dieses unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Die Kultur wird nach der IPTG-Zugabe noch für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (Sorvall RC6 plus, 5000G, 5min, 4°C), in ca. 10-20ml eiskaltem Zellaufschlusspuffer^{His} resuspendiert und mit dem Precellys-Homogenisator aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Proteine werden durch Zentrifugation (Sorvall RC6 plus, 20min, 39000G, 4°C) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wird durch einen Sterilfilter (0,2µm) filtriert und auf eine äquilibrirte Ni-NTA Superflow gravity flow column (IBA) geladen. Die Säule wird mit 5 x 2ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit 4 x 1ml Elutionspuffer. Dabei wird His-Pkal durch kompetitive Verdrängung durch Imidazol wieder von der Ni-NTA-Säule gelöst. Die Säule wird nach der Elution wieder mit Waschpuffer regeneriert. Die Fraktionen aus der Elution werden mittels SDS-PAGE untersucht.

2.10.2 Expression und Aufreinigung von MreC-S-Tag und PBP2-S-Tag aus *E. coli* BL21 (DE3)

Die S-Tag-Fusionsproteine mit C-terminalem S-Tag werden in den *E. coli* Stämmen Duet-MreC, Duet-Pkal-MreC und Duet-Pkal-PBP2 exprimiert. Um ein S-Tag-Fusionsprotein aus einem der Stämme aufzureinigen, wird eine Kolonie des jeweiligen Stammes in 50ml LB⁺-Medium mit Spectinomycin über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag werden 2ml der Übernachtskultur in 400ml LB⁺-Medium mit Spectinomycin überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,6–0,8 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,5mM wird die Expression des T7-Polymerasegens induziert. Wird diese exprimiert, wird auch das S-Tag-Fusionsprotein gebildet, da das entsprechende Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Die Kultur wird nach der IPTG-Zugabe noch für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (Sorvall RC6 plus, 5000G, 5min, 4°C), in ca. 10-20ml eiskaltem Zellaufschlusspuffer^{S-Tag} resuspendiert und mit dem Precellys-Homogenisator aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Proteine werden durch Zentrifugation (Sorvall RC6 plus, 20min, 39000G, 4°C) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wird durch einen Sterilfilter (0,2µm) filtriert. Währenddessen werden 4ml

S-Agarose in eine Ultrafree-CL-Säule (Merck-Millipore) gegeben und der wässrige Anteil durch Zentrifugation bei 500G für 2min bei 4°C (Heraeus Multifuge) abzentrifugiert. Die Säule wird mit ca. 10ml Wasch/Binde-Puffer äquilibriert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird auf die mit S-Agarose beladene Säule gegeben und durch auf- und abpipettieren mit dieser durchmischt. Dann wird die Säule wieder bei 500G für 2min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wird wiederholt bis der gesamte proteinhaltige Überstand auf die Säule aufgetragen ist. Die Säule wird anschließend mit ca. 20ml Wasch/Binde-Puffer und Zentrifugation bei 500G für 2min und 4°C gewaschen. Die gebundenen Proteine werden mit insgesamt 10ml 3M MgCl₂ bei 500G für 2min und 4°C eluiert. Das Eluat wird danach in einem Amicon Ultra 15 (Merck-Millipore) Zentrifugationsfilter mit einem Cut off von 10000MW für eine Stunde bei 5000G und 4°C zentrifugiert. Um das MgCl₂ möglichst vollständig zu verlieren werden 10ml Wasch/Binde-Puffer zugegeben und noch einmal für eine Stunde bei 5000G bei 4°C zentrifugiert. Die Proteine werden mit 1ml Wasch/Binde-Puffer vorsichtig von der Filtermembran abgelöst und in ein ERG überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Da PBP2-S-Tag nur unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden kann, enthalten alle Puffer (bis auf die Elutionslösung) zur Aufreinigung von PBP2-S-Tag 6M Harnstoff.

Die S-Agarose kann durch das waschen mit reichlich Wasch/Binde-Puffer wieder regeneriert werden und in Wasch/Binde-Puffer im Kühlschrank gelagert werden.

2.10.3 Expression und Aufreinigung von CRP-Strep aus *E. coli* BL21 (DE3)

CRP-Strep wird mit C-terminalem Strep-Tag in den *E. coli* Stämmen Duet-Pkal/CRP und Duet-Pkal-MreC/CRP exprimiert. Um das Strep-Tag-Fusionsprotein aus einem der Stämme aufzureinigen, wird eine Kolonie des jeweiligen Stammes in 50ml LB-Medium mit Spectinomycin und Ampicillin über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag werden 2ml der Übernachtskultur in 400ml LB-Medium mit Spectinomycin überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,6–0,8 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,5mM wird die Expression des T7-Polymerasegens induziert. Wird dieses

exprimiert, wird auch *his-pkal* bzw. *his-pkal* und *mreC-S-Tag* exprimiert, da diese unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Die Expression von *CRP-Strep* wird durch die Zugabe von Rhamnose mit einem finalen Anteil von 0,02% im Medium induziert. Die Kultur wird nach der IPTG- und Rhamnosezugabe noch für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (Sorvall RC6 plus, 5000G, 5min, 4°C), in ca. 10-20ml eiskaltem Zellaufschlusspuffer^{Strep-Tag} resuspendiert und mit dem Precellys-Homogenisator aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Proteine werden durch Zentrifugation (Sorvall RC6 plus, 20min, 39000G, 4°C) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wird durch einen Sterilfilter (0,2µm) filtriert. Das Lysat wird mit einem Äkta Purifier (GE Healthcare) mit einer StrepTrap HP 1ml Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Alle Fraktionen werden gesammelt und in einer SDS-PAGE analysiert.

2.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gele

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen bezüglich ihres Molekulargewichtes (Laemmli 1970). SDS (Sodiumdodecylsulfat), ein anionisches Detergenz, belagert das denaturierte Protein und lädt es negativ. Die Eigenladung des Proteins geht dadurch verloren. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide. Aus diesem Grund ist die Auftrennung der denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld möglich. Proteinproben (25 µl) werden hierzu 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Davon werden 10-20 µl jeder Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proteinproben wandern unter 20-60 mA ins Proteingel (Sammelgel 6%, Trenngel 12,5%) ein und werden anhand ihres Molekulargewichts im Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung ist es erforderlich, einen sogenannten Marker aufzutragen. Dabei handelt es sich um ein Proteingemisch, von welchem die Größen jedes einzelnen Proteins klar definiert sind. Als Marker wird Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermofisher) verwendet.

2.10.5 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 beruht auf der unspezifischen Bindeeigenschaft des Farbstoffs an Proteinen (Switzer *et al.*, 1979). Dabei bilden sich zwischen Farbstoff und Protein nicht-kovalente Komplexe aus. Das Gel wird in Lösung A für ca. 3 min in einer mikrowellenbeständigen Gefäß bei 600Watt erhitzt und ebenso mit 10%iger Essigsäure 3min entfärbt. Anschließend werden der noch heißen Lösung kleine Zellstoffstücke zugegeben, die den Rest des Farbstoffes aufnehmen. Ist keine Hintergrundfärbung mehr zu erkennen, kann das Gel fotografiert werden.

2.10.6 Qualitative Phospho-Serin/Threonin/Tyrosin-Detektion im SDS-Gel

Für den qualitativen Nachweis der Phosphorylierung eines Proteins wird der Farbstoff ProQ Diamond (Molecular Probes) verwendet. Die Färbung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Visualisierung wird das Gel auf einem Typhoon Trio+ (GE Healthcare) mit dem grünen Laser (532nm) durch den 555nm BP Filter gescannt.

2.10.7 Protein-Blots

2.10.7.1 Elektroblob

Für die Durchführung eines E-Blots (Elektroblob) wurde die Semi-Dry-Blot-Apparatur SEDEC M (peqlab) mit der Spannungsquelle EV202 (peqlab) verwendet. Die Nitrocellulosemembran wird zu Beginn mit H₂O benetzt und in E-Blot mit 6 Whatman-Papieren gleicher Größe für mehrere Minuten inkubiert. Auf die Anode der Semi-Dry-Blot-Apparatur werden zuerst drei Whatman-Papiere, dann die Membran und im Anschluss daran das Gel belegt. Abgeschlossen wird der Aufbau von drei weiteren Whatman-Papieren. Etwaige Luftblasen werden durch Walzen mit einem runden Gegenstand (z.B. Glaspipette) entfernt, überschüssiger Transferpuffer abgenommen und der Kathoden-beinhaltende Deckel aufgebracht. Der Blot erfolgt je nach Proteingröße bei 400mA, 25V und 300W für 30-60 min. Die Membran kann im Anschluss daran entwickelt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit die Membran in Alufolie für mehrere Wochen bis zur weiteren Entwicklung bei 4°C aufzubewahren.

2.10.7.2 Immunoblot (Westernblot)

Der Immunoblot ermöglicht es, die Echtheit verschiedener Proteine durch spezifische Antikörperreaktionen nachzuweisen. Hierfür werden die zu analysierenden Proteine in der Regel in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Anschluss daran in dieser Arbeit auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (s. Elektroblot). Darauffolgend wird die Membran in 5%iger Milchpulverlösung in TBST für eine Stunde bei RT schaukelnd geblockt. Anschließend wird dreimal mit 1%iger Milchpulverlösung in TBST für jeweils 5min gewaschen und der Blot mit dem Antikörper (Anti-S-Tag- und Anti-Strp-Tag-Antikörper sind HRP-konjugiert) ebenfalls in 1%iger Milchpulverlösung in TBST bei RT für eine weitere Stunde schaukelnd inkubiert. Im Anschluss daran wird nochmals mit 50mM Tris/HCl pH=7,5 Puffer für 20-40min gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgt mit Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) Lösungen nach Angaben des Herstellers und wird auf einer Molecular Imager ChemiDoc XRS System (BioRad).

2.11 Die Suche nach Interaktionspartnern mit dem BTH unter Einfluss der eSTPK PkaI

Enthalten die adenylatzyklasedefizienten *E. coli* BL21(DE3) Δ *cya*-Zellen zwei Plasmide mit interagierenden Fusionsproteinen, so wird die Adenylatzyklaseaktivität wiederhergestellt und die Zellen können Maltose, bzw. Lactose verstoffwechseln und β -Galaktosidase exprimieren. Um zu testen ob die gleichzeitige Expression der eSTPK PkaI einen Einfluss auf diese Interaktion hat, werden die Zellen neben den zu untersuchenden pKT25- und pUT18c-Konstrukten außerdem entweder mit dem Plasmid pDuet-PkaI oder dem leeren pDuet transformiert. β -Galaktosidaseaktivität wird mit Hilfe des Substrats X-Gal nachgewiesen.

Der adenylatzyklasedefiziente *E. coli*-Stamme BL21(DE3) Δ *cya* wird mit den beiden Vektoren (pUT18c-Y und pKT25-X) transformiert. 50 μ l elektrokompente BL21(DE3) Δ *cya*-Zellen werden mit jeweils 1 μ l Plasmid-DNA (Qiagen-Lyse) pKT25-X, pUT18c-Y und pDuet bzw. pDuet-PkaI wie oben beschrieben transformiert. Die Transformanten werden auf je einer LB-Agarplatte, welche die drei Selektionsantibiotika (Ampicillin, Kanamycin und Spectinomycin) enthält, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Transformanten werden gepickt und in 5ml LB⁺-Medium über

Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wird die OD₅₇₈ der Kulturen ermittelt. Die Kulturen werden mit LB⁺-Medium auf eine OD₅₇₈=1 verdünnt. 1ml der Kulturen mit OD₅₇₈=1 wird bei 4°C für 3min bei 5000rpm (Eppendorf Centrifuge 54R) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird noch einmal wiederholt. Anschließend werden je 2µl der Kulturen auf eine M63-Agarplatte mit X-Gal, Maltose und IPTG aufgetropft. Auf dem Indikatormedium M63-X-Gal-Agar (enthält 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galacto-pyranosid, ein chromogenes Substrat für die β-Galaktosidase; bei β-Galaktosidaseaktivität entsteht eine Blaufärbung) wird die Interaktion durch Blaufärbung sichtbar gemacht. Die Kulturen mit den gleichen pKT25- und pUT18c-Konstrukten werden nebeneinander aufgetropft, um den Einfluss von P_{kal} direkt mit der Kontrolle mit leerem pDuet-Plasmid vergleichen zu können. Die Platten werden drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit werden die Veränderungen auf den Platten durch Fotos dokumentiert.

2.12 Massenpektrometrische Analyse der Modifikationen von MreC und PBP2 und des Phosphoproteoms von *S. coelicolor*

2.12.1 Phosphoproteomanalyse

2.12.1.1 Proteomisolation

Um das Gesamtproteom von dem jeweiligen Stamm von *S. coelicolor* zu isolieren, werden zehn MS-Agarplatten mit Cellophanscheiben belegt und auf diesen jeweils 3x10⁷ Sporen des jeweiligen Stammes ausplattiert. Die Platten werden bei 30°C bis zum Zeitpunkt der Untersuchung inkubiert.

Für den Aufschluss wird das Myzel von je einer Platte in ein FastPrep-Gefäß mit Glasperlen überführt und 1ml Lysepuffer^{Proteom} dazugegeben. Anschließend werden die Proben fünfmal im Precellys-Homogenisator (peqlab) mit dem Programm 2 (6500rpm, 2x20s) aufgeschlossen. Die Proben werden 15min bei 10000G und 4°C (Eppendorf Centrifuge 54R) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmer zu präzipitieren. Die Präzipitation der Proteine erfolgt nach der Methode von Yague, Rodriguez-Garcia et al. (2013). Die Proteine im Überstand werden durch

die Mischung mit eiskaltem Ethanol und Aceton (Verhältnis Probe/Ethanol/Aceton= 1:4:4 v/v/v) und die Lagerung über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die ausgefallenen Proteine werden für 20min bei 2000rpm und 4°C (Heraeus Multifuge) abzentrifugiert und zweimal mit eiskaltem H₂O/Ethanol/Aceton (Verhältnis 1:2:2 v/v/v) gewaschen.

Die ausgefallenen Proteine werden in 1-2ml H₂O resuspendiert und in einem Dialyseschlauch (ZelluTrans MWCO 8000-10000, Roth) für eine Stunde gegen 5l H₂O (mit vier Wasserwechseln) bei 4°C dialysiert. Die gereinigten Proteine werden anschließend in einem 50ml Falcontube für 30min bei -80°C eingefroren. Der Deckel des Falcontube wird mit einem Loch versehen und in der vorgekühlten Lyophylle (Lyovac GT 2, Leybold-Heraeus) gefriergetrocknet.

2.12.1.2 Proteinverdau

Für die Proteomanalyse werden 3mg Protein auf ein NuPAGE Bis-Tris 4%–12% Gradientengel (Invitrogen) geladen. Die Probe wird ca. 1cm in das Gel einlaufen gelassen, gestoppt, mit Coomassie gefärbt und im Gel mit Trypsin verdaut (Borchert, Dieterich et al. 2010). Anschließend wird das Gel fertig laufen gelassen. Die Peptide werden extrahiert (Borchert, Dieterich et al. 2010) und mit C18 StageTips (Rappsilber, Mann et al. 2007) entsalzt.

2.12.1.3 Phosphopeptidanreicherung

Die Phosphopeptidanreicherung und Phosphoproteomanalyse wird nach dem Protokoll von Olsen and Macek (2009) mit kleinen Modifikationen: Die Elution von den Beads wird dreimal mit 100µl 40% Ammoniumhydroxidlösung in 60% Acetonitril (pH>10,5) durchgeführt. Die Anreicherung der Phosphopeptide wird in fünf aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt. Die Peptide werden mit C18 StageTips (Rappsilber, Mann et al. 2007) entsalzt. Die Eluate werden vereinigt und der LC-MS/MS-Analyse unterzogen.

2.12.1.4 Massenspektrometrie für die Phosphoproteomanalyse

Die LC-MS/MS-Analysen werden mit einer EasyLC II nano-HPLC (Proxeon Biosystems) verbunden mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Scientific) wie bei Carpy, Krug et al. (2014) durchgeführt. Die Peptide werden in der

HPLC-Lösung A (0,5%ige Essigsäure) bei einer Flussrate von 500nl/min auf die Säule gegeben. Anschließend werden die Peptide mit einem 216min langen Gradienten von 5-33% der HPLC-Lösung B (80% Acetonitril in 0,5%iger Essigsäure) mit einer Flussrate von 200nl/min wieder eluiert. Für die Proteomanalyse werden die fünf intensivsten Vorläuferionen jedes Zyklus' fragmentiert und erhalten so hochauflösende HCD MS/MS Spektren. Die Fragmentierung erfolgte mittels mehrstufiger Aktivierung von Neutralverlustionen bei -98, -49 und -32,6 Th relativ zu dem Vorläuferion (Schroeder, Shabanowitz et al. 2004). In allen Messungen werden die sequenzierten Vorläufermassen für 90s von der weiteren Auswahl ausgeschlossen. Die Zielwerte für die MS/MS Fragmentierung sind 5000 Ladungen und 10^6 Ladungen für einen MS Scan. Die Messungen werden als drei technische Replikate durchgeführt.

2.12.1.5 MS Datenverarbeitung

Die MS-Daten werden mit den voreingestellten Parametern der Software MaxQuant (Version 1.2.2.9) (Cox and Mann 2008) verarbeitet. Für die Datenbankabfrage wird die Suchmaschine Andromeda verwendet (Cox, Neuhauser et al. 2011). Die MS/MS-Spektren werden gegen die Zieldatenbank, bestehend aus 8038 Proteineinträgen aus der uniprot-*Streptomyces coelicolor* Datenbank und 248 häufig beobachteten Kontaminanten.

Für die Datenbankabfrage wird die ganze tryptische Spezifität benötigt und bis zu zwei nicht geschnittene Schnittstellen sind erlaubt. Die Carbaimdomethylierung von Cystein wird als fixe Modifikation angenommen, die N-terminale Acetylierung von Proteinen, die Oxidation von Methionin und die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin werden als variable Modifikation angenommen. Die ursprüngliche Vorläufermassentoleranz wird auf 6 parts per million (Teile pro Millionen Teile; ppm) eingestellt und bei einem Fragmentenlevel von 0,5 Dalton (Da) auf CID-Fragmentierung und bei 20ppm auf HCD-Fragmentierung eingestellt.

2.12.2 Massenspektrometrische Analyse der Modifikationen von MreC und PBP2

Die Proben werden ein NuPAGE Bis-Tris 4%-12% Gradientengel (Invitrogen) laufen gelassen und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die zu untersuchenden Banden werden mit Trypsin oder GluC im Gel verdaut, wie bei Borchert, Dieterich et al. (2010) beschrieben. Die LC-MS-Analyse der Peptide wird mit einer EasyLC nano-HPLC (Proxeon Biosystems), welche an ein LTQ Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Scientific) wie bei Conzelmann, Williams et al. (2013) durchgeführt. Die Auswertung der MS-Daten erfolgt mit der Software MaxQuant (Version 1.2.2.9) (Cox and Mann 2008). Sie werden mit der Andromeda Suchmaschine (Cox, Neuhauser et al. 2011) mit der *E. coli* Datenbank mit 4311 Proteinen, den bekannten Sequenzen der getaggten und überexprimierten Proteine, sowie 248 häufig beobachteten Kontaminanten verglichen. Trypsin und GluC werden als Proteasen eingestellt und bis zu zwei nicht geschnittene Schnittstellen sind erlaubt. Die Carbamidomethylierung von Cystein wird als fixe Modifikation angenommen, die N-terminale Acetylierung von Proteinen, die Oxidation von Methionin und die Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin werden als variable Modifikation angenommen. Die ursprüngliche Vorläufermassentoleranz wird auf 6 parts per million (Teile pro Millionen Teile; ppm) beim Vorläuferion und 20ppm beim Fragmentionenlevel eingestellt. Die Ergebnisrate an falschpositiven Ergebnissen wird bei Peptid-, Phosphorylierungsstellen- und Proteingruppenlevel auf 1% gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 in silico Analyse des Gens *pkaI* und des Genclusters *pkaH-pkaJ* aus *S. coelicolor*

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob, und wenn ja wie, das Gen *pkaI* in die Sporulation und die verstärkte Sporenwandsynthese von *S. coelicolor* involviert ist. Über das Gen und das daraus abgeleitete Protein PkaI ist bislang nur wenig bekannt. Mittels verschiedener Datenbanken und Onlinetools sollten Ähnlichkeiten zu charakterisierten Proteinen untersucht werden und auch ob Orthologe des Gens in anderen Streptomyceten vorhanden sind. Da das Gencluster aus fünf eSTPK-Genen, in welchem sich *pkaI* befindet, ungewöhnlich ist und auch an der Sporenwandsynthese beteiligt sein könnte, sollte auch das gesamte Cluster *in silico* mit anderen Streptomycetengenomen verglichen werden.

3.1.1 Das Gen *pkaI* und das daraus abgeleitete Protein PkaI

Die eSTPK PkaI aus *S. coelicolor* wird durch das Gen *pkaI* (*sco4778*) kodiert. Das Gen ist 1142 bp lang. Das daraus abgeleitete Protein PkaI hat mit einer Länge von 380 Aminosäuren ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 39362 Da und einen pI von 8,72.

Ein Vergleich mit der Onlinedatenbank für Proteindomänen Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) sagte voraus, dass PkaI eine Proteinkinasedomäne besitzt, welche von Aminosäure 18-272 reicht. Eine genauere Analyse der Kinasedomäne lieferte das Webtool Batch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi?>) auf der NCBI Homepage. Sie zeigte, dass alle hochkonservierten Aminosäurereste in den Motiven der ATP-Bindestelle, der Dimerisierungsdomäne, im Aktiven Zentrum, der Substratbindestelle und in der Aktivierungsschleife zu 100% mit denen der "Musterkinase" PknB aus *M. tuberculosis* übereinstimmen. Eine Blastp Analyse der Kinasedomäne von PkaI im Vergleich mit PknB ergab eine Aminosäureidentität von 36% und eine Ähnlichkeit von 53% der Aminosäuren.

Zusätzlich konnte mit dem Webtool TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) eine Transmembranhelix zwischen den Aminosäuren 305-327 vorhergesagt werden.

3.1.2 Das Gencluster *pkaH-pkaJ* aus *S. coelicolor* im Vergleich mit anderen Streptomyceten

Das Gencluster *pkaH-pkaJ* (*sco4775-sco4779*) stellt den einzigen Ort im Genom von *S. coelicolor* dar an welchem fünf eSTPK Gene hintereinander liegen. Aufgrund dieser Tatsache wurde untersucht, ob die Gene *pkaH-pkaJ* und ihre Anordnung in Streptomyceten konserviert sind.

Für diese Analyse wurden orthologe Gencluster mit der Onlinedatenbank Integrated Microbial Genomes (img.jgi.doe.gov) in den verfügbaren Streptomycetengenomen gesucht. In über 100 Streptomycetengenomen konnte das gesamte Gencluster gefunden werden. Die orthologen Gene und Regionen in den Genomen der Streptomyceten *S. scabies*, *S. avermitilis*, *S. griseus* und *S. venezuelae* wurden mittels der Onlinedatenbank StrepDB genauer untersucht.

Das gesamte Cluster kommt auch in den Arten *S. scabies* und *S. avermitilis* vor (Abb. 3.1). Während im Genom von *S. scabies* die Orthologen der Gene *sco4776* und *pkaI* nicht als eSTPK annotiert sind, wurden in *S. avermitilis* alle fünf orthologen Gene als eSTPK annotiert. In beiden Genomen haben die orthologen Gene die gleiche Reihenfolge wie die Gene in *S. coelicolor*. Bei *S. avermitilis* ist das Gen *sav_5009* zwischen die Orthologen von *pkaI* und *pkaJ* inseriert. Das Gen *sav_5009* kodiert für ein putatives Protein mit unbekannter Funktion. In den Arten *S. griseus* und *S. venezuelae* dagegen sind nur die Gene *pkaH*, *sco4776* und *pkaD* vorhanden (Abb. 3.1). Auch diese orthologen Gene haben die gleiche Anordnung wie die entsprechenden Gene in *S. coelicolor*.

Interessanterweise befindet sich in allen Fällen vor dem Ortholog von *pkaH* ein Gen für eine Glycerinphosphat Dehydrogenase (Abb. 3.1). Im Fall von *S. coelicolor* ist dies das Gen *sco4774*, bei *S. scabies* das Gen *glpA*, bei *S. avermitilis* das Gen *glpD* (hier liegt zusätzlich noch das Gen *ampC* für die β -Lactamase AmpC in

3. Ergebnisse

entgegengesetzter Leserichtung zwischen *glpD* und dem *pkaH* Ortholog *pkn18*), bei *S. griseus* das Gen *glpA* und bei *S. venezuelae* das Gen *sven_4458*.

Streptomyces coelicolor

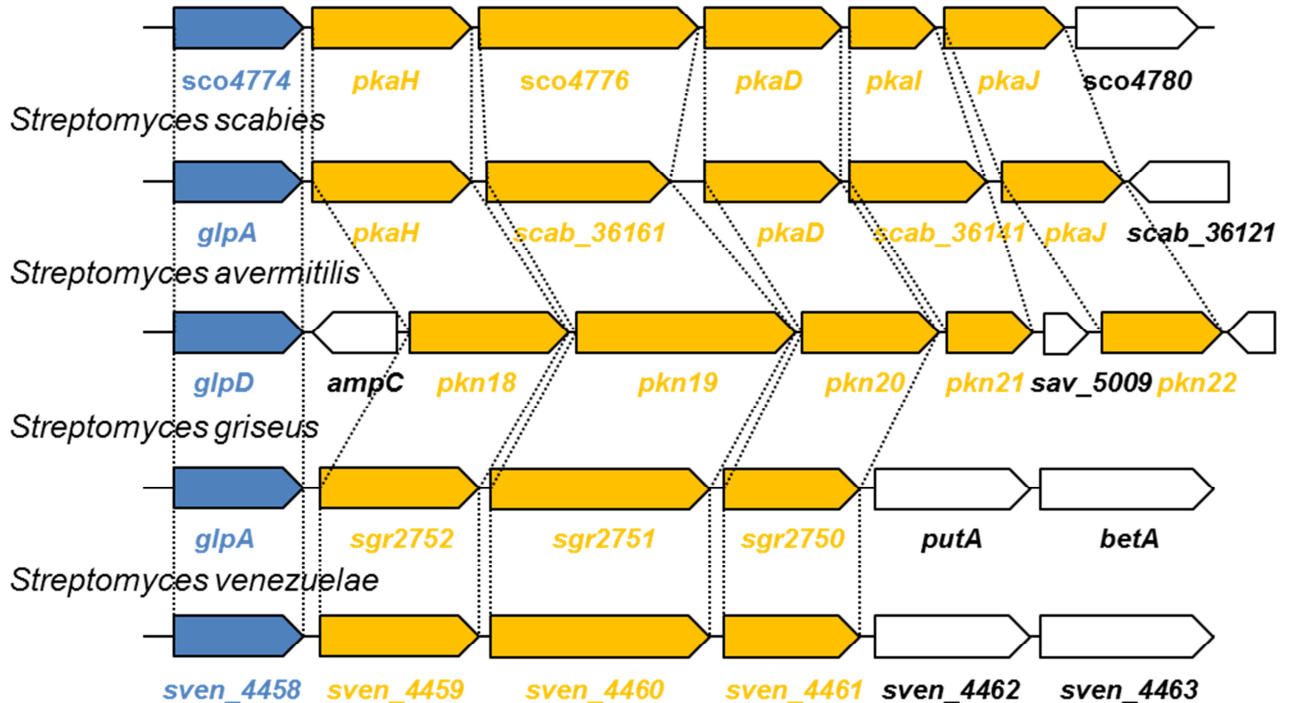


Abbildung 3.1: Organisation der Genregion *pkaH-pkaJ* in *S. coelicolor* und orthologer Genombereiche in anderen Streptomyceten: Schematische Darstellung der Gene *pkaH-pkaJ* und der flankierenden Gene in *S. coelicolor* und der orthologen Gene in *S. scabies*, *S. avermitilis*, *S. griseus* und *S. venezuelae*. Die Gene für die Glycerinphosphat Dehydrogenase sind jeweils durch die blauen Pfeile markiert und blau beschriftet. Gene für eSTPKs sind durch die gelben Pfeile markiert und gelb beschriftet. Andere Gene sind durch die weißen Pfeile markiert und schwarz beschriftet.

3.2 Untersuchung des Expressionsprofils von *pkaI* und des eSTPK Clusters *pkaH-pkaJ*

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt das Gen *pkaI* (*sco4778*) und die weiteren eSTPK-Gene *pkaH* (*sco4775*), *sco4776*, *pkaD* (*sco4777*) und *pkaJ* (*sco4779*) in M145 exprimiert werden, wurden semiquantitative RT-PCR Experimente durchgeführt. Um einen möglichst guten Überblick über die Expression während des gesamten Lebenszyklus von *S. coelicolor* zu erhalten, wurden die Kulturen für 24, 48, 96 bzw. 168 Stunden auf Festmedium inkubiert. Die Proben wuchsen auf Zellophanscheiben, welche auf MS-Agarplatten lagen. Aus den Proben wurde RNA isoliert und diese dann mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zum spezifischen Nachweis der Transkripte wurden Primerpaare designt, welche innerhalb der ersten 300 bp des jeweiligen Transkripts binden und die in der PCR spezifische Fragmente von 200-250 bp Länge produzierten. Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der zum Umschreiben eingesetzten RNA-Proben wurde ein Primerpaar verwendet, welches innerhalb des 16s rRNA Gens band.

3.2.1 Untersuchung des Expressionsprofils von *pkaI* und des eSTPK Clusters *sco4775-4779* im Wildtyp M145 mittels semiquantitativer RT-PCR

Die Expression von *pkaH* konnte in M145 nicht eindeutig gezeigt werden. Die Funktionalität des Primerpaars wurde im Kontrollexperiment bestätigt. Das *sco4776* spezifische Fragment konnte dagegen zu allen Zeitpunkten sehr gut amplifiziert werden. Die Expression war in den Proben zu allen Zeitpunkten konstant. Die Expression von *pkaD* konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Die Menge des *pkaD* Fragments nahm nach 96 Stunden verglichen mit den Proben nach 24 und 48 Stunden deutlich ab.

Die Expression von *pkaI* war in der 24-Stunden-Probe am stärksten. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten war deutlich weniger amplifiziertes Fragment zu sehen. Auch für *pkaJ* konnten in allen Proben PCR-Fragmente nachgewiesen werden. In den Proben nahm die Signalstärke mit fortschreitendem Alter der Proben ab. Nach 24 Stunden war ein starkes Signal zu sehen, nach 168 Stunden nur noch ein sehr schwaches.

3. Ergebnisse

Das Kontrollfragment aus dem 16s rRNA Gen wurde hingegen in allen Proben gleichmäßig stark amplifiziert (Abb. 3.2).

Eine Expression des Gens *pkaH* konnte unter den untersuchten Kulturbedingungen nicht nachgewiesen werden. Das Gen *sco4776* zeigte dagegen ein konstante starke Expression während des gesamten Lebenszyklus. Das Experiment zeigte, dass die Gene *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* in M145 ein ähnliches Expressionsprofil aufwiesen. Nach 24 Stunden war das Signal stets am stärksten und nahm im Laufe der Differenzierung ab (Abb. 3.2).

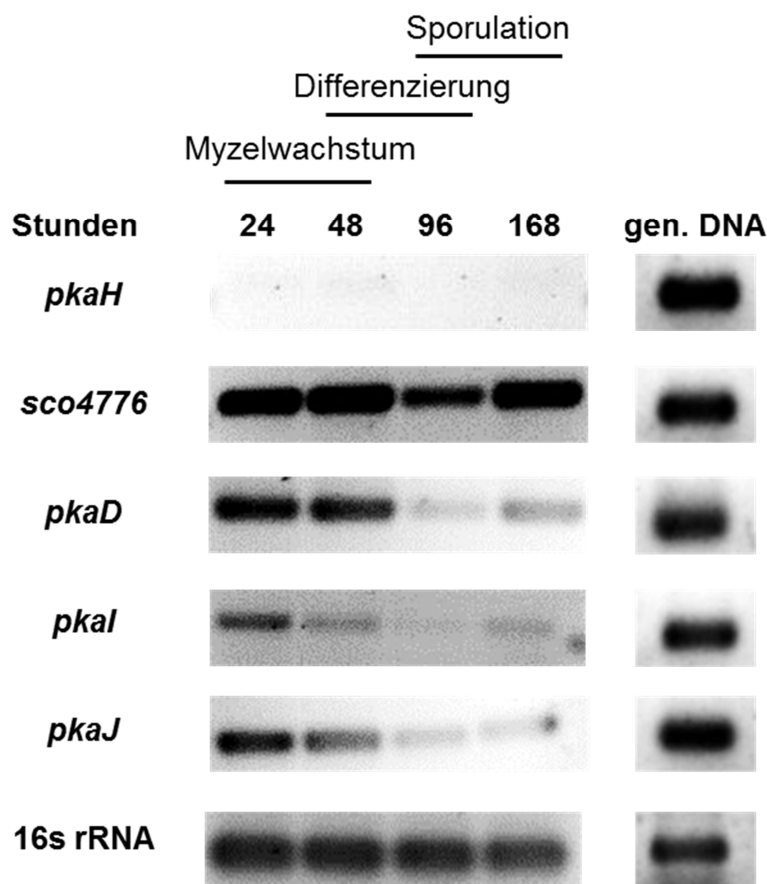


Abbildung 3.2: Untersuchung des Expressionsmusters der Gene des eSTPK Clusters *pkaH-pkaJ* während des Lebenszyklus von *S. coelicolor*: Die Proben wurden auf Zellophanscheiben auf MS-Agarplatten für 24, 48, 96 oder 168 Stunden inkubiert und dann geerntet. Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR und spezifischer Primer für die Gene *pkaH*, *sco4776*, *pkaD*, *pkaI*, *pkaJ* und das 16s rRNA Gen wurden Fragmente amplifiziert und miteinander verglichen. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der Primer wurde unter den gleichen Bedingungen auch mit genomischer DNA (gen. DNA) von *S. coelicolor* eine PCR durchgeführt.

3.2.2 Untersuchung der Operonstruktur des eSTPK Clusters *pkaH-pkaJ*

Alle fünf eSTPK Gene des Clusters hatten die gleiche Orientierung im Genom und es war nicht zu erkennen, dass potentiell regulierte Zielgene der eSTPK Proteine in der direkten Umgebung lagen. Auch war das Expressionsprofil der Gene *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* ähnlich. Dies führte zu der Vermutung, dass es sich bei dem Cluster zum Teil um ein Operon handeln könnte. Alle drei Gene hätten von einer gemeinsamen polycistronischen mRNA codiert sein können. Eine genaue *in silico* Analyse der Gene zeigte (Abb. 3.3), dass zwischen dem Stopcodon von *pkaH* und dem Startcodon von *sco4776* 173 bp liegen. Zwischen *sco4776* und *pkaD* lagen 136 bp, zwischen *pkaD* und *pkaI* 93 bp und zwischen dem Stopcodon von *pkaI* und dem Startcodon von *pkaJ* lagen 173 bp.

Wären alle fünf oder nur einige dieser Gene Teil eines Operons, so gäbe es mindestens eine polycistronische mRNA, welche mindestens einen dieser intergenischen Bereiche abdecken müsste. Das Vorhandensein solcher mRNAs wurde mit Primerpaaren getestet, welche spezifisch die intergenischen Bereiche der eSTPK Gene amplifizieren sollten (Abb. 3.3). Mit jedem der Primerpaare für die vier intergenischen Bereiche wurde je eine PCR mit den verschiedenen cDNA Proben von M145 gemacht. Dabei konnten in keinem Fall Fragmente amplifiziert werden (Abb. 3.3), obwohl diese bei Verwendung genomischer DNA von M145 problemlos erhalten wurden (Abb. 3.3).

Da keiner der intergenischen Bereiche amplifiziert werden konnte, wird jedes eSTPK Gen getrennt transkribiert, somit handelte es sich bei dem eSTPK Gencluster SCO4775-4779 in M145 nicht um ein Operon.

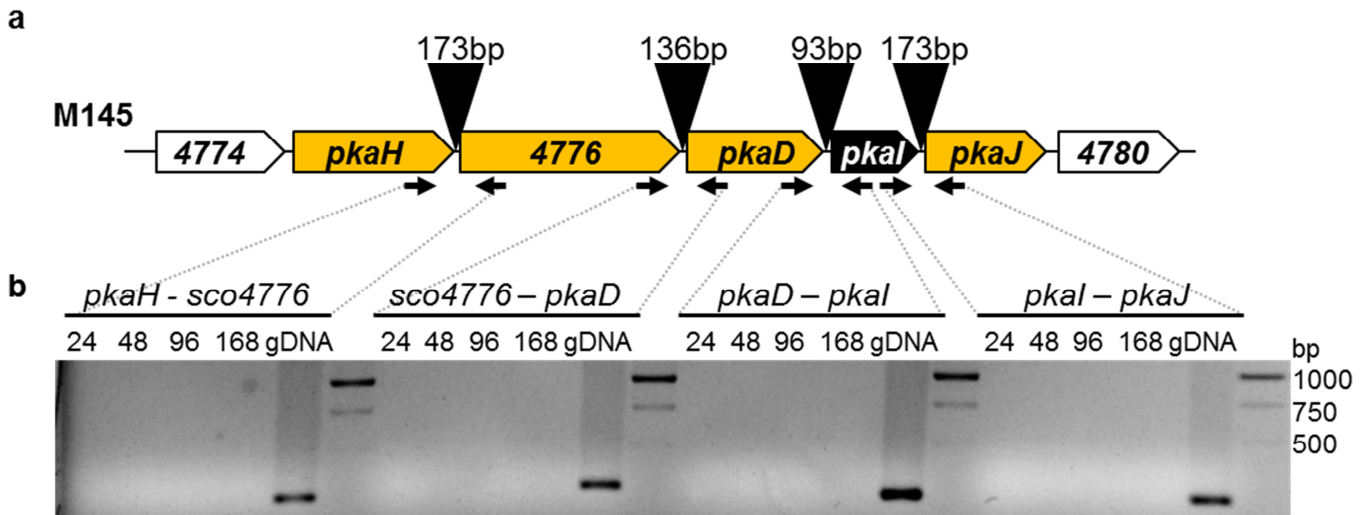


Abbildung 3.3: Organisation der Genregion um das Cluster *pkaH-pkaJ* und Kontrolle auf das Vorhandensein einer polycistronischen mRNA: **a** Schematische Darstellung der Genomregion *sco4774-sco4780* in M145. Die untersuchten intergenischen Bereiche sind durch die schwarzen Dreiecke gekennzeichnet. Die Primer für die PCR sind als schwarze Pfeile eingezeichnet und durch die grauen Linien werden die Paare den entsprechenden Produkten in **b** zugeordnet. **b** Eine PCR mit cDNA von M145 von den Zeitpunkten 24, 48, 96 und 168 Stunden und genomischer DNA (gDNA) von M145 wurde mit Primerpaaren für den intergenischen Bereich zwischen den Genen *pkaH - sco4776*, *sco4776 - pkaD*, *pkaD - pkaI* und *pkaI - pkaJ* durchgeführt. Nur mit genomischer DNA konnten Fragmente amplifiziert werden.

3.3 Konstruktion der Deletionsmutanten NL Δ PakI und NL Δ 4775-4779

Um untersuchen zu können, ob und welche Effekte die putative eSTPK PakI auf die Sporenwandsynthese von *S. coelicolor* hat, sollte das Gen für eine phänotypische Charakterisierung deletiert werden. Da *pkaI* als Teil eines Genclusters aus den fünf hintereinander liegenden eSTPK-Genen *pkaH* (*sco4775*), *sco4776*, *pkaD* (*sco4777*), *pkaI* (*sco4778*) und *pkaJ* (*sco4779*) vorliegt, sollte aufgrund des Wissens um die starke Kreuzreaktivität von eSTPKs (siehe Kapitel 1.3.2, Abb. 1.7) zusätzlich eine Deletionsmutante generiert werden, in welcher das gesamte eSTPK-Cluster deletiert wurde.

3.3.1 Konstruktion der Deletionsmutante NL Δ PakI

Ziel war es, eine markerlose Mutante zu konstruieren, welche anstatt des gesamten Gens *pkaI* nur noch das Start- und das Stopcodon sowie eine Endonucleaseschnittstelle für BamHI enthalten sollte (Abb. 3.4).

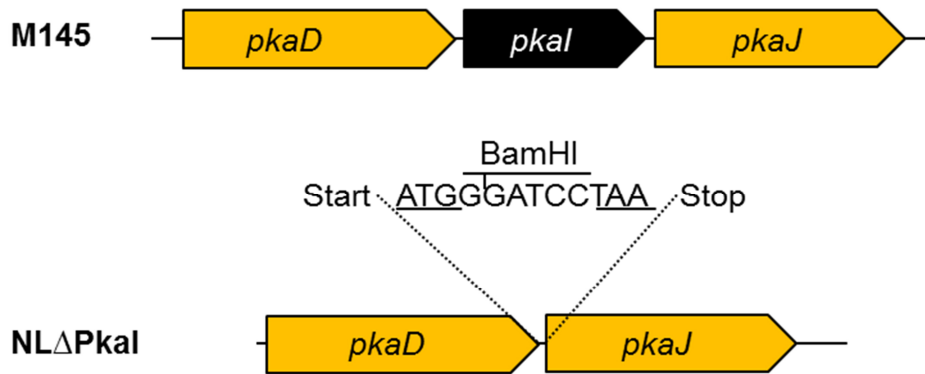


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Genregion um *pkal* in M145 und in der Deletionsmutante *NLΔPkal*: Schematische Darstellung der Genregion *pkaD-pkaJ* in M145 und *NLΔPkal*. Bei *NLΔPkal* ist die Sequenz hervorgehoben, welche nach der Deletion übrig blieb. Markiert ist das übriggebliebene Start-, sowie Stopcodon und die Schnittstelle für die Endonuclease BamHI.

Dafür wurden zunächst Fragmente upstream und downstream des Gens *pkal* mittels PCR amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. coelicolor*. Die PCR-Primer für das 1590 bp große upstream-Fragment wurden so ausgewählt, dass das entstehende Fragment am 3'-Ende das ATG-Startcodon von *pkal* und eine angehängte Schnittstelle für die Endonuclease BamHI enthielt. An den Primer für das 5'-Ende wurde eine EcoRI Schnittstelle angehängt. Die PCR-Primer für das 1640 bp große downstream-Fragment wurden so gewählt, dass das Fragment am 5'-Ende mit dem TGA-Stopcodon startet, an welches ebenfalls eine BamHI Schnittstelle angehängt wurde. Am 3'-Ende wurde eine HindIII Schnittstelle angehängt. Das upstream- und das downstream-Fragment wurden nach einander als EcoRI/BamHI Fragment bzw. als BamHI/HindIII Fragment in den Vektor pA18 kloniert. Im fertigen Konstrukt pA18-KO-4778, welches homologe Bereiche upstream und downstream von *pkal* (*sco4778*) besaß, war das *pkal* Start- und Stopcodon durch eine BamHI-Schnittstelle getrennt. Das Plasmid wurde mit Hilfe des *E. coli* Stamms ET12567 und dem Helferplasmid pUZ8002 nach *S. coelicolor* M145 transferiert. Da es in Streptomyceten nicht replizieren kann, konnte es nur durch homologe Rekombinationsereignisse in M145 etabliert werden. Dabei wird das gesamte Plasmid über einen der homologen Bereiche in das Chromosom von *S. coelicolor* integriert. Durch das auf dem Plasmid kodierte Markergen *aac(3)IV*, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apramycin vermittelt, konnte auf die Integration selektioniert werden.

Durch ein zweites Crossover-Ereignis kann das integrierte Plasmid wieder verloren gehen. Dabei kann es passieren, dass der ursprüngliche genomische Zustand wieder hergestellt wurde oder dass das chromosomale durch das „deletierte“ *pkal* Gen des pA18-KO-4778 ersetzt wird. Um auf das zweite Crossover-Ereignis zu selektionieren, wurden zunächst Sporen von Apramycin-resistenten Klonen isoliert und diese auf Agarplatten ohne Apramycin zu Einzelkolonien ausgestrichen. Anschließend wurden die Einzelkolonien parallel auf Agarplatten mit und ohne Apramycin gestochert. Von Kolonien, die nicht mehr Apramycin-resistent waren, wurde genomische DNA isoliert. Insgesamt wurden mehr als 10.000 Klone auf diese Weise untersucht. Von etwa 50 Klonen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR-Analyse überprüft. Unter Verwendung von Primern, die 528 bp vor dem Startcodon des Gens *pkal* und 154 bp hinter dem Stopcodon banden, wurde ein Fragment amplifiziert. Das mit diesen Primern amplifizierte Fragment wurde „*pkal* Ex“[tern] benannt. Das Fragment „*pkal* Ex“ war im Wildtyp M145 1825 bp groß und in der Deletionsmutante $NL\Delta P_{kal}$ 694 bp groß (Abb. 3.5). In einem zweiten Ansatz wurde ein internes Fragment aus dem Gen *pkal* amplifiziert. Dieses war 710 bp groß und wurde „*pkal* In“[tern] benannt (Abb. 3.5). In $NL\Delta P_{kal}$ war die Amplifikation des Fragments „*pkal* In“ nicht möglich, da *pkal* im Chromosom deletiert wurde.

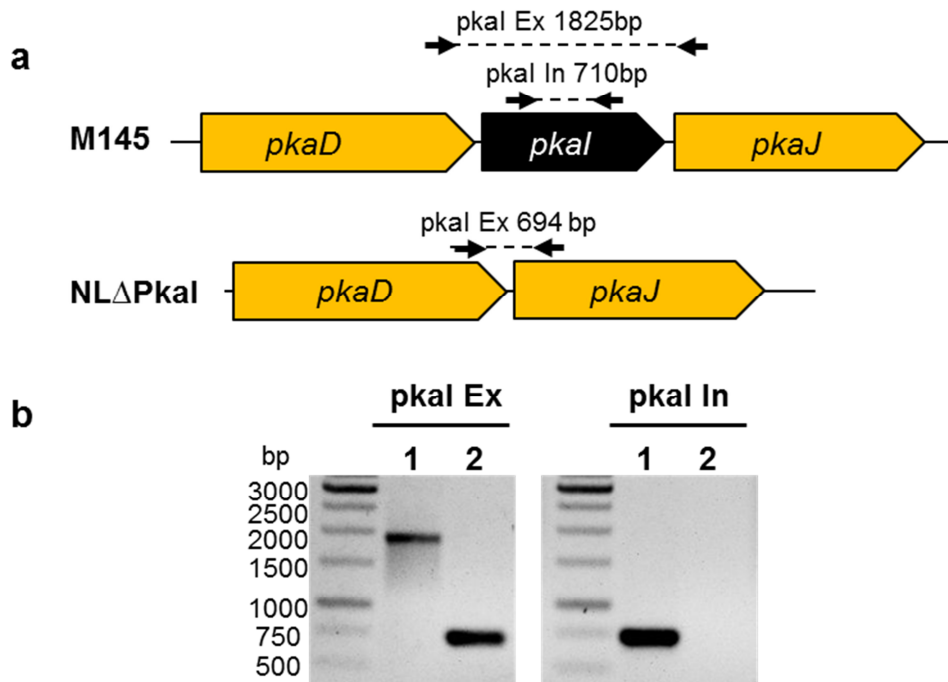


Abbildung 3.5: Organisation der Genregion um *pkaI* und der Nachweis der Mutante NL Δ PkaI mittels PCR: **a** Schematische Darstellung der Genregion *pkaD-pkaJ* in M145 und in NL Δ PkaI. **b** Mit genomischen DNAs von 1= M145, 2= NL Δ PkaI wurden mit den spezifischen Primern (siehe Kapitel 2.1.3) die Fragmente *pkaI Ex* und *pkaI In* amplifiziert. Für das Fragment *pkaI Ex* konnte mit M145 DNA die Bande bei 1825bp und mit NL Δ PkaI DNA die Bande bei 694bp nachgewiesen werden. Für das Fragment *pkaI In* wurde mit M145 DNA die Bande bei 710bp nachgewiesen. Die Primerbindestellen und amplifizierten Fragmente sind in der schematischen Darstellung (**a**) als Pfeile bzw. unterbrochene Linien eingezeichnet.

Für den endgültigen Nachweis der Deletion von *pkaI* wurde zusätzlich ein Southernblot durchgeführt. Hierfür wurden genomische DNA des Wildtyps M145, von den zwei NL Δ PkaI Klonen und Plasmid DNA des Deletionsplasmid pA18-KO-4778 mit der Endonuclease *SmaI* bzw. *ApaI* verdaut. Die Proben wurden mit einer Sonde (DIG-gelabeltes upstream-PCR-Fragment aus dem Deletionsplasmids pA18-KO-4778) hybridisiert. Aufgrund der Deletion von *pkaI* unterscheidet sich das Hybridisierungsmuster von M145 und NL Δ PkaI. Im Fall des *SmaI* Verdau wurden in M145 wie erwartet Banden in der Größe von 1976 bp und 834 bp sichtbar gemacht (Abb. 3.6). In der Deletionsmutante NL Δ PkaI waren die Banden 1203 bp und 834 bp groß (Abb. 3.6). Bei dem zur Kontrolle mit untersuchten Plasmid pA18-KO-4778 wurden wie erwartet Banden in der Größe von 1203 bp und 4765 bp hybridisiert. Auch im *ApaI* Verdau wurde das erwartete Bandenmuster gefunden. Dies waren Banden in einer Größe von 1908 bp im Wildtyp M145, 2216 bp in der Mutante

3. Ergebnisse

NL Δ PakI und 2857 bp im Plasmid pA18-KO-4778 (Abb. 3.6). Durch dieses Experiment konnte die Deletion des Gens *pkal* in der Mutante NL Δ Pkal eindeutig nachgewiesen werden.

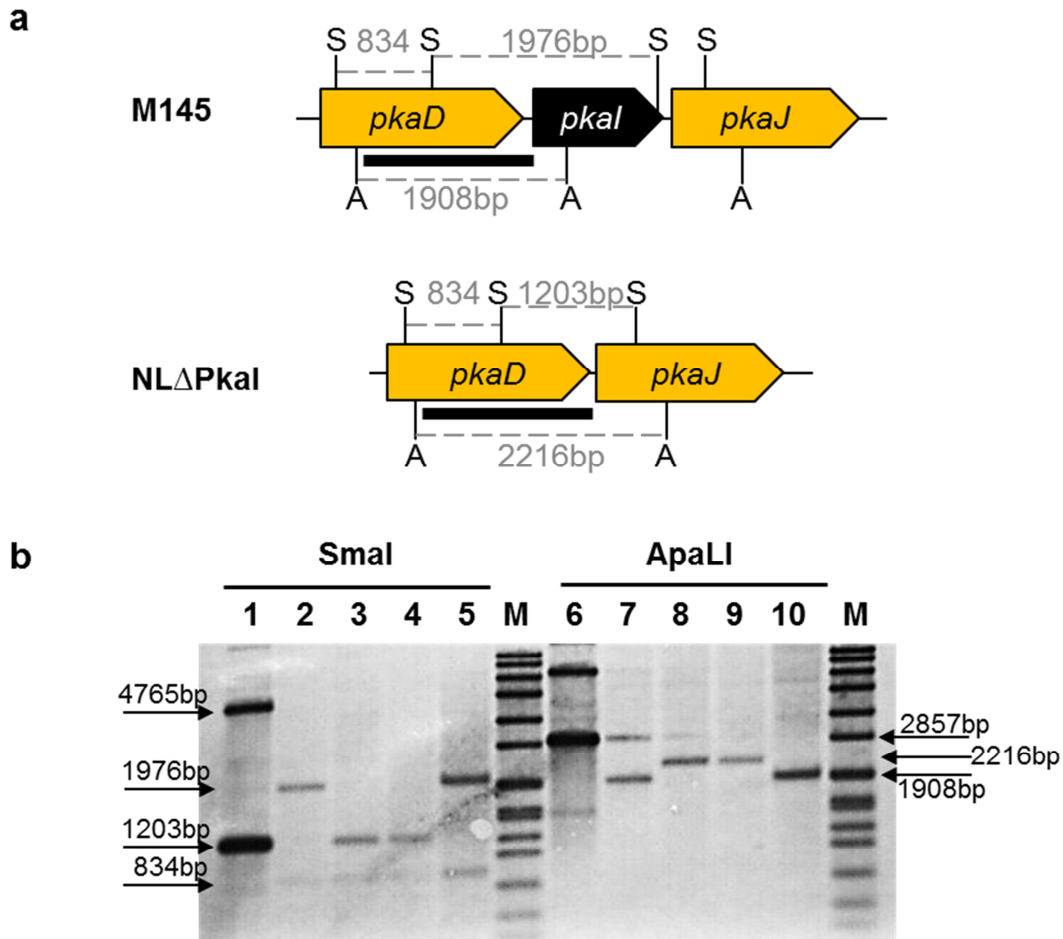


Abbildung 3.6: Organisation der Genregion um *pkal* und Southernblot zur Bestätigung der Mutante NL Δ Pkal: **a** Schematische Darstellung der Genregion *pkaD-pkaJ* in M145 und NL Δ Pkal. Die relevanten Schnittstellen von SmaI (S) und ApaLI (A) sind eingezeichnet. Die Hybridisierungssonde ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die erwarteten Banden sind als gestrichelte Linien in Grau eingezeichnet. Ihre erwartete Größe ist in Grau unterlegt. **b** DNA von pA18-KO-4778, M145 und zwei Klonen von NL Δ PakI wurden mit SmaI (1-5) und ApaLI (6-10) verdaut. 1, 6=pA18-KO-4778; 2, 7=M145; 3, 8= NL Δ Pkal Klon1; 4, 9 = NL Δ Pkal Klon2; 5, 10= M145; M= DIGVII Standard. Die Größe der hybridisierenden Banden ist mit Pfeilen angezeigt. Die Bande bei ~6000bp in Spur 6 ist unverdautes Plasmid. Die Banden bei 2857bp in den Spuren 7+8 sind Folge der Überladung von Spur 6.

3.3.2 Konstruktion der Deletionsmutante NL Δ 4775-4779

Die Deletion des eSTPK Genclusters *sco4775-sco4779* wurde mit der gleichen Methode begonnen wie die oben beschriebene Deletion von *pkaI*. Zunächst wurde das 1536 bp große upstream-Fragment amplifiziert. Der Primer für das 5'-Ende besaß eine angehängte EcoRI Schnittstelle, der Primer für das 3'-Ende eine BamHI Schnittstelle an das ATG Startcodon von *pkaH* (*sco4775*) angehängt. An die Primer für das 1545 bp große downstream-Fragment wurden für den Primer am 5'-Ende, eine BamHI Schnittstelle angehängt und für den Primer am 3'-Ende eine HindIII Schnittstelle. Der 5'-Primer für das downstream-Fragment überlappte nicht mit dem Stopcodon, sondern band 20 bp davor. Grund dafür war, dass aufgrund des hohen GC-Gehaltes von *S. coelicolor* kein mit dem Stopcodon überlappender Primer abgeleitet werden konnte, der in der PCR funktionell war. Die Fragmente wurden nacheinander in den Vektor pA18 kloniert. Im fertigen Konstrukt pK18-KO-4775-4779, welches homologe Bereiche upstream und downstream des Clusters *sco4775-sco4779* besaß, waren das Startcodon von *pkaH* (*sco4775*) und die letzten 23 bp von *pkaJ* (*sco4779*) durch eine BamHI-Schnittstelle verbunden. Das nicht replikative Plasmid wurde mittels Protoplastentransformation nach *S. coelicolor* transferiert. Klone mit integriertem Plasmid wurden auf das auf dem Plasmid kodierte Markergen *aphII*, welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermittelt, selektioniert.

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben wurde durch paralleles Stochern von Einzelkolonien auf das Ereignis eines zweiten Crossovers selektioniert. Dies blieb auch nach mehr als 5000 getesteten Klonen erfolglos.

Deshalb wurde die Strategie geändert und der gesamte homologe Bereich zum Genom von *S. coelicolor* wurde aus dem Plasmid pK18-KO-4775-4779 mit den Endonucleasen EcoRI und HindIII herausgespalten und in das ebenso geschnittene Plasmid pGus21 ligiert. Das resultierende Plasmid pGus21-KO-4775-9 wurde nach M145 transferiert. Nach Selektion von M145 Transkonjuganten, die pGus21-KO-4775-9 im Chromosom integriert trugen, und Isolierung von Sporen unter nicht selektiven Bedingungen konnten auf Grund des *gusA* Gens einfach große Mengen an Einzelkolonien auf die Präsenz des Plasmids getestet werden. Kolonien mit Plasmid bildeten nach Überschichtung mit einer X-Gluc Lösung einen blauen Hof.

Dagegen blieben Kolonien, die das Plasmid durch ein zweites Crossover verloren hatten, weiß. Weiße Kolonien wurden anschließend auf die Abwesenheit des *aac(3)IV* Gens mittels parallelem Stochern auf Agarplatten mit und ohne Apramycin überprüft. Es konnten mit dieser Methode in kurzer Zeit mehr als 10.000 Kolonien überprüft werden. Von fünf Kolonien, die nach X-Gluc Übersichtung weiß blieben und die apramycinsensitiv waren, wurde genomische DNA isoliert. Diese wurden mittels PCR auf Deletion des Clusters *pkaH-pkaJ* analysiert. Die PCR-Analysen zeigten für zwei Klone das mutantenspezifische Amplifikationsmuster.

Durch PCR konnte die Deletion von *sco4775-sco4779* in beiden Klonen nachgewiesen werden. Hierfür wurden Primer verwendet, die 51 bp vor dem Startcodon von *pkaH* und 830 bp hinter dem Stopcodon von *pkaJ* überlappten und in der Deletionsmutante $NL\Delta 4775-4779$ das Fragment "4775-9 Ex" von 916 bp Größe amplifizierten.

Es ist nicht möglich unter Verwendung eines einzelnen Primerpaares sehr große Fragmente von 10000 und mehr Basenpaaren zu amplifizieren. Im Wildtyp M145 konnte mit dem Primerpaar das Fragment "4775-9 Ex" nicht amplifiziert werden, denn das Fragment wäre 11142 bp groß gewesen, stattdessen wurde ein unspezifisches Fragment mit einer Größe von ca. 500 bp amplifiziert (Abb. 3.7). Auch in $NL\Delta PkaI$ konnte mit dem Primerpaar das Fragment "4775-9 Ex" nicht amplifiziert werden, da es 10012 bp groß gewesen wäre. Auch hier wurde ein unspezifisches Fragment von ca. 500 bp Größe amplifiziert. Da dieses unspezifische Fragment nur mit den genomischen DNAs von M145 und $NL\Delta PkaI$ amplifiziert werden konnte, kann das Primerpaar mit geringerer Spezifität wohl auch noch an eine andere Stelle im Genom von *S. coelicolor* binden. Die Spezifität zu den Bindestellen, für die es designt wurde, ist allerdings deutlich höher, und so wird das unspezifische Fragment nur amplifiziert, wenn das Fragment "4775-9 Ex" nicht amplifiziert werden kann. Da das Fragment "4775-9 Ex" in M145 und $NL\Delta PkaI$ nicht nachweisbar war und kein Fragment erwartet wurde, konnte durch die Amplifikation eines Kontrollfragments bestätigt werden, dass alle DNAs von *S. coelicolor* waren (Abb. 3.7). Die Primer für das Fragment überlappten mit Sequenzen innerhalb des Gens *sco3845* und amplifizierten ein Fragment von 1000 bp Größe.

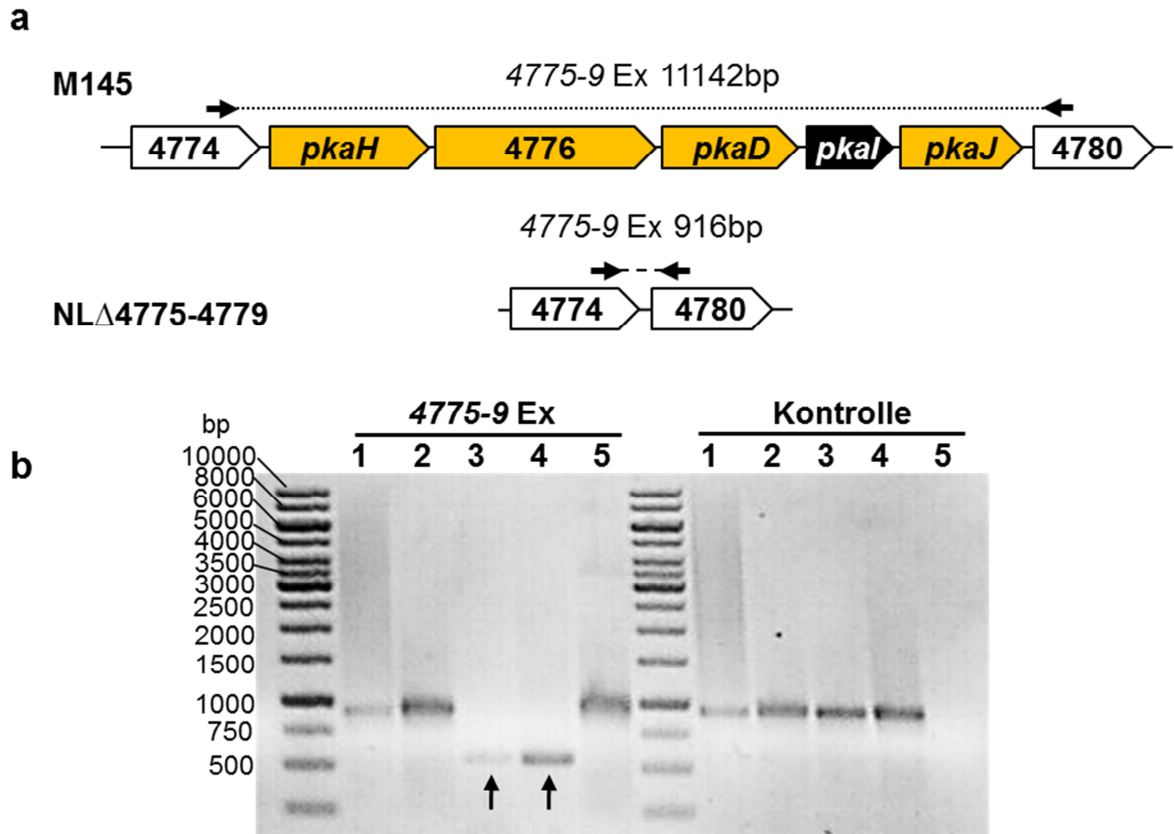


Abbildung 3.7: Organisation der Genregion um das Cluster *sco4775-sco4779* und der Nachweis der Mutante NLΔ4775-4779 mittels PCR: **a** Schematische Darstellung der Genomregion *sco4774-sco4780* in M145 und in der Deletionsmutante NLΔ4775-4779. **b** Amplifikation des Fragments *4775-9 Ex* mit genomischen DNAs von 1= NLΔ4775-4779 Klon 1, 2= NLΔ4775-4779 Klon 2, 3= NLΔPkaI, 4= M145 und Plasmid DNA von 5= pGus-KO-4775-9. Um zu verifizieren, dass es sich bei 3 und 4 um genomische DNA von *S. coelicolor* handelt, wurde zusätzlich ein Kontrollfragment (*Kontrolle*) mit spezifischen Primern für ein internes Fragment von *sco3845* (siehe Kapitel 2.1.3) mit einer Größe von 1000bp amplifiziert. Für das Fragment *4775-9 Ex* konnte mit in den NLΔ4775-4779 Klonen 1 und 2 (1 und 2) und in pGus-KO4775-9 (5) die Bande bei 916bp nachgewiesen werden. Mit der genomischen DNA von NLΔPkaI (3) und M145 (4) wurde eine Bande bei ~500 bp nachgewiesen. Dieses war ein unspezifisches Fragment und ist mit Pfeilen markiert. Für das Kontrollfragment konnte für alle genomischen DNAs der verschiedenen Klone von *S. coelicolor* (1-4) das gleiche Fragment bei 1000 bp nachgewiesen werden. Die Primerbindestellen sind in der schematischen Darstellung (**a**) als Pfeile eingezeichnet. Das Fragment *4775-9 Ex* in NLΔ4775-4779 ist als unterbrochene Linie, das theoretische Fragment *4775-9 Ex* in M145 als gepunktete Linie dargestellt.

3.3.3 Untersuchung der Mutante NL Δ PkaI auf polare Effekte auf die Gene *pkaD* und *pkaJ* mittels semiquantitativer RT-PCR

Die Deletion von Genen kann einen Einfluss auf die Expression der benachbarten Gene haben. Dies wird als polarer Effekt bezeichnet. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion von *pkaI* in der Mutante NL Δ PkaI zu polaren Effekten auf sowohl *pkaD* als auch *pkaJ* führte. Deshalb wurde das Expressionsprofil von *pkaD* und *pkaJ* in NL Δ PkaI untersucht.

Um das Expressionsprofil von *pkaD* und *pkaJ* in NL Δ PkaI mit M145 vergleichen zu können, wurden Sporen von NL Δ PkaI auf die gleiche Weise ausgebracht und inkubiert wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Anschließend wurde von den Proben auf die gleiche Weise die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, und eine semiquantitative RT PCR mit den Primern zum Nachweis von *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* wurde mit cDNA von NL Δ PkaI durchgeführt.

Für *pkaI* konnte wie erwartet keine Expression nachgewiesen werden, da das Gen deletiert war (Abb. 3.8).

Die Expression von *pkaD* und *pkaJ* in NL Δ PkaI glich der Expression in M145 (Kapitel 3.3.1, Abb. 3.2). Die Expression war nach 24 Stunden am stärksten und nahm mit zunehmendem Alter ab (Abb. 3.8). Durch die Deletion von *pkaI* kam es demnach zu keinen polaren Effekten auf die Expression von *pkaD* und *pkaJ*.

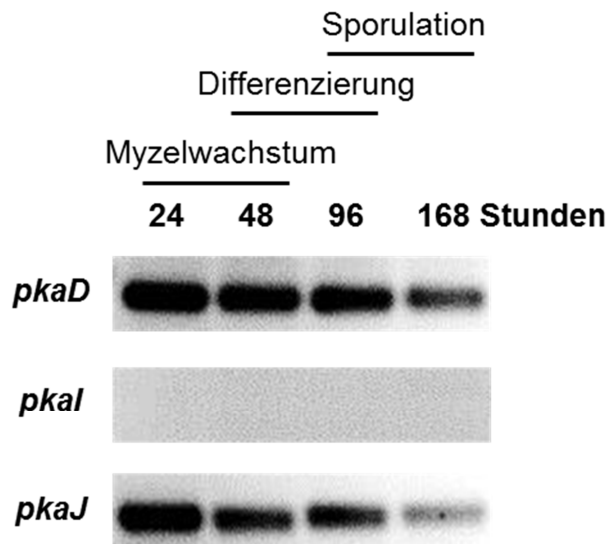


Abbildung 3.8: Untersuchung der Expression von *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* in $NL\Delta PkaI$: Die Proben wurden auf Zellophanscheiben auf MS-Agarplatten für 24, 48, 96 oder 168 Stunden inkubiert und dann geerntet. Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR und spezifischer Primer für die Gene *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* wurden Fragmente amplifiziert und miteinander verglichen.

3.4 Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten $NL\Delta PkaI$ und $NL\Delta 4775-4779$ im Vergleich mit dem Wildtyp M145

Bei den Mutanten $NL\Delta PkaI$ und $NL\Delta 4775-4779$ wurden Gene deletiert, welche eine vermutete Rolle in der korrekten Ausbildung und Reifung der Sporen besaßen. Deshalb wurden die Mutantenphänotypen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Sporenproduktion, Sporenform, Lebensfähigkeit der Sporen, Anfälligkeit der Sporen gegen Stress und zellwandschädigende Agenzien getestet.

3.4.1 Untersuchung der morphologischen Entwicklung von $NL\Delta PkaI$ und $NL\Delta 4775-4779$

Um die morphologische Entwicklung von M145, $NL\Delta PkaI$, $NL\Delta PkaI::pSET-pkaI$, $NL\Delta 4775-4779$ und $NL\Delta 4775-4779::pSET-pkaI$ vergleichen zu können, wurden Sporen dieser Stämme zusammen auf einer MS Agarplatte ausgestrichen, um die morphologische Differenzierung der Stämme miteinander zu vergleichen (Abb. 3.9). Die Stämme $NL\Delta PkaI::pSET-pkaI$ und $NL\Delta 4775-4779::pSET-pkaI$ hatten das integrative Plasmid in das Chromosom in der Attachmentsite des Phagen $\Phi C31$ integriert. Das Plasmid *pSET-pkaI* besteht aus dem integrativen *pSET152* Plasmid, in

3. Ergebnisse

welches das Gen *pkal* und seine putative Promotorregion als mittels PCR amplifiziertes Fragment kloniert wurde (siehe Kapitel 2.5).

Die MS Agarplatte wurde sieben Tage bei 30°C inkubiert. Nach zwei, drei und sieben Tagen wurden Bilder von der Platte gemacht.

Nach zwei Tagen war bei allen Stämmen außer NLΔPkal dichtes, weißes Luftmyzel zu erkennen (Abb. 3.9). NLΔPkal zeigte hingegen nur eine schwache Luftmyzelbildung. Die Kolonie war noch zu einem großen Teil farblos. Die Kolonie der komplementierten Mutante NLΔPkal::pSET-*pkal* sah aus wie M145. Um die Kolonie von NLΔ4775-4779::pkal konnte man nach zwei Tagen bereits einen blauen Hof erkennen. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt schon Aktinorhodin produziert wurde. Aktinorhodin ist ein Antibiotikum, welches blau pigmentiert ist und im Zuge der Differenzierung und der damit verbundenen Produktion von Sekundärmetaboliten gebildet wird.

Nach drei Tagen hatte NLΔPkal Luftmyzel wie M145 gebildet und auch schon erste Sporen ausgebildet (Abb. 3.9). Dies konnte man an der charakteristischen Braun/Graufärbung erkennen. Bis auf NLΔPkal hatten zu diesem Zeitpunkt schon alle Stämme mit der Aktinorhodinproduktion begonnen. Nach sieben Tagen waren die fünf Stämme optisch nicht mehr voneinander zu unterscheiden (Abb. 3.9).

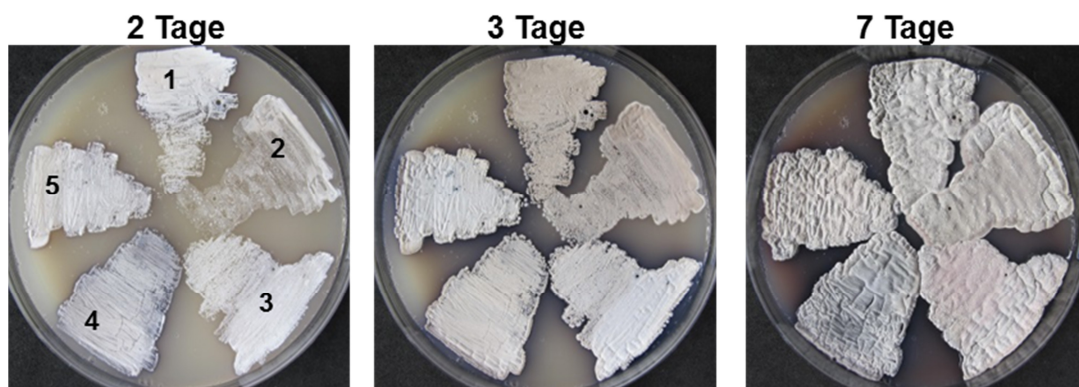


Abbildung 3.9: Vergleich der Differenzierung von M145 mit den eSTPK Mutanten: Es wurden ca. 10^5 Sporen der Stämme M145 (1), NLΔPkal (2), NLΔPkal::pSET-*pkal* (3), NLΔ4775-4779 (4) und NLΔ4775-4779::pSET-*pkal* (5) auf einer MS- Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde sieben Tage bei 30°C inkubiert. Nach zwei, drei und sieben Tagen wurde die Platte fotografiert.

3.4.2 Quantitative Bestimmung der Sporenproduktion nach drei Tagen und nach sieben Tagen

Die Mutante $N\Delta P_{kal}$ zeigte eine Verzögerung in der Differenzierung (Kapitel 3.4.1, Abb. 3.9). Deshalb wurde untersucht, ob die Sporulation nur zeitlich verzögert war oder ob in $N\Delta P_{kal}$ der Mutante weniger Sporen produziert werden.

Hierzu wurde von den Stämmen M145, $N\Delta P_{kal}$, $N\Delta P_{kal}::pSET-p_{kal}$ und $N\Delta 4775-4779$ $3 \cdot 10^7$ Sporen auf MS-Agar ausplattiert. Nach drei Tagen sowie nach sieben Tagen Inkubation bei 30°C wurden die gesamten Sporen einer Agarplatte isoliert und die Anzahl der lebenden Sporen durch Titerungsexperimente bestimmt. Nach drei Tagen war die gemessene Sporenproduktion von M145 bei $3,69 \cdot 10^9$ Sporen/Platte. Mit $2,77 \cdot 10^9$ bzw. $1,95 \cdot 10^9$ Sporen/Platte war die Sporenproduktion von $N\Delta P_{kal}::pSET-p_{kal}$ und $N\Delta 4775-4779$ im Bereich der Standardabweichung (Tab. 3.1; Abb. 3.10). Die Sporenproduktion von $N\Delta P_{kal}$ lag dagegen bei nur $5,61 \cdot 10^7$ Sporen/Platte. Dies war eine um den Faktor 65 niedrigere Sporenmenge als im Wildtyp M145 bzw. in der komplementierten Mutante $N\Delta P_{kal}::pSET-p_{kal}$ und $N\Delta 4775-4779$.

Die gemessene Sporenproduktion von $N\Delta P_{kal}$ nach sieben Tagen war $1,31 \cdot 10^9$ Sporen/Platte. Für M145 wurden durchschnittlich $2,45 \cdot 10^9$ Sporen/Platte, für $N\Delta P_{kal}::pSET-p_{kal}$ $6,06 \cdot 10^9$ Sporen/Platte und für $N\Delta 4775-4779$ $3,27 \cdot 10^9$ Sporen/Platte gemessen. Somit lag die Sporenproduktion von $N\Delta P_{kal}$ nach sieben Tagen in derselben Größenordnung wie die der anderen Stämme (Tab. 3.1; Abb. 3.10).

Tabelle 3.1: Mittelwerte der Sporenproduktion/Platte in den verschiedenen Stämmen

Mittelwerte Sporenproduktion				
Stamm	M145	$N\Delta P_{kal}$	$N\Delta P_{kal}::pSET-p_{kal}$	$N\Delta 4775-4779$
3 Tage	3.69E+09	5.61E+07	2.77E+09	1.95E+09
7 Tage	2.45E+09	1.31E+09	6.06E+09	3.27E+09
Standardabweichung				
3 Tage	1.57E+09	6.85E+07	2.78E+09	6.44E+08
7 Tage	1.46E+09	1.39E+09	2.82E+09	1.41E+09

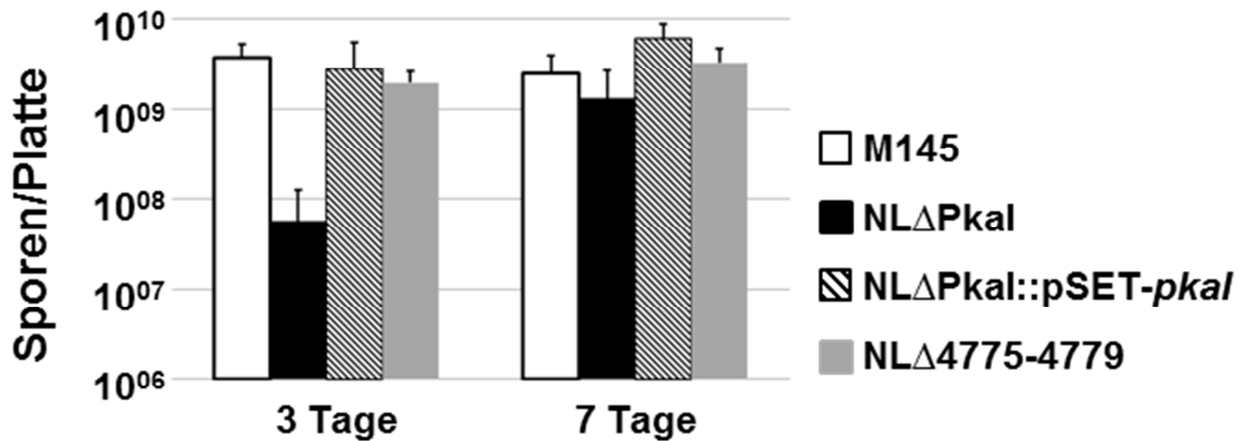


Abbildung 3.10: Vergleich der durchschnittlichen Sporenproduktion in den eSTPK-Deletionsmutanten von *S. coelicolor*: Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sporenproduktion aus Tabelle 3.1 wurden als Balkendiagramm dargestellt. Die Y-Achse mit der Einheit Sporen/Platte besitzt eine logarithmische Skalierung.

3.4.3 Morphologie der Sporen von NLΔPkal und NLΔ4775-4779 im Vergleich zum Wildtyp M145

Bei den vorangegangenen Experimenten zur Charakterisierung des SSSC wurden Deletionsmutanten der Gene *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2*, *sfr*, *sco2097*, *sco2584* und *sco2997* konstruiert (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Eine gemeinsame Eigenschaft aller dieser Mutanten war, dass sie alle Sporen mit aberranter Morphologie bildeten. Während die Sporen des Wildtyps M145 gleichmäßig waren und die gemessenen Werte keine große Varianz und Standardabweichung hatten, waren Sporen der Mutanten signifikant unterschiedlich, und die Präsenz von abnormal geformten Sporen konnte im Lichtmikroskop beobachtet werden (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Auch konnten, mittels Transmissionselektronenmikroskopie, Unterschiede in der Dicke der Zellwand von M145 im Vergleich mit den Deletionsmutanten der Gene *mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr* beobachtet werden (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011).

3.4.3.1 Quantitativer Vergleich der Sporenlängen der Sporen von NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 im Vergleich zum Wildtyp M145

Um zu untersuchen, ob auch die Sporen der Mutanten NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 abnormal geformt waren, wurden diese mit dem Programm analySIS von Olympus vermessen. Die ermittelten Werte wurden mittels deskriptiver Statistik untersucht und mit den Sporengrößen von M145 verglichen (Tab. 3.2).

Die 966 vermessenen Sporen innerhalb der Sporenketten von M145 hatten im Mittelwert eine Länge von 1,24 μ m bei einer Standardabweichung von \pm 0,28 μ m (Tab. 3.2). Die 591 vermessenen Sporen in den Sporenketten von NL Δ PkaI waren mit einem Mittelwert von 1,31 μ m (\pm 0,47 μ m) Länge nicht deutlich länger als die Sporen von M145. Im Lichtmikroskop sahen die Sporenketten von NL Δ PkaI aber nicht so uniform aus wie die Sporenketten von M145 (Abb. 3.11). Innerhalb der Sporenketten wurden einzelne Sporen gefunden, welche aberrant waren (Abb. 3.11). Dies äußerte sich in der höheren Standardabweichung von \pm 0,47 μ m (Tab. 3.2).

Auch die 739 vermessenen Sporen in Sporenketten von NL Δ 4775-4779 sahen im Lichtmikroskop nicht so uniform aus wie M145 (Abb. 3.11). Im Vergleich zum Mittelwert der Sporenlänge von M145 innerhalb der Sporenketten war auch hier kein deutlicher Unterschied festzustellen. Der Mittelwert der Sporenlänge betrug für NL Δ 4775-4779 1,31 μ m (\pm 0,35 μ m). Statistisch machten sich die aberrant geformten Sporen auch hier wieder in der größeren Standardabweichung von \pm 0,35 μ m bemerkbar (Tab. 3.2).

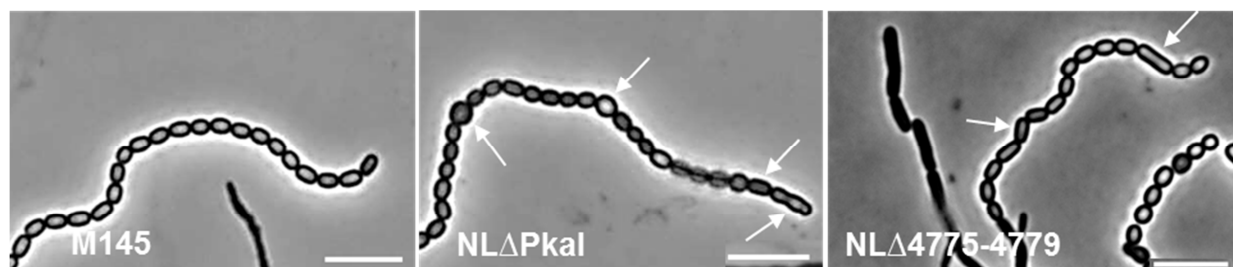


Abbildung 3.11: Sporenketten der Stämme M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779: Eine Sporensuspension des jeweiligen Stammes wurde je an den Rändern von in MS-Agarplatten gesteckten Deckgläsern ausgebracht. Die Platten wurden für sechs Tage inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend auf mit Agar bedeckten Objektträgern mikroskopiert. Aberrante Sporen sind mit den weißen Pfeilen gekennzeichnet. Die Länge des Messbalkens entspricht 5 μ m.

Auch der Median und die mittlere absolute Abweichung bezüglich des Medians (abgekürzt: MAD; englisch für median absolute deviation) zur Bestimmung eines Mittels und dessen Abweichung zeigten dasselbe Bild. Um den Median zu berechnen, werden alle Messpunkte ihrer Größe nach sortiert. Der Wert in der Mitte (bei ungerader Anzahl an Messpunkten; bei gerader Anzahl das Mittel der beiden Mittleren) ist der Median. Aufgrund dieser Berechnung ist der Median sehr robust gegen Ausreißer an beiden Enden. Die Mediane der Sporenlänge waren mit $1,19\mu\text{m}$ für M145 und $1,20\mu\text{m}$ für $\text{NL}\Delta\text{Pka1}$ und $\text{NL}\Delta 4775-4779$ sehr nahe beieinander. Die mittlere absolute Abweichung bezüglich des Medians (Abkürzung: MAD; englisch für median absolute deviation) dagegen ist mit $0,12\mu\text{m}$ bei M145 kleiner als bei $\text{NL}\Delta\text{Pka1}$ mit $0,16\mu\text{m}$ und bei $\text{NL}\Delta 4775-4779$ mit $0,17\mu\text{m}$ (Tab. 3.2). Der MAD ist ein Maß für die Streuung um den Median und in der Regel kleiner als die Standardabweichung. Die Varianz ist die Streuung um den Mittelwert. Zur Berechnung werden die Abweichungen vom Mittelwert quadriert, summiert und durch die Zahl der Datenpunkte geteilt. Durch die Quadrierung ist die Varianz immer positiv. Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel der Varianz. Da die Standardabweichung von $\text{NL}\Delta\text{Pka1}$ und $\text{NL}\Delta 4775-4779$ größer war als die von M145, war auch die Varianz von $\text{NL}\Delta\text{Pka1}$ mit $0,22\mu\text{m}^2$ und $\text{NL}\Delta 4775-4779$ mit $0,12\mu\text{m}^2$ größer als die von M145 mit $0,08\mu\text{m}^2$.

Außerdem wurde der Interquartilabstand (Abkürzung: IQR; englisch für inter quartil range) berechnet. Der IQR gibt den Bereich innerhalb einer Verteilung an, der die mittleren beiden Quartile abdeckt. Diese umfassen je die 25% der gemessenen Werte ober- und unterhalb des Median. In M145 war der IQR $0,25\mu\text{m}$. In $\text{NL}\Delta\text{Pka1}$ und $\text{NL}\Delta 4775-4779$ war der IQR mit je $0,34\mu\text{m}$ größer. Auch diese größere Streuung spiegelte die weniger uniformen Sporen in den Deletionsmutanten wider.

Tabelle 3.2: Deskriptive Statistik für die gemessenen Sporenlängen von M145, NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779

	M145	NLΔPkal	NLΔ4775-4779
Mittelwert	1.24 μ m	1.31 μ m	1.29 μ m
Standardabweichung	0.28 μ m	0.47 μ m	0.35 μ m
Median	1.19 μ m	1.20 μ m	1.20 μ m
MAD	0.12 μ m	0.16 μ m	0.17 μ m
Varianz	0.08 μ m ²	0.22 μ m ²	0.12 μ m ²
IQR	0.25 μ m	0.34 μ m	0.34 μ m
ausgemessene Sporen	966	591	739

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Sporen nicht so uniform waren wie die Sporen von M145. Der Mittelwert der Sporenlängen und auch der Median war zwar in allen drei Fällen sehr ähnlich, aber die höheren Werte von NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779 bezüglich Standardabweichung, MAD, Varianz und IQR zeigten, dass in diesen Mutanten viele Sporen vorhanden waren, welche von der Norm abwichen.

3.4.3.2 Untersuchung der Sporenmorphologie von M145, NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779 durch Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Untersuchung von Deletionsmutanten der am SSSC beteiligten Gene *mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr* konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie festgestellt werden, dass die Sporenwand in diesen Mutanten nicht so stark erschien wie in M145 (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Da auch die Deletionsmutanten NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779 aberrante Sporen bildeten, wurden die Sporen dieser Mutanten, in Kooperation mit Dr. Iris Maldener vom Lehrstuhl für Organismische Interaktion der Universität Tübingen, mit Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

3. Ergebnisse

Die Sporen von M145 waren gleichmäßig geformt. Das kondensierte Chromosom war als helle Struktur in der Mitte der Spore zu erkennen (Abb. 3.12). Das Cytoplasma der Spore war dunkel gefärbt. Das Cytoplasma war von einer dicken, hellen Schicht umgeben, bei welcher es sich vermutlich um die Zellwand aus Peptidoglycan handelte. Auf diese helle Schicht war noch eine dunkle Schicht aufgelagert (Abb. 3.12). Diese war vermutlich die hydrophobe Beschichtung der Spore, bestehend aus den kleinen Proteinen Rodline und Chapline. Auf einigen Bildern war auch zu erkennen, dass diese Schicht diffus um die Spore verteilt war und sich an manchen Stellen ablöste (Abb. 3.12).

Im Gegensatz zu den bereits in vorherigen Arbeiten untersuchten und beschriebenen Sporen der Deletionsmutanten der Gene *mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr* (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011) zeigten die Sporen von $NL\Delta Pka1$ und $NL\Delta 4775-4779$ keine auffällig dünnen oder deformierten Sporenwände (Abb. 3.12). Es waren aberrante Sporen zu sehen (Abb. 3.12), welche sich aber in der Struktur der Sporenwand nicht von M145 unterschieden.

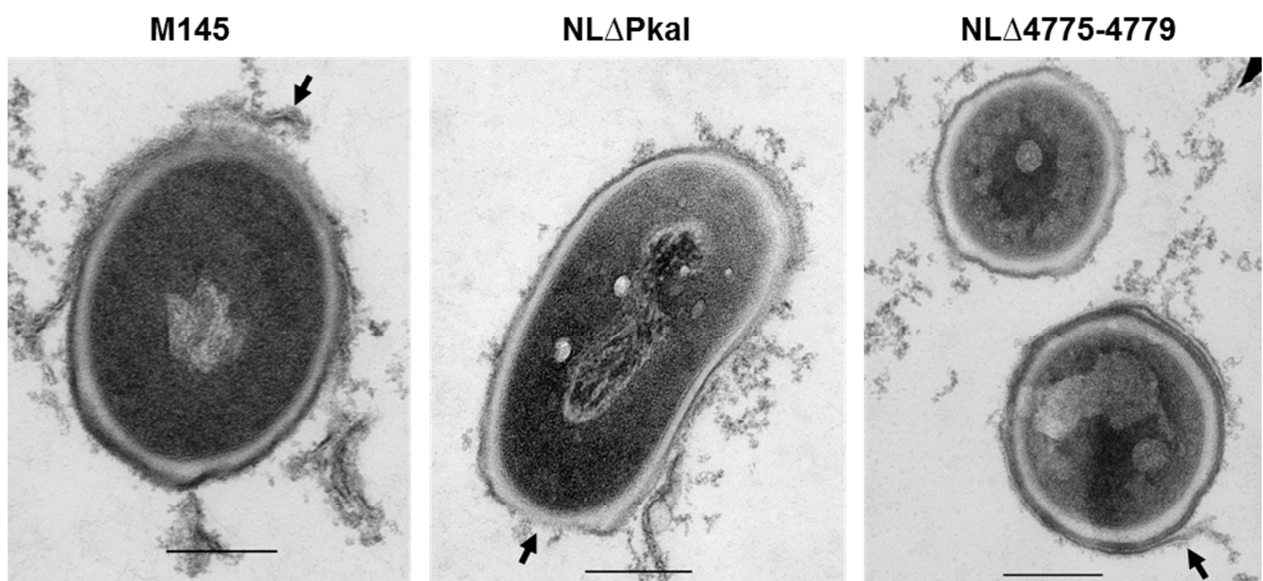


Abbildung 3.12: Transmissionselektronenmikroskopische Bilder von Sporen der Stämme M145, $NL\Delta Pka1$ und $NL\Delta 4775-4779$: Die Sporen der verschiedenen Stämme wurden wie in Kapitel 2.9.4 beschrieben fixiert. Anschließend wurden Schnitte der Präparate angefertigt, welche im Transmissionselektronenmikroskop untersucht wurden. In den Sporen ist stets das kondensierte Chromosom als helle Struktur in der Sporenmitte zu erkennen. Das Cytoplasma ist dunkel gefärbt und von einer hellen Schicht umgeben, welche vermutlich die Zellwand ist. Die dunkle Schicht ganz außen ist vermutlich die aufgelagerte Proteinschicht aus Rodlinen und Chaplinen. Diese äußerste Schicht kann sich ablösen (Pfeile). Die Messbalken auf den Bildern sind 300nm lang.

3.4.4 Morphologie der Sporenketten von M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 mit einer integrierten eSTPK als pSET-Konstrukt

Die Deletion von *pkaI* und *sco4775-sco4779* hatte einen Einfluss auf den Phänotyp der Sporen (Kapitel 3.4.3, Abb. 3.11, Tab. 3.2). In einem folgendem Experiment wurde untersucht, ob sich der Phänotyp in den Sporenketten der Mutanten NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 bei Integration einer der eSTPK Gene veränderte. Auch in den Wildtyp M145 wurden die eSTPK Gene integriert, um zu beobachten, ob die Überexpression der Gene einen Effekt auf die Sporenmorphologie hatte.

Die hierfür verwendeten Plasmide waren pSET-*pkaH*, pSET-*sco4776*, pSET-*pkaD*, pSET-*pkaI* und pSET-*pkaJ*. Die Konstruktion der Plasmide ist in Kapitel 2.5 beschrieben. Mittels PCR und spezifischer Primer wurden Fragmente mit dem entsprechenden eSTPK Gen und einem Bereich von mindestens 160 bp vor dem Startcodon amplifiziert. Diese wurden in das integrative Plasmid pSET152 kloniert. Anschließend wurden die Plasmide via Konjugation in die Stämme M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 von *S. coelicolor* transferiert, wo sie in die Attachmentsite des Phagen Φ C31 integrierten.

Die Morphologie der Sporen in der Sporenkette der verschiedenen Stämme wurde durch Phasenkontrastmikroskopie untersucht.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, waren die beobachteten Sporen des Wildtyps von *S. coelicolor* M145 gleichmäßig geformt, und es waren keine auffällig großen oder kleinen Sporen sichtbar (Abb. 3.11 und Abb. 3.13). Die aus M145 abgeleiteten und mit einer zusätzlichen Kopie einer der eSTPKs versehenen Stämme M145::pSET-*pkaH*, M145::pSET-*sco4776*, M145::pSET-*pkaD*, M145-*pkaI* und M145::pSET-*pkaJ* zeigten alle einen ähnlichen Phänotyp bezüglich der Sporenketten. In jedem der Stämme waren aberrante Sporen in den Sporenketten vorhanden (Abb. 3.13). Die Integration einer zusätzlichen Kopie mit dem putativen Promotor führte also zu Bildung von aberranten Sporen.

Die Deletion des Gens *pkaI* in der Mutante NL Δ PkaI führte zur Bildung von aberranten Sporen (Abb. 3.11 und 3.13). Durch die genetische Komplementation mit der Integration des Plasmid pSET-*pkaI* konnte dieser Phänotyp wieder aufgehoben werden (Abb. 3.13). Die Bilder der Sporenketten von NL Δ PkaI::pSET-*pkaI* sahen im

Phasenkontrastmikroskop aus wie Sporenketten von M145. Die Sporenketten der Stämme $N\Delta PkaI::pSET-pkaH$, $N\Delta PkaI::pSET-sco4776$, $N\Delta PkaI::pSET-pkaD$ und $N\Delta PkaI::pSET-pkaJ$ zeigten alle die Bildung von aberranten Sporen in den Sporenketten (Abb.3.13), wie sie für $N\Delta PkaI$ und $N\Delta 4775-4779$ beschrieben wurden. Da die Sporen nicht ausgemessen wurden, kann keine genauere Aussage darüber getroffen werden, ob die Sporenlänge in den Sporenketten von $N\Delta PkaI::pSET-pkaH$, $N\Delta PkaI::pSET-sco4776$, $N\Delta PkaI::pSET-pkaD$ oder $N\Delta PkaI::pSET-pkaJ$ stärker variierte als in $N\Delta PkaI$. Während $pSET-pkaI$ den Phänotyp hinsichtlich der aberranten Sporen komplementieren konnte, war bei der Integration der anderen $pSET152$ Konstrukte in $N\Delta PkaI$ kein Unterschied zu erkennen.

Die Integration der verschiedenen eSTPKs in $pSET152$ in die Mutante $N\Delta 4775-4779$ führte in keinem Fall zu einer Komplementation des Phänotyps der aberranten Sporenbildung (Abb. 3.13). Die beobachteten Sporenketten glichen dem beschriebenen Phänotyp von $N\Delta PkaI$ und $N\Delta 4775-4779$ (Abb. 3.11 und Tab. 3.2). Wie auch für die Stämme $N\Delta PkaI::pSET-pkaH$, $N\Delta PkaI::pSET-sco4776$, $N\Delta PkaI::pSET-pkaD$ und $N\Delta PkaI::pSET-pkaJ$ beschrieben, konnte eine genaue Aussage zur Sporenlänge in den Sporenketten nicht gemacht werden. Die Integration einer Kinase führte nicht zur Komplementation des Phänotyps der aberranten Sporenbildung.

Aufgrund der hohen Anzahl an zu untersuchenden Stämmen und des großen zeitlichen Aufwands wurden die Sporen in den Sporenketten nicht vermessen.

Die Integration einer zusätzlichen Kopie einer der eSTPKs $pkaH-pkaJ$ in M145 führte in allen Fällen zur Bildung aberranter Sporen (Abb. 3.13). In $N\Delta PkaI$ konnte nur $pkaI$ Phänotyp der aberranten Sporenbildung komplementieren (Abb. 3.13). Die Integration einer der anderen eSTPKs in $N\Delta PkaI$ hatte keine Auswirkungen auf diesen Phänotyp (Abb. 3.13). Durch die einzelne Integration einer der fünf eSTPKs in $N\Delta 4775-4779$ konnte auch hier keine Änderung des Phänotyps beobachtet werden (Abb. 3.13).

3. Ergebnisse

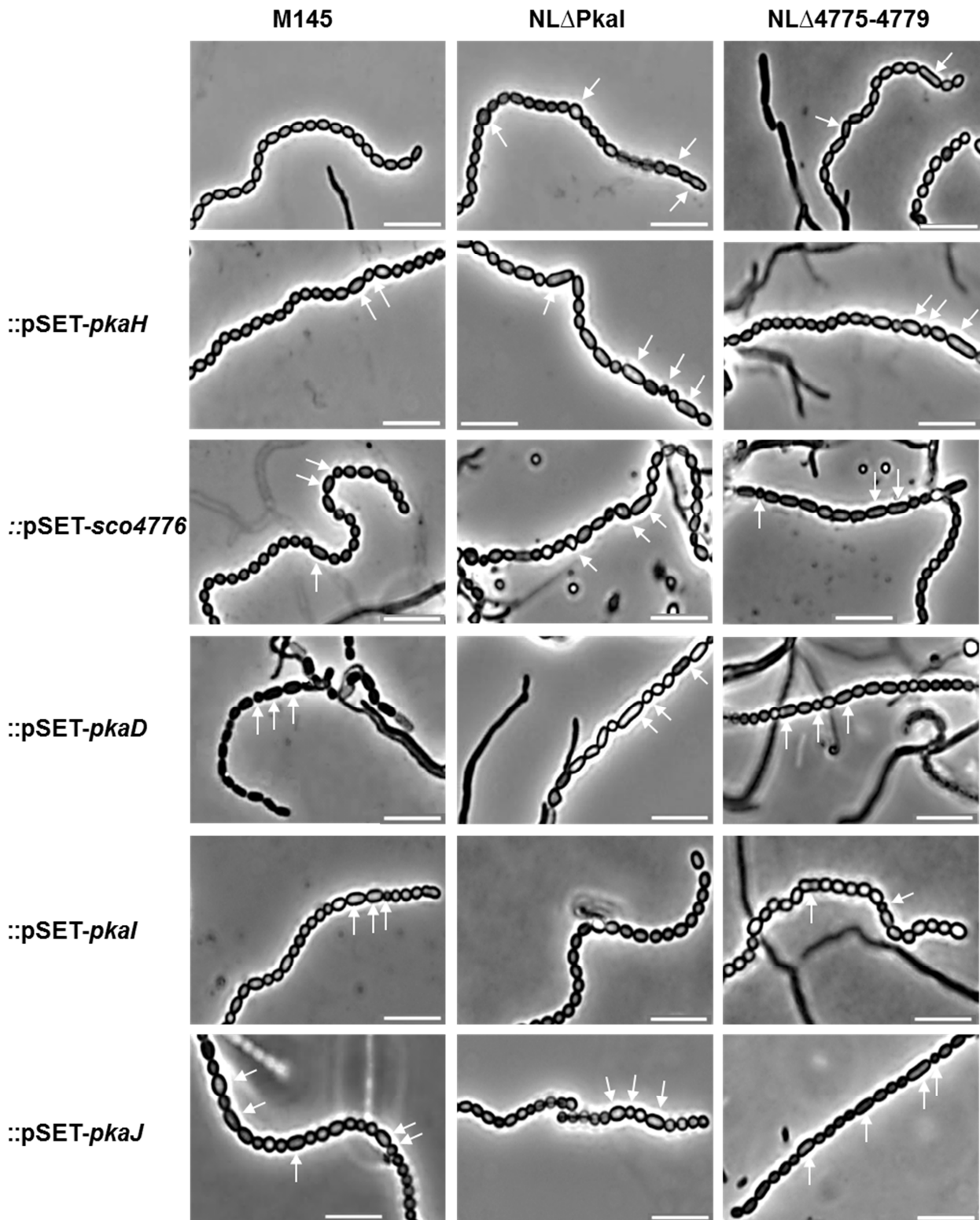


Abbildung 3.13: Sporenketten der Stämme M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779 ohne und mit pSET-Konstrukten der eSTPK-Gene *pkaH-pkaJ*: Eine Sporensuspension des jeweiligen Stammes wurde je an den Rändern von in MS-Agarplatten gesteckten Deckgläsern ausgebracht. Die Platten wurden für sechs Tage inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend auf mit Agarose bedeckten Objektträgern mikroskopiert. Aberrante Sporen sind mit den weißen Pfeilen gekennzeichnet. Die Länge des Messbalkens entspricht 5 μ m.

3.4.5 Lebensfähigkeit der Sporen in Sporenketten

Die Deletion einer einzelnen, sowie die Deletion aller eSTPK Gene *pkaH-pkaJ* führte zu einer veränderten Morphologie der Sporen (Kapitel 3.4.3.1, Abb. 3.11). Die Insertion einer zusätzlichen Kopie einer der eSTPK Gene aus *pkaH-pkaJ* führte auch in M145 zur Bildung aberranter Sporen (Kapitel 3.4.4, Abb. 3.13). Im Weiteren sollte untersucht werden, ob dieser Phänotyp auch Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der aberranten Sporen hatte.

Um dies zu untersuchen, wurden die Stämme wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben für die Mikroskopie vorbereitet und noch auf der Agarplatte mit den Farbstoffen SYTO9 und Propidiumiodid aus dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit von Molecular Probes inkubiert. Beide Farbstoffe binden an DNA und fluoreszieren im gebundenen Zustand. SYTO9 fluoresziert grün, wenn es DNA gebunden hat, und ist membrangängig. Sporen mit einer intakten Zellmembran werden also grün gefärbt und werden als lebend definiert. Propidiumiodid fluoresziert rot, wenn es an DNA gebunden hat, und ist nicht in der Lage, eine intakte Zellmembran zu überwinden. Der Farbstoff bindet mit höherer Affinität an DNA als SYTO9 und kann dieses so verdrängen. Sporen mit beschädigter Zellmembran werden also rot gefärbt und als tot definiert. Sollte die Zellmembran erst kurz vor dem Mikroskopieren beschädigt werden, so kann sowohl rote als auch grüne Fluoreszenz beobachtet werden. Diese Zellen erscheinen im Overlay als orangefarben und werden als tot definiert, da Propidiumiodid dabei ist, in die Zelle einzudringen, und nach einer Zeit das SYTO9 verdrängen würde. Hierfür wurden die Sporen innerhalb von Sporenketten ausgewertet.

In jedem der untersuchten Präparate wurden Sporenketten gefunden die, nur aus lebenden Sporen bestanden. Es wurden jedoch keine Sporenketten beobachtet, die nur aus toten Sporen oder Sporen ohne DNA bestanden. In Sporenketten, welche tote Sporen bzw. Sporen ohne DNA enthielten, waren immer auch lebende Sporen sichtbar (Abb. 3.14). Die Morphologie der Sporen hatte keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit. Es kamen in allen Präparaten, welche aberrante Sporen enthielten, sowohl lebende als auch tote aberrante Sporen vor (Abb. 3.14). Auch die Sporen ohne DNA hatten keine einheitliche Morphologie (Abb. 3.14).

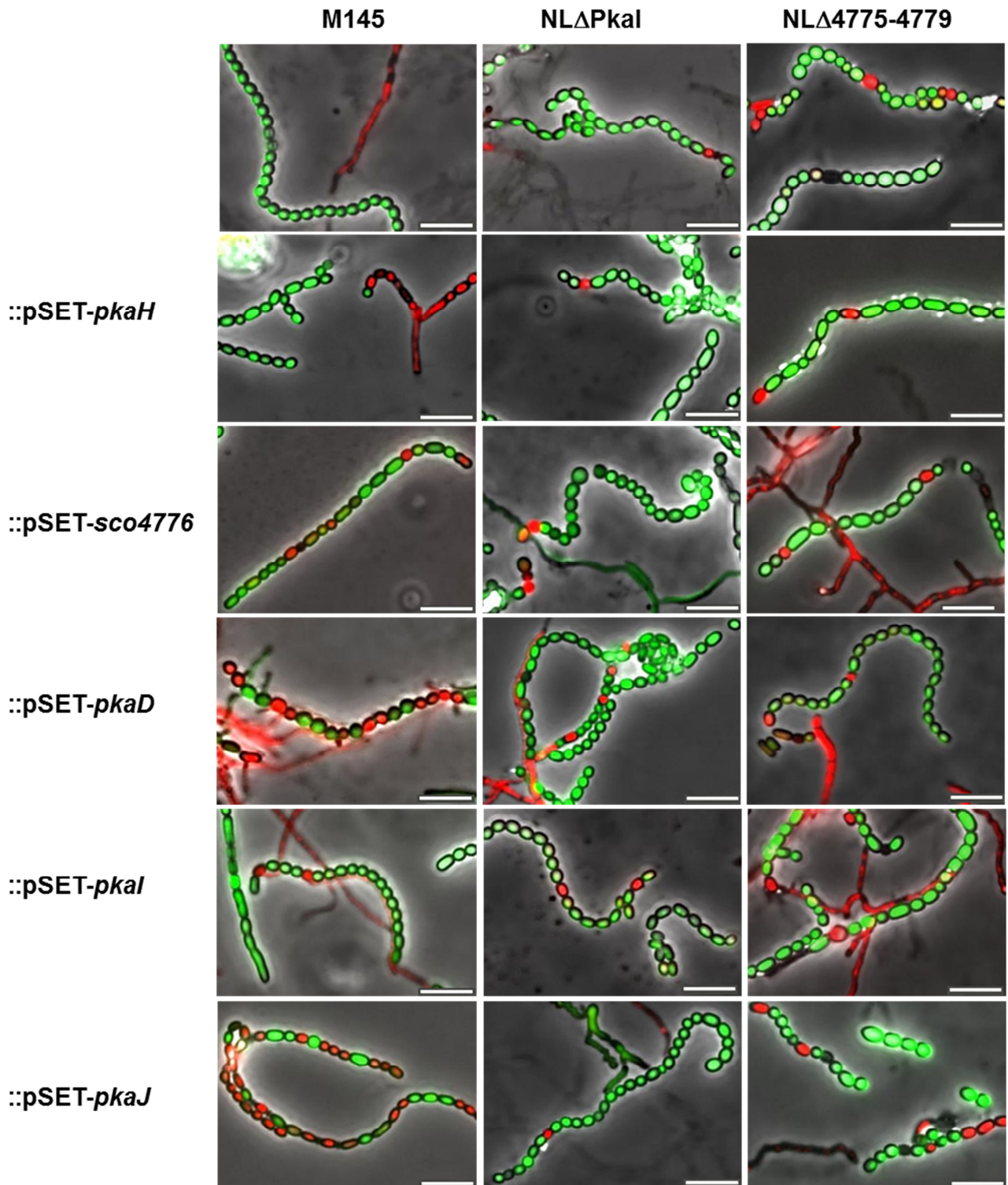


Abbildung 3.14: Einfluss der Überexpression, bzw. Deletion der eSTPKs *pkaH-pkaJ* auf die Lebensfähigkeit der Sporen in den Stämmen M145, NL Δ PkaI und NL Δ 4775-4779: Eine Sporensuspension des jeweiligen Stammes wurde je an den Rändern von in MS-Agarplatten gesteckten Deckgläsern ausgebracht. Die Platten wurden für sechs Tage inkubiert. Die Präparate wurden auf der Agarplatte mit dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit gefärbt. Die Deckgläser wurden anschließend auf mit Agarose bedeckten Objektträgern mikroskopiert. Die gezeigten Bilder sind Overlays des Grün-, Rot- und Durchlichtkanals. Lebende Sporen sind grün, tote Sporen rot und Sporen ohne DNA sind schwarz. Die Länge des Messbalkens entspricht 5 μ m

3.4.5.1 Lebensfähigkeit der Sporen von M145 und M145 mit zusätzlicher Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ*

Es wurde eine quantitative Analyse über die Lebensfähigkeit der Sporen von M145 sowie der Stämme von M145 mit zusätzlichem eSTPK-Gen gemacht. Um zu sehen, ob die eSTPK-Gene *pkaH-pkaJ* neben der Bildung aberranter Sporen auch einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Sporen haben können, wurden Bilder mehrerer verschiedener Präparate aller Stämme gemacht und die Sporen in den Sporenketten mit Hilfe des Programms Fiji (Version 1.49b) ausgezählt.

Im Wildtyp M145 wurden 991 Sporen ausgewertet. Von diesen waren 99,29% lebendig und 0,71% tot (Tab. 3.3, Abb. 3.15). Dieses Bild änderte sich stark in den von M145 abgeleiteten Stämmen mit einem zusätzlichen eSTPK Gen. In M145::pSET-*pkaH* waren von 1488 ausgezählten Sporen nur 72,31% lebendig, während 27,49% tot waren, in 0,2% war keine DNA nachweisbar, d.h. sie fluoreszierten gar nicht (Tab. 3.3, Abb. 3.15). M145::pSET-*sco4776* hatte mit 85,05% lebenden Sporen und 13,68% toten bzw. 1,27% Sporen ohne DNA auch einen deutlichen Unterschied zu M145 bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen (Tab. 3.3, Abb. 3.15). Die Insertion einer zusätzlichen Kopie von *pkaD* in M145::pSET-*pkaD* führte zu einem noch drastischeren Phänotyp. Von 707 ausgewerteten Sporen waren nur 59,69% lebendig. 36,78% waren tot und 3,54% enthielten keine DNA (Tab. 3.3, Abb. 3.15). Von den 1725 ausgezählten Sporen aus M145::pSET-*pkaI* waren mit 85,39% prozentual in etwa so viele lebendig wie in M145::pSET-*sco4776*. Aber mit 10,49% toten und 4,12% der Sporen ohne nachweisbare DNA waren es im Vergleich mit M145::pSET-*sco4776* fast 3% mehr Sporen ohne DNA (Tab. 3.3, Abb. 3.15). Bei M145::pSET-*pkaJ* wurde der dramatischste Phänotyp bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen beobachtet. Mit 42,56% waren weniger als die Hälfte der gemessenen Sporen lebendig. 55,58% der Sporen waren tot und 1,86% ohne DNA. Für M145::pSET-*pkaJ* wurden insgesamt 968 Sporen ausgezählt (Tab. 3.3, Abb. 3.15).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.3: Auswertung der lebend/tot Färbung der Stämme M145 und M145 mit je einer Kopie eines eSTPK-Gens

Stamm	M145	::pSET- <i>pkaH</i>	::pSET- <i>sco4776</i>	::pSET- <i>pkaD</i>	::pSET- <i>pkaI</i>	::pSET- <i>pkaJ</i>
Lebend (grün)	99.29%	72.31%	85.05%	59.69%	85.39%	42.56%
Tot (rot)	0.71%	27.49%	13.68%	36.77%	10.49%	55.58%
Ohne DNA		0.20%	1.27%	3.54%	4.12%	1.86%
Gezählte Sporen	991	1488	1104	707	1725	968

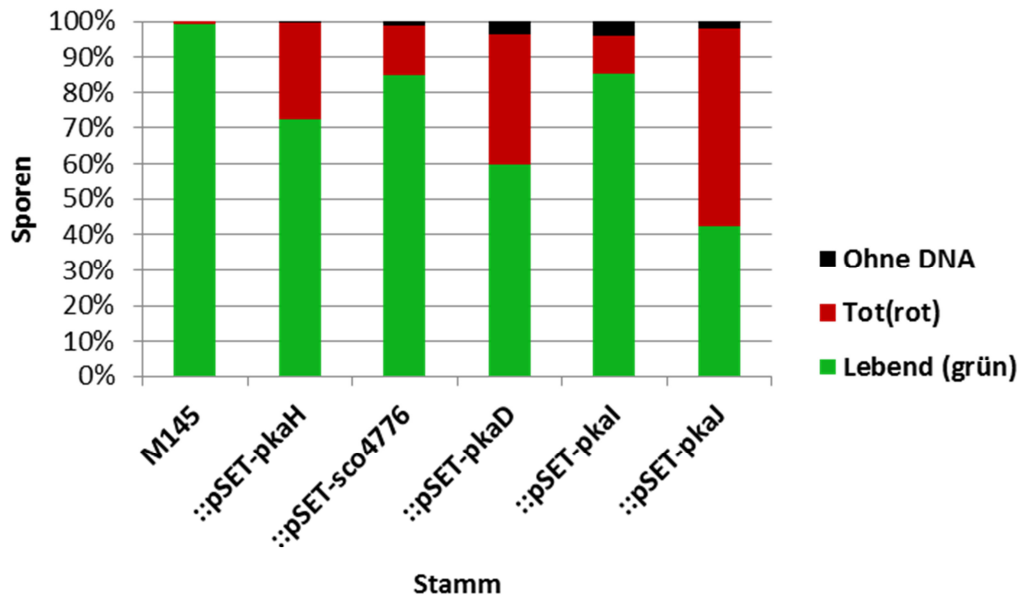


Abbildung 3.15: Vergleich des Anteils an lebenden Sporen, toten Sporen und Sporen ohne DNA in verschiedenen Stämmen von *S. coelicolor* M145: Die berechneten prozentualen Werte für lebende, tote und keine DNA enthaltende Sporen aus Tabelle 3.3 wurden als gestapelte Säule grafisch dargestellt.

3.4.5.2 Lebensfähigkeit der Sporen von NL Δ Pkal und NL Δ Pkal mit zusätzlicher Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ*

Eine zweite Kopie eines der Gene von *pkaH-pkaJ* im Wildtyp M145 zeigte sowohl die die Bildung aberranter Sporen, als auch einen starken Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Sporen (Kapitel 3.4.5.1; Abb. 3.15). Da die Deletionsmutante NL Δ Pkal und alle Stämme von NL Δ Pkal mit einer zusätzlichen Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ*, bis auf NL Δ Pkal::pSET-*pkaI*, auch aberrante Sporen produzierten (Abb. 3.13), wurde auch für diese Stämme quantitativ bestimmt, ob es einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Sporen gab.

Die Deletion von *pkaI* in NL Δ Pkal zeigte im Vergleich zu M145 einen Effekt, wenn auch nicht so stark wie bei der der Insertion zusätzlicher eSTPKs in M145. Von den 1655 ausgezählten Sporen waren 92,99% lebendig und 4,29% tot, bzw. 2,72% ohne DNA (Tab. 3.4, Abb. 3.16). Der Phänotyp änderte sich durch die darauffolgende Insertion der getesteten eSTPK Gene *pkaH-pkaJ* in NL Δ Pkal im Vergleich zu NL Δ Pkal nicht stark. Der Satz der lebendigen Sporen war in allen Stämmen größer als 90% (Tab. 3.4, Abb. 3.16). Für NL Δ Pkal::pSET-*pkaH* wurden 1538 Sporen untersucht. 95,32% waren lebendig, 3,38% tot und 1,3% besaßen keine DNA (Tab. 3.4, Abb. 3.16). 91,75% der ausgewerteten Sporen von NL Δ Pkal::pSET-*sco4776* waren lebendig. 3,27% der Sporen waren tot und mit 4,98% waren hier etwa doppelt so viele Sporen ohne DNA wie in den anderen von NL Δ Pkal abgeleiteten Stämmen. Es wurden 1285 Sporen von NL Δ Pkal::pSET-*sco4776* ausgewertet (Tab. 3.4, Abb. 3.16). NL Δ Pkal::pSET-*pkaD* besaß 95,74% lebendige und 2,56% tote Sporen. 1,7% besaßen keine DNA. 1526 Sporen wurden ausgewertet (Tab. 3.4, Abb. 3.16). Von den 1646 untersuchten Sporen von NL Δ Pkal::pSET-*pkaI* waren 93,99% lebendig, 4,25% tot und 1,76% ohne DNA (Tab. 3.4, Abb. 3.16). Für den Stamm NL Δ Pkal::pSET-*pkaJ* wurden 1022 Sporen ausgewertet. Von diesen waren 93,64% lebendig, 4,21% tot und 2,15% der Sporen besaßen keine DNA (Tab. 3.4, Abb. 3.16).

Tabelle 3.4: Auswertung der lebend/tot Färbung der Stämme NL Δ Pkal und NL Δ Pkal mit je einer Kopie eines eSTPK-Gens

Stamm	NL Δ Pkal	::pSET- <i>pkaH</i>	::pSET- <i>sco4776</i>	::pSET- <i>pkaD</i>	::pSET- <i>pkaI</i>	::pSET- <i>pkaJ</i>
Lebend (grün)	92.99%	95.32%	91.75%	95.74%	93.99%	93.64%
Tot (rot)	4.29%	3.38%	3.27%	2.56%	4.25%	4.21%
Ohne DNA	2.72%	1.30%	4.98%	1.70%	1.76%	2.15%
Gezählte Sporen	1655	1538	1285	1526	1646	1022

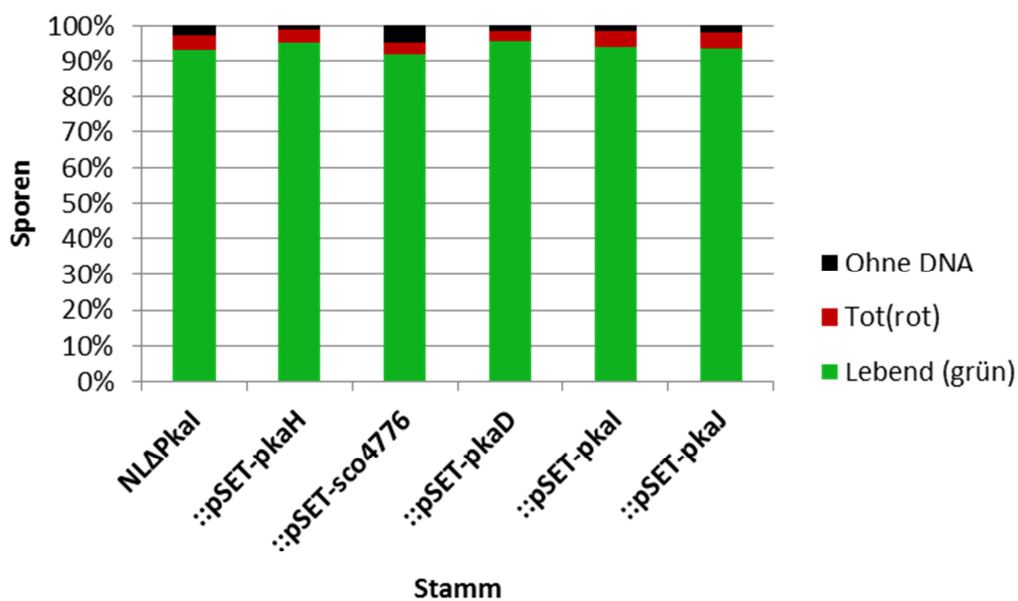


Abbildung 3.16: Vergleich des Anteils an lebenden Sporen, toten Sporen und Sporen ohne DNA in verschiedenen Stämmen von *S. coelicolor* NL Δ Pkal: Die berechneten prozentualen Werte für lebende, tote und keine DNA enthaltende Sporen aus Tabelle 3.4 wurden als gestapelte Säule grafisch dargestellt.

3.4.5.3 Lebensfähigkeit der Sporen von NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit zusätzlicher Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ*

NL Δ 4775-4779 produzierte aberrante Sporen (Abb. 3.13). Ein einzelnes der eSTPK-Gene *pkaH-pkaJ* war nicht in der Lage, den Phänotyp zu komplementieren (Abb. 3.13). Um zu untersuchen, ob die Deletion des eSTPK-Clusters *pkaH-pkaJ*, bzw. die Expression eines einzelnen eSTPK-Gens, ähnlich dramatische Auswirkungen

bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen in den Sporenketten hatte, wurde auch die LIVE/DEAD-Färbung von NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit einer der eSTPKs quantitativ ausgewertet.

In der Deletionsmutante NL Δ 4775-4779 wurde beobachtet, dass von 1808 ausgezählten Sporen 82,14% lebendig waren und 16,81% tot. In 1,05% der Sporen wurde keine DNA nachgewiesen (Tab. 3.5, Abb. 3.17). Es wurden also ca. 10% mehr nicht lebendige Sporen gefunden als in der Mutante NL Δ Pkal, in welcher nur *pkaI* deletiert war. Durch den höheren Prozentsatz an toten Sporen war der Unterschied in diesem Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp M145 stärker als der Unterschied zwischen NL Δ Pkal und M145. 779 Sporen von NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaH* wurden untersucht. 89,99% waren lebendig, 6,42% tot und 3,59% ohne DNA (Tab. 3.5, Abb. 3.17). 80,43% der ausgezählten Sporen von NL Δ 4775-4779::pSET-*sco4776* waren lebendig. Nur 12,34% waren tot und 7,23% enthielten keine DNA. Von diesem Stamm wurden 1272 Sporen untersucht (Tab. 3.5, Abb. 3.17). In NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaD* waren von 1704 Sporen 90,37% lebendig. 6,81% waren tot und 2,82% enthielten keine DNA (Tab. 3.5, Abb. 3.17). NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaI* besaß 87,61% lebendige Sporen, 4,58% tote Sporen und 7,81% Sporen ohne DNA, dabei wurden 1178 Sporen ausgewertet (Tab. 3.5, Abb. 3.17). In dem Stamm NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaJ* wurden 1178 Sporen untersucht. Von diesen waren 87,01% lebendig, 8,41% tot und 4,58% ohne DNA (Tab. 3.5, Abb. 3.17). Der Anteil an lebenden Sporen von NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779::pSET-*(pkaH-pkaJ)* lag zwischen 80% und 90%. Der Anteil an toten Sporen war auch hier nicht so groß wie in den Stämmen mit je einer zusätzlichen Kinase M145::pSET-*(pkaH-pkaJ)*. Bei der Untersuchung der von NL Δ 4775-4779 abgeleiteten Stämme mit je einer Kopie eines eSTPK-Gens fiel auf, dass der Anteil an Sporen ohne DNA mit mindestens 2,8% stets deutlich größer war wie in NL Δ 4775-4779 mit 1% (Tab. 3.5). In den Stämmen NL Δ 4775-4779::pSET-*sco4776* und NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaI* lag der Anteil der Sporen ohne DNA mit ~7% sogar sehr deutlich über dem Wert von NL Δ 4775-4779.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.5: Auswertung der lebend/tot Färbung der Stämme NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit je einer Kopie eines eSTPK-Gens

Stamm	NL Δ 4775-4779	::pSET- <i>pkaH</i>	::pSET- <i>sco4776</i>	::pSET- <i>pkaD</i>	::pSET- <i>pkaI</i>	::pSET- <i>pkaJ</i>
Lebend (grün)	82.14%	89.99%	80.43%	90.37%	87.61%	87.01%
Tot (rot)	16.81%	6.42%	12.34%	6.81%	4.58%	8.41%
Ohne DNA	1.05%	3.59%	7.23%	2.82%	7.81%	4.58%
Gezählte Sporen	1808	779	1272	1704	1178	1178

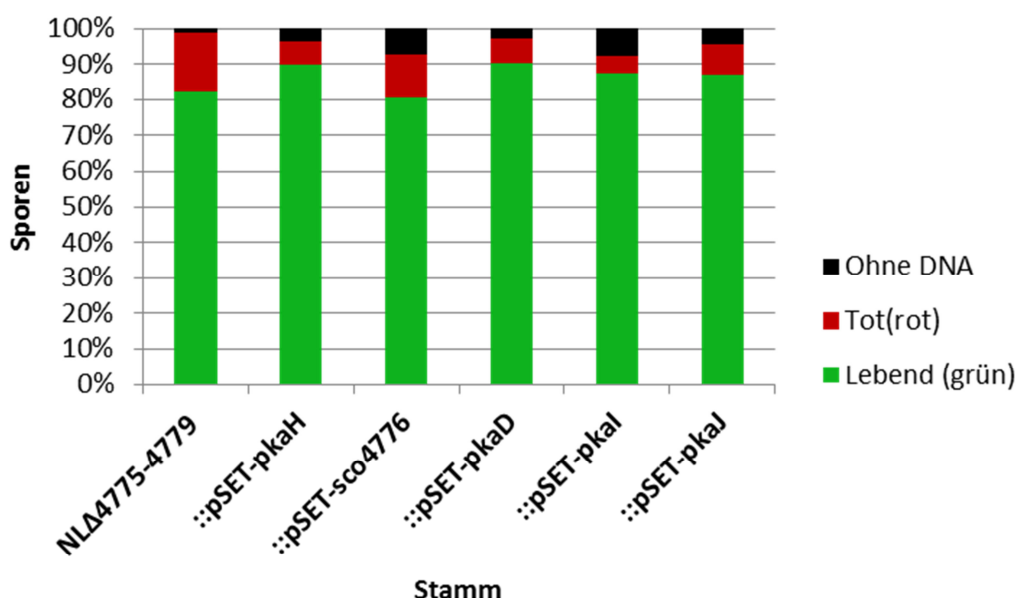


Abbildung 3.17: Vergleich des Anteils an lebenden Sporen, toten Sporen und Sporen ohne DNA in verschiedenen Stämmen von *S. coelicolor* NL Δ 4775-4779: Die berechneten prozentualen Werte für lebende, tote und keine DNA enthaltende Sporen aus Tabelle 3.5 wurden als gestapelte Säule grafisch dargestellt.

Während in M145 über 99% der Sporen lebendig waren, führte schon eine zusätzliche Kopie eines der Gene aus dem eSTPK-Cluster *pkaH-pkaJ* zu einer starken Veränderung dieses Phänotyps (Abb. 3.15). Bei M145::*pSET-pkaJ* waren mit nur noch 43% lebendigen Sporen mehr als die Hälfte der Sporen in Sporenketten tot (Tab. 3.3). Auch konnten im Gegensatz zu M145 in allen Stämmen mit zusätzlichem eSTPK-Gen tote Sporen nachgewiesen werden (Tab. 3.3).

In der Deletionsmutante $N\Delta PkaI$ waren 93% der Sporen lebendig (Tab. 3.4). Die Deletion führte also nur zu einem milden Effekt bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen im Vergleich zu M145. Auch die Stämme von $N\Delta PkaI$ mit zusätzlichem *eSTPK*-Gen zeigten einen ähnlich milden Effekt bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen. Der Anteil an lebendigen Sporen lag immer über 90% (Tab. 3.4).

Die Deletion des gesamten Clusters *pkaH-pkaJ* in der Mutante $N\Delta 4775-4779$ hatte einen drastischeren Effekt auf die Lebensfähigkeit der Sporen als die Deletion von *pkaI* in $N\Delta PkaI$. Bei $N\Delta 4775-4779$ lag der Anteil lebendiger Sporen nur noch bei 82% (Tab. 3.5). In den Stämmen von $N\Delta 4775-4779$ mit einer einzelnen Kopie eines der Gene waren zwischen 80% und 90% der Sporen lebendig (Abb. 3.17). Auffallend war bei diesen Stämmen, dass der Anteil an Sporen ohne DNA mit mindestens 2,8% und bis 7,8% deutlich erhöht war (Tab. 3.5).

Ein Zusammenhang zwischen der Bildung aberranter Sporen und der Lebensfähigkeit war nicht zu erkennen (Abb. 3.14). Die zusätzliche Kopie eines der Gene in M145 führte also bezüglich des Anteils an lebendigen Sporen zu den größten Abweichungen. Die höchsten Anteile an Sporen ohne DNA wurden in den Stämmen von $N\Delta 4775-4779$ mit einem der *eStPK*-Gene gefunden (Abb. 3.17).

3.4.6 Einfluss von osmotischem Stress und wachstumshemmenden Stoffen auf das Auskeimen der Sporen

Aufgrund seiner nicht motilen Lebensweise bildet *S. coelicolor* Sporen zur Verbreitung, vor allem aber um widrige Umweltzustände zu überdauern. Um zu gewährleisten, dass Sporen von *S. coelicolor* in der Lage sind, negative Umweltbedingungen wie z.B. hohen osmotischen Stress durch Trockenheit oder das Vorhandensein von zellwandschädigenden Agenzien wie Antibiotika oder Enzyme durch konkurrierende Mikroorganismen zu überleben, ist eine intakte Zellwand essentiell.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob osmotischer Stress durch hohe NaCl-Konzentrationen oder ob die direkt auf die Zellwand wirkenden Agenzien Lysozym und Vancomycin einen Einfluss auf die Keimfähigkeit der Sporen besitzen.

3.4.6.1 Einfluss von osmotischem Stress auf das Auskeimen der Sporen

Die intakte Zellwand schützt die Zelle zuverlässig vor wechselnden osmotischen Bedingungen, denen sie in ihrem Habitat ausgesetzt sein kann. Ein Beweis für einen Defekt in der Zellwand ist eine niedrigere Toleranz für osmotischen Stress. Auskeimende Sporen der Deletionsmutanten der Gene *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2*, *sfr* und *sco2097* von *S. coelicolor* zeigten eine deutlich niedrigere Toleranz gegen eine hohe Salzkonzentration von 6% NaCl als M145 (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Sie keimten auf LB Agar ohne zusätzliches NaCl wie M145 aus. Auf LB Agar mit 6% NaCl konnte ein Wachstum der Deletionsmutanten allerdings nur beobachtet werden, wenn sie in sehr großer Zahl aufgetropft wurden.

Um zu untersuchen, ob die Gene *pkaH-pkaJ* einen Einfluss auf die Toleranz der keimenden Sporen gegen osmotischen Stress durch hohe Salzkonzentrationen haben, wurden M145, NLΔPkaI und NLΔ4775-4779 inklusive aller abgeleiteter Stämme auf LB Agarplatten mit einem Gradienten von +0% - +6% NaCl getestet (Abb. 3.17).

Die Sporen der Stämme NLΔPkaI und NLΔ4775-4779 waren tolerant gegenüber dem osmotischen Stress und waren in der Lage, genau wie M145 über den gesamten Gradienten ein dichtes Substratmyzel zu bilden (Abb. 3.18). Bis auf NLΔ4775-4779::pSET-*pkaI* konnten die Sporen aller Stämme mit einer Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens nicht über den gesamten Gradienten auszukeimen. Sie konnten jeweils nur bei geringen NaCl Konzentrationen ein dichtes Substratmyzel bilden. Wurde die NaCl Konzentration höher, konnten nur noch vereinzelt Sporen auskeimen. Dies machte sich im Wachstum von nur einigen wenigen Einzelkolonien, im Gegensatz zu dem dichten Wachstum der toleranten Stämme bemerkbar (Abb. 3.18). Auffallend war, dass von den Stämmen mit einer Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens diejenigen am tolerantesten waren, welche das pSET-*pkaI* Plasmid trugen. NLΔ4775-4779::pSET-*pkaI* konnte sogar über den gesamten Gradienten genauso gut wachsen wie M145, NLΔPkaI und NLΔ4775-4779 (Abb. 3.17).

Der Versuch zeigte, dass die Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens die Toleranz gegenüber osmotischem Stress und somit vermutlich auch die Integrität der Zellwand verringerte. Das Gen *pkaI* hatte stets den geringsten Einfluss.

3. Ergebnisse

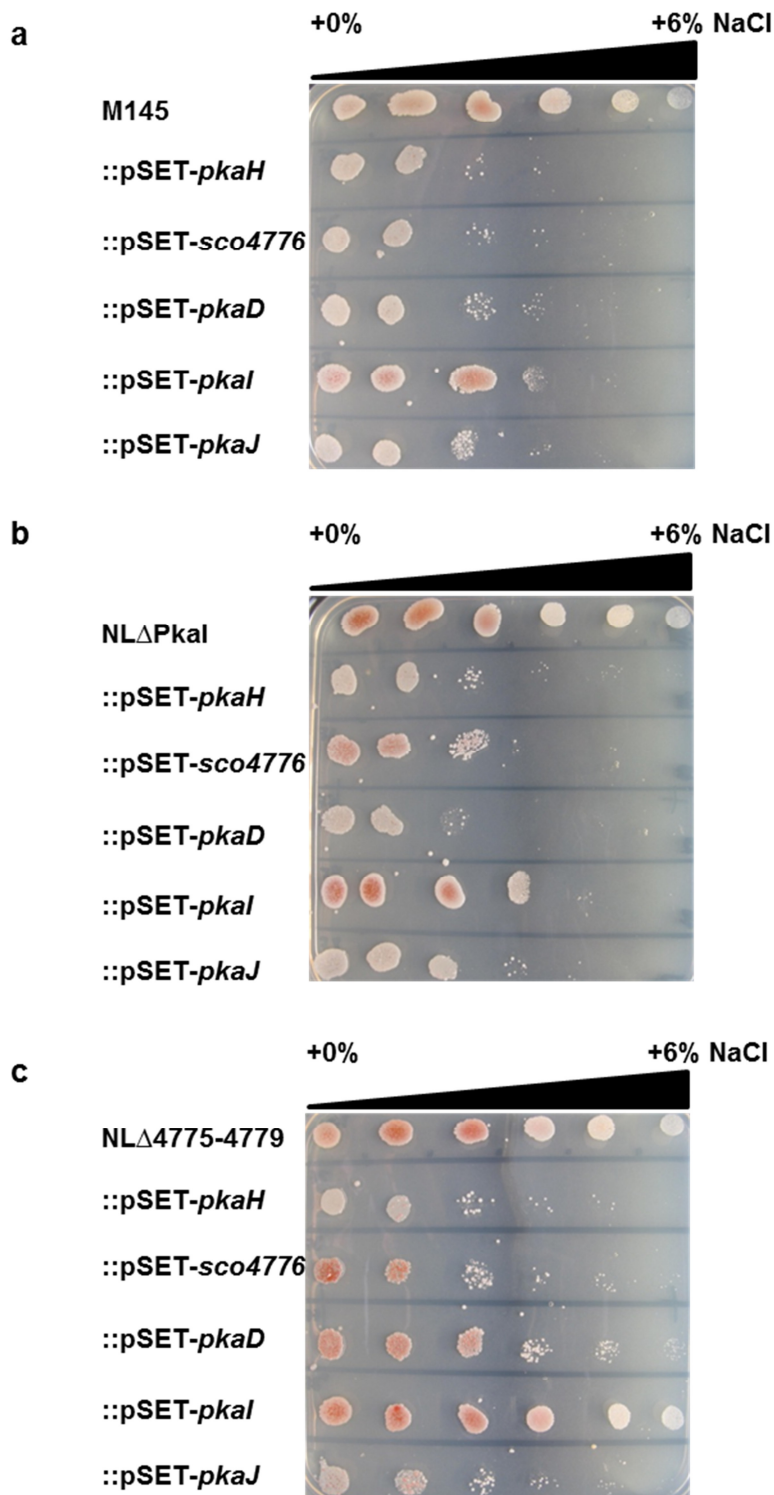


Abbildung 3.18: Toleranz keimender Sporen gegenüber Zellwandstress durch osmotischen Stress: Ca. 10.000 Sporen der Stämme M145 inklusive einer Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens (a), NLΔ*PkaI* inklusive einer Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens (b) und NLΔ4775-4779 inklusive einer Insertion eines zusätzlichen eSTPK-Gens (c) wurden auf LB Agarplatten mit einem Gradienten von +0-6% NaCl aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Der Gradient war von links nach rechts ansteigend, gekennzeichnet durch die zunehmende Breite des schwarzen Dreiecks. Die Minimalkonzentration von +0%NaCl und die Maximalkonzentration von +6% NaCl sind angegeben.

3.4.6.2 Empfindlichkeit auskeimender Sporen gegen Vancomycin und Lysozym

Viele im Boden lebende Mikroorganismen produzieren Antibiotika oder sekretieren Enzyme, die andere Mikroorganismen hemmen oder töten, und verschaffen sich so einen Vorteil im Kampf um die limitiert verfügbaren Ressourcen. *S. coelicolor* M145 besitzt die Resistenzgene gegen das Glycopeptid Vancomycin, und seine Sporen können in dessen Gegenwart auskeimen. Allerdings genügt das Vorhandensein der Resistenzgene alleine nicht, um auskeimende Sporen resistent zu machen. Bei den Experimenten zur Charakterisierung des SSSC wurden Sporen der Deletionsmutanten der Gene *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2*, *sfr*, *sco2097*, *sco2584* und *sco2997* auf ihre Resistenz während des Auskeimens gegen Vancomycin getestet (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Bis auf die Sporen der Deletionsmutante von *sco2584* zeigten alle Sporen der übrigen SSSC-Mutanten eine hohe Sensitivität gegen Vancomycin (Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Auch die Sensitivität der Sporen der Mutanten im Vergleich zu M145 gegen das zellwandverdauende Enzym Lysozym wurde getestet. Hier zeigten alle Mutanten eine erhöhte Sensitivität im Vergleich mit M145 (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011).

Sowohl die Resistenz bzw. Sensitivität der Sporen der Deletionsmutanten $NL\Delta Pka1$ und $NL\Delta 4775-4779$ im Vergleich zu M145 als auch die der abgeleiteten Stämme von M145, $NL\Delta Pka1$ und $NL\Delta 4775-4779$ mit je einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens gegen Vancomycin und Lysozym wurde getestet.

Hierfür wurden ca. 10^6 Sporen einer Sporensuspension des jeweiligen Stammes auf LB Agarplatten ausgestrichen und je eine Verdünnungsreihe von Vancomycin (10m μ g; 5 μ g; 2,5 μ g; 1,25 μ g; 0,625 μ g und 0,3125 μ g) oder Lysozym (500 μ g; 250 μ g; 125 μ g; 62,5 μ g; 31,25 μ g und 15,625 μ g) auf die eingetrockneten Sporen aufgetropft (Abb. 3.19).

Die Sporen von M145 konnten bis zu einer Menge von etwa 2,5 μ g aufgetropftem Vancomycin auskeimen und bildeten ein dichtes Myzel. Bei den größeren Mengen von Vancomycin waren nur einige wenige Kolonien zu beobachten, welche auf einzelne Sporen zurückgingen, die trotz der hohen Vancomycinkonzentration auskeimen konnten (Abb. 3.19). Von den Stämmen mit einer zusätzlichen Kopie

eines eSTPK-Gens konnten nur Sporen von M145::pSET-*pkaI* bei aufgetropften Mengen von mehr als 0,625µg Vancomycin auskeimen (Abb. 3.19). Sie zeigten in etwa das gleiche Wuchsverhalten wie M145. M145::pSET-*pkaH* konnte etwa bis zu 0,625µg aufgetropften Vancomycin zu einem dichten Myzel auskeimen. Für Sporen von M145::pSET-*sco4776*, M145::pSET-*pkaD* und M145::pSET-*pkaJ* waren nur vereinzelte Kolonien bis ca. 0,625µg aufgetropften Vancomycin zu beobachten.

Das Auftropfen der Verdünnungsreihe von Lysozym auf Sporen von M145 und Stämme mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens führte in allen Fällen zu Hemmhöfen. Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde mit sinkender Menge aufgetropften Lysozyms kleiner (Abb. 3.19). Dieser Effekt war bei allen M145-Stämmen sichtbar. Alle Hemmhöfe hatten einen unscharfen Rand, was bedeutete, dass einzelne Sporen in den Randbereichen der Hemmhöfe auskeimen konnten (Abb. 3.19).

Sporen der Mutante NLΔPkaI konnten auf bis zu einer aufgetropften Menge von 5µg Vancomycin als dichtes Myzel wachsen (Abb. 3.19). NLΔPkaI::pSET-*pkaH* und NLΔPkaI::pSET-*sco4776* wuchsen bis 1,25µg Vancomycin als dichtes Myzel. Bei höheren Konzentrationen konnten nur noch sehr wenige Sporen auskeimen, erkennbar an vereinzelt Kolonien (Abb. 3.19). Nur sehr wenige Sporen der Stämme NLΔPkaI::pSET-*pkaD* und NLΔPkaI::pSET-*pkaJ* waren in der Lage, in Gegenwart von Vancomycin auszukeimen. Für diese Stämme wurden wenige Einzelkolonien bis zu einer aufgetropften Menge von 0,625µg Vancomycin beobachtet (Abb. 3.19). Der genetisch komplementierte Stamm NLΔPkaI::pSET-*pkaI* konnte bis zu einer aufgetropften Menge von 2,5µg als dichtes Myzel wachsen (Abb. 3.19).

In der Anfälligkeit gegen Lysozym zeigte sich kein Unterschied zwischen den Stämmen NLΔPkaI und den Stämmen mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens, wie es auch schon bei den Stämmen M145 und den von M145 abgeleiteten Stämmen mit je einer Kopie eines eSTPK-Gens beobachtet wurde (Abb. 3.19). Bei den Stämmen NLΔPkaI und den Stämmen mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens konnten einige Sporen am Rand des Hemmhofes auskeimen (Abb. 3.19).

Sporen von NL Δ 4775-4779 und der Stämme mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens waren nicht in der Lage, in Gegenwart von Vancomycin auszukeimen (Abb. 3.19), weder als Myzel noch als Einzelkolonien. Einzig Sporen von NL Δ 4775-4779::pSET-*pkaH* konnten bis zu einer aufgetropften Menge von 0,625 μ g Vancomycin ein dichtes Myzel bilden und bei größeren Mengen Einzelkolonien (Abb. 3.19).

Die Sporen von NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens sind anfälliger gegen Lysozym als die Sporen von M145, NL Δ PkaI und der abgeleiteten Stämme von M145 und NL Δ PkaI mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens. Dies war an etwas größeren Hemmhöfen bei allen aufgetropften Mengen an Lysozym im Vergleich zu M145, NL Δ PkaI und den abgeleiteten Stämmen sichtbar. Vor allem die scharfen Ränder der Hemmhöfe, deuteten darauf hin, dass Sporen auch durch die geringen Mengen an Lysozym an den Rändern der Hemmhöfe wirksam am Auskeimen gehemmt wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die zusätzliche Insertion eines der Gene *pkaH*, *sco4776*, *pkaD* oder *pkaJ* in M145 oder NL Δ PkaI zu einer stark erhöhten Sensitivität gegenüber Vancomycin, nicht aber gegenüber Lysozym führte (Abb. 3.19). Eine zusätzliche Kopie von *pkaI* in M145 oder NL Δ PkaI hatte kaum Auswirkungen auf diesen Phänotyp (Abb. 3.19).

Die keimenden Sporen der Mutante NL Δ 4775-4779 zeigten eine hohe Sensitivität gegenüber Vancomycin und auch Lysozym (Abb. 3.19). Die Insertion einer Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ* führte zu keiner signifikanten Veränderung dieses Phänotyps.

3. Ergebnisse

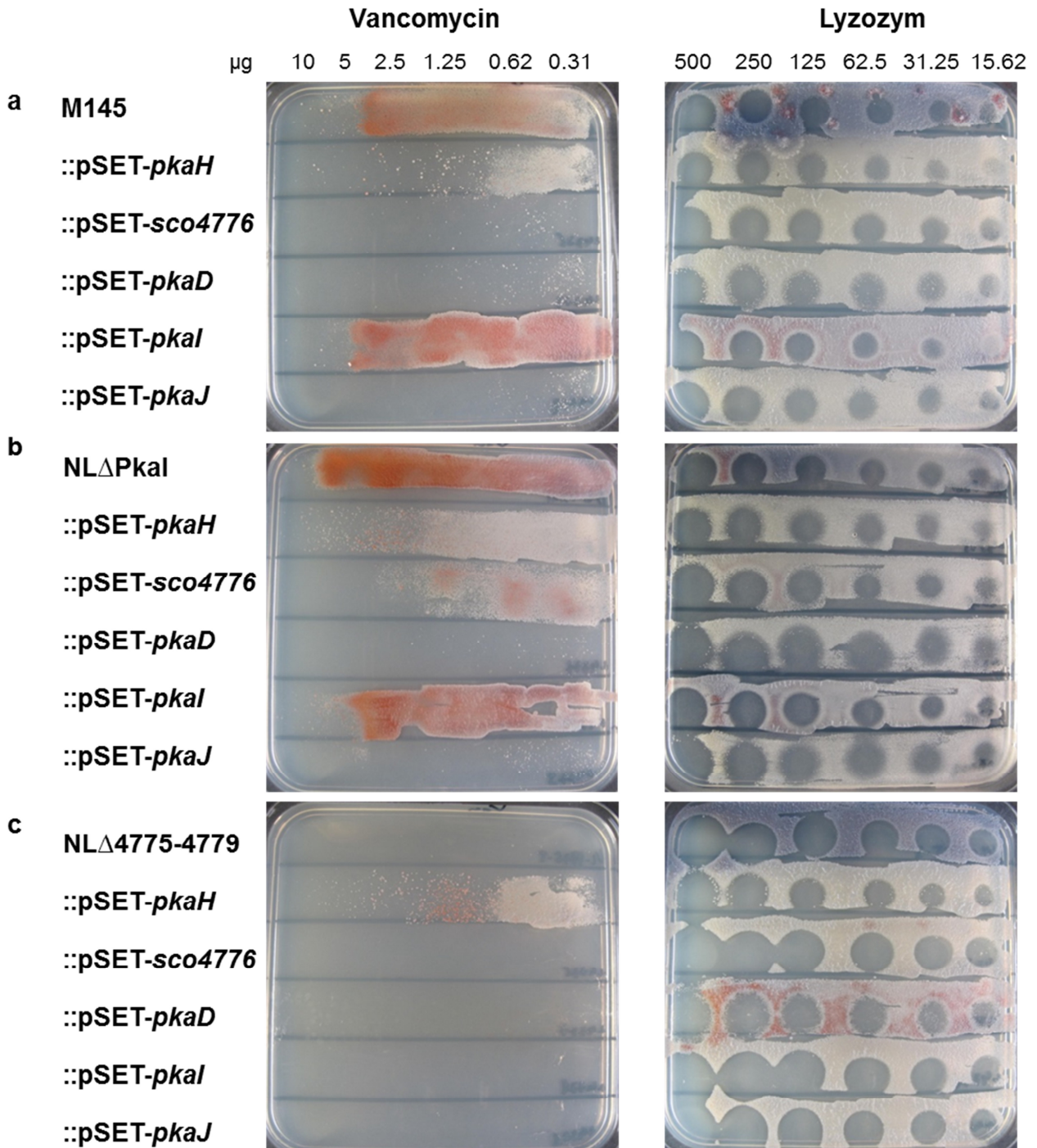


Abbildung 3.19: Anfälligkeit der Sporen von M145, NL Δ PkaI, NL Δ 4775-4779 und der abgeleiteten Stämme gegen Vancomycin und Lysozym: Je 10^6 Sporen der Stämme M145 und M145 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens (**a**), der Stämme NL Δ PkaI und NL Δ PkaI mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens (**b**) und NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens (**c**) wurden gemeinsam auf LB Agarplatten ausplattiert. Auf die ausplattierten Sporen wurde jeweils 5 μl einer Verdünnungsreihe von Vancomycin mit den Mengen 10 μg ; 5 μg ; 2,5 μg ; 1,25 μg ; 0,62 μg und 0,31 μg in Wasser bzw. 500 μg ; 250 μg ; 125 μg ; 62,5 μg ; 31,25 μg und 15,62 μg Lysozym in Wasser aufgetropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert.

3.4.6.3 Vergleich der Empfindlichkeit keimender Sporen und Substratmyzels von M145, NL Δ Pka1 und NL Δ 4775-4779 gegenüber Vancomycin und Lysozym

Die Sporen von NL Δ 4775-4779 waren sensitiver gegenüber Lysozym und Vancomycin als die Sporen von M145 und NL Δ Pka1 (Abb. 3.19). Diese Sensitivität ist auch für die meisten der charakterisierten Deletionsmutanten von *S. coelicolor* in Genen des SSSC beschrieben. Allerdings wurde für alle diese Deletionsmutanten und auch den Wildtyp M145 nachgewiesen, dass nur auskeimende Sporen und nicht das vegetative Substratmyzel von dieser Sensitivität betroffen waren (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011).

Um zu untersuchen, ob das Substratmyzel von NL Δ Pka1 und NL Δ 4775-4779 im Vergleich mit dem von M145 sensitiv gegenüber Vancomycin und Lysozym war, wurden Sporen der Stämme auf einer LB Agarplatte ausgestrichen und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden Filterplättchen mit je 5 μ g Vancomycin oder 50 μ g Lysozym auf das gewachsene Substratmyzel gelegt (Abb. 3.20). Für den direkten Vergleich mit dem Effekt auf auskeimende Sporen wurden auch Filterplättchen mit Vancomycin oder Lysozym auf frisch ausgestrichene Sporen gelegt (Abb. 3.20).

Während die auskeimenden Sporen von M145 und NL Δ Pka1 keine Sensitivität gegen Vancomycin oder Lysozym (Abb. 3.20) zeigten, wiesen auskeimende Sporen von NL Δ 4775-4779 jedoch einen Hemmhof um die Filterplättchen auf, in welchem keine Sporen ausgekeimt waren (Abb. 3.20). Das Substratmyzel von keinem der getesteten Stämme zeigte hingegen eine Inhibierung des Wachstums durch Vancomycin oder Lysozym (Abb. 3.20). Es waren nur die auskeimenden Sporen NL Δ 4775-4779 von dem inhibierenden Effekt von Vancomycin und Lysozym betroffen.

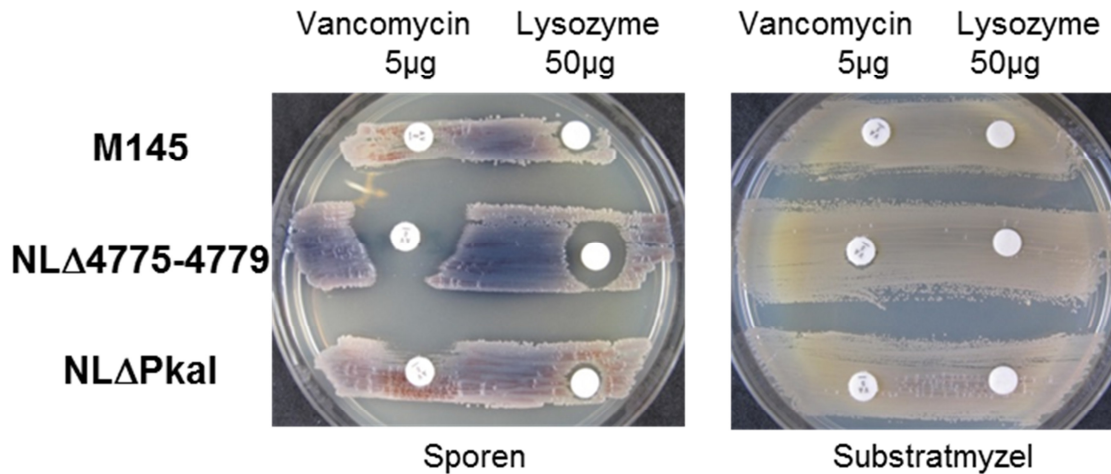


Abbildung 3.20: Vergleich der Anfälligkeit der Sporen und des Substratmyzels von M145, NLΔ4775-4779 und NLΔPkal gegen Vancomycin und Lysozym: Je 10^6 Sporen von M145, NLΔPkal und NLΔ4775-4779 wurden auf zwei LB Agarplatten ausgestrichen. Auf einer Platte wurden Filterplättchen mit 5µg Vancomycin und 50µg Lysozym direkt nach dem Ausplattieren der Sporen auf diese aufgelegt. Die zweite Platte wurde zunächst für 24 Stunden bei 30°C inkubiert, so dass die Sporen auskeimen und Substratmyzel ausbilden konnten, bevor die Filterplättchen mit Vancomycin und Lysozym aufgelegt wurden. Insgesamt wurden beide Platten für drei Tage bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert.

3.4.6.4 Einfluss von $MgCl_2$ auf die Sensitivität der Sporen gegen Vancomycin und Lysozym während des Auskeimens

Eine massive Störung in der Zellwandsynthese kann für eine Bakterienzelle letal sein (Kawai, Asai et al. 2009, Schirner and Errington 2009) bzw. sie anfälliger für Stress und Antibiotika machen (siehe Kapitel 3.4.6.1+2). Interessanterweise scheinen hohe Konzentrationen an Mg^{2+} -Ionen einen stabilisierenden Einfluss auf die Zellwand zu haben. Deletionsmutanten von *B. subtilis* in den Genen *mreB* oder *mbi* konnten auf Medium, welches mit 20mM $MgSO_4$ supplementiert war wachsen. Ohne zusätzliche Mg^{2+} -Ionen im Medium war nahezu kein Wachstum möglich (Schirner and Errington 2009). Die durch diese Gene kodierten Proteine MreB und Mbi sind wichtig für die laterale Zellwandsynthese und für die Ausbildung der korrekten Zellform.

Sporen der Stämme M145, NLΔPkal, NLΔ4775-4779 und der abgeleiteten Stämme von M145, NLΔPkal, NLΔ4775-4779 mit einem zusätzlichen eSTPK-Gen wurden auf einen Einfluss von $MgCl_2$ bezüglich des Auskeimens der Sporen in Gegenwart von Vancomycin und Lysozym untersucht. Hierfür wurden je 10^6 Sporen der

verschiedenen Stämme je auf einer LB Agarplatte und auf einer LB +3mM MgCl₂ Agarplatte ausgebracht. In diesem Fall wurde keine Verdünnungsreihe von Vancomycin und Lysozym auf die frisch ausplattierten Sporen aufgetropft, sondern Filterplättchen aufgelegt, die 5µg Vancomycin bzw. 50µg Lysozym enthielten.

Wie in vorherigen Kapitel 3.4.6.2 beschrieben, waren die auskeimenden Sporen von M145 und von M145::pSET-*pkaI* resistent gegen Vancomycin, während bei den Stämmen M145::pSET-*pkaH*, M145::pSET-*sco4776*, M145::pSET-*pkaD* und M145::pSET-*pkaJ* ein deutlicher Hemmhof zu sehen war (Abb. 3.20). Das Auflegen der Filterplättchen mit 50µg Lysozym hatte keine nennenswerten Effekte auf das Auskeimen (Abb. 3.21).

Durch die Zugabe von 3mM MgCl₂ zum LB Agar konnte die hemmende Wirkung von Vancomycin auf das Auskeimen der Sporen der Stämme M145::pSET-*pkaH*, M145::pSET-*sco4776*, M145::pSET-*pkaD* und M145::pSET-*pkaJ* aufgehoben werden (Abb. 3.21). Der Phänotyp bezüglich der Sensitivität gegenüber Vancomycin konnte also durch die Zugabe von 3mM MgCl₂ zum Medium vollständig aufgehoben werden.

Sporen von NLΔ*PkaI* keimten wie M145 normal aus und zeigten keine Sensitivität gegenüber Vancomycin oder Lysozym (Abb. 3.21). Die Sporen der Stämme NLΔ*PkaI* mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens waren alle sensitiver gegenüber Vancomycin als NLΔ*PkaI*. Der Stamm NLΔ*PkaI*::pSET-*pkaI* war nur geringfügig sensitiver (Abb. 3.20). Gegenüber Lysozym konnte bei keinem der Stämme eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu M145 oder NLΔ*PkaI* festgestellt werden (Abb. 3.21).

Der Phänotyp bezüglich der Sensitivität gegenüber Vancomycin der NLΔ*PkaI* Stämme mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens konnte durch die Zugabe von 3mM MgCl₂ vollständig aufgehoben werden, und es war kein Unterschied mehr zwischen diesen Stämmen und M145 oder NLΔ*PkaI* zu erkennen (Abb. 3.21).

Den größten Einfluss auf das Auskeimen der Sporen hatten sowohl Vancomycin als auch Lysozym auf Sporen der Stämme NLΔ4775-4779 und NLΔ4775-4779 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens. Für diese Stämme konnte auf LB Agar in allen Fällen eine hohe Sensitivität gegenüber Vancomycin beobachtet werden (Abb.

3. Ergebnisse

3.21). Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Stämmen M145, NL Δ PkaI und M145 bzw. NL Δ PkaI mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens konnte für NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens eine Sensitivität der Sporen gegenüber Lysozym beobachtet werden (Abb. 3.21).

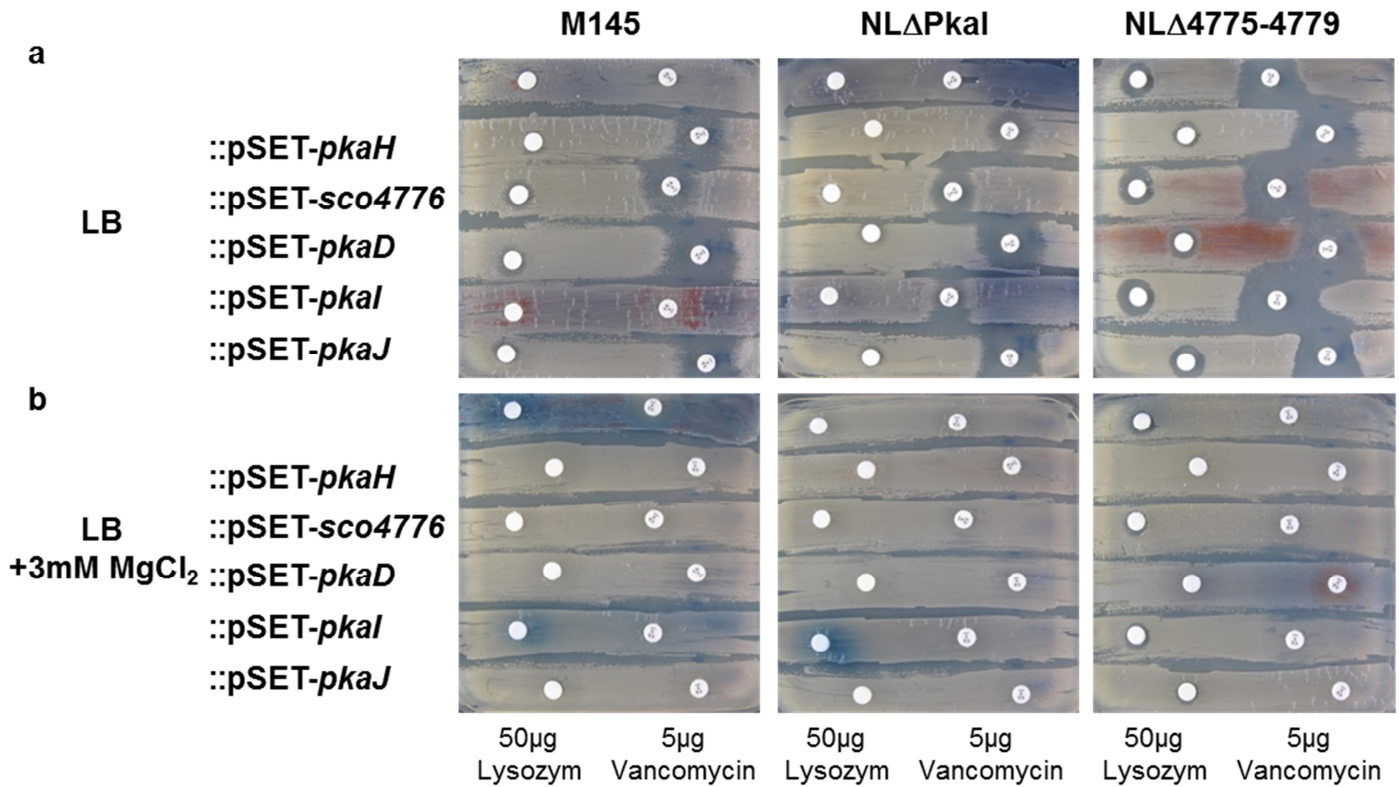


Abbildung 3.21: Einfluss von MgCl₂ auf die Sensitivität der auskeimenden Sporen gegenüber Vancomycin und Lysozym: 10⁶ Sporen der Stämme M145, M145 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens, NL Δ PkaI, NL Δ PkaI mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens, NL Δ 4775-4779 und NL Δ 4775-4779 mit einer zusätzlichen Kopie eines eSTPK-Gens wurden (**a**) auf Platten mit LB Agar und (**b**) auf Platten mit LB +3mM MgCl₂ Agar ausplattiert. Auf die frisch ausplattierten Sporen wurde je ein Filterplättchen mit 50µg Lysozym und eines mit 5µg Vancomycin aufgelegt. Die Platten wurden drei Tage lang bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert.

3.5 Untersuchung der Phosphorylierung der SSSC-Proteine MreC und PBP2 durch die eSTPK Pkal

Die zum Teil starken Phänotypen der Deletionsmutanten und der Stämme von M145 mit einer zweiten Kopie einer der eSTPK-Gene zeigten eindeutig, dass eSTPKs essentiell an der Synthese der verstärkten Sporenwand beteiligt sind (Kapitel 3.4.6). Welche Proteine unter der Kontrolle der eSTPKs stehen ließ sich aus diesen Ergebnissen allerdings nicht sagen.

Um die molekulare Rolle von Pkal besser verstehen zu können, wurden *in vivo*-Daten durch eine Phosphoproteomanalyse von M145 und $\text{NL}\Delta\text{Pkal}$ erhoben. Außerdem wurde die Interaktion von Pkal mit den SSSC-Proteinen MreC und PBP2 genauer untersucht. Sowohl MreC als auch PBP2 wurden im BTH-Experiment als starke Interaktionspartner von Pkal identifiziert (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Aufgrund der gezeigten Toxizität der Überexpression von MreC oder PBP2 in Streptomyceten (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011) wurden die Proteine heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert.

3.5.1 Proteine der Zellwandynthese im Phosphoproteom von *S. coelicolor*

Um Interaktionen auch *in vivo* nachweisen zu können und um weitere Zielproteine von Pkal zu identifizieren, sollte in Kooperation mit dem Proteomcenter Tübingen das Phosphoproteom von M145 mit dem Phosphoproteom von $\text{NL}\Delta\text{Pkal}$ an verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden.

Vor allem die Änderungen des Phosphoproteoms während der Differenzierung des Substratmyzels zum Luftmyzel und weiter zu den reifen Sporen sollte beobachtet werden. Hierfür wurden je $3 \cdot 10^7$ Sporen/Platte der Stämme M145 oder $\text{NL}\Delta\text{Pkal}$ auf Zellophanscheiben ausgestrichen, welche auf MS-Agarplatten lagen. Die Platten wurden für zwei oder vier Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Myzel von den Platten geerntet und aufgeschlossen. Die Proteine wurden durch Ethanol/Aceton-Fällung präzipitiert, gewaschen und für die weitere Untersuchung lyophilisiert. Nachdem die Proteine wieder gelöst und die Konzentration bestimmt wurde, wurden sie mit Trypsin verdaut. Die phosphorylierten Peptide wurden über

TiO₂ Affinitätschromatographie angereichert und durch LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2.12).

Es konnten zwar in beiden Proben Phosphosites nachgewiesen werden, aber die Ergebnisse waren nicht vergleichbar. Von den insgesamt 312 identifizierten Phosphosites wurden 137 ausschließlich in NLΔPkal gefunden während es in M145 nur 25 Phosphopeptide waren. 150 Phosphosites wurden in beiden Proben identifiziert. Insgesamt wurden Die niedrige Anzahl der gemessenen Phosphosites in M145 konnte auf den unterschiedlichen Actinorhodingehalt der Proben zurückgeführt werden. Nach zwei Tagen ist zwar im Fall von M145 noch fast kein Actinorhodin auf der Agarplatte erkennbar, aber das aufgeschlossene Lysat war schon tiefblau gefärbt. Das Lysat von NLΔPkal dagegen war stets heller als das Lysat von M145. Nach der Fällung der Proteine und der Lyophilisierung der Proben waren die M145 Proben immer deutlich stärker blau gefärbt als die Proben von NLΔPkal. Dies war vermutlich auf Actinorhodin zurückzuführen, welches an die Proteine gebunden hatte.

Actinorhodin ist wasserlöslich, fällt aber bei einem pH unter 3 aus. Das Laufmittel der Säule der LC-MS/MS Maschine hat einen pH von 1. Es wurde bei den Proben von M145 oft beobachtet, dass der Druck in der Säule anstieg, während dies bei den Proben von NLΔPkal nicht geschah. Dies ist durch das Ausfallen von Actinorhodin erklärbar.

Aufgrund dieser Problematik wurden vermutlich viele Phosphosites in M145 nicht detektiert und ein Vergleich mit den in NLΔPkal gefundenen Phosphosites war daher nicht sinnvoll. Dennoch war das Phosphoproteom mit insgesamt 312 identifizierten Phosphosites in insgesamt 217 Proteinen das bislang größte Set an Daten über das Phosphoproteom von *S. coelicolor*. 65 der identifizierten Phosphosites waren bereits in der Datenbank PhosSite (geschlossen seit 01.01.2015) erfasst. Es konnten keine Phosphosites in SSSC Proteinen detektiert werden.

Zu den bereits erfassten Phosphosites gehörten unter anderem eine Phosphosite in DivIVA bei welchem die Phosphosites *in vivo* bereits gut charakterisiert sind (Manteca, Ye et al. 2011, Saalbach, Hempel et al. 2013), aber auch die bereits *in vivo* detektierten Phosphosites in den Septierungsfaktoren SepF1 (SCO1749) und

SepF2 (SCO2079), den ribosomalen Proteinen RpID (SCO4703) und RpmC (SCO4710) oder dem Chaperon GroEL2 (SCO4296) (Manteca, Ye et al. 2011). Es wurden zudem neue Phosphosites in Proteinen entdeckt, in denen bereits Phosphosites identifiziert wurden. So wurden beispielsweise neue Phosphosites in den Proteinen GroEL2 (SCO4296), GroES (SCO4761), FtsH (SCO3404), Pgm (SCO7443) oder der putativen Glycosyltransferase SCO1554 gefunden. Sowohl die Verifizierung bereits detektierter Phosphosites als auch die Detektion neuer Phosphosites in bereits beschriebenen phosphorylierten Proteinen zeigte die gute Qualität des gemessenen Phosphoproteoms und dass es sich nicht um Artefakte handelte.

126 der identifizierten Proteine wurde mittels der Proteindatenbank UniProt (www.uniprot.org) eine Funktion zugeordnet.

Obwohl keine Phosphosites in SSSC Proteinen nachgewiesen werden konnten, wurden Phosphosites in insgesamt 13 Proteinen aus den zellwandverwandten Komplexen der Zellwandsynthese (DivIVA (SCO2077), ParB (SCO3887), putative D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidasen (SCO4439, SCO5660)), der Luftmyzelbildung (BldG (SCO3549), BldKA (SCO5112), BldKB (SCO5113), BldKE (SCO5116)) und der Zellteilung (SepF1 (SCO1749), SepF2 (SCO2079), Tig (SCO2620), FtsH (SCO3404), SepF3 (SCO5967)) identifiziert (Tab. 3.7). Außerdem wurde das nicht ribosomal synthetisierte und sekretierte Lantipeptid SapB (SCO6682, *ramS*) gefunden, welches essentiell für die Luftmyzelbildung ist. Diese Funde zeigten, dass auch in *S. coelicolor* Phosphorylierung in allgemeinen Prozessen der Zellwandsynthese, Zellteilung und auch in frühen Schritten der Differenzierung eine Rolle spielt.

Außerdem konnten 34 Proteine dem Primärmetabolismus, zwei dem Sekundärmetabolismus, 33 dem Protein-Metabolismus/Katabolismus, sieben der DNA-Synthese/Reparatur und 35 regulatorischen Funktionen zugeordnet werden. 91 der identifizierten Phosphoproteine waren als "mit unbekannter Funktion" annotiert. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Regulation der Sporenwandsynthese und damit verwandter Themen lag, wurde in diesem Kapitel tiefer auf die Phosphoproteine mit den zugeordneten Funktionen in Zellwandsynthese, Differenzierung und Zellteilung

3. Ergebnisse

eingegangen. Die Vollständige Liste mit allen Phosphoproteinen und zugeordneten Funktionen befindet sich im Anhang 6.3.

Tabelle 3.7: Im Phosphoproteom identifizierte phosphorylierte Proteine mit Rolle in Zellwandsynthese, Zellteilung oder Luftmyzelbildung

SCO Nummer	Synonym	Funktion (aus UniProt)	Größe (phororylierte Aminosäure)	in PhosSite identifiziert
SCO1749	SepF1	Funktion überschneidet sich mit FtsA (Septumbildung)	146 (T ₄₀)	+
SCO2077	DivIVA	Uncharakterisiertes Protein	398 (S ₃₀₉)	+
SCO2079	SepF2	Funktion überschneidet sich mit FtsA	213(S ₉₇ , T ₉₉ , S ₂₁₃)	+ (T ₉₉)
SCO2620	Tig	Triggerfaktor der Zellteilung	468 (T ₄₀)	-
SCO3404	FtsH	ATP-abhängige Zink-Metalloprotease	668 (S ₆₀₀)	-
SCO3549	BldG	Anti-Sigmafaktor Antagonist	113 (T ₁₁₂)	-
SCO3887	ParB	DNA-Aufteilungsprotein oder Sporulationsprotein	328 (S ₃₂₈)	-
SCO4439		Putative D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase	832 (T ₂₄ , T ₇₄ , T ₉₁ , T ₂₈₉)	+ (T ₇₄) + (T ₂₈₉)
SCO5112	BldKA	ABC-Transportsystem, integrales Membranprotein	343 (S ₃)	+
SCO5113	BldKB	ABC-Transportsystem, Lipoprotein	600 (T ₅₆₉)	-
SCO5116	BldKE	Peptid-Transportsystem, ATP-bindende Untereinheit	381 (T ₇ , T ₂₃ , T ₃₇₇)	-
SCO5660		Putative D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase	386 (S ₉₉ , T ₁₀₁)	-
SCO5967	SepF3	Funktion überschneidet sich mit FtsA (Septumbildung)	136 (S ₃₄)	-

Die große Anzahl an gefundenen Phosphoproteinen im allgemeinen und im speziellen die Phosphoproteine mit einer zugeordneten Funktion in den Bereichen Zellwandsynthese, Differenzierung und Zellteilung zeigten, dass Phosphorylierung eine wichtige Rolle in diesen Prozessen spielt.

3.5.2 Untersuchung der Phosphorylierung von MreC durch die Koexpression mit Pkal in *E. coli* BL21 (DE3)

Die Interaktion von Pkal und MreC auf Proteinebene konnte durch die BTH Experimente und deren Quantifizierung von Kleinschnitz (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011) gezeigt werden. Es handelte sich um eine starke Interaktion.

Um zu überprüfen, ob die eSTPK Pkal MreC phosphoryliert, wurden beide Proteine in *E. coli* BL21 (DE3) nach der Methode von Molle et al. koexprimiert (Molle, Leiba et al. 2010). Hierfür wurde zunächst das Gen *mreC* aus *S. coelicolor* via PCR amplifiziert und mittels der an den Primern angehängten Endonucelaseschnittstellen in die Multiple Cloning Site 2 (MCS2) des Plasmids pDuet-Pkal kloniert. Vor der MCS2 war ein Promotor für die T7 RNA Polymerase (P_{T7}). Hinter der MCS2 war eine Nucleotidsequenz für einen Linker und das S-Protein (S-Tag). S-Tag-Fusionsproteine können mittels S-Agarose aufgereinigt werden. Beim Ableiten der Primer wurde darauf geachtet, dass das *mreC* Gen kein Stopcodon mehr enthielt und sich im gleichen Leseraster wie der S-Tag befand. So konnte das Fusionsprotein MreC-S-Tag translatiert werden. Das durch die Klonierung entstandene Plasmid wurde pDuet-MreC genannt.

Auch das Gen *pkal* aus *S. coelicolor* wurde via PCR amplifiziert und mittels der an den Primern angehängten Endonucelaseschnittstellen in das Plasmid pDuet-MreC kloniert. Vor der MCS1, in welche das *pkal* Fragment kloniert wurde, befand sich auch ein P_{T7} , ein ATG Startcodon und eine Nucleotidsequenz für einen His₆ Tag im gleichen Leseraster. Die Primer waren so gewählt, dass das eingefügte *pkal* Gen das gleiche Leseraster wie das ATG Startcodon vor dem His₆ Tag besaß und so das Fusionsprotein His-Pkal translatiert wurde. Also Pkal mit einem N-terminalen His₆ Tag welcher durch via Ni²⁺-NTA aufgereinigt werden kann. Das entstandene Plasmid hieß pDuet-Pkal-MreC.

CaCl₂ kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden entweder mit dem Plasmid pDuet-MreC oder mit dem Plasmid pDuet-Pkal-MreC transformiert.

Für die Expression und Aufreinigung der Proteine MreC und Pkal wurden die *E. coli* BL21 (DE3) Stämme, welche entweder das Plasmid pDuet-MreC (Stamm Duet-MreC) oder das Plasmid pDuet-Pkal-MreC (Stamm Duet-Pkal-MreC) trugen, wie von Molle et al. beschrieben angezogen und die Expression induziert (Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Zunächst wurden die Stämme in LB Medium mit 100µg/ml Spectinomycin bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,6 bei 37°C wachsen gelassen. Danach wurde die Expression der Gene durch Zugabe von IPTG bis zu einer finalen Konzentration von 0,5mM induziert, und die Stämme wurden so weitere drei Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Proteine gemäß der Protokolle (Kapitel 2.10) aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden dann in einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Die drei aufgereinigten Proben (MreC-S-Tag aufgereinigt durch S-Agarose Chromatographie aus Duet-MreC und Duet-Pkal-MreC; His-Pkal aufgereinigt durch Ni²⁺ NTA Chromatographie Duet-Pkal-MreC) waren mit anderen Proteinen verunreinigt. Dies zeigte sich daran, dass in allen Proben im coomassiegefärbten Gel mehrere Banden zu erkennen waren, welche aber deutlich dünner waren als die Banden von MreC-S-Tag und His-Pkal (Abb. 3.22). Ein Gel mit den aufgereinigten Proben von MreC-S-Tag aus Duet-MreC, MreC-S-Tag aus Duet-Pkal-MreC und His-Pkal aus Duet-Pkal-MreC wurde mit ProQ Diamond gefärbt und analysiert. Mit dem Farbstoff ProQ Diamond konnten spezifisch Phosphoserine/-threonine/-tyrosine sichtbar gemacht werden. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, welches alle Proteine in einem Gel anfärbt (Abb. 3.22).

MreC-S-Tag hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 38,42kDa. Das Protein lief im Polyacrylamidgel bei ca. 40kDa (Abb. 3.22). Bei der Aufreinigung von MreC-S-Tag aus Duet-MreC war das Protein als dicke Bande im Gel zu sehen. Bei der Aufreinigung von MreC-S-Tag via S-Agarose aus dem Stamm Duet-Pkal-MreC war neben der Bande für MreC-S-Tag zusätzlich auch eine dicke Bande auf der Höhe

von 55kDa sichtbar (Abb. 3.22). His-Pkal hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 40,86kDa. Trotzdem lief auch das via Ni²⁺-NTA gereinigte His-Pkal auf der Höhe von 55kDa (Abb. 3.22). Dass die Bande bei 55kDa tatsächlich His-Pkal war, wurde durch die spätere Analyse der Doppelbande am Proteome Center Tübingen bestätigt (siehe Kapitel 3.5.3). Zusätzlich konnte mittels Westernblot in allen drei Proben MreC-S-Tag durch einen S-Tag spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Bei der ProQ Diamond Färbung zur Detektion von Phosphoserine/-threonine/-tyrosine waren starke Signale in den beiden aus Duet-Pkal-MreC aufgereinigten Proben zu sehen (Abb. 3.22). Im Falle der S-Agarose Aufreinigung wurden sowohl die Bande von MreC-S-Tag als auch für His-Pkal stark angefärbt (Abb. 3.22). Bei dem Ni²⁺-NTA gereinigten His-Pkal war nur dieses sehr stark angefärbt (Abb. 3.22). In der Probe von MreC-S-Tag aus Duet-MreC wurde keinerlei Signal detektiert (Abb. 3.22). Da in der Probe von MreC-S-Tag aus Duet-MreC kein Signal sichtbar war, war es im Gegensatz zu MreC-S-Tag und His-Pkal aus Duet-Pkal-MreC nicht phosphoryliert. Auch dies konnte vom Proteome Center Tübingen eindeutig nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass es sich bei Pkal tatsächlich um eine eSTPK handelt, da Pkal sich selbst phosphorylieren konnte (Abb.3.22). Die Tatsache, dass MreC-S-Tag nur bei Koexpression mit His-Pkal phosphoryliert wurde, zeigte, dass MreC von Pkal phosphoryliert wird. Außerdem deutet die Koaufrreinigung von MreC und Pkal in allen Proben darauf hin, dass es eine starke Protein-Protein-Interaktion gab.

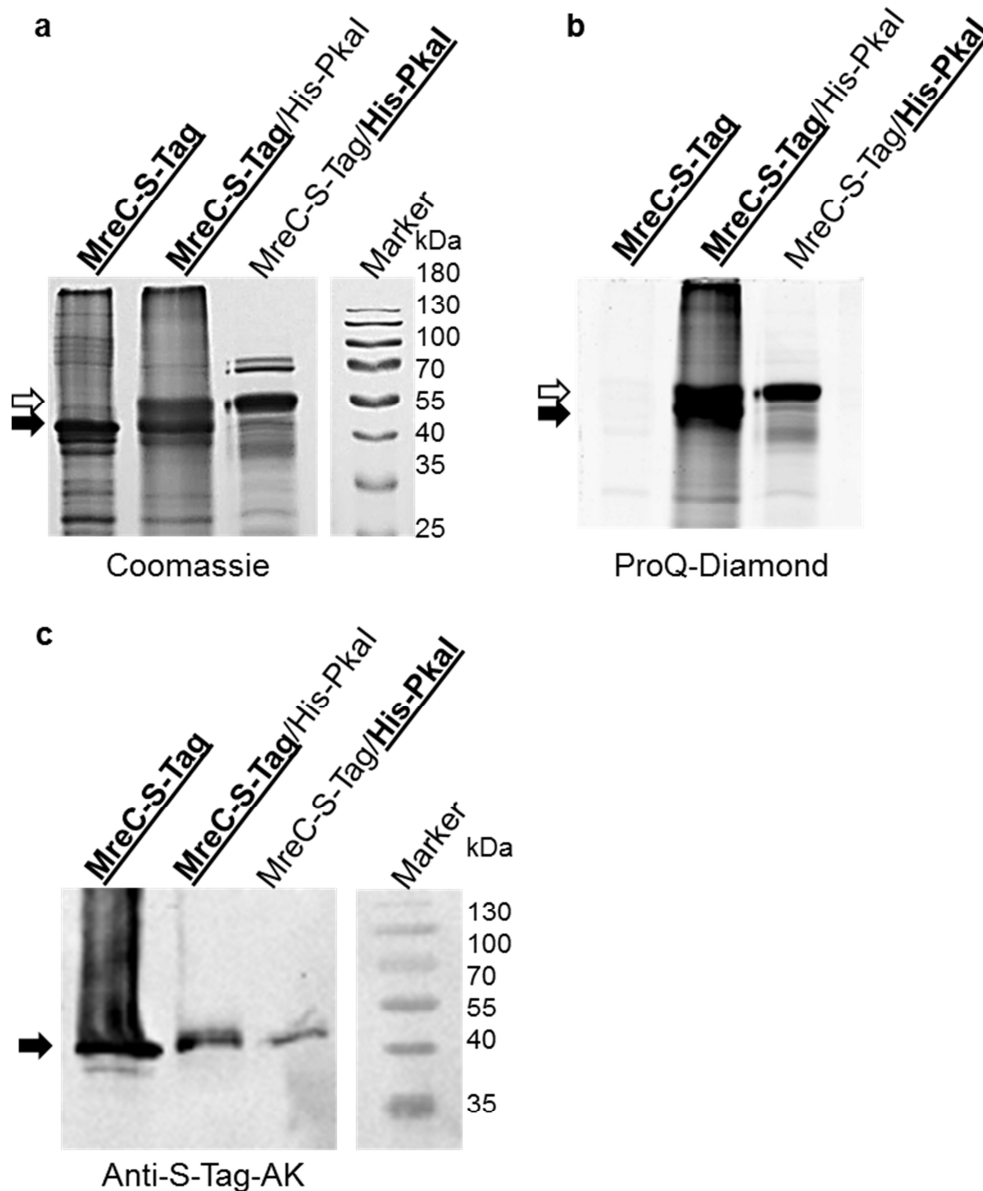


Abbildung 3.22: Untersuchung von MreC-S-Tag und His-Pkal auf Phosphorylierung: **a** Coomassiefärbung einer 12,5%igen SDS-PAGE mit durch S-Agarose Chromatographie aufgereinigtem MreC-S-Tag aus Duet-MreC (**MreC-S-Tag**) und aus Duet-Pkal-MreC (**MreC-S-Tag/His-Pkal**) und durch Ni²⁺-NTA Chromatographie aufgereinigtem His-Pkal aus Duet-Pkal-MreC (MreC-S-Tag/**His-Pkal**). **b** ProQ Diamond Färbung zum Nachweis von Phosphoserine/-threonine/-tyrosine des Gel aus **a**. **c** Westernblot Analyse der Proben aus **a** mit einem Anti-S-Tag-Antikörper welcher mit HRP konjugiert war (Anti-S-Tag AK). MreC-S-Tag ist immer mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet, His-Pkal mit dem weißen.

3.5.2 Untersuchung der Interaktion von Pkal mit PBP2 durch Koexpression in *E. coli* BL21 (DE3)

Neben MreC interagierte Pkal auch stark mit anderen Proteinen des SSSC (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Eines dieser Proteine war PBP2. Dies ist ein monofunktionales Penicillinbindeprotein, welches durch seine Transpeptidase Domäne Peptidoglycanstränge durch das Verknüpfen der Stammpeptide quervernetzen kann. Das für das Protein codierende Gen liegt auch im *mre*-Gencluster von *S. coelicolor*.

Um die mögliche Interaktion von Pkal mit PBP2 zu untersuchen wurden auf die gleiche wie in Kapitel 3.5.1 beschriebene Weise die beiden Plasmide pDuet-PBP2 und pDuet-Pkal-PBP2 konstruiert. Das Fusionsprotein PBP2-S-Tag hat ein berechnetes Molekulargewicht von 86,018kDa. CaCl₂-kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden mit je einem der beiden Plasmide transformiert, was zu den Stämmen Duet-PBP2 und Duet-Pkal-PBP2 führte.

Die Expression der Proteine wurde genau wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben nach der Methode von Molle et al. durchgeführt (Molle, Leiba et al. 2010). Außerdem wurde untersucht ob PBP2-S-Tag in beiden Stämmen exprimiert wurde. Dazu wurden Zellen der Stämme Duet-PBP2 und Duet-Pkal-PBP2 30 Minuten und 120 Minuten nach der Induktion der Expression geerntet und aufgeschlossen. Das Lysat wurde per Zentrifugation fraktioniert (Mat+Meth xxx). Der Überstand enthielt alle löslichen Proteine und die Pelletfraktion Zelltrümmer und unlösliche Proteine. Die Pelletfraktion wurde in 50mM Tris/HCl Puffer resuspendiert. Mit allen Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und anschließend wurden die Proteine per Westernblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Mit dem spezifischen Anti-S-Tag Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass PBP2-S-Tag nur im Stamm Duet-Pkal-PBP2 exprimiert wurde (Abb. 3.23). In keiner Probe des Stammes Duet-PBP2 wurde ein Signal des Antikörpers auf der erwarteten Höhe zwischen 70kDa und 100kDa gesehen (Abb. 3.23). In den Proben von Duet-Pkal-PBP2 war dagegen in den Überstandfraktionen jeweils ein deutliches Signal auf dieser Höhe sichtbar (Abb. 3.23). PBP2 war also nur in Gegenwart von Pkal stabil.

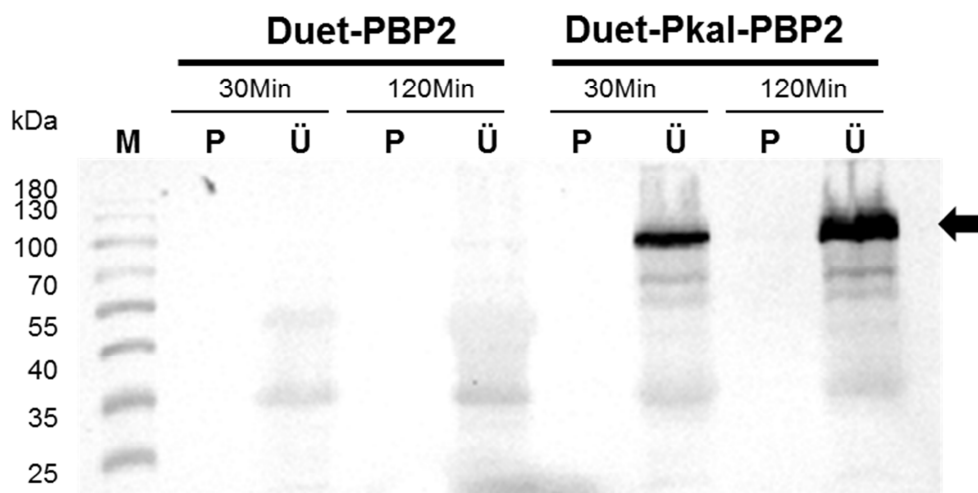


Abbildung 3.23: Synthese von PBP2-S-Tag in An- und Abwesenheit von His-Pkal: Die Stämme Duet-PBP2 und Duet-Pkal-PBP2 wurden bis zu einer OD_{578} von 0,6 angezogen und die Expression mit einer Endkonzentration von 0,5mM IPTG induziert. Zellen wurden 30Minuten und 120 Minuten nach Induktion geerntet, aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Pellet (P) und Überstand (Ü) fraktioniert. Eine Analyse der verschiedenen Proben mittels Westernblot mit spezifischem Antikörper gegen den S-Tag wurde durchgeführt. Das Signal für PBP2-S-Tag ist mit dem schwarzen Pfeil markiert.

Zum Aufreinigen von PBP2-S-Tag wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5mM zu dem Stamm Duet-Pkal-PBP2 zugegeben und für drei Stunden wachsen gelassen. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Expression von *pbp2-S-Tag* und *His-pkal* induziert. Anschließend wurde PBP2-S-Tag unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Hierfür wurden alle Puffer für die Aufreinigung via S-Tag Chromatographie außer dem Elutionspuffer mit 6M Harnstoff versetzt (Mat+Meth xxx). Pkal wurde hingegen unter nativen Bedingungen aufgereinigt (Mat+Meth xxx).

Die aufgereinigten Proteine His-Pkal und PBP2-S-Tag aus Duet-Pkal-PBP2 wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben via ProQ Diamond Färbung auf Phosphorylierung durch His-Pkal untersucht. Sowohl in der Probe von PBP2-S-Tag als auch von His-Pkal konnte ein Signal festgestellt werden (Abb. 3.23). Im mit Coomassie gefärbten Gel konnte gezeigt werden, dass diese Banden mit den Massen von His-Pkal und PBP2-S-Tag korrelierten (Abb. 3.24). Durch eine Westernblot Analyse mit einem S-Tag spezifischen Antikörper wurde PBP2-S-Tag in der durch S-Agarose aufgetrennten Probe nachgewiesen (Abb. 3.24). PBP2-S-Tag wurde vom Proteome

Center Tübingen zusätzlich verifiziert und weiter analysiert, um die exakten Phosphosites zu bestimmen (Kapitel 3.5.3).

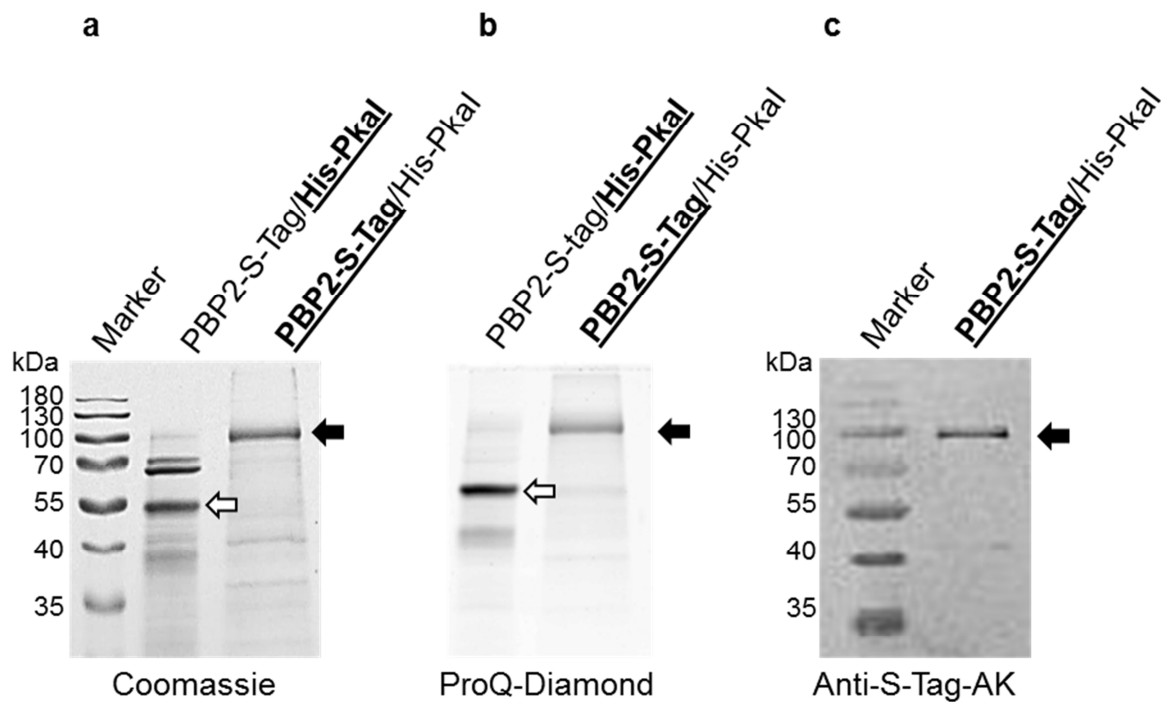


Abbildung 3.24: Untersuchung von PBP2-S-Tag und His-Pkal auf Phosphorylierung: **a** Coomassiefärbung einer 12,5%igen SDS-PAGE mit durch Ni²⁺-NTA Chromatographie aufgereinigtem His-Pkal aus Duet-Pkal-PBP2 (PBP2-S-Tag/His-Pkal) und durch S-Agarose Chromatographie aufgereinigtem PBP2-S-Tag aus Duet-Pkal-PBP2 (PBP2-S-Tag/His-Pkal). **b** ProQ Diamond Färbung zum Nachweis von Phosphoserine/-threonine/-tyrosine des Gel aus **a**. **c** Westernblot Analyse der Probe PBP2-S-Tag/His-Pkal mit einem Anti-S-Tag-Antikörper welcher mit HRP konjugiert war (Anti-S-Tag AK). PBP2-S-Tag ist immer mit dem schwarzen Pfeil gekennzeichnet, His-Pkal mit dem weißen.

3.5.3 Bestimmung der phosphorylierten Aminosäuren in His-Pkal, MreC-S-Tag und PBP2-S-Tag

In den Versuchen 3.5.1+2 konnte durch die Färbung mit ProQ Diamond nachgewiesen werden, dass His-Pkal in der Lage war, sich selbst zu phosphorylieren und sowohl MreC-S-Tag als auch PBP2-S-Tag phosphorylieren konnte (Abb. 3.21 und 3.23). Diese Versuche konnten allerdings nur die generelle Phosphorylierung zeigen. Um die phosphorylierten Aminosäuren identifizieren zu können, wurden die Proben von MreC-S-Tag/His-Pkal und PBP2-S-Tag/His-Pkal vom Proteome Center Tübingen weiter analysiert. Die Proben wurden dabei in einer SDS-PAGE

aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Banden, welche bei der ProQ Diamond Färbung ein Signal gegeben hatten, wurden ausgeschnitten. Im Fall von **MreC-S-Tag**/His-Pkal wurde die Probe mit den Proteasen Trypsin oder GluC verdaut. Diese Probe wurde mit zwei verschiedenen Proteasen verdaut, da die Standardprotease Trypsin nicht genug Schnittstellen in MreC-S-Tag besitzt, um das ganze Protein in Fragmente spalten zu können, welche gut im Massenspektrometer zu untersuchen waren. Deshalb wurde die Probe auch mit der Protease GluC verdaut, um mehr messbare Fragmente zu erzeugen. Die Probe **PBP2-S-Tag**/His-Pkal wurde nur mit Trypsin verdaut.

Nach dem Verdau wurden die Proben in einem xxx LC-MS/MS-Spektrometer gemessen.

Bei den Messungen der Probe **MreC-S-Tag**/His-Pkal konnte His-Pkal als das häufigste Protein in der Bande bei 55kDa identifiziert werden (Abb. 3.21). Es konnten insgesamt für His-Pkal 18 Phosphosites, für MreC-S-Tag 23 Phosphosites und für PBP2-S-Tag 33 Phosphosites identifiziert werden. Dass diese Zahlen so hoch waren, lag daran, dass in den beiden untersuchten Stämmen Duet-Pkal-MreC und Duet-Pkal-PBP2 die Proteine in deutlich höherer Kopienzahl vorlagen als sie dies *in vivo* in *S. coelicolor* tun und es so zu stärkerer Interaktion und Hyperphosphorylierung durch His-Pkal kam. In publizierten Phosphoproteomen konnten beim größten Teil der phosphorylierten Proteine ein bis vier Phosphorylierungen beobachtet werden (Manteca, Ye et al. 2011, Soares, Spat et al. 2013, Basell, Otto et al. 2014, Ravikumar, Shi et al. 2014, Fortuin, Tomazella et al. 2015).

Ein Vergleich der Peptide, die sowohl einfach phosphoryliert als auch unphosphoryliert vorlagen, zeigte jedoch, dass die nicht phosphorylierten Peptide in His-Pkal durchschnittlich 120 mal, in MreC-S-Tag durchschnittlich 150 mal und in PBP2-S-Tag durchschnittlich 100 mal öfter vorlagen als die einfach phosphorylierten Peptide. Es wurden nur solche phosphorylierte Aminosäuren als relevant definiert, welche auf Peptiden lagen, die mindestens zehnmal häufiger einfach phosphoryliert als unphosphoryliert vorlagen.

Nach dieser Umrechnung blieben aus den 23 Phosphosites von MreC-S-Tag noch drei Phosphosites. Diese waren die Threonine T₂₃₈ und T₂₄₀ und das Serin S₃₄₆. Da

3. Ergebnisse

die beiden Threonine nur durch ein einziges Isoleucin I₂₃₉ getrennt waren, konnte die Phosphosite nicht exakt bestimmt werden. Bei dem Peptid LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVDPNGGDLTR auf dem die beiden Phosphosites lagen war der Quotient der gemessenen Intensitäten von unphosphoryliertem zu einfach phosphoryliertem Peptid 0,01. Das bedeutete, dass das einfach phosphorylierte Peptid 100 mal häufiger gefunden wurde als das nicht phosphorylierte. T₂₃₈ und T₂₄₀ befinden sich in der konservierten, von Pfam annotierten MreC-Domäne, welche die Aminosäuren 140-271 umfasst (Abb. 3.25). Serin S₃₄₆ befindet sich auf dem Peptid SGKETAALKFE. Dieses Serin ist im nativen Protein nicht enthalten, sondern Teil des sechs Aminosäuren langen Linkerbereiches zwischen MreC (bis Aminosäure 341) und dem S-Tag (ab Aminosäure 348). Demnach handelt es sich bei dieser Phosphosite um ein Artefakt. Der Quotient der Intensitäten von unphosphoryliertem zu phosphoryliertem Peptid war 0,02. Es lag also 50 mal häufiger einfach phosphoryliert vor als das unphosphorylierte Peptid.

Für PBP2-S-Tag konnten vier Phosphosites von den 33 zuvor identifizierten bestätigt werden. Es waren die Serine S₈₇ und S₂₁₆ und die Threonine T₈₀ und T₅₅₈. T₈₀ wurde in dem Peptid GVALADNETR gefunden. Das Peptid lag mit einem Quotienten der Intensitäten von 0,004 ca. 225 mal häufiger phosphoryliert als unphosphoryliert vor. Das Serin S₈₇ wurde auf dem Peptid LVVSASRTDLLK identifiziert. Das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Peptid war 0,1; damit lag das Peptid zehnmal häufiger im einfach phosphorylierten Zustand vor. Der Quotient der Intensitäten von unphosphoryliertem zu einfach phosphoryliertem Peptid war im Fall von SDQVGRSGLER, in welchem S₂₁₆ lag, 0,029. Das entsprach einer 34 mal höheren Häufigkeit des einfach phosphorylierten Peptids. Die drei Aminosäuren T₈₀, S₈₇ und S₂₁₆ lagen in der von Pfam annotierten Dimerisierungsdomäne (Abb. 3.25). Das Threonin T₅₅₈ war Teil des Peptids AVVSPDGKTVR. Es lag in der von Pfam annotierten Transpeptidasedomäne von PBP2 (Abb. 3.25). Der Quotient der Intensitäten von unphosphoryliertem zu einfach phosphoryliertem Peptid betrug 0,007; was einem 126 mal häufigeren Auftreten des phosphorylierten Peptids entsprach.

In His-Pkal konnten auf diese Weise drei Phosphosites identifiziert werden. Diese waren T₁₁₃ T₁₇₃ und T₁₇₄. Alle lagen in der von Pfam annotierten eSTPK-Domäne

(Abb. 3.25). T₁₇₃ und T₁₇₄ sind hochkonservierte Threonine im sogenannten Aktivierungsloop, welcher die Aktivität der eSTPK kontrolliert. Sie wurden auf dem Peptid FGVAQVAGATTLTE identifiziert. Von diesem Peptid konnte nur die Intensität des einfach phosphorylierten Peptids gemessen werden. Das unphosphorylierte Peptid konnte zwar im Massenspektrometer nachgewiesen werden, aber die Anzahl der gemessenen unphosphorylierten Peptide war sehr gering. Deshalb konnte für dieses Peptid vom Proteome Center Tübingen keine Intensität angegeben werden. Der Quotient der Intensitäten vom unphosphorylierten zum einfach phosphorylierten Peptid war folglich nicht exakt messbar. Aufgrund dessen wurde das Ergebnis der Berechnung als $\rightarrow 0$ (mathematisch: geht gegen null) angegeben. Dies bedeutete, dass dieses Peptid fast ausschließlich im einfach phosphorylierten Zustand vorlag. Da die Threonine T₁₇₃ und T₁₇₄ direkt nebeneinander lagen, konnte eine eindeutige Phosphosite nicht bestimmt werden. Das Threonin T₁₁₃ wurde auf dem Peptid VLTRGPVDAVEAAR gefunden. Der Quotient der Intensitäten der betrug 0,02; also wurde das phosphorylierte Peptid 50 mal häufiger gefunden als das unphosphorylierte.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.7 Die häufigsten einfach phosphorylierten Peptide in MreC-S-Tag, PBP2-S-Tag und His-Pkal*

Protein	Peptid	Phospho site	Quotient
MreC-S-Tag	LVTFGSQADKPFVPGVPVG p[TIT] RVDPNGGDLTR**	T ₂₃₈ / T ₂₄₀	0,01
	p SGKETAAAKFE	S ₃₄₆	0,02
PBP2-S-Tag	GVALADNE p TR	T ₈₀	0,004
	LVVSA p SRTDLLK	S ₈₇	0,1
	SDQVGR p SGLER	S ₂₁₆	0,029
	AVVSPDGK p TVR	T ₅₅₈	0,007
His-Pkal	VL p TRGPVDAVEAAR	T ₁₁₃	0,02
	FGVAQVAG p[TT] LTE	T _{173,174}	→0

*Die wahrscheinlichsten Phosphosites/phosphorylierten Regionen sind durch die fetten Buchstaben hervorgehoben. Nicht eindeutig zuordenbare Phosphosites sind durch die eckigen Klammern gekennzeichnet. Als Quotient ist das Ergebnis von gemessene Intensität unphosphoryliertes Peptid/gemessene Intensität einfach phosphoryliertes Peptid.

** Dieses Peptid wurde auch in mehrfach phosphorylierter Form gefunden. Für die Berechnung des Quotienten wurde nur die Intensität des einfach phosphorylierten Peptids verwendet

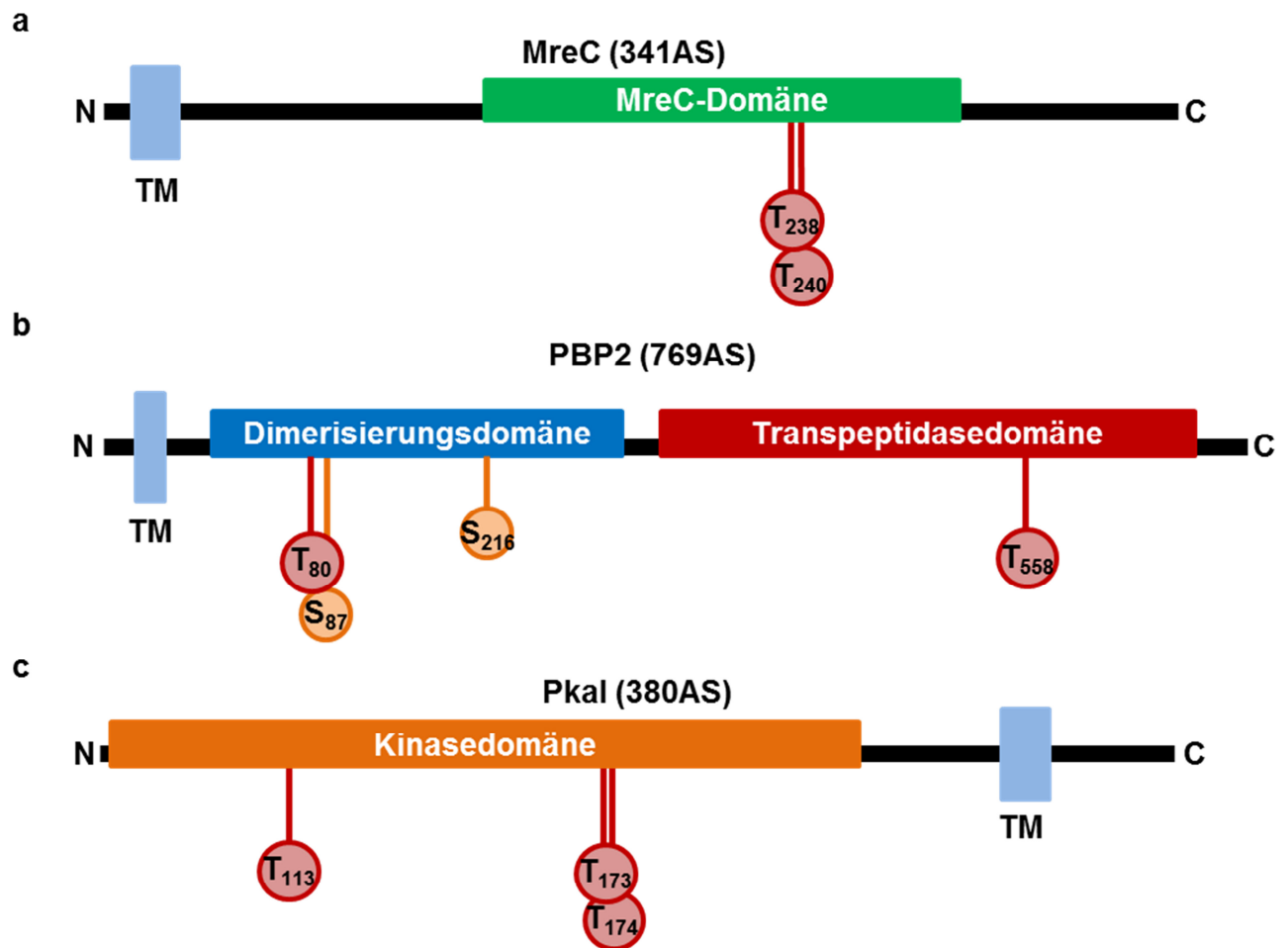


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der nativen Proteine MreC, PBP2 und Pkal mit den identifizierten Phosphosites: Für alle drei Proteine ist hinter dem Namen in Klammern angegeben aus wie vielen Aminosäuren (AS) das Protein besteht. Bei allen Proteinen ist der N-Terminus (N) auf der linken, der C-Terminus (C) auf der rechten eingezeichnet. Die Transmembranregionen (TM) der Proteine sind jeweils als hellblaue Säule eingezeichnet. Die roten Kreise zeigen Threonine an, welche als Phosphosites identifiziert wurden, die orangefarbenen Serine. Konservierte Domänen wurden via Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), die Transmembranregionen via TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) identifiziert. **a** ist die schematische Darstellung von MreC. Die MreC-Domäne ist in grün eingezeichnet. **b** stellt PBP2 dar, bei welchem die Dimerisierungsdomäne in blau, die Transpeptidasedomäne in rot eingezeichnet ist. **c** ist die schematische Darstellung von Pkal mit der Kinasedomäne in orange.

Alle identifizierten Phosphosites lagen innerhalb von Domänen, welche von Pfam annotiert waren (Abb. 3.25). Diese Tatsache unterstützte die Relevanz der Ergebnisse, da diese Domänen wahrscheinlich maßgeblich für die Aktivität bzw. Konformation der Proteine MreC, PBP2 und Pkal verantwortlich sind.

3.5.4 Nachweis der Substratspezifität von Pkal

MreC und PBP2 wurden in Anwesenheit von Pkal phosphoryliert (Kapitel 3.5.1+2). Da beide Proteine in einem heterologen Wirt koexprimiert wurden, konnte auf eine Spezifität von Pkal aus diesen Experimenten allerdings nicht geschlossen werden. Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen Pkal und MreC bzw. PBP2 spezifisch war, wurde ein weiteres Protein als Negativkontrolle zusammen mit Pkal oder Pkal und MreC exprimiert.

Hierfür wurden CaCl_2 kompetente *E. coli* BI21 (DE3) Zellen entweder mit den Plasmiden pDuet-Pkal oder pDuet-Pkal-MreC und pYT-CRP transformiert. Die Stämme wurden Duet-Pkal/CRP und Duet-Pkal-MreC/CRP genannt. Das Plasmid pYT-CRP enthält das Gen für CRP von *S. tsukubaensis* mit einem C-terminalen Strep-Tag, sowie den mit Rhamnose induzierbaren Promotor P_{Rham} .

Die Stämme wurden bei 37°C in LB Medium ohne Glucose bis zu einer OD_{578} von 0,6 wachsen gelassen. Um die Expression der auf den Plasmiden codierten Gene für die Proteine His-Pkal und CRP-Strep bzw. His-Pkal, MreC-S-Tag und CRP-Strep zu induzieren, wurden IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5mM und Rhamnose bis zu einem finalen Anteil von 0,02% Rhamnose im Medium zugegeben. Anschließend wurden die induzierten Stämme noch weitere drei Stunden wachsen gelassen. Danach wurden sie geerntet, und CRP-Strep wurde durch Streptavidin Chromatographie aufgereinigt.

Die aufgereinigten Proben aus Duet-Pkal/CRP und Duet-Pkal-MreC/CRP wurden zusammen mit via Ni^{2+} -NTI Chromatographie aufgereinigtem His-Pkal und dem durch S-Agarose aufgereinigtem MreC-S-Tag aus Kapitel 3.5.1 durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im mit Coomassie gefärbten Gel war in den Proben aus Duet-Pkal/CRP und Duet-Pkal-MreC/CRP auf der Höhe von 25kDa eine dicke Bande sichtbar (Abb. 3.26). Dass es sich hierbei um CRP-Strep handelte, konnte durch eine Westernblot Analyse mit Strep-Tag-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Im mit ProQ Diamond gefärbten Gel konnte CRP-Strep nicht angefärbt werden, Verunreinigungen von His-Pkal und MreC-S-Tag dagegen schon. (Abb. 3.26). Dieses Experiment zeigte, dass CRP aus *S. tsukubansis* trotz großer Verfügbarkeit

3. Ergebnisse

nicht von Pkal als Substrat erkannt wurde. Die Phosphorylierung von MreC und PBP2 durch Pkal erfolgte somit unter den gewählten Bedingungen spezifisch.

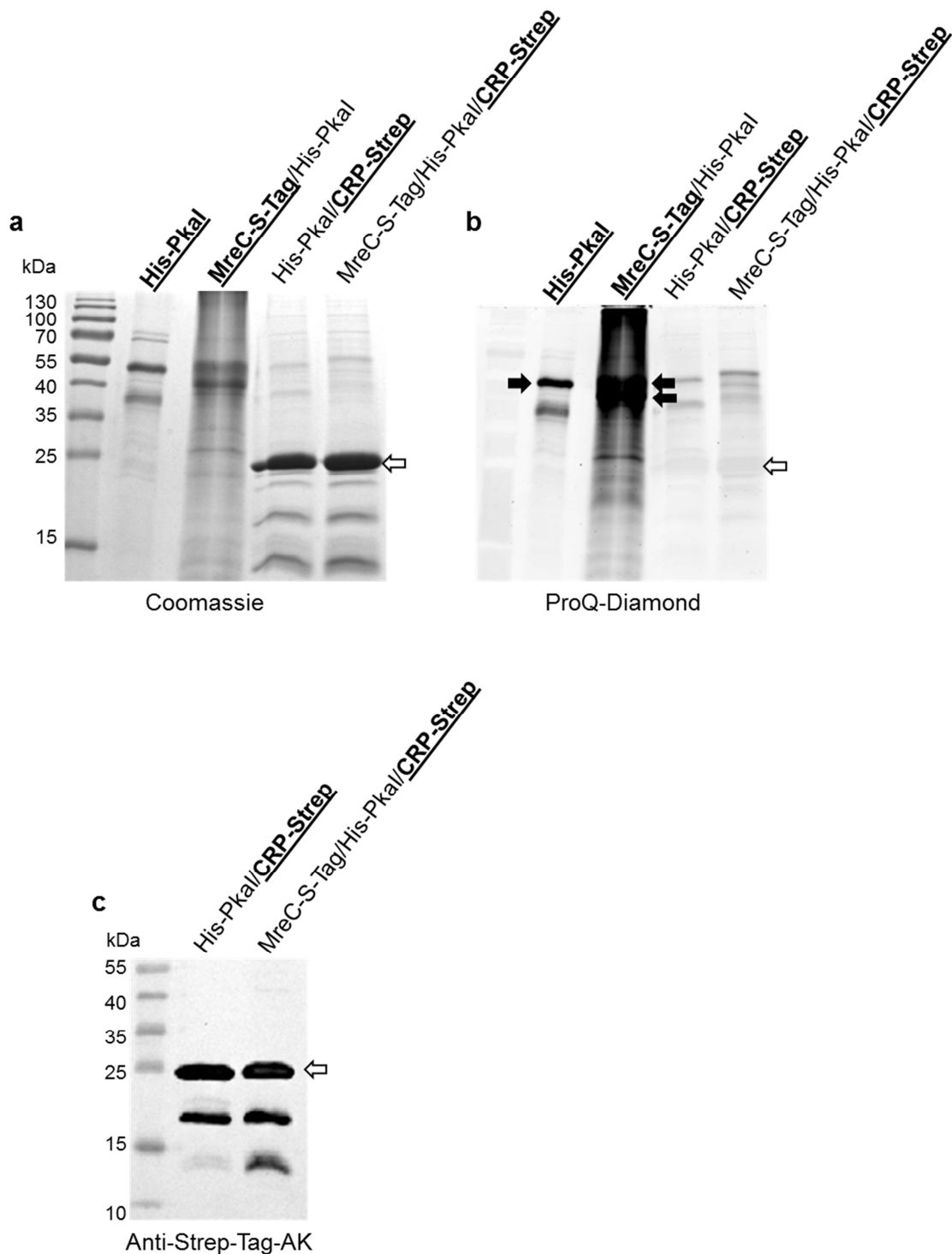


Abbildung 3.26: Untersuchung von CRP-Strep auf Phosphorylierung: **a** Coomassiefärbung einer 12,5%igen SDS-PAGE mit durch Ni^{2+} NTI Chromatographie aufgereinigtem His-Pkal aus Duet-Pkal (**His-Pkal**), durch S-Agarose Chromatographie aufgereinigtem MreC-S-Tag aus Duet-Pkal-MreC (**MreC-S-Tag/His-Pkal**) und durch Streptavidin Chromatographie aufgereinigten CRP-Strep aus Duet-Pkal/CRP (**His-Pkal/CRP-Strep**) und Duet-Pkal-MreC/CRP (**MreC-S-Tag/His-Pkal/CRP-Strep**) **b** ProQ Diamond Färbung zum Nachweis von Phosphoserin/-threonin/-tyrosin des Gels aus **a**. **c**

3. Ergebnisse

Westernblot Analyse der Proben His-Pkal/**CRP-Strep** und MreC-S-Tag/His-Pkal/**CRP-Strep** mit einem Anti-Strep-Tag-Antikörper, welcher mit HRP konjugiert war (Anti-Strep-Tag AK). Bei den beiden ebenfalls durch den Antikörper sichtbar gemachten Banden unterhalb und oberhalb des 15kDa Markers handelt es sich vermutlich Degradationsprodukte von CRP-Strep welche den Strep Tag enthalten. Diese sind auch im mit Coomassie gefärbten Gel zu sehen. MreC-S-Tag und His-Pkal sind mit den schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, CRP-Strep mit dem weißen.

3.6 Untersuchung des Einflusses von Pkal auf die Protein-Protein-Interaktionen des SSSC

Pkal phosphoryliert die SSSC Proteine MreC und PBP2 (s. Kapitel 3.5.1+2). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion spezifisch war (s. Kapitel 3.5.4), da Pkal nicht in der Lage war CRP aus *S. tsukubaensis* zu phosphorylieren. Diese Ergebnisse gaben allerdings keine Auskunft darüber welche Auswirkung die Phosphorylierung auf die Aktivität von MreC und PBP2 hat. In den BTH Experimenten, welche zum Konzept des SSSC führten, konnten Interaktionen zwischen MreC und PBP2, sowie eine Selbstinteraktion von MreC gezeigt werden (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Durch die erneute Untersuchung dieser Interaktionen in Gegenwart von Pkal sollte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Interaktionen untersucht werden.

Hierfür wurden die Plasmidpaare pKT25 und pUT18c, pKT25-zip und pUT18c-zip, pKT25-PBP2 und pUT18c-MreC und das Paar pKT25-MreC und pUT18c-MreC jeweils in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) Δcya mit und ohne pDuet-Pkal transferiert.

Das *cyo* Gen kodiert für die einzige Adenylatcyclase in *E. coli*, durch diese Deletion konnte der Stamm für die BTH Experimente verwendet werden. Da der Stamm das T7-RNA-Polymerase Gen verfügte, konnte gleichzeitig mit den Genen der BTH Plasmide auch das unter der Kontrolle des Promotors P_{T7} stehende *his-pkal* Gen exprimiert werden.

Die Versuche wurden auf M63 Minimalmedium Agarplatten durchgeführt, welche 2% Maltose, 0,5mM IPTG und X-Gal auch 75 μ g/ml Ampicilin, 25 μ g/ml Kanamycin und 50 μ g/ml Spectinomycin enthielten. IPTG induzierte die Expression der Gene auf den jeweiligen pKT25- und pUT18c-Konstrukten sowie die Expression von *his-pkal* auf pDuet-Pkal. Die Antibiotikazugabe diente der Selektion auf die Derivate der Plasmide pUT18c (Ampicilin), pKT25 (Kanamycin) und pDuet (Spectinomycin). Die Expression des β -Galactosidase Gens *lacZ* ist cAMP abhängig und nur in dessen Gegenwart

aktiv. Durch die Blaufärbung der Kolonien durch den bei der Spaltung von X-Gal freigesetzten Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galacto-pyranosid konnte die Produktion von cAMP beobachtet werden. So konnte indirekt die Interaktion der Proteine nachgewiesen werden.

Einzelkolonien der verschiedenen Stämme wurden gepickt und über Nacht bei 37°C in LB Medium mit 150 μ g/ml Ampicilin, 50 μ g/ml Kanamycin und 100 μ g/ml Spectinomycin inkubiert. Die OD₅₇₈ der Kulturen wurde bestimmt. Die Kulturen wurden so verdünnt, dass sie anschließend eine OD₅₇₈ von 1 hatten. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen, um die Nährstoffe des LB Mediums zu entfernen. 2 μ l von je zwei verschiedenen Kulturen eines Stammes wurden auf eine Agarplatte mit M63 Medium nebeneinander aufgetropft. Durch die Anpassung der OD₅₇₈ wurde sichergestellt, dass die später beobachteten Kolonien in etwa die gleiche Zelldichte hatten und eine Blaufärbung der Kolonien so besser vergleichbar war. Die Platten wurden nach fünf Tagen Inkubation bei 30°C ausgewertet.

Die Negativkontrollen, welche die leeren pKT25 und pUT18c trugen, zeigten sowohl bei den Klonen mit als auch ohne pDuet-Pkal keine Blaufärbung (Abb. 3.27). Die Positivkontrollen, welche die Plasmide pKT25-zip und pUT18c-zip trugen, waren in allen Fällen stark blau gefärbt (Abb. 3.27). Auf den Plasmiden waren Fusionsproteine der beiden Adenylatcyclasendomänen mit sogenannten Leucinzipper codiert. Die starke Interaktion führte zu der intensiven Blaufärbung. In den Klonen der Stämme Δ cya-Duet/pKT25-PBP2/pUT18c-MreC sowie Δ cya-Duet/pKT25-MreC/pUT18c-MreC war durch die Blaufärbung eine Interaktion nachweisbar (Abb. 3.27). In den Klonen des Stammes Δ cya-Duet-Pkal/pKT25-PBP2/pUT18c-MreC war keine Blaufärbung zu sehen und so auch keine Interaktion nachweisbar (Abb. 3.27). Die beiden Klone von Δ cya-Duet-Pkal/pKT25-MreC/pUT18c-MreC zeigten beide eine leichte Blaufärbung (Abb. 3.27). Diese war aber deutlich schwächer als die der beiden Klone von Δ cya-Duet/pKT25-MreC/pUT18c-MreC auf derselben Platte (Abb. 3.27). Die Interaktion von MreC mit sich selbst war demnach in Gegenwart von His-Pkal nicht so stark wie die ursprünglich gemessene Interaktion.

Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von MreC und/oder PBP2 die Protein-Protein-Interaktion verhindert.

3. Ergebnisse

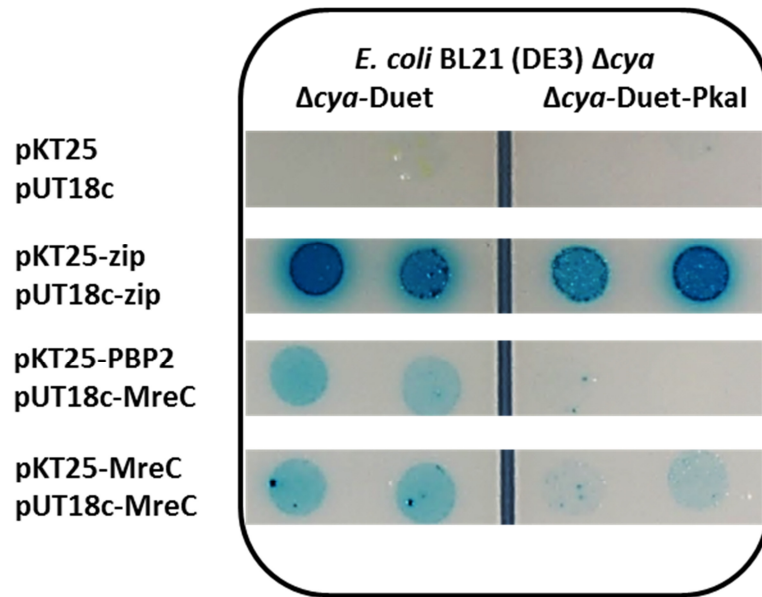


Abbildung 3.27: BTH Interaktionsstudien von MreC und PBP2 in Abwesenheit und Gegenwart von Pkal: Von je zwei Klonen der beiden von *E. coli* BL21 (DE3) Δcya abgeleiteten Stämme Δcya -Duet und Δcya -Duet-Pkal, welche die Plasmidpaare pKT25/pUT18c, pKT25-zip/pUT18c-zip, pKT25-PBP2/pUT18c-MreC und pKT25-MreC/pUT18c-MreC trugen, wurden 2 μ l einer Kultur mit $OD_{578}=1$ auf eine M63 Agarplatte mit 2% Maltose, 0,5mM IPTG, X-Gal, 75 μ g/ml Ampicilin, 25 μ g/ml Kanamycin und 50 μ g/ml Spectinomycin aufgetropft. Die Platte wurde fünf Tage bei 30°C inkubiert und anschließend fotografiert.

4. Diskussion

4.1 Die molekularen Mechanismen der morphologischen Differenzierung von *S. coelicolor* sind weitgehend unverstanden

Während der Differenzierung werden in *S. coelicolor* zeitgleich 50-100 Sporen aus einer Lufthyphe gebildet. Um dies bewerkstelligen zu können, ist ein präzise regulierter und koordinierter Prozess nötig. Wie dieser Prozess im Detail aussieht, ist bislang noch weitgehend unverstanden. Bekannt ist, dass es eine Reihe für diesen Prozess essentieller Proteine mit unterschiedlichen Funktionen gibt.

Zu diesen Proteinen gehören z.B. die transkriptionellen Regulatoren CrgA (Del Sol, Mullins et al. 2006), AfsQ1 (Shu, Chen et al. 2009), sowie die Whi- und Bld-Regulatoren (Chater 2001, Claessen, de Jong et al. 2006). Andere beteiligte Proteine sind die sogenannten SALPs (SsgA-like Proteins), welche in die Positionierung des Z-Rings und die weitere Sporenreifung involviert sind (Noens, Mersinias et al. 2005, Willemse, Borst et al. 2011, Jakimowicz and van Wezel 2012). Darüber hinaus gibt es eine Reihe Proteine, die in die Sporulation involviert sind, deren Funktion aber nicht bekannt ist und deren tiefere Rolle noch nicht untersucht wurde. Zu diesen zählen z.B. die putativen Septierungsfaktoren SepF1-F3 oder der Triggerfaktor der Zellteilung Tig (Tab. 3.7).

Ein weiterer Regulationsmechanismus scheint auch die Phosphorylierung durch eSTPKs zu sein. So konnte bereits der Septierungsfaktor SepF2, genauso wie die Divisomkomponenten FtsZ und FtsH, in einem Phosphoproteom von *S. coelicolor* nachgewiesen werden (Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführten Phosphoproteomanalysen von *S. coelicolor* identifizierten zusätzlich noch die an der Sporulation beteiligten Proteine BldG, BldKA, BldKB, BldKE, ParB, SepF1, SepF3 und Tig als Phosphoproteine (Tab. 3.7).

Auch wenn das bloße Vorhandensein von phosphorylierten Proteinen kein Beweis für eine Wirkung der Phosphorylierung auf Zellprozesse ist, ist die Phosphorylierung von an derart vielen Schritten der Differenzierung beteiligten Proteinen ein guter Indikator für die bedeutende Rolle welche eSTPKs bei der Differenzierung und Sporulation spielen. Auch das Wissen, dass eSTPKs und Phosphorylierung eine

zentrale Rolle bei der Zellteilung in dem naheverwandten Aktinobakterium *M. tuberculosis* spielen (Kang, Abbott et al. 2005, Dasgupta, Datta et al. 2006), stärkt die Vermutung, dass eSTPKs auch in *S. coelicolor* eine wichtige Funktion bei der Differenzierung und Sporulation haben.

4.2 Pkal interagiert mit zentralen Komponenten des SSSC sowie der Differenzierung

Über die Rolle von eSTPKs im Allgemeinen und Pkal im Speziellen war in *S. coelicolor* bislang nur sehr wenig bekannt. Von den sieben in *S. coelicolor* näher beschriebenen eSTPKs konnte bislang einzig für AfsK eine Rolle beim Wachstum nachgewiesen werden (Hempel, Cantlay et al. 2012). AfsK reguliert die Positionierung des Polarisoms während des vegetativen Myzelwachstums durch die Phosphorylierung von DivIVA (Hempel, Cantlay et al. 2012).

Pkal ist in sporenbildenden Streptomyceten sehr verbreitet. Ein Ortholog des Gens *pkal* konnte in über 100 Streptomycetengenomen gefunden werden (img.jgi.doe.gov). Es scheint also in Streptomyceten konserviert zu sein.

Die zentrale Rolle, welche Pkal im SSSC zu spielen scheint, ergab sich aus den, von Kleinschnitz et al., im BTH Experiment identifizierten Interaktionen mit den SSSC Proteinen MreC, MreD, PBP2, Sfr, FtsI und RodZ (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Dass Pkal auch schon eine Rolle in der Differenzierung spielt, lassen BTH Untersuchungen mit Pkal als Bait-Protein vermuten. In diesen Experimenten Darüberhinaus interagierte Pkal mit den transkriptionellen Regulatoren CrgA und BldB (Ladwig, Franz-Wachtel et al. 2015), die wichtige Regulatoren der frühen und mittleren Stadien der Differenzierung darstellen.

Vorangegangene Studien (Urabe, Aoyagi et al. 2008, Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013) zeigten, dass die Expression von *pkal* nach 12-24 Stunden am stärksten ist und danach stetig abnimmt. Da diese Studien allerdings maximal den Zeitraum von 12-48 Stunden nach der Keimung abbilden und die Aktivität des SSSC frühestens nach 72 zu erwarten ist, wurde in dieser Arbeit ein der Zeitraum bis 168 Stunden nach Keimung betrachtet (Abb. 3.2). Auch hier zeigte sich, dass die Expression mit

fortlaufendem Alter der Kultur abnahm, aber bis zuletzt eine schwache Expression messbar war (Abb. 3.2).

Obwohl Transkriptomanalysen von *S. coelicolor* ergaben, dass viele SSSC Proteine auch schon während der frühen Phasen der Differenzierung exprimiert werden, wenn auch auf niedrigem Niveau, haben sie ihr Expressionsmaximum während der Differenzierung (Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013, Burger et al. 2000). Somit scheint PkaI seine Hauptaktivität dann auszuüben, wenn die Zielproteine von PkaI in eher geringen Konzentrationen vorliegen.

4.3 *pkaI* ist Teil eines eSTPK Genclusters

Das eSTPK-Gen *pkaI* liegt in einem aus den fünf eSTPK-Genen *pkaH*, *sco4776*, *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ* (*pkaH-pkaJ*) bestehenden Gencluster. Es ist das einzige Cluster von eSTPK-Genen im Genom von *S. coelicolor*. Die Genregion scheint in sporenbildenden Streptomyceten konserviert zu sein, da Orthologe aller fünf eSTPK-Gene in der gleichen Anordnung in mehr als 100 Streptomycetengenomen vorkommen (img.jgi.doe.gov). Nicht nur das Cluster an sich, sondern auch dessen Lokalisation im Genom scheint konserviert zu sein, da in den untersuchten Streptomyceten vor dem Cluster stets ein Ortholog des Glycerinphosphat-Dehydrogenase-Gens *sco4774* in der gleichen Leserichtung gefunden wurde (Abb. 3.1).

Auffallend ist, dass die Genome der beiden Streptomyceten *S. griseus* und *S. venezuelae* keine Orthologe von *pkaI* und *pkaJ* besitzen (Abb. 3.1). Diese beiden Stämme sind in der Lage in Flüssigkultur zu sporulieren, während sowohl *S. coelicolor* als auch *S. scabies* und *S. avermitilis*, welche auch Orthologe von *pkaI* und *pkaJ* besitzen, nur auf Festmedien sporulieren können. Möglicherweise hängt die besondere Fähigkeit auch in Flüssigkultur zu Sporulieren von *S. griseus* und *S. venezuelae* mit der Abwesenheit von *pkaI* und *pkaJ* zusammen. Um dies klären zu können, müssten *pkaI* und *pkaJ* in *S. griseus* und *S. venezuelae* heterolog exprimiert werden und ihr Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit untersucht werden.

4.4 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten NL Δ Pkal und NL Δ 4775-4779 und der Stämme mit einem zusätzlichen eSTPK-Gen

4.4.1 Der Phänotyp der Mutante NL Δ Pkal

Experimente zum SSSC zeigten, dass die Deletion der Gene einzelner Komponenten des SSSC, z.B. *mreC* oder *pbp2*, zu gravierenden Phänotypen bezüglich der Sporenbildung und der Integrität der Sporenwand führte (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Daher wäre zu erwarten gewesen, dass auch die Deletion von *pkaI* zu diesen Phänotypen geführt hätte.

Die Deletion von *pkaI* hatte allerdings keinerlei Auswirkungen auf die Integrität der Sporenwand. Weder waren die Sporen sensitiver gegenüber Lysozym oder Vancomycin (Abb. 3.19), noch gegenüber hohen NaCl-Konzentrationen (Abb. 3.18). Unterschiede zum Wildtyp M145 waren lediglich die leicht verzögerte Sporulation (Abb. 3.9) sowie die Produktion einiger aberranter Sporen (Abb. 3.11). Verglichen mit den Sporen anderer Deletionsmutanten von SSSC-Genen (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011) wiesen die Sporen der *pkaI*-Mutante NL Δ Pkal allerdings nur einen schwach ausgeprägten Defekt auf.

Obwohl man aufgrund der starken Interaktionen von PkaI im BTH mit SSSC Proteinen (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011) vermutet hätte, dass die Deletion von *pkaI* zu einem starken Phänotyp führen würde blieb dieser aus. Eine Erklärung für den schwachen Phänotyp der Mutante NL Δ PkaI ist, dass mehrere eSTPKs redundante Funktionen in der Regulation der SSSC Proteine haben. Da die Deletion von *pkaI* beispielsweise keinen polaren Effekt auf die benachbarten eSTPK Gene *pkaD* oder *pkaJ* (Abb. 3.8) hatte, könnten möglicherweise diese beiden eSTPKs PkaI in der Deletionsmutante NL Δ PkaI ersetzen. Für PkaD wurde bereits eine Funktion in der Regulation der Actinorhodinproduktion beschrieben (Urabe, Aoyagi et al. 2008), welche stark mit der Differenzierung zusammenhängt. Auch ist die Redundanz von Phosphorylierungen eines Proteins durch mehr als eine eSTPK bereits gezeigt worden (Schultz, Niebisch et al. 2009, Pereira, Goss et al. 2011).

Im Gegensatz zum Wildtyp M145, welcher fast ausschließlich lebendige Sporen produzierte (Tab 3.3), waren in NL Δ PkaI nur ca. 90% der Sporen lebendig (Tab. 3.4),

die restlichen waren tot oder enthielten keine DNA. Dieser Phänotyp belegte den Einfluss der Deletion von *pkaI* auf die Sporulation. Vermutlich lässt sich dieser Phänotyp dadurch erklären, dass PkaI auch schon in einer sehr frühen Differenzierungsphase, vor der eigentlichen Aktivität des SSSC, mit Proteinen des Zellteilungsprozesses und der Chromosomensegregation interagiert.

4.4.2 Der Phänotyp der Mutante NL Δ 4775-4779

Die Mutante NL Δ 4775-4779, in welcher das gesamte Gencluster *pkaH-pkaJ* deletiert wurde, zeigte die gleichen Phänotypen bezüglich der Integrität der Sporenwand, wie die anderen Deletionsmutanten von SSSC-Komponenten (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Diese Phänotypen waren die hohe Sensitivität der auskeimenden Sporen gegen Lysozym und Vancomycin (Abb. 3.18 und Abb. 3.20). Die hohe Sensitivität der auskeimenden Sporen gegen Vancomycin kann durch das extensive Umformen der Zellwand zu diesem Zeitpunkt erklärt werden. Schon in der dormanten Spore sind Hydrolasen vorhanden (Strakova, Bobek et al. 2013), welche auf einen äußeren Reiz hin beginnen die Zellwand teilweise zu verdauen und sie so für Wasser und Nährstoffe durchlässig zu machen (Haiser, Yousef et al. 2009). Kommen Sporen mit Nährmedien in Kontakt, so beginnen sie innerhalb einer Stunde viele Enzyme zur Zellwandsynthese zu produzieren, darunter viele der Fts-Proteine, wie die Flippase FtsW oder das Penicillinbindeprotein FtsI (Strakova, Bobek et al. 2013). Ist die verstärkte Sporenwand zuvor nicht korrekt synthetisiert worden, so ist es verständlich, dass der Verdau der Zellwand durch die Hydrolasen größere Schäden anrichtet. So werden die Orte der Zellwandsynthese zugänglich für z.B. Vancomycin gemacht, welches die Synthese und Quervernetzung der Zellwand verhindert. Auch die höhere Sensitivität gegenüber Lysozym kann durch das Wirken der Hydrolasen an der nicht korrekt gebildeten Zellwand erklärt werden.

Durch die Zugabe von MgCl₂ konnte die Sensitivität der auskeimenden Sporen gegenüber Lysozym und Vancomycin komplett aufgehoben werden (Abb. 3.20). Wie die Mg²⁺-Ionen genau die Zellhülle stabilisieren können, ist nicht bekannt. Aber die Tatsache, dass durch Zugabe von Mg²⁺-Ionen zellwandstressende Effekte aufgehoben werden konnten, sprach stark für eine vorherige Schädigung der

Zellwand und so für eine nicht korrekte Synthese der Sporenwand in Abwesenheit der eSTPKs PkaH-PkaJ. In *B. subtilis* konnte bereits gezeigt werden, dass der eigentlich letale Knockdown der Gene *mreC* und *mreD*, welche essentiell für das Streckungswachstum sind, durch Zugabe von $MgCl_2$ zum Medium vollständig komplementiert werden konnte (Leaver and Errington 2005). Außerdem waren einfache und mehrfache Deletionsmutanten der Gene *mreB*, *mreBH* und *mbl* in *B. subtilis* durch Zugabe von Mg^{2+} ebenfalls wieder in der Lage zu wachsen (Schirner and Errington 2009).

Ein veränderter Phänotyp in der Sporenmorphologie von $NL\Delta 4775-4779$ im Vergleich zu M145 war sichtbar (Tab. 3.2), aber nicht so dramatisch wie bei anderen SSSC-Mutanten (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Bemerkenswert war die Tatsache, dass die Deletion von *pkaH-pkaJ* dazu führte, dass ca. 20% der Sporen in Sporenketten entweder tot waren oder keine DNA enthielten (Tab. 3.5). Auch dass die toten Sporen und diejenigen ohne DNA mitten in den Sporenketten und von lebendigen Sporen umgeben waren (Abb. 3.13) spricht dafür, dass der Effekt der Deletion von *pkaH-pkaJ* auf die Sporen erst in den letzten Zügen der Sporenreifung, also während der Aktivität des SSSC, eintritt.

All diese verschiedenen Phänotypen der Deletionsmutante $NL\Delta 4775-4779$ zeigten eindeutig, dass die eSTPKs PkaH-PkaJ essentielle Schritte in der Synthese der verdickten Sporenwand regulieren, aber auch Schritte der Zellteilung und der Chromosomensegregation. Um zu untersuchen, ob der Phänotyp von $NL\Delta 4775-4779$ auf dem Fehlen einer einzigen eSTPK beruhte, wurde versucht die Phänotypen der Mutante durch das Einbringen einzelner eSTPK Gene zu komplementieren.

4.4.3 Eine einzelne eSTPK reicht nicht aus um den korrekten Ablauf der Sporulation zu gewährleisten

Die Deletion der Gene *pkaH-pkaJ* hatte dramatische Effekte auf die Lebensfähigkeit der Sporen in den Sporenketten und auch auf die Sensitivität der auskeimenden Sporen bezüglich Lysozym und Vancomycin (Tab. 3.5; Abb. 3.18). Außerdem führte die Deletion zur Bildung von aberranten Sporen. Infolge dessen wurde zunächst überprüft, ob eines der fünf eSTPK-Gene genügte um die Phänotypen der fünffach

Mutante NL Δ 4775-4779 wieder aufzuheben. Erstaunlicherweise bewirkte die Einführung jedes der einzelnen eSTPK-Gene, bis auf *pkal*, in die Mutante NL Δ 4775-4779 eine deutliche erhöhte Sensitivität der auskeimenden Sporen gegen osmotischen Stress (Abb. 3.17). Da die eSTPK-Gene als pSET-Konstrukte mit dem nativen Promotorbereich ins Genom integriert wurden, zeigte dieses Ergebnis, wie sensibel die Regulation durch eSTPKs ist. Die Expression einer einzelnen Kopie eines eSTPK Gens hatte so z.T. dramatischere Folgen als die Deletion aller an diesem Prozess beteiligten.

Auch auf die Verteilung der Chromosomen in den Sporenketten hatte die Einführung der einzelnen eSTPKs Auswirkungen. So war der gemessene Anteil der Sporen in den Sporenketten ohne DNA in allen Fällen gegenüber NL Δ 4775-4779 deutlich erhöht (Tab. 3.5). Die Chromosomensegregation wurde demnach beeinträchtigt. Dazu passte, dass in den Phosphoproteomdaten von *M. tuberculosis* das Protein FtsK, welches das Chromosom am Septum in die Tochterzelle transferiert (Steiner, Liu et al. 1999), als Phosphoprotein identifiziert wurde und also unter der Kontrolle einer eSTPK steht (Fortuin, Tomazella et al. 2015). Da *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* recht nahe miteinander verwandt sind, könnte also auch die hier die Funktion von FtsK durch eine eSTPK reguliert werden.

Die Integrität der Sporenwand wurde vor dem Hintergrund einer einzelnen vorhandenen eSTPK noch weiter herabgesetzt (Abb. 3.17). Auch die starke Anfälligkeit von NL Δ 4775-4779 für Lysozym und Vancomycin im Vergleich zu M145 (Abb. 3.18 und 3.20) konnte durch die Integration der einzelnen Gene nicht reduziert werden. Dieses Bild war plausibel, da in *M. tuberculosis* gezeigt werden konnte, dass eSTPKs in einem komplizierten Netzwerk miteinander interagieren und sich gegenseitig regulieren (Baer, Iavarone et al. 2014).

Eine einzelne der fünf eSTPKs PkaH-PkaJ ist demnach nicht in der Lage einen der untersuchten Phänotypen von NL Δ 4775-4779 wieder in den Zustand in M145 zurückzuführen. Teilweise werden die Phänotypen durch die einzelne Expression einer dieser eSTPKs sogar noch verstärkt. Deshalb müssen mindestens zwei dieser eSTPKs notwendig sein, um die Sporenwand korrekt zu synthetisieren.

4.4.4 Störung des Gleichgewichts des eSTPK-Netzwerks in M145 und NLΔPkaI

Dass die untersuchten eSTPKs PkaH-PkaJ tatsächlich stark voneinander abhängig waren und vermutlich in ähnlicher Beziehung zueinander stehen wie die eSTPKs in *M. tuberculosis* (Baer, Iavarone et al. 2014) und in einem sehr feinen Gleichgewicht miteinander interagieren, konnte durch die Störung dieses Netzwerks gezeigt werden. Durch die Integration einer zusätzlichen Kopie eines der fünf untersuchten eSTPK-Gene in das Chromosom von M145 und NLΔPkaI wurden unerwartet drastische Phänotypen beobachtet. In M145 bildeten dadurch alle Stämme aberrante Sporen (Abb. 3.12).

Die Lebensfähigkeit der Sporen der Stämme M145 mit einer zusätzlichen Kopie eines der eSTPK-Gene nahm stark ab. Der Anteil an lebendigen Sporen in Sporenketten lag in M145 bei über 99% (Tab.3.3). In M145::pSET-*pkaI* waren nur noch 85% der Sporen lebendig und in M145::pSET-*pkaH* waren mit nur 42% mehr als die Hälfte aller Sporen tot oder besaßen keine DNA (Tab. 3.3). Auffallend war auch die Tatsache, dass in M145 keine Sporen ohne DNA gefunden werden konnten. In allen von M145 abgeleiteten Stämmen dagegen konnten Sporen ohne DNA nachgewiesen werden (Tab. 3.3). Das beweist, dass diese eSTPKs nicht nur an der Sporenwandsynthese, sondern auch schon an Schritten davor, wie der Segregation der Chromosomen, beteiligt sein müssen.

In NLΔPkaI hatte die Integration einer zusätzlichen Kopie eines der eSTPK-Gene keinen deutlichen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Sporen. Der Anteil an lebenden Sporen lag hier in allen Fällen über 90%.

Eine mögliche Erklärung, warum nur in M145 die Integration einer zusätzlichen Kopie eines Gens zu so dramatischen Effekten auf die Lebensfähigkeit der Sporen führte, und in NLΔPkaI zu sehr geringen Effekten, wäre die, dass PkaI eine oder mehrere der anderen eSTPKs durch Phosphorylierung kontrolliert. Daraus würde folgen, dass in der Mutante NLΔPkaI andere eSTPKs weniger aktiv wären und Phänotyp bezüglich der Lebensfähigkeit der Sporen schwächer ist. Ein ähnliches Modell wurde für *M. tuberculosis* vorgeschlagen (Baer, Iavarone et al. 2014).

Interessanterweise führte die Integration eines zusätzlichen eSTPK-Gens sowohl in M145 als auch in NLΔPkaI zu einer deutlich höheren Sensitivität gegenüber hohem

osmotischem Druck (Abb. 3.17) und der Anfälligkeit der auskeimenden Sporen gegen Vancomycin oder Lysozym (Abb. 3.19 und 3.21). Sie glichen bezüglich dieser Phänotypen, denen bei NL Δ 4775-4779 beobachteteten und denen der für die SSSC-Deletionsmutanten (Heichlinger, Ammelburg et al. 2011, Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011) beschriebenen Phänotypen. Nur M145::pSET-*pkaI* und NL Δ PkaI::pSET-*pkaI* zeigten die wildtypische Resistenz (Abb. 3.19 und 3.21).

Die Ergebnisse beweisen zum einen, dass die Expression von *pkaH-pkaJ* und Aktivität von PkaH-PkaJ sehr genau reguliert sein muss. Ansonsten hätte die Integration einer einzigen zusätzlichen Kopie in das Chromosom unter dem nativen Promotor keine so dramatischen Effekte gehabt.

Zum andern zeigten diese Ergebnisse, dass *pkaI*, obwohl als zentraler Bestandteil des SSSC identifiziert (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011), den geringsten Einfluss auf die Integrität der Sporenwand hatte. Die zusätzliche Kopie in M145::pSET-*pkaI* veränderte das Gleichgewicht der eSTPKs zwar, sodass Effekte auf Toleranz von osmotischem Druck (Abb. 3.17), Sporenmorphologie (Abb. 3.12) und Lebensfähigkeit der Sporen (Tab. 3.13) gezeigt werden konnten. Dies waren aber jeweils die geringsten messbaren Effekte in M145 mit einem zusätzlichen dieser eSTPK Gene. Hieraus und aus den Ergebnissen der Tests mit der Mutante NL Δ PkaI kann geschlossen werden, dass von den fünf eSTPKs PkaI eine eher geringe Bedeutung für die korrekte Synthese der Sporenwand hat.

Die verschiedenen und unabhängigen Phänotypen zeigten zudem eindrucksvoll, dass die eSTPKs PkaH-PkaJ eine ganze Reihe von zellulären Prozessen, während der Sporulation, regulieren müssen. Diese reichten von einer korrekten Verteilung der Chromosomen in den Vorsporen bis zur korrekten Synthese der Sporenwand.

Die Phänotypen der "Überexpression" einzelner eSTPKs belegen eindeutig, dass die eSTPKs miteinander interagierten und sich gegenseitig beeinflussen. Eine Wechselwirkung von *S. coelicolor* eSTPKs wurde auch in den BTH Experimente mit PkaI gefunden (Ladwig, Franz-Wachtel et al. 2015). So wurde die direkte Interaktion von PkaI mit den eSTPKs PkaA (SCO2974), PkaD und sich selbst gezeigt (Ladwig, Franz-Wachtel et al. 2015). Für *M. tuberculosis* gibt es ein Interaktionsmodell,

welches alle elf eSTPKs beinhaltet und diese in direkte Beziehung zueinander setzt (Baer, Iavarone et al. 2014). Es ist demnach sehr unwahrscheinlich, dass die eSTPKs aus *S. coelicolor* völlig eigenständig voneinander arbeiten und nicht auch selbst von anderen eSTPKs in ihrer Aktivität reguliert werden. Vermutlich hat dieses komplexe Zusammenspiel auch Auswirkungen auf die Phänotypen von M145 und $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ mit einer zusätzlichen Kopie eines der Gene *pkaH-pkaJ*. Diese Zusammenhänge können allerdings nicht mit den hier erhobenen Daten zufriedenstellend erklärt werden. Somit sind für das Verständnis dieser Phänotypen weiterführende Experimente nötig. Da auch die Mutante $\text{NL}\Delta 4775-4779$ noch in der Lage war, den vollständigen Differenzierungszyklus zu durchlaufen, ist davon auszugehen, dass noch weitere eSTPKs aus *S. coelicolor* an der Kontrolle der Differenzierung beteiligt sind und das Fehlen von *pkaH-pkaJ* zumindest teilweise ersetzen können.

4.5 PkaI phosphoryliert die SSSC Proteine MreC und PBP2

Die Interaktion verschiedener Mre-Proteine mit PkaI (Kleinschütz, Heichlinger et al. 2011) deutete darauf hin, dass diese von PkaI phosphoryliert und so in ihrer Aktivität reguliert werden. Obwohl die Mre-Proteine in fast allen stäbchenförmigen Bakterien zu finden sind und ihre Rolle auf die Zellwandsynthese während des Streckungswachstums in *E. coli* und *B. subtilis* gut untersucht ist (Kruse, Bork-Jensen et al. 2005, Leaver and Errington 2005, White, Kitich et al. 2010), konnte bis jetzt keine Phosphorylierung eines dieser Proteine nachgewiesen werden. Allerdings tauchen in den Datensätzen der Phosphoproteome viele Fts-Proteine und PBPs auf (Soares, Spat et al. 2013, Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013, Ravikumar, Shi et al. 2014, Fortuin, Tomazella et al. 2015). Weiterhin wurden verschiedene Mur-Proteine für die Herstellung der Zellwandvorstufen als Interaktionspartner von eSTPKs in *C. glutamicum* und in *M. tuberculosis in vitro* und durch BTH Experimente bestimmt werden (Fiuza, Canova et al. 2008, Munshi, Gupta et al. 2013).

Durch die heterologe Ko-Expression von *pkaI* mit entweder *mreC* oder *pbp2* in *E. coli* BL12 (DE3) konnte erstmals biochemisch gezeigt werden, dass es sich bei PkaI tatsächlich um eine eSTPK handelt und dass PkaI in der Lage war sich selbst, MreC und PBP2 zu phosphorylieren (Abb. 3.21 und Abb. 3.23). Die bei diesen Arbeiten

beobachtete Ko-Reinigung von Pkal und MreC (Abb. 3.22) bestätigt die durch BTH-Experimente gefundene Interaktion von Pkal mit MreC und PBP2 (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Durch verschiedene Kontrollexperimente wurde die Spezifität der Phosphorylierung von MreC und PBP2 bestätigt (Abb. 3.22 und Abb. 3.26, Anhang xxx). Dies war das erste Mal, dass eine Phosphorylierung in einem Mre Protein nachgewiesen werden konnte. Dass PBPs phosphoryliert werden können ist zwar bekannt (www.phosida.com, Soares, Spat et al. (2013), Ravikumar, Shi et al. (2014), Fortuin, Tomazella et al. (2015)), doch eine Phosphorylierung von PBP2 in anderen Bakterien ist trotz der großen Anzahl an verfügbaren Phosphoproteom Daten bislang unbekannt. Vermutlich handelt es sich deshalb bei der Phosphorylierung von MreC und PBP2 um eine Besonderheit der Streptomyceten, die eine wichtige Adaption an den speziellen Lebenszyklus, z.B. koordinierte Septierung des Luftmyzels, darstellt, und in einzelligen Bakterien keine Rolle spielt und daher nicht vorhanden ist.

Bemerkenswert ist nicht nur, dass zum ersten Mal eine Phosphorylierung von PBP2 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.24), sondern auch, dass sich PBP2 nur in Anwesenheit von Pkal heterolog exprimieren lies (Abb. 3.23). Dies bedeutete entweder auf eine wichtige Funktion der Phosphorylierung für die Stabilität von PBP2 hin oder dass unphosphoryliertes PBP2 unter den untersuchten Bedingungen toxisch gewesen ist. Der genaue Mechanismus dieser Stabilisierung kann allerdings nicht vorhergesagt werden (Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012). Drei der vier identifizierten Phosphosites in PBP2 lagen in der vorhergesagten Dimerisierungsdomäne des Proteins (Abb. 3.25). Die vierte Phosphosite wurde in der Transpeptidasedomäne identifiziert (Abb. 3.25). Daher lag die Vermutung nahe, dass die Protein-Protein-Interaktion und/oder die enzymatische Aktivität von PBP2 direkt durch die Phosphorylierung beeinflusst wurden.

Funktionell wurde bisher nur die Auswirkung der Phosphorylierung für das monofunktionelle PBP PBPA aus *M. tuberculosis* genauer untersucht (Dasgupta, Datta et al. 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung in der Transpeptidasedomäne essentiell für die korrekte Funktion bei der Zellteilung ist (Dasgupta, Datta et al. 2006). Das für dieses PBP kodierende Gen liegt in einem nur in Aktinobakterien konservierten Gencluster, welches auch mindestens ein eSTPK

Gen enthält. Das Ortholog von PBPA in *S. coelicolor* ist SCO3847, das Ortholog der eSTPK ist SCO3848. Für SCO3847 ist bisher keine Funktion beschrieben und der Nachweis der Phosphorylierung ist nicht erfolgt.

MreC ist ein Bestandteil des Elongasoms (Cabeen and Jacobs-Wagner 2005) und zumindest in *B. subtilis* ein essentielles Protein (Leaver and Errington 2005). Obwohl die Kristallstruktur von MreC aus *Listeria monocytogenes* (van den Ent, Leaver et al. 2006) und *Streptococcus pneumoniae* (Lovering and Strynadka 2007) aufgeklärt wurde, ist die genaue Funktion von MreC nach wie vor unbekannt. BTH Experimente in verschiedenen Organismen zeigen, dass MreC mit sich selbst, mit MreD und einer Vielzahl von PBPs interagiert (Kruse, Bork-Jensen et al. 2005, van den Ent, Leaver et al. 2006, White, Kitich et al. 2010, Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Eine Phosphorylierung von MreC wurde bisher in keinem Bakterium nachgewiesen.

Nur durch das Wissen um eine Phosphorylierung kann noch keine Aussage bezüglich der physiologischen Wirkung gemacht werden (Pereira, Goss et al. 2011, Mijakovic and Macek 2012). Die identifizierten Phosphosites von MreC befinden sich in der sogenannten MreC-Domäne (Abb. 3.24). Diese Domäne ist nur in MreC-Proteinen konserviert und mit einer Länge von 149 Aminosäuren macht sie einen Großteil des Proteins aus. Vermutlich ist sie essentiell für die Interaktionen von MreC.

Da eine enzymatische Aktivität von MreC unbekannt ist, konnte der Einfluss der Phosphorylierung auf die MreC Aktivität nicht gemessen werden. Jedoch konnte mittels eines BTH-Experiments gezeigt werden, dass die Auswirkung der Phosphorylierung von MreC und PBP2 zu einer verminderten Protein-Protein-Interaktion führte (Abb. 3.26). Dass MreC in Anwesenheit von Pka1 nicht mehr in der Lage war, mit sich selbst zu interagieren (Abb. 3.26), deutet darauf hin, dass sich die Phosphorylierung in diesem Fall negativ auf Protein-Protein-Interaktionen auswirkte.

4.6 Modell zur Kontrolle des SSSC durch Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen der Zellwandsynthese durch eSTPKs kann in vielen Bakterien nachgewiesen werden. Da diese Daten jedoch hauptsächlich auf Phosphoproteomen (Soares, Spat et al. 2013, Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013,

Basell, Otto et al. 2014, Ravikumar, Shi et al. 2014, Fortuin, Tomazella et al. 2015) und BTH-Experimenten beruhen (Munshi, Gupta et al. 2013), ist über die molekularen Wirkmechanismen sehr wenig bekannt. In den Datensätzen der Phosphoproteome tauchen viele Fts-Proteine und PBPs auf (Soares, Spat et al. 2013, Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013, Ravikumar, Shi et al. 2014, Fortuin, Tomazella et al. 2015). Die Mur-Proteine für die Herstellung der Zellwandvorstufen konnten in *C. glutamicum* und in *M. tuberculosis in vitro* und durch BTH Experimente als Interaktionspartner von eSTPKs bestimmt werden (Fiuza, Canova et al. 2008, Munshi, Gupta et al. 2013).

Die Phosphorylierung eines der Mre-Proteine bisher nur bei *S. coelicolor* gefunden (Ladwig, Franz-Wachtel et al. 2015). Vermutlich handelt es sich bei der Phosphorylierung dieser Proteine um eine Streptomyceten-spezifische Adaption an die Bedürfnisse des Streptomyceten Lebenszyklus, welche in einzelligen Bakterien nicht benötigt wird. So haben Streptomyceten, im Gegensatz zu Bakterien, die sich durch Zweiteilung fortpflanzen und eine einzige Querwand einfügen müssen, während der Differenzierung das Problem die simultane Synthese von mehr als 50 Querwänden zu koordinieren. Die simultane Synthese von multiplen Sporulationssepten in eine Luftmyzelhyphe setzt voraus, dass die dafür benötigten Synthesekomplexe in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt, positioniert und koordiniert werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wird folgendes Modell postuliert, welches die Kontrolle der koordinierten Sporenwandsynthese während der Sporulation von Streptomyceten durch Phosphorylierung von SSSC Proteinen beschreibt:

Bereits während der Luftmyzelbildung werden die Gene vieler SSSC-Komponenten transkribiert (Yague, Rodriguez-Garcia et al. 2013). Um eine unkoordinierte Assemblierung des SSSC zu vermeiden, werden die SSSC-Proteine von PkaH-PkaJ phosphoryliert (Abb. 4.1 I). Die BTH-Experimente in Anwesenheit von PkaI zeigen, dass die Protein-Protein-Interaktion von MreC mit sich selbst und die mit PBP2 deutlich verringert wird. Folglich beeinflusst die Phosphorylierung von SSSC

Proteinen deren Protein-Protein Interaktion und somit vermutlich die Assemblierung eines funktionellen SSSC.

Erst wenn das Auswachsen der Luftmyzelhyphen fertiggestellt ist und ein bestimmter Abschnitt in der Differenzierung erreicht ist, werden die SSSC-Proteine von Phosphatasen dephosphoryliert (Abb. 4.1 II). *S. coelicolor* kodiert 55 Ser/Thr Phosphatasen. Eine davon, SCO7326, wurde im BTH Screen als Interaktionspartner von Pkal gefunden und könnte somit an diesem Prozess beteiligt sein. Die SSSC-Proteine scheinen schon früher, vor der Synthese der verdickten Sporenwand (Mazza, Noens et al. 2006, Heichlinger, Ammelburg et al. 2011), mit dem Divisom zu interagieren. Dies zeigt sich in der Tatsache, dass alle Mutanten in Genen, welche für am SSSC beteiligte Proteine kodieren, aberrante Sporen produzieren (Abb. 3.13, Mazza, Noens et al. (2006), Kleinschnitz, Heichlinger et al. (2011), Kleinschnitz, Latus et al. (2011)). Auf welche Weise die SSSC-Proteine allerdings einen Einfluss auf die Morphologie der Sporen haben können, ist noch unbekannt. Möglicherweise werden die SSSC-Proteine nach und nach vom Divisom rekrutiert, und es findet ein fließender Übergang vom Divisom zum aktiven SSSC statt. Dies würde erklären, warum beispielsweise das PBP FtsI Teil des SSSC ist (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011). Für die Aktin-homologen Komponenten des SSSC, MreB und Mbl, wurde in vorangegangenen Arbeiten durch Fluoreszenzmikroskopie eine dynamische Lokalisation beobachtet. In Substratmyzel und beginnenden Luftmyzel fand keine spezifische Lokalisation statt, obwohl MreB zu diesem Zeitpunkt im Immunoblot deutlich nachweisbar war (Mazza, Noens et al. 2006, Heichlinger, Ammelburg et al. 2011). Im ausgewachsenen Luftmyzel lokalisierte MreB zusammen mit Mbl und FtsZ (Grantcharova, Lustig et al. 2005) an den Sporulationssepten. Während der Sporenreifung breitete sich MreB von den Septen ausgehend auf die gesamte Spore aus und bildete eine Schicht an der inneren Sporenwand. Dieses Lokalisationspattern deckt sich mit der Synthese der verdickten Sporenwand (Sigle, Ladwig et al. 2015). Da die SSSC-Proteine im Proteom der dormanten wie auch der keimenden Sporen nicht nachweisbar sind (Strakova, Bobek et al. 2013), werden sie vermutlich nach der Verstärkung der Sporenwand wieder abgebaut.

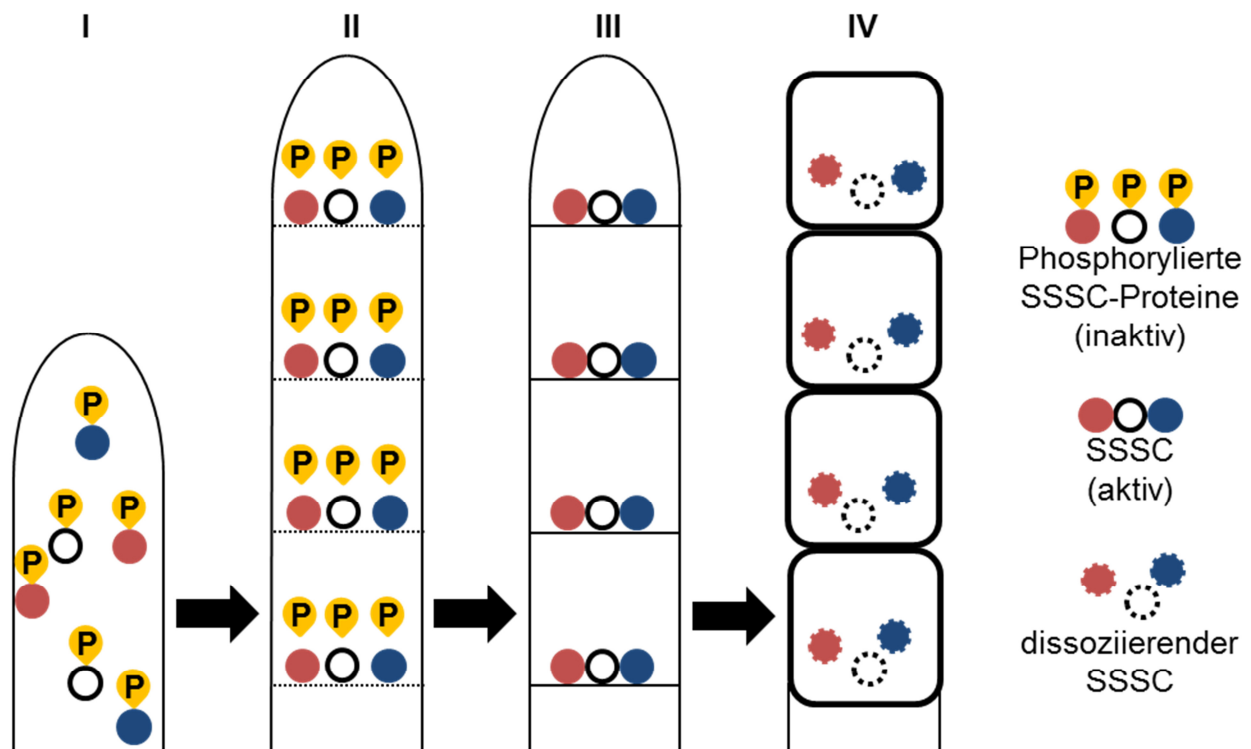


Abb.4.1: Modell der Regulation des SSSC durch Phosphorylierung: Die synthetisierten SSSC-Proteine werden in der wachsenden Lufthyphe zunächst phosphoryliert und sind so inaktiv (I). Ist die Lufthyphe ausgewachsen und die Septierung beginnt, werden die SSSC-Proteine dephosphoryliert und werden zum Septum rekrutiert (II). Ist die Septierung abgeschlossen formiert sich der aktive SSSC und verdrickt die Sporenwand (III). Nach der Fertigstellung der verdickten Sporenwand dissoziiert der SSSC und die Proteine werden abgebaut (IV).

Die phänotypische Charakterisierung der kreierte Mutanten zeigen, dass sowohl die Deletion des eSTPK-Clusters *pkaH-pkaJ* als auch die Störung des nativen Gleichgewichts unter den eSTPKs durch eine zweite Kopie eines der Gene zu starken Effekten auf die Sporenwand führt. Dies könnte durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen den eSTPKs und den korrespondierenden Phosphatasen erklärt werden:

Werden die Phosphatasen aktiv und dephosphorylieren die SSSC-Komponenten, so kann eine gesteigerte Expression durch eine zweite Kopie einer eSTPK zu einer erneuten Phosphorylierung der SSSC-Proteine führen. Das entsprechende Protein ist wieder inaktiv und in der Protein-Protein-Interaktion gestört. Da in diesem Fall der SSSC nicht vollständig aufgebaut werden kann, fehlt das phosphorylierte Protein. Der Effekt ist also identisch mit der Deletion des entsprechenden Gens des SSSC-Proteins. Daher finden sich in fast allen Mutanten mit zusätzlichem eSTPK-Gen die

gleichen Phänotypen, welche bezüglich der Integrität der Sporenwand schon in den Deletionsmutanten von SSSC-Proteinen nachgewiesen wurden (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Da die SSSC-Proteine auch einen Einfluss auf die Platzierung der Septen zu haben scheinen, wie die Produktion von aberranten Sporen bei Deletionsmutanten von Genen für SSSC-Proteine zeigt, findet sich der Phänotyp der aberranten Sporenbildung auch bei Stämmen mit zusätzlichem eSTPK-Gen. Die Einführung eines zusätzlichen eSTPK-Gens erzeugt also den gleichen Phänotyp wie Deletionsmutanten von Genen für SSSC-Proteine, da der SSSC unvollständig bleibt.

Werden die eSTPKs *pkaH-pkaJ* deletiert, so können die SSSC-Proteine nicht phosphoryliert werden (Abb. 4.2). Deshalb können sie schon direkt nach der Translation miteinander interagieren. So interagieren vermutlich SSSC-Proteine spontan schon im Luftmyzel. Eine koordinierte Assemblierung des SSSC ist unter diesen Umständen unmöglich. Der SSSC ist aber nur aktiv, wenn alle Komponenten vorhanden sind, wie die Phänotypen der Deletionsmutanten von SSSC-Proteinen zeigen (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011). Vermutlich spielen auch die Reihenfolge der Interaktionen und Stöchiometrie der einzelnen Komponenten eine Rolle. Dies alles kann bei spontanen und vorzeitigen Interaktionen nicht gewährleistet werden, und ein funktionsfähiger SSSC kann nicht gebildet werden. Deshalb sind die Effekte auf die Sporenwand die gleichen wie bei der Störung des SSSC durch die Deletion einzelner Komponenten (Kleinschnitz, Heichlinger et al. 2011, Kleinschnitz, Latus et al. 2011).

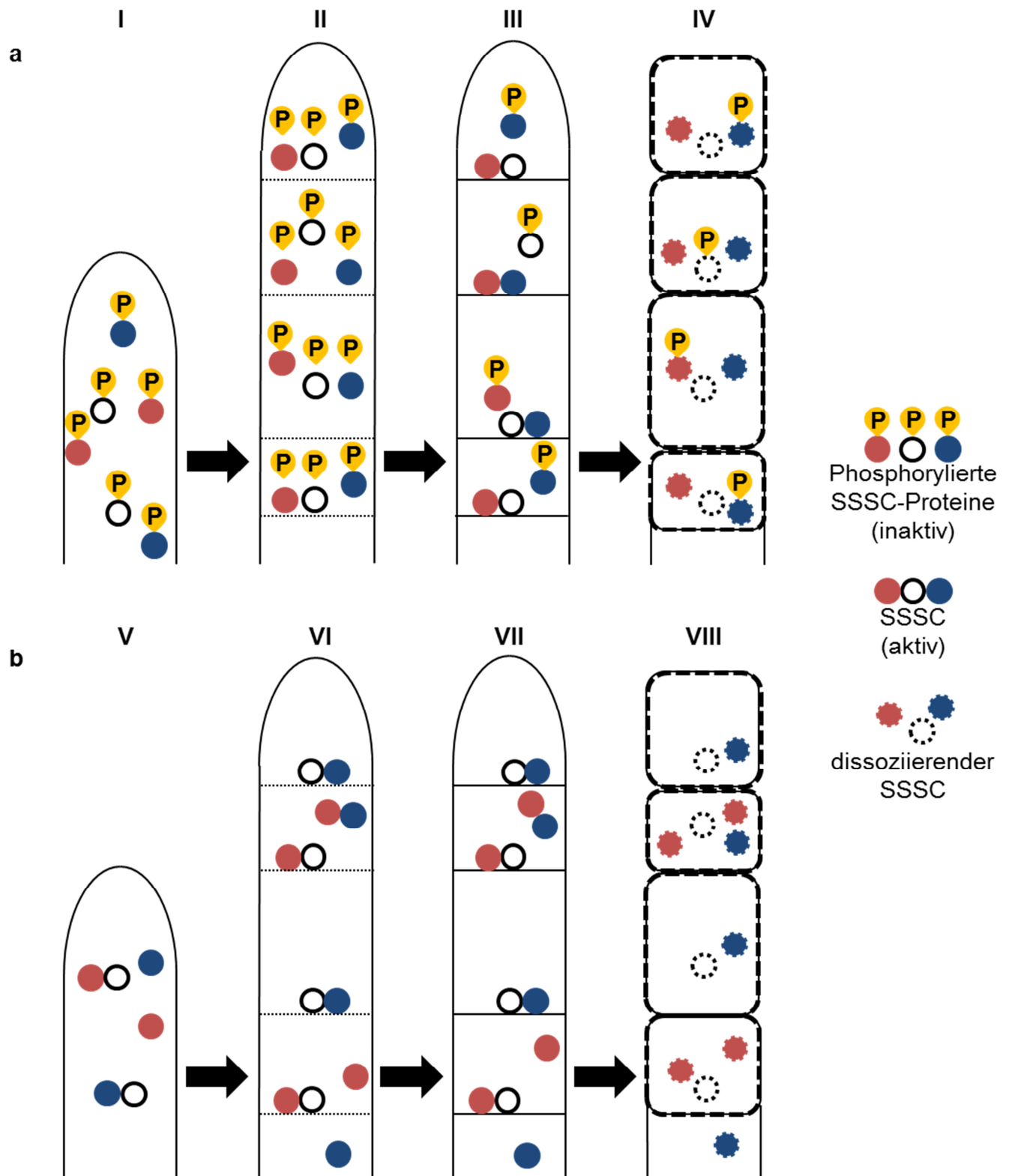


Abb.4.1: Modell der Störung des SSSC durch gesteigerte eSTPK Aktivität bzw. fehlende Phosphorylierung: Der SSSC kann entweder durch die Einführung einer zweiten Kopie eines der eSTPK-Gene *pkaH-pkaJ* (a) bzw. durch deren Deletion (b) dereguliert werden. Im Fall der gesteigerten Aktivität der eSTPKs durch eine zusätzliche Kopie (a) werden die synthetisierten SSSC-Proteine in der wachsenden Lufthyphe zunächst phosphoryliert und sind so inaktiv (I). Ist die Lufthyphe ausgewachsen und die Septierung der Lufthyphe beginnt, werden die SSSC-Proteine

4. Diskussion

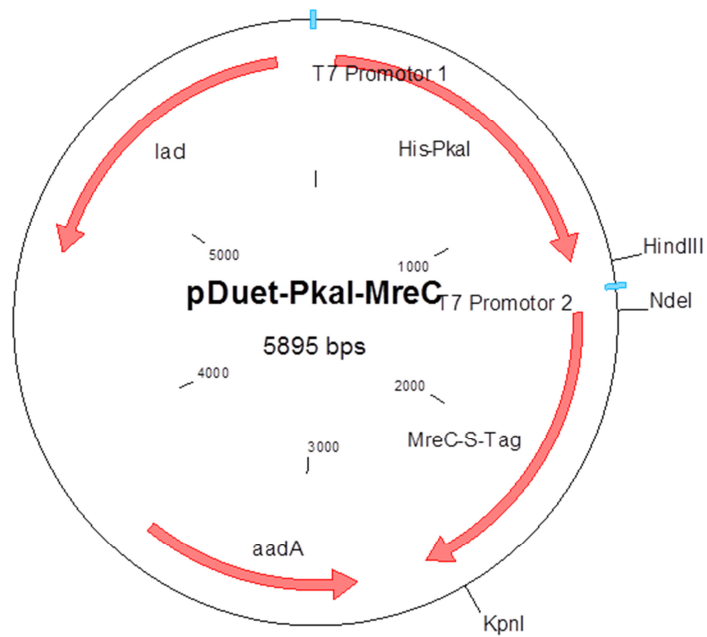
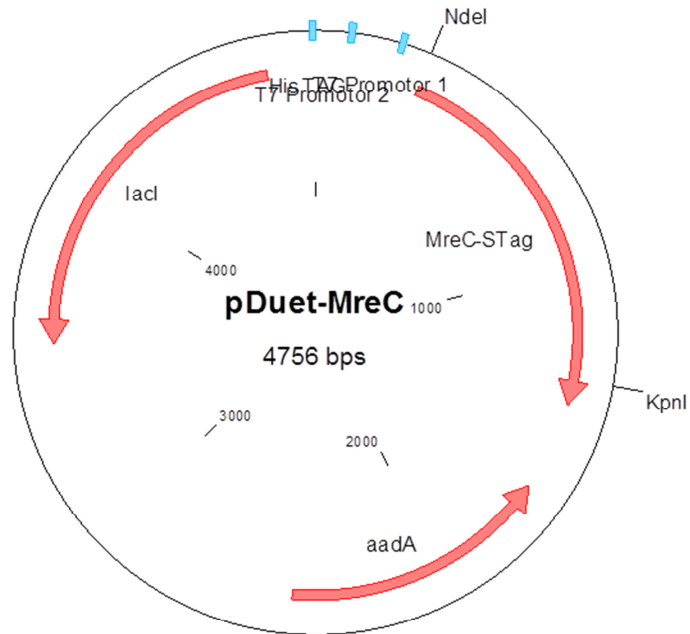
dephosphoryliert, jedoch sorgt die erhöhte eSTPK-Aktivität dafür, dass einige SSSC-Proteine wieder phosphoryliert und so wieder inaktiviert werden. Die dephosphorylierten SSSC-Proteine werden zum Septum rekrutiert, da aber nicht alle SSSC-Komponenten da sind, wird auch die Positionierung des Septums gestört (II). Ist die Septierung abgeschlossen, formiert sich der SSSC. Da einzelne Komponenten noch phosphoryliert sind, assembliert er nur unvollständig und ist nicht in der Lage, die verstärkte Sporenwand korrekt zu synthetisieren (III). Nach der partiellen Fertigstellung der Sporenwand dissoziiert der SSSC und die Proteine werden abgebaut (IV). Die Deletion der eSTPK-Gene *pkaH-pkaJ* (b) hat einen ähnlichen Effekt, der auf anderem Wege zustande kommt. Die SSSC-Proteine in der wachsenden Lufthyphe sind nicht phosphoryliert und so inaktiv. Sie können noch während des Wachstums der Lufthyphe spontan interagieren (V). Dies beeinflusst auch die Septierung, wodurch es zu unregelmäßigen Septen kommt. Unvollständige SSSCs werden vom Divisom zu den Septen rekrutiert (VI). Da die Verteilung der SSSC-Komponenten und die Assemblierung ohne die regulierende Phosphorylierung nicht geordnet verläuft, ist die Zusammensetzung der SSSCs nicht korrekt und die Komplexe sind nicht voll funktionsfähig (VII). Nach der partiellen Verstärkung der Sporenwand dissoziiert auch hier der SSSC und wird abgebaut (VIII).

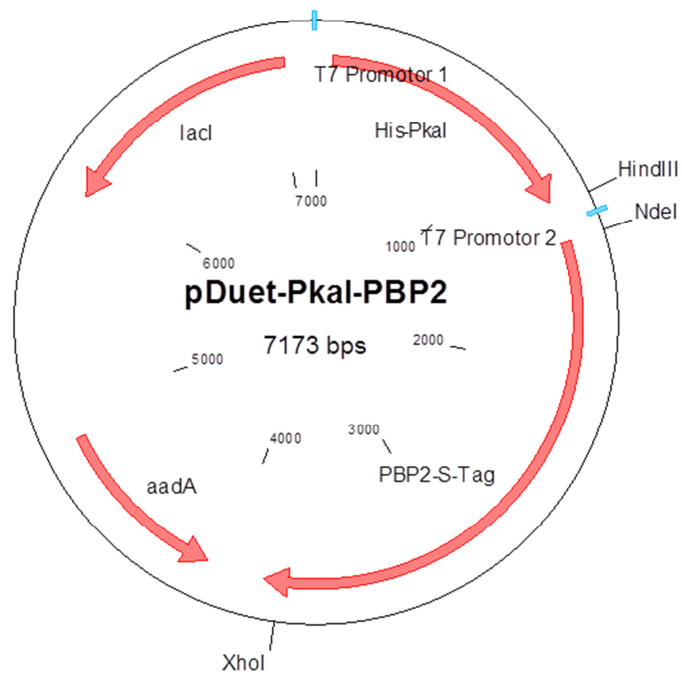
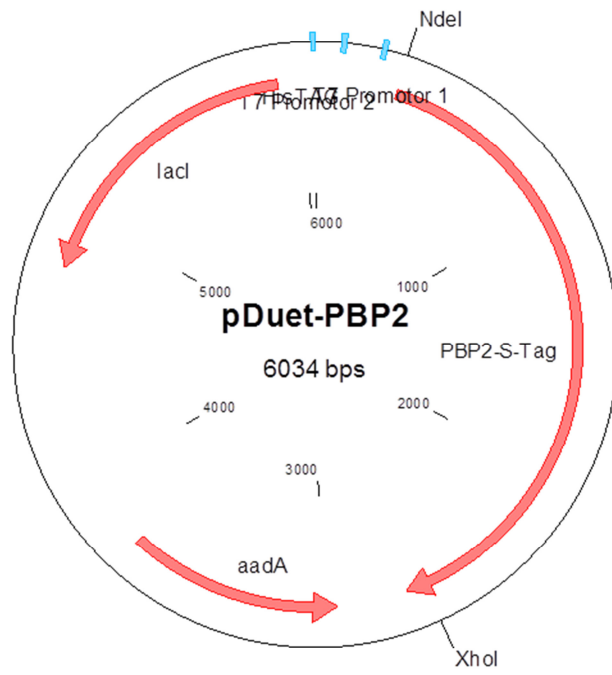
Dieses Modell ist eine Interpretation der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse. Um es vollständig zu bestätigen, müssten noch weitere Experimente, wie z.B. die Identifizierung der Phosphosites aller SSSC Proteine und die Untersuchung von Effekten einer Phosphorylierung auf eine messbare Enzymaktivität einer SSSC-Komponente, gemacht werden. Jedoch erlaubt die nachgewiesene Rolle der eSTPKs bei der morphologischen Differenzierung von *S. coelicolor* eine vollkommen neue Sichtweise des *Streptomyces* Lebenszyklus und stellt möglicherweise den Schlüssel dar, die Koordination der Septensynthese und den Sporulationsprozess im Ganzen zu verstehen.

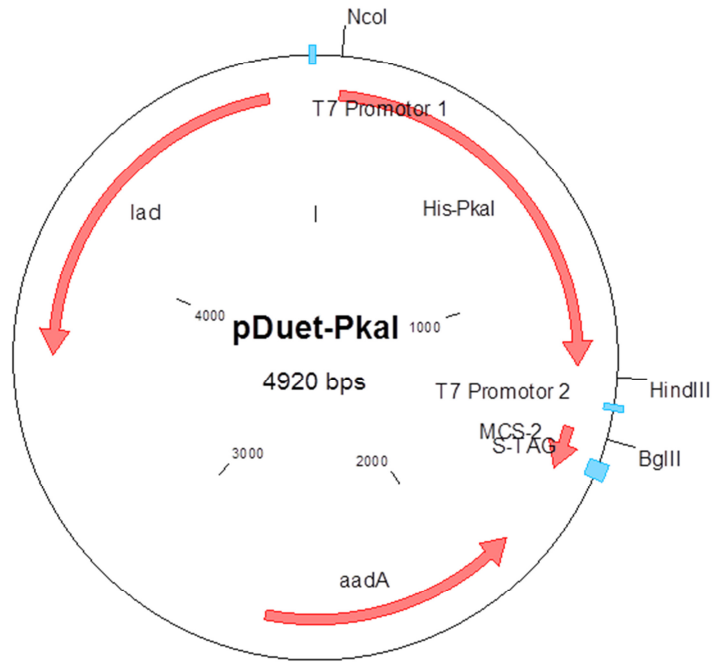
5. Anhang

5.1 Plasmidkarten

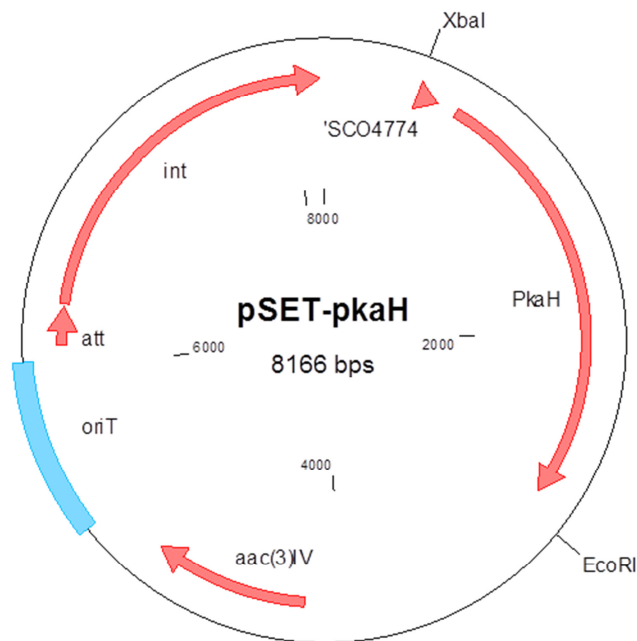
5.1.1 pCDF-Duet-1-Konstrukte

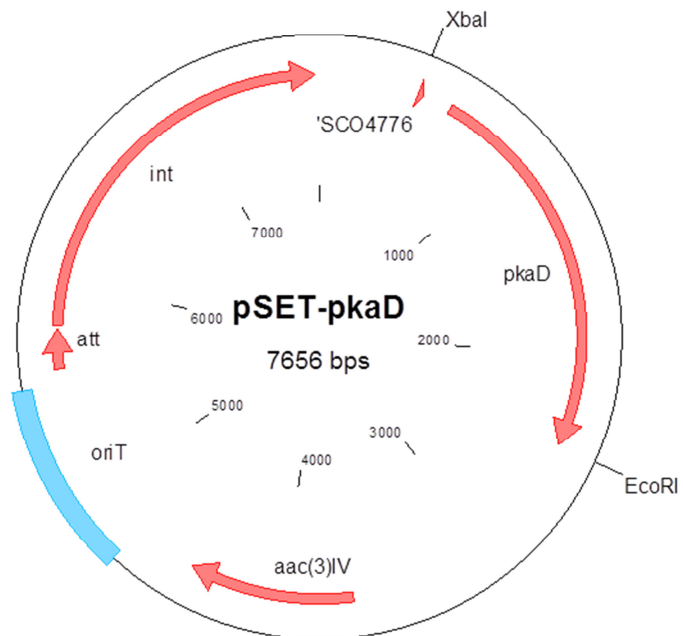
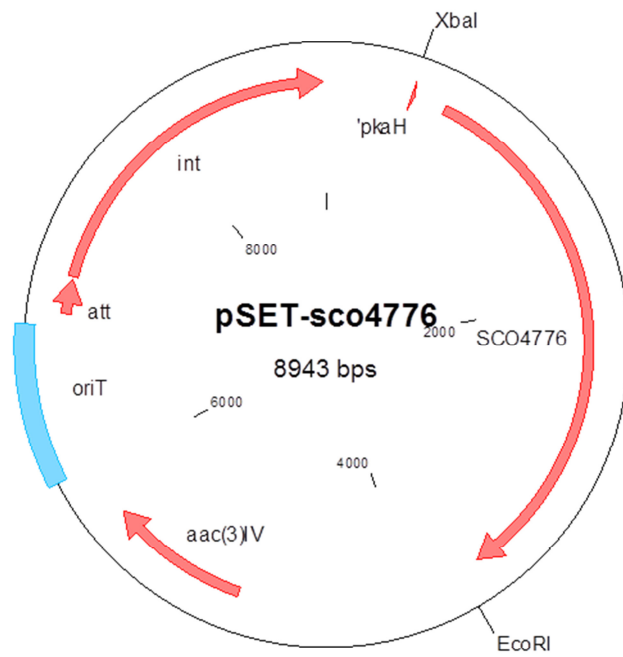


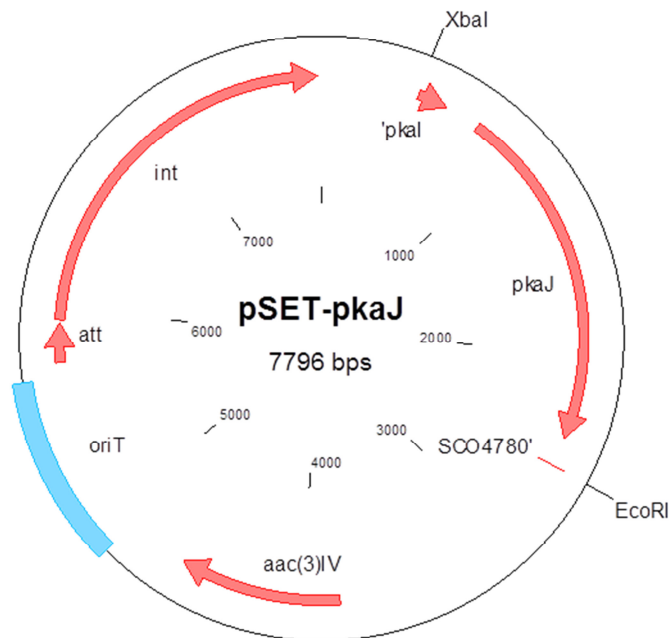
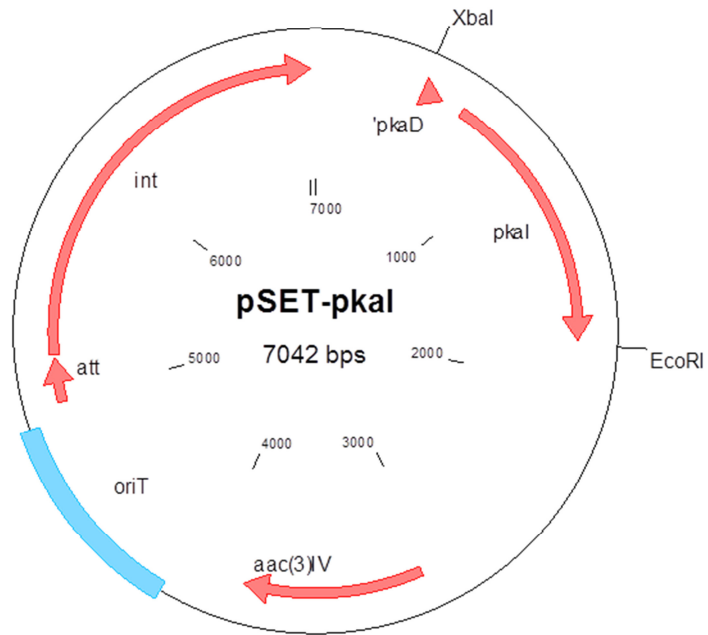




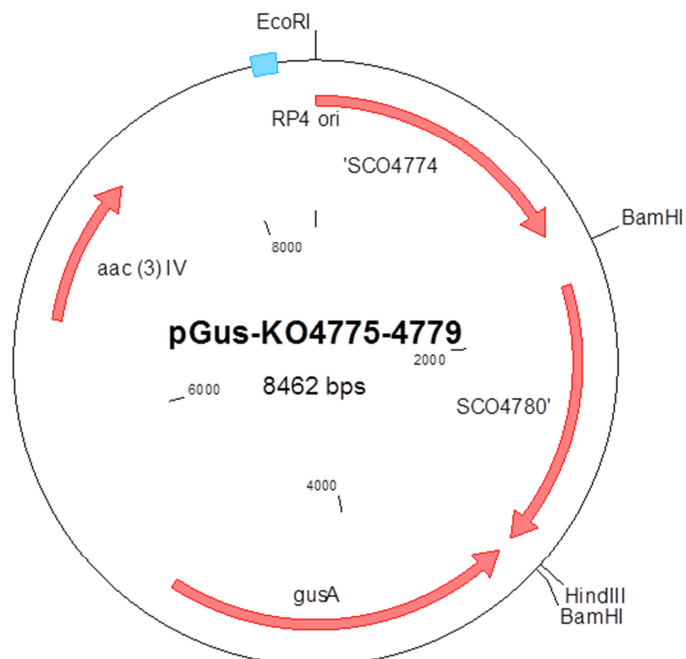
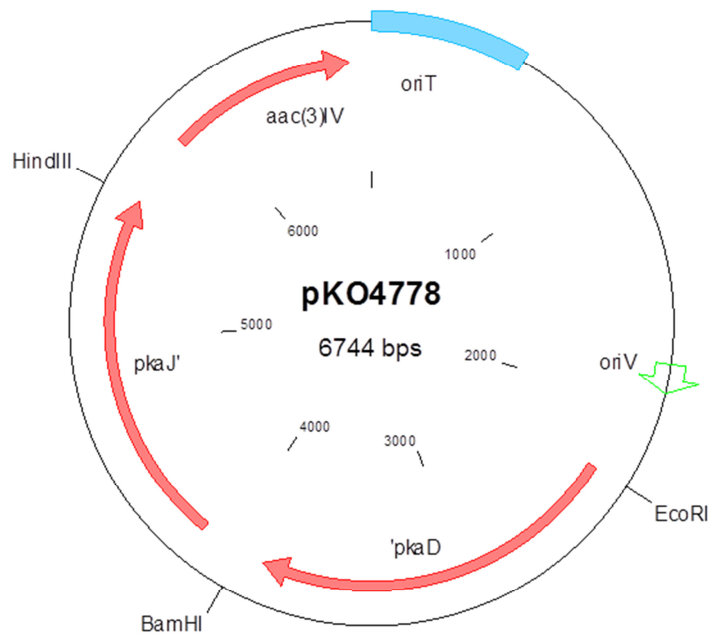
5.1.2 pSet152-Konstrukte







5.1.3 Plasmide zur Generierung der Deletionsmutanten $NL\Delta PkaI$ und $NL\Delta 4775-4779$



5.2 Rohdaten der Lebend/Tot-Färbung

Stamm	M145	%	M145+4775	%	M145+4776	%	M145+4777	%	M145+4778	%	M145+4779	%
Lebend (grün)	984	99,29%	1076	72,31%	939	85,05%	422	59,69%	1473	85,39%	412	42,56%
Tot (rot)	7	0,71%	409	27,49%	151	13,68%	260	36,78%	181	10,49%	538	55,58%
Ohne DNA			3	0,20%	14	1,27%	25	3,54%	71	4,12%	18	1,86%
Total	991		1488		1104		707		1725		968	

Stamm	NL-Pkal	%	NL-Pkal+4775	%	NL-Pkal+4776	%	NL-Pkal+4777	%	NL-Pkal+4778	%	NL-Pkal+4779	%
Lebend (grün)	1539	92,99%	1466	95,32%	1179	91,75%	1461	95,74%	1547	93,99%	957	93,64%
Tot (rot)	71	4,29%	52	3,38%	42	3,27%	39	2,56%	70	4,25%	43	4,21%
Ohne DNA	45	2,72%	20	1,30%	64	4,98%	26	1,70%	29	1,76%	22	2,15%
Total	1655		1538		1285		1526		1646		1022	

Stamm	NL-4775-9	%	NL-4775-9 +4775	%	NL-4775-9 +4776	%	NL-4775-9 +4777	%	NL-4775-9 +4778	%	NL-4775-9 +4779	%
Lebend (grün)	1485	82,13%	701	89,99%	1023	80,42%	1540	90,38%	1032	87,61%	1025	87,01%
Tot (rot)	304	16,81%	50	6,42%	157	12,34%	116	6,81%	54	4,58%	99	8,40%
Ohne DNA	19	1,05%	28	3,59%	92	7,23%	48	2,82%	92	7,81%	54	4,58%
Total	1808		779		1272		1704		1178		1178	

5.3 identifizierte Phosphoproteine

SCO Nummer	Synonym	Funktion (aus UniProt)	Größe (phosphorylierte Aminosäure)	in PhosSite identifiziert
SCO0264		putativer transkriptioneller Regulator	150 (S ₁₃₆)	-
SCO0387		putative Bi-Domänen-Oxidoreductase	726 (S ₇)	-
SCO0396		uncharakterisiertes Protein	424 (S ₃₆₈)	-
SCO0492		putative Peptidsynthetase	3643 (S ₁₂₆₇)	-
SCO0588		putative Sensorkinase	575 (T ₄₅₉)	+
SCO0596	DspA	putatives DNA-Bindeprotein	187 (S ₁₀₁)	-
SCO0684		uncharakterisiertes Protein	258 (T ₂₄₅)	-
SCO0701		uncharakterisiertes Protein	147 (T ₁₃₂)	-
SCO0702	AbaA	Regulator	192 (S ₂₅)	-
SCO0705		konserviertes hypothetisches Protein	272 (S ₈ , T ₉)	-
SCO0719		uncharakterisiertes Protein	158 (T ₁₀₆)	-
SCO0738		putatives sekretiertes Protein	179 (S ₅₀)	-
SCO0791		putatives integrales Membranprotein	379 (T ₃₂₄ , T ₃₂₆)	-
SCO0911		uncharakterisiertes Protein	446 (T ₁₀)	-
SCO0936		putative Oligosacchariddeacetylase	201 (T ₃₅)	-
SCO0996		putatives Lipoprotein	347 (T ₁₀₁)	-
SCO1024		konserviertes hypothetisches Protein	833 (T ₃₉₈)	-
SCO1116		hypothetisches Protein	308 (S ₂)	-
SCO1200		putatives regulatorisches Protein	191 (T ₃)	-
SCO1382		uncharakterisiertes Protein	157 (T ₁₅₄)	-
SCO1395		MutT ähnliches Protein,	138 (T ₁₉)	-

5.Anhang

		Pyrophosphohydrolase		
SCO1421	RbpA	RNA Polymerase-Bindeprotein	124 (T ₁₈)	-
SCO1422		putatives Membranprotein	194 (T ₁₅₄)	-
SCO1434		putatives Protein aus Cbx/CfqX-Familie	618 (S ₃₈₁ , T ₃₈₆ , T ₃₈₉)	-
SCO1436		putatives sekretiertes Protein	443 (S ₂₃₄ , T ₂₃₆ , T ₂₄₃)	-
SCO1480		konserviertes hypothetisches Protein	107 (S ₈₂ , S ₉₂)	-
SCO1507		putatives integrales Membranprotein	240 (T ₃₁)	-
SCO1508	HisS	Histidin-tRNA-Ligase	425 (T ₆₈)	-
SCO1511		uncharakterisiertes Protein	355 (T ₁₄)	-
SCO1517		putatives sekretiertes Protein	169 (T ₁₅₅)	+
SCO1523	PdxS	Pyridoxal-Biosynthese-Lyase	303 (S ₂)	-
SCO1548		hypothetisches Protein	86 (S ₈₅ , S ₈₆)	-
SCO1551		putative eukaryontenähnliche Serin/Threonin-Proteinkinase	493 (T ₃₂₉)	+
SCO1554		putative Nicotinat-Nucleotid- Dimethylbenzimidazol- Phosphoribosyltransferase	1212 (S ₈₂ , S ₈₄ , T ₅₇₅)	+ (S ₈₂)
SCO1598	RplT	50S ribosomales Protein L20	127 (S ₂₂)	-
SCO1630		putatives integrales Membranprotein	541(S ₃₄₃ , T ₄₂₂)	-
SCO1646	Pup	prokaryotisches Ubiquitin- ähnliches Protein	72 (S ₁₆)	+
SCO1647		konserviertes hypothetisches Protein	497 (S ₆₆)	-
SCO1648	Arc	Proteasom-assoziierte ATPase	588 (T ₅₇₇)	-
SCO1660	GK2	Glycerinkinase 2	512 (S ₃₄)	-
SCO1749	SepF1	Funktion überschneidet sich mit FtsA (Septumbildung)	146 (T ₄₀)	+

5.Anhang

SCO1774		putatives regulatorisches Protein	682 (T ₅₁ , S ₅₃)	-
SCO1796		putatives sekretiertes Protein	319 (T ₂₉₈)	-
SCO1836		putatives Stress-ähnliches Protein	160 (T ₁₃)	+
SCO1851	CobO	Cobalamin-Adenosyltransferase	199 (T ₁₆)	-
SCO1903		putatives Transport-assoziiertes Protein	399 (T ₂₂₄)	-
SCO1925		konserviertes hypothetisches Protein	473 (T ₅)	-
SCO1946	Pgk	Phosphoglyceratkinase	403 (T ₃₉₄)	-
SCO1947	Gap1	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	336 (T ₂₀₉)	-
SCO1998	RpsA	30S ribosomales Protein S1	502 (S ₄₈₁)	+
SCO2008		putatives verzweigt-kettige-aminosäurenbindendes Protein	418 (T ₂₀₆ , T ₃₉₄)	-
SCO2011		putatives verzweigt-kettige-aminosäuren-Transportprotein	309 (T ₁₀)	-
SCO2077	DivIVA	uncharakterisiertes Protein	398 (S ₃₀₉)	+
SCO2079	SepF2	Funktion überschneidet sich mit FtsA	213 (S ₉₇ , T ₉₉ , S ₂₁₃)	+ (T ₉₉)
SCO2087	MraY	Phospho-N-Acetylmuramoyl-Pentapeptide-Transferase	363 (S ₁₁₄)	-
SCO2110	PkaF	putative eukaryontenähnliche Serin/Threonin-Proteinkinase	667 (S ₃₄₄)	-
SCO2121		putative Zweikomponentensystem-Kinase	413 (T ₂₆₇)	-
SCO2127		uncharakterisiertes Protein	191 (T ₇₉)	-
SCO2161		konserviertes hypothetisches	118 (T ₇)	-

5.Anhang

		Protein		
SCO2168	PspA	Phagenschockprotein A	259 (S ₁₉₂ , T ₂₁₀ , S ₂₄₇)	+ (T ₂₁₀)
SCO2198	GlnA	Glutaminesynthetase I	469 (Y ₃₉₇) wahrscheinlich Adenylierung	(+) (Y ₃₉₇)
SCO2210	GlnII	Glutaminsynthetase	343 (S ₂₅₇ , S ₂₇₅)	-
SCO2339		uncharakterisiertes Protein	160 (S ₈₄)	-
SCO2447		hypothetisches Protein	153 (S ₁₅₃)	-
SCO2519		putatives integrales Membranprotein	692 (T ₄₀₇ , Y ₄₁₂ , S ₄₁₅ , S ₄₂₁ , T ₄₂₃)	-
SCO2615	ValS	Valin-tRNA-Ligase	874 (S ₅₃₅)	-
SCO2620	Tig	Triggerfaktor der Zellteilung	468 (T ₄₀)	-
SCO2668		konserviertes hypothetisches Protein	452 (T ₃₉₀ , S ₄₀₂ , T ₄₀₈ , S ₄₄₄ , T ₄₄₅)	+ (T ₄₀₈ , T ₄₂₅)
SCO2736	CitA	Citratsynthase	429 (T ₂₃)	+
SCO2836		putative Glycosyltransferase	653 (S ₃₂)	-
SCO2883		putatives Cytochrom P450	410 (T ₂)	-
SCO2917		Nicotinatphosphoribosyl- transferase	448 (S ₄₄₈)	-
SCO2941		konserviertes hypothetisches Protein	773 (T ₃₈ , T ₁₅₇)	-
SCO2943		putative Zuckerhydrolase	545 (Y ₄₇₂)	-
SCO2950	Hup1	DNA-Bindeprotein HU1	93 (T ₄₄ , S ₇₇)	-
SCO2974	PkaA	Serin/Threonin Proteinkinase A	543 (T ₁₇₆ , T ₃₈₉)	-
SCO2975		hypothetisches Protein	1345 (S ₄₇₅ , T ₁₁₅₉)	+
SCO3002		uncharakterisiertes Protein	95 (Y ₄)	-
SCO3023	AhcY	Adenosylhomocysteinase	485 (T ₂₂₄)	-
SCO3037	FbiB	Coenzyme F420; L-	443 (S ₂₄₅)	-

5.Anhang

		glutamatlignase		
SCO3059	PurE	Phosphoribosylaminoimidazol-carboxylase katalytische Untereinheit PurE	180 (T ₁₅₉)	-
SCO3063		putativer Zweikomponentensystem Responsregulator	225 (T ₈₁)	-
SCO3096	Eno1	Enolase	426 (S ₄₂ , T ₄₃ , T ₁₀₀)	-
SCO3102	PkaE	Serin/Threonin Proteinkinase E	487 (T ₃₂₁)	-
SCO3103		putatives integrales Membranprotein	201 (Y ₁₈₃) wahrscheinlich Adenylierung	(+)
SCO3116		hypothetisches Protein	335 (S ₃₃₁)	-
SCO3218		putatives kleines konserviertes hypothetisches Protein	71 (S ₆₈)	-
SCO3289		putatives großes Membranprotein	536 (T ₂ , T ₃ , T ₄₂₀ , S ₄₂₁)	+ (T ₄₂₀)
SCO3290		Uncharakterisiertes Protein	249 (T ₂₁₀)	-
SCO3302		putatives integrales Membranprotein	433 (S ₃₄₂)	-
SCO3342		putatives glycinreiches, sekretiertes Protein	224 (T ₁₅₉)	-
SCO3343		hypothetisches Protein	124 (T ₃₃)	-
SCO3373		putative ATP-bindende Protease der Clp-Familie	841 (T ₁₅₂ , S ₄₀₄)	-
SCO3375		putative Lsr2-ähnliches Protein	111 (T ₃₀)	-
SCO3404	FtsH	ATP-abhängige Zink-Metalloprotease	668 (S ₆₀₀)	-
SCO3460		putative Oxidoreduktase	505 (T ₄₂₀ , T ₄₂₁)	-

5.Anhang

SCO3542	Tmk	Thymidylate kinase, integrales Membranprotein mit Kinaseaktivität	1089 (T₉₆₄ , S₁₀₄₀)	+ (T₉₆₄)
SCO3549	BldG	Anti-Sigmafaktor Antagonist	113 (T₁₁₂)	-
SCO3571		putativer transkriptioneller Regulator	224 (T₁₃₄)	-
SCO3659		hypothetisches Protein	178 (S₆ , S₇)	-
SCO3768		putative Translocase	82 (T₇₂)	-
SCO3822		uncharakterisiertes Protein	179 (T₃₉)	+
SCO3828		putatives Molybdopterin-Guanin-Dinucleotidbiosynthese-Protein	303 (S₂₈₂)	-
SCO3843		uncharakterisiertes Protein	290 (T₁₈)	-
SCO3848		Serin/Threonin Proteinkinase	673 (S₁₆₄ , T₁₇₉)	-
SCO3859		putatives DNA-Bindeprotein	182 (T₁₁₆ , S₁₁₇ , S₁₁₈ , S₁₁₉)	+ (T₁₁₆ , S₁₁₇ , S₁₁₉)
SCO3862		putatives Membranprotein	93 (S₈₈ , S₉₃)	+ (S₉₃)
SCO3878	DnaN	DNA-Polymerase-III-untereinheit beta	376 (T₁₄₈)	-
SCO3887	ParB	DNA-Aufteilungsprotein oder Sporulationsprotein	328 (S₃₂₈)	-
SCO3894		putatives Transmembranprotein	811 (S₆₀)	-
SCO4009		putative bifunktionelles Protein (Histidinkinase und Regulator)	1463 (S₁₀₇₃ , T₁₀₇₄ , T₁₀₈₃ , S₁₁₆₄ , T₁₁₇₆)	+ (T₁₀₈₃ , S₁₁₆₄ , T₁₁₇₆)
SCO4027		putativer Anti-Sigma-Faktor-Antagonist	126 (S₆₆)	-
SCO4087	PurM	Phosphoribosylformylglycinamidincyclo-Ligase	355 (T₄)	-
SCO4088		uncharakterisiertes Protein	84 (S₂₁)	-
SCO4118		putativer transkriptioneller	297 (T₁₇₆ , S₁₈₆)	-

5.Anhang

		Regulator der tetR-Familie		
SCO4134		putatives Lipoprotein	527 (T ₂₆₀ , S ₂₆₈)	-
SCO4140	PstA	ABC-Transportsystem Permease	354 (T ₅)	-
SCO4141	PstC	ABC-Transportsystem Permease	336 (T ₇)	-
SCO4142	PstS	phosphatbindendes Protein	370 (S ₃₇₀)	-
SCO4148		putatives ABC-Transporter- ATP-Bindeprotein	289 (T ₁₇)	-
SCO4157		putative Protease	347 (S ₁₉₅)	-
SCO4165		konserviertes hypothetisches Protein	95 (T ₃₃ , T ₅₄)	-
SCO4190		putativer transkriptioneller Regulator der GntR-Familie	291 (S ₇₄)	-
SCO4237		putatives integrales Membranprotein	571 (T ₁₄₄ , T ₁₄₆)	-
SCO4242		putative Membranprotein	468 (T ₈₄ , T ₁₆₇ , S ₁₆₉)	+ (T ₈₄)
SCO4252		hypothetisches Protein	149 (T ₅₅)	-
SCO4263		putatives transkriptionelles regulatorisches Protein	1251 (T ₁₀₈₇ , T ₁₀₈₉)	-
SCO4277		putatives Tellurium-Resistenz- Protein	191 (T ₇₂)	-
SCO4281		konserviertes hypothetisches Protein	553 (S ₅)	+
SCO4296	GroEL2	60 kDa Chaperonin 2	541(T ₄₇ , S ₅₄ , S ₃₃₆)	+ (T ₄₇)
SCO4328		putatives Lipoprotein	154 (T ₁₄₄)	-
SCO4330		uncharakterisiertes Protein	308 (S ₃₀₈)	+
SCO4423	AfsK	Serin/Threonin Protein Kinase AfsK	799 (S ₁₆₃)	-
SCO4439		Putative	832 (T ₂₄ , T ₇₄ , T ₂₈₉)	+ (T ₇₄ , T ₂₈₉)

5.Anhang

		D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase	T₉₁, T₂₈₉	
SCO4509		hypothetisches Protein	124 (T₃₂, T₇₁, T₈₆)	+ (T₈₆)
SCO4566	NuoE	NADH Dehydrogenase Untereinheit NuoE	290 (S₂₂₂)	-
SCO4614		konserviertes hypothetisches Protein	162 (S₆₇)	-
SCO4632		putatives ATP/GTP-bindendes Protein	966 (T₆₃₉)	-
SCO4654	RpoB	DNA-gerichtete RNA- Polymerase beta Kette	1161 (S₈)	-
SCO4655	RpoC	DNA-gerichtete RNA- Polymerase beta' Kette	1299 (S₁₂₂₇)	-
SCO4660	RspG	30S ribosomales Protein S7	156 (S₁₀₈)	-
SCO4661	EF-G1	Elongationsfaktor G 1	708 (T₃)	-
SCO4662	EF-Tu1	Elongationsfaktor Tu 1	397 (T₂₇, T₂₂₄)	-
SCO4675		uncharakterisiertes Protein	302 (S₂₂₆)	-
SCO4677		putatives regulatorisches Protein	144 (S₅, T₆, T₇, S₁₇)	-
SCO4701	RspJ	30S ribosomales Protein S10	102 (T₂₈)	-
SCO4703	RplD	50S ribosomales Protein L4	219 (S₂, T₁₆)	+ (T₁₆)
SCO4704	RplW	50S ribosomales Protein L23	139 (S₇₆)	-
SCO4705	RplB	50S ribosomales Protein L2	278 (S₁₅₈)	-
SCO4708	RpsC	30S ribosomales Protein S3	277 (S₁₀₇)	-
SCO4710	RpmC	50S ribosomales Protein L29	74 (T₇₄)	+
SCO4713	RplX	50S ribosomales Protein L24	107 (S₅₄)	-
SCO4761	GroES	10 kD Chaperon, Cpn10	102 (T₂₈)	-
SCO4895		putativer ECF Sigmafaktor	334 (T₇)	-
SCO4911		putatives bifunktionelles Protein	670 (T₃₀₀)	-
SCO4920		putativer transkriptioneller Regulator der deoR-Familie	317 (T₅₁)	-

5.Anhang

SCO4961		putativer transkriptioneller Regulator der marR-Familie	166 (S ₁₆₄)	-
SCO4965	GreA	Transkriptionselongationsfaktor GreA	165 (T ₂)	-
SCO4969		putatives regulatorisches Protein	1167 (S ₆₇₁ , T ₆₇₂)	-
SCO5058	IspH	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatereduktase	338 (S ₃₀₆)	+
SCO5078	ActVA3	hypothetisches Protein	281 (S ₂₇₈)	-
SCO5101		konserviertes hypothetisches Protein	63 (S ₄ , T ₃₉)	-
SCO5112	BldKA	ABC-Transportsystem, integrales Membranprotein	343 (S ₃)	+
SCO5113	BldKB	ABC-Transportsystem, Lipoprotein	600 (T ₅₆₉)	-
SCO5116	BldKE	Peptid-Transportsystem, ATP-bindende Untereinheit	381 (T ₇ , T ₂₃ , T ₃₇₇)	-
SCO5126	MshB	1D-Myo-Inositol 2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranosidedeacetylase	295 (T ₂₉₀)	-
SCO5128		putatives Membranprotein	775 (S ₂₂ , T ₂₄ , S ₁₄₇)	+ (S ₂₂)
SCO5135	FdxA1	Ferredoxin	106 (S ₈₆)	-
SCO5204		putatives integrales Membranprotein	1000 (T ₄₂₀)	-
SCO5244	PrsH	putativer Sigmafaktor SigH Anti-Sigmafaktor	137 (S ₂)	-
SCO5282		putative Zweikomponentensystem-Sensorkinase	375 (S ₃₇₄)	-
SCO5356	ThrB	Homoserinkinase	309 (T ₃₀₉)	-
SCO5357	Rho	Transcriptionsterminations-	694 (S ₁₆₆)	+

5.Anhang

		faktor Rho		
SCO5370	AtpH	ATP-Synthase delta-Kette	274 (S ₁₆₄)	-
SCO5373	AtpD	ATP-Synthase β-Kette	478 (T ₂ , T ₃ , T ₄)	-
SCO5389		hypothetisches Protein	130 (T ₁₀₉)	+
SCO5396		putative Cellulose-Bindeprotein	310 (T ₄ , S ₁₀₅ , T ₂₇₅ , S ₂₉₉)	+ (T ₄ , S ₂₉₉)
SCO5419	TrxA4	putatives Thioredoxin	318 (T ₂₁₆)	+
SCO5464		etwaiges Calcium-bindendes Protein	70 (T ₁₆)	+
SCO5480		Oligopeptid-ABC-Transporter ATP-bindendes Protein	496 (T ₂₈)	-
SCO5535		putative Carboxyltransferase	527 (T ₁₂)	+
SCO5544		putatives Membranprotein	1329 (S ₉₃₈ , T ₁₁₉₁)	-
SCO5562		putative Thiaminmonphosphatkinase	527 (S ₃₂₂)	+
SCO5574		konserviertes hypothetisches Protein	141 (T ₁₅)	-
SCO5584	P-II	Stickstoff-regulierendes Protein P-II	112 (Y ₅₁) wahrscheinlich Adenylierung	(+)
SCO5589		hypothetisches Protein	295 (S ₁₀₆ , T ₁₀₇)	-
SCO5590		hypothetisches Protein	198 (S ₁₉₈)	-
SCO5608		uncharakterisiertes Protein	266 (T ₁₇)	+
SCO5627	RRF	Ribosomrecyclingfaktor	185 (S ₉₂)	-
SCO5660		Putative D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase	386 (S ₉₉ , T ₁₀₁)	-
SCO5703	RimP	Ribosomenreifungsfaktor RimP	177 (T ₄₆)	-
SCO5717		konserviertes hypothetisches Protein	1083 (S ₁₆₆ , T ₂₇₇)	+ (T ₂₇₇)
SCO5736	RpsO	30S ribosomales Protein S15	95 (T ₁₇)	-

5.Anhang

SCO5862	CutR	Zweikomponentensystem-Regulator	217 (T ₁₁₉)	-
SCO5864		konserviertes hypothetisches Protein	98 (T ₁₁ , S ₁₇)	+
SCO5967	SepF3	Funktion überschneidet sich mit FtsA (Septumbildung)	136 (S ₃₄)	-
SCO6006		wahrscheinliches Transmembrantransportprotein	353 (T ₇)	-
SCO6061		putative Oxidoreduktase	135 (T ₇₇)	-
SCO6551		putative Oxidoreduktase	277 (S ₂₇₇)	-
SCO6618		uncharakterisiertes Protein	226 (T ₁₁₄)	-
SCO6626		putative Proteinkinase	1557 (S ₁₃₂₇ , S ₁₃₂₈)	+ (S ₁₃₂₈)
SCO6682	SapB	Lanthionin enthaltendes Peptid SapB	42 (T ₂₂ , S ₂₄)	+ (S ₂₄)
SCO6879		hypothetisches Protein	153 (T ₁₃₉ , T ₁₄₀)	-
SCO7154	IlvC2	Ketol-Säure Reduktoisomerase	332 (T ₂₈₆)	-
SCO7173		putativer transkriptioneller Regulator	908 (S ₉₀₆)	-
SCO7243		putatives sekretiertes Protein	597 (S ₅ , S ₆ , T ₁₂ , S ₁₆)	-
SCO7324		putatives regulatorisches Protein	299 (S ₁₉₀ , S ₂₂₄)	+ (S ₁₉₀)
SCO7345		wahrscheinliche ATP-abhängige DNA-Ligase	326 (T ₁₀₄)	-
SCO7404		konserviertes hypothetisches Protein	263 (T ₂)	-
SCO7417		putatives Cytochrom P450-Familie Protein	407 (S ₂₃)	-
SCO7443	Pgm	Phosphoglucomutase	546 (S ₁₄₆)	-

5.Anhang

SCO7548		uncharakterisiertes Protein	314 (T)	-
SCO7559		putative sekretierte Zuckerhydrolase	398 (T ₂₅₄ , T ₂₆₀)	-

5.4 Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse von Pkai, MreC und PBP2

5.4.1 Pkai

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Intensity R11GluC	Intensity R11trypsin	Ratio (Intensities)
AARIGVALLD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	165170000	165170000	0	
AARIGVALLDALD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	13632000	13632000	0	
AARIGVALLDALDTAHASGILHRD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11109000	11109000	0	
AASAQRMLRAFLSTGRTPATPEE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	15243000	15243000	0	
AFLSTGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	27671000000	0	27671000000	16,26
AFLSTGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1702100000	0	1702100000	
AFLSTGRTPATPEEATAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	155240000	0	155240000	
AFLSTGRTPATPEEATAARPLR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	70317000	0	70317000	
AFLSTGRTPATPEEATAARPLR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	174220000	0	174220000	
ALDTAHASGILHRD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	6544200	6544200	0	
ALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	54094000000	0	54094000000	6,57
ALPLDELSAAEAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	8234900000	0	8234900000	
ALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11307000	0	11307000	0,06
ALPLDELSAAEAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	178880000	0	178880000	
ARAVQLRHPHVIVVHVDVVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	16218000	16218000	0	
ARAVQLRHPHVIVVHVDVVED	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	894950	894950	0	
ATDQLLAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	29324000000	0	29324000000	35,47
ATDQLLAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	826800000	0	826800000	
AYMVMELVDGGSLADR	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	29425000000	0	29425000000	114,87
AYMVMELVDGGSLADR	2 Oxidation (M),Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	256170000	0	256170000	
AYMVMELVDGGSLADR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	4552100000	0	4552100000	
AYMVMELVDGGSLADR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	760730000	0	760730000	
DDGRAYMVMME	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	29798000	29798000	0	
DGRAYMVMME	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	5523000	5523000	0	
DSLGGVLHAVVTEIR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	9833100	0	9833100	
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	25496000000	0	25496000000	1,57
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	16274000000	0	16274000000	
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	352820000	0	352820000	
DVKPSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	36202000000	0	36202000000	2021,33
DVKPSNVLVADDGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	17910000	0	17910000	
EIRPPAQAGPLPVVRGLLE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4965400	4965400	0	
EVAVKALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	328210000	0	328210000	
FGVAQVAGATTLTE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	6939000	6939000	0	
FGVAQVAGATTLTE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	0	0	0	0,00
GAGGRVIAGRYRLHE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1137300000	1137300000	0	
GGMGIVWR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	15893000000	0	15893000000	
GGMGIVWR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4895000000	0	4895000000	
GGSLADRVLTRGPVDAVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	69179000	69179000	0	
GLLERDPR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11262000000	0	11262000000	
GPVDAVEAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	44622000000	0	44622000000	
HPHVIVVHVDVVEDDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11160000000	0	11160000000	
HPHVIVVHVDVVEDDGRAYMVMELVDGGSLADR	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	23361000	0	23361000	
IGVALLDALDTAHASGILHR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	35064000000	0	35064000000	17,82
IGVALLDALDTAHASGILHR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1967500000	0	1967500000	
IGVALLDALDTAHASGILHR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	116010000	0	116010000	
IGVALLDALDTAHASGILHRDVKPSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	110000000	0	110000000	
IRPPAQAGPLPVVRGLLE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	192030000	192030000	0	
LDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	729650000	0	729650000	20,11
LDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	36283000	0	36283000	
LMGRMVTE	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	11580000	11580000	0	
LVDDGGSLADRVLTRGPVD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	36758000	36758000	0	
MVTEGAGGR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	600020000	0	600020000	10,19
MVTEGAGGR	Oxidation (M),Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	58879000	0	58879000	
MVTEGAGGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	143220000	0	143220000	
PSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1269200000	0	1269200000	
RLDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	3671900000	0	3671900000	44,19
RLDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	83097000	0	83097000	
RLGRGGMGIVWRATDQLLARE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	208770000	208770000	0	34,13
RLGRGGMGIVWRATDQLLARE	Oxidation (M),Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	6117700	6117700	0	
RRDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	154620000	0	154620000	34,34
RRDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	4502900	0	4502900	
RVLTRGPVDAVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	26295000	26295000	0	
SGSFVGSPE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	18640000	18640000	0	
SGSFVGSPEYTAPE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	2311200	2311200	0	
SLGGVLHAVVTE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1558100	1558100	0	
SLGGVLHAVVTEE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	6419300	6419300	0	5,91
SLGGVLHAVVTEE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1086400	1086400	0	
TPATPEEATAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	27014000000	0	27014000000	13,01
TPATPEEATAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2077100000	0	2077100000	
TPATPEEATAAR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	33019000	0	33019000	
TPATPEEATAARPLR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	22972000000	0	22972000000	1,21
TPATPEEATAARPLR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	19038000000	0	19038000000	

5. Anhang

Sequence	Modification	Protein	Intensity	Intensity R11Gluc	Intensity R11trypsin	Ratio (Intensities)
TPATPEEATAARPLR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	756950000	0	756950000	
VAVKALPLD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	42253000	42253000	0	
VAVKALPLDE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	901530000	901530000	0	
VAVKALPLDELSAAE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	295230000	295230000	0	0,43
VAVKALPLDELSAAE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	686070000	686070000	0	
VKPSNVLVADD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	3274100	3274100	0	
VKPSNVLVADDGRVVLTD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4125800	4125800	0	
VLTRGPVDAVEAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	82476000	0	82476000	0,02
VLTRGPVDAVEAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	4304900000	0	4304900000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGFSVGSPEYTAPER	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	2894800000	0	2894800000	1,38
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGFSVGSPEYTAPER	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2099500000	0	2099500000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGFSVGSPEYTAPER	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2055100000	0	2055100000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGFSVGSPEYTAPER	3 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	226690000	0	226690000	
YTAPERMSGAGTGE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	99427000	99427000	0	
YTAPERMSGAGTGPESD	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	68865000	68865000	0	

5.4.2 MreC

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Intensity R11Gluc	Intensity R11trypsin	Ratio (Intensities)
AKLGSDER	Unmodified	seq1_mrec	10968000	0	10968000	19,68
AKLGSDER	Phospho (STY)	seq1_mrec	557210	0	557210	
DMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M)	seq1_mrec	19382000000	0	19382000000	4,91
DMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq1_mrec	3943800000	0	3943800000	
DMTVLNGDGLVGR	Unmodified	seq1_mrec	719050000	0	719050000	0,45
DMTVLNGDGLVGR	Phospho (STY)	seq1_mrec	1594400000	0	1594400000	
DMTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGR	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq1_mrec	2611100	0	2611100	
DPRDVLPEK	Phospho (STY)	seq1_mrec	238150000	0	238150000	
DPRDVLPEKK	Unmodified	seq1_mrec	33250000	0	33250000	0,08
DPRDVLPEKK	Phospho (STY)	seq1_mrec	159720000	0	159720000	
DSGDRHDLAR	Unmodified	seq1_mrec	675710	0	675710	
DSPVDGARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	18344000	18344000	0	
DTVLPK	Unmodified	seq1_mrec	33695000000	0	33695000000	10,92
DTVLPK	Phospho (STY)	seq1_mrec	750690000	0	750690000	
DTVLPK	Unmodified	seq1_mrec	11057000000	0	11057000000	
DTVLPK	Phospho (STY)	seq1_mrec	3347000000	0	3347000000	
ELGFASGQGSRLRVE	Unmodified	seq1_mrec	8949000	8949000	0	8,03
ELGFASGQGSRLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1114800	0	1114800	
FTVGRME	Oxidation (M)	seq1_mrec	26250000	26250000	0	
FTVGRMESGDE	Oxidation (M)	seq1_mrec	28164000	28164000	0	
GARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	21439000	21439000	0	
GARQAAANVFGPIENGVSVAVDVGNVAVSAVRD	Unmodified	seq1_mrec	2801300	2801300	0	
GDRLVTFGSQADKPFVPGVPGVTIR	Unmodified	seq1_mrec	70251000	0	70251000	
GGEDSPVDGAR	Unmodified	seq1_mrec	53541000000	0	53541000000	1306,42
GGEDSPVDGAR	Phospho (STY)	seq1_mrec	40983000	0	40983000	
GLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGRME	Oxidation (M)	seq1_mrec	6628700	6628700	0	
ILDVTPFVSFTK	Unmodified	seq1_mrec	50582000000	0	50582000000	3,19
ILDVTPFVSFTK	Phospho (STY)	seq1_mrec	15853000000	0	15853000000	
ILDVTPFVSFTK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	742070000	0	742070000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSK	Unmodified	seq1_mrec	1257300000	0	1257300000	3,70
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSK	Phospho (STY)	seq1_mrec	339480000	0	339480000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	156480000	0	156480000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPR	Unmodified	seq1_mrec	3093100000	0	3093100000	0,54
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPR	Phospho (STY)	seq1_mrec	5767800000	0	5767800000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	1928300000	0	1928300000	
IVGVVVQAPSKDPRD	Unmodified	seq1_mrec	6076700	6076700	0	50,79
IVGVVVQAPSKDPRDVLPE	Unmodified	seq1_mrec	789080000	789080000	0	
IVGVVVQAPSKDPRDVLPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	14529000	14529000	0	
IVGVVVQAPSKDPRDVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5414600	5414600	0	
IVGVVVQAPSKDPRDVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1125500	1125500	0	
IVGVVVQAPSKDPRDVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	726790	726790	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	Unmodified	seq1_mrec	388010000	388010000	0	3,20
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	121220000	121220000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	72867000	72867000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	4191600	4191600	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	Unmodified	seq1_mrec	62066000	62066000	0	1,08
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	Phospho (STY)	seq1_mrec	57682000	57682000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	210650000	210650000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	8314100	8314100	0	
KPFVGPVGTITRVDPNGLDRLID	Unmodified	seq1_mrec	7952200	7952200	0	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	4362400000	0	4362400000	1,02
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	4260100000	0	4260100000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	11140000000	0	11140000000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	1390100000	0	1390100000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	10675000	0	10675000	
LARLETENAALK	Unmodified	seq1_mrec	7962700	0	7962700	
LDIVGVVVQAPSK	Unmodified	seq1_mrec	21186000000	0	21186000000	4293,35
LDIVGVVVQAPSKDPR	Unmodified	seq1_mrec	28209000000	0	28209000000	
LDIVGVVVQAPSKDPR	Phospho (STY)	seq1_mrec	11505000	0	11505000	
LDIVGVVVQAPSKDPRDVLPEK	Unmodified	seq1_mrec	294700000	0	294700000	0,35
LDIVGVVVQAPSKDPRDVLPEK	Phospho (STY)	seq1_mrec	852480000	0	852480000	
LETENAALK	Unmodified	seq1_mrec	65067000000	0	65067000000	5,07
LETENAALK	Phospho (STY)	seq1_mrec	12897000000	0	12897000000	
LETENAALKK	Unmodified	seq1_mrec	363550000	0	363550000	
LGAFASGQGSRLRVE	Unmodified	seq1_mrec	1751800000	1751800000	0	1,56
LGAFASGQGSRLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1121200000	1121200000	0	
LGAFASGQGSRLRVE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	107980000	107980000	0	
LKQFDKMLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	6457500	0	6457500	
LLNGKAD	Unmodified	seq1_mrec	2603800	2603800	0	

5. Anhang

LLNGKADVKKGD	Unmodified	seq1_mrec	103070000	103070000	0	
LLNGKADVKKGDRLVTFGSQAD	Unmodified	seq1_mrec	123360000	123360000	0	
LVTFGSQADK	Unmodified	seq1_mrec	2326900000	0	2326900000	12,81
LVTFGSQADK	Phospho (STY)	seq1_mrec	181650000	0	181650000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITR	Unmodified	seq1_mrec	71456000000	0	71456000000	2,25
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITR	Phospho (STY)	seq1_mrec	31798000000	0	31798000000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5112400000	0	5112400000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	454840000	0	454840000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	Unmodified	seq1_mrec	21528000	0	21528000	0,01
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	3204400000	0	3204400000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	1086500000	0	1086500000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	1322700000	0	1322700000	
LVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	69356000	0	69356000	
MESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M)	seq1_mrec	44467000000	0	44467000000	84,38
MESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	526990000	0	526990000	
MESGDELGFASGQGSR	Unmodified	seq1_mrec	16263000000	0	16263000000	105,04
MESGDELGFASGQGSR	Phospho (STY)	seq1_mrec	154830000	0	154830000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M)	seq1_mrec	24130000000	0	24130000000	3,66
MESGDELGFASGQGSRPLR	Unmodified	seq1_mrec	6025600000	0	6025600000	8,19
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	6596100000	0	6596100000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Phospho (STY)	seq1_mrec	735290000	0	735290000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	457320000	0	457320000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	35161000	0	35161000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M)	seq1_mrec	250750000	0	250750000	0,91
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	274800000	0	274800000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	30686000	0	30686000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	13991000	0	13991000	
MLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	55779000000	0	55779000000	
MLGLAGAGQYGIK	Unmodified	seq1_mrec	17507000000	0	17507000000	
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGTTRME	2 Oxidation (M)	seq1_mrec	30445000	30445000	0	6,32
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGTTRME	2 Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	4821000	4821000	0	
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGTTRME	2 Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	429320	429320	0	
NAALKAKLGSDE	Unmodified	seq1_mrec	218990000	218990000	0	309,47
NAALKAKLGSDE	Unmodified	seq1_mrec	3830700000	3830700000	0	
NAALKAKLGSDE	Phospho (STY)	seq1_mrec	13086000	13086000	0	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGK	Unmodified	seq1_mrec	4898100000	0	4898100000	18,07
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGK	Phospho (STY)	seq1_mrec	270990000	0	270990000	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	Unmodified	seq1_mrec	709400000	0	709400000	1,87
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	Phospho (STY)	seq1_mrec	378940000	0	378940000	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	42083000	0	42083000	
NGVSSAVDPVGNVSAVRD	Unmodified	seq1_mrec	126570000	126570000	0	25,07
NGVSSAVDPVGNVSAVRD	Phospho (STY)	seq1_mrec	5048900	5048900	0	
PFVPGVPVGTITR	Unmodified	seq1_mrec	72912000	0	72912000	3,08
PFVPGVPVGTITR	Phospho (STY)	seq1_mrec	23690000	0	23690000	
PFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	7635600	0	7635600	
PFVPGVPVGTITRVPNGGDLTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	33492000	0	33492000	
PLRVELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	444920000	0	444920000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	5326100000	0	5326100000	1,87
PTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	2842000000	0	2842000000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	2723700000	0	2723700000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	9928400	0	9928400	
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVR	Unmodified	seq1_mrec	20915000000	0	20915000000	3,39
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVR	Phospho (STY)	seq1_mrec	6176200000	0	6176200000	
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	58897000	0	58897000	
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRSDSGDR	Unmodified	seq1_mrec	253810000	0	253810000	22,67
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRSDSGDR	Phospho (STY)	seq1_mrec	11198000	0	11198000	
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRSDSGDRHDR	Unmodified	seq1_mrec	314130000	0	314130000	1,46
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRSDSGDRHDR	Phospho (STY)	seq1_mrec	214900000	0	214900000	
QAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRSDSGDRHDR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	80065000	0	80065000	
QFKMMLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	248170000	0	248170000	
QHMDSTSAA	Oxidation (M)	seq1_mrec	14471000	0	14471000	
QHMDSTSAA	Unmodified	seq1_mrec	32169000	0	32169000	13,99
QHMDSTSAA	Phospho (STY)	seq1_mrec	2299400	0	2299400	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	13231000000	0	13231000000	1,46
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	21255000000	0	21255000000	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	9082900000	0	9082900000	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	1163500000	0	1163500000	
QQNEQPEPGLTE	Unmodified	seq1_mrec	75252000	75252000	0	60,54
QQNEQPEPGLTE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1243100	1243100	0	
QTEQQNEQPEPGLTE	Unmodified	seq1_mrec	5030400	5030400	0	
RDMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M)	seq1_mrec	2369000000	0	2369000000	0,89
RDMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	2670600000	0	2670600000	
RDMTVLNGDGLVGR	Unmodified	seq1_mrec	449080000	0	449080000	12,93
RDMTVLNGDGLVGR	Phospho (STY)	seq1_mrec	34726000	0	34726000	
RGRSRLKQFD	Unmodified	seq1_mrec	1886300	1886300	0	
RHDRLARLE	Unmodified	seq1_mrec	26928000	26928000	0	
RHDRLARLETE	Unmodified	seq1_mrec	1679400	1679400	0	
RLARLETE	Unmodified	seq1_mrec	8961500	8961500	0	
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTRILD	Unmodified	seq1_mrec	2321000	2321000	0	0,17
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTRILD	Phospho (STY)	seq1_mrec	13285000	13285000	0	
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRVPNGGDLTRILD	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	3203500	3203500	0	
RQHMDSTSAA	Oxidation (M)	seq1_mrec	3175500	3175500	0	
RQHMDSTSAA	Unmodified	seq1_mrec	577200	577200	0	
SGDELGFASGQGSRPLRVE	Unmodified	seq1_mrec	205980000	205980000	0	3,39
SGDELGFASGQGSRPLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	60814000	60814000	0	
SGDELGFASGQGSRPLRVE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	3884000	3884000	0	
SGDRHDLARLE	Unmodified	seq1_mrec	677240000	677240000	0	
SGKETAATAKFE	Unmodified	seq1_mrec	14776000	14776000	0	0,02
SGKETAATAKFE	Phospho (STY)	seq1_mrec	816820000	816820000	0	
SPVDGARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	21711000	21711000	0	
SPVDGARQAAANVFGPIENGVSASVDPVGNVSAVRD	Unmodified	seq1_mrec	12192000	12192000	0	
SRLKQFDK	Unmodified	seq1_mrec	28911000	0	28911000	
TAAAKFE	Unmodified	seq1_mrec	415980000	415980000	0	
TAAAKFERQHMDSTSAA	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	13706000	13706000	0	
TENAALKKLGSD	Unmodified	seq1_mrec	136560000	136560000	0	60,41
TENAALKKLGSD	Phospho (STY)	seq1_mrec	2260500	2260500	0	

5. Anhang

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Ratio (Intensities)
VDPNGDLTR	Unmodified	seq1_mrec	2954400000	0
VDPNGDLTRILDVTPFVSFTK	Phospho (STY)	seq1_mrec	1933700000	0
VDPNGDLTRILDVTPFVSFTK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	2109800000	0
VELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	3122200000	0
VELLNGKADVK	Unmodified	seq1_mrec	48678000	0
VELLNGKADVKK	Unmodified	seq1_mrec	0	0
VTPFVSFTKLD	Unmodified	seq1_mrec	1062300000	1062300000
VTPFVSFTKLD	Phospho (STY)	seq1_mrec	1100700	1100700
VTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPRD	Unmodified	seq1_mrec	13583000	13583000
VTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPRDVLPE	Unmodified	seq1_mrec	329830000	329830000
VTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPRDVLPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	77512000	77512000
VTPFVSFTKLDIVGVVVQAPSKDPRDVLPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	20355000	20355000
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGR	Unmodified	seq1_mrec	2578200000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGR	Phospho (STY)	seq1_mrec	1121000000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5787700000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	806560000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	156810000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	282050000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),3 Phospho (STY)	seq1_mrec	276480000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),4 Phospho (STY)	seq1_mrec	84469000	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSR	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	707450	0
VTTVGPNTATVLLANDPDTVGTGRMESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	10074000	0

5.4.3 PBP2

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Ratio (Intensities)
AAHQFGLGAK	Unmodified	seq_pbp2	306990000	
AAHQFGLGAKTGIDLPNEVTGR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	6827800	
AAHQFGLGAKTGIDLPNEVTGRVPRD	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	11725000	
AEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M)	seq_pbp2	1451600000	36,82
AEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_pbp2	39425000	
AEDFPGITAEPMAVR	Unmodified	seq_pbp2	526730000	39,60
AEDFPGITAEPMAVR	Phospho (STY)	seq_pbp2	13302000	
AGVTRYEVNGLGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	221890000	
ALELSCDVFYR	Unmodified	seq_pbp2	1244000000	1,24
ALELSCDVFYR	Phospho (STY)	seq_pbp2	994950000	
ALELSCDVFYR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	8879800	
ALLPKPQASLPK	Unmodified	seq_pbp2	37163000	10,58
ALLPKPQASLPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	3511400	
AQDQDTPYLRL	Phospho (STY)	seq_pbp2	6292100	
AQDQDTPYLRL	Unmodified	seq_pbp2	1905900000	302,90
AQDQDTPYLRLSDQVGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	2158800	
ASPDEEYAPVEEGDQPATTPNQNGENR	Unmodified	seq_pbp2	179080000	
ATQGQAA PGSIFK	Unmodified	seq_pbp2	3274700000	60,62
ATQGQAA PGSIFK	Phospho (STY)	seq_pbp2	532190000	
ATQGQAA PGSIFK	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	802850	
AVLTKLAGVLGMPQDVIDK	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_pbp2	2068600	
AVVSPDK	Unmodified	seq_pbp2	25462000	
AVVSPDGKTVR	Unmodified	seq_pbp2	770400	0,01
AVVSPDGKTVR	Phospho (STY)	seq_pbp2	97132000	
DGSYVEK	Unmodified	seq_pbp2	4884800	
DSNYPLLNR	Unmodified	seq_pbp2	795410000	
DYSIVMTISGGTGS GASGPAVR	Oxidation (M)	seq_pbp2	182330000	114,50
DYSIVMTISGGTGS GASGPAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_pbp2	1592400	
DYSIVMTISGGTGS GASGPAVR	Unmodified	seq_pbp2	72890000	
EIEPTAHGK	Unmodified	seq_pbp2	29328000	3,32
EIEPTAHGK	Phospho (STY)	seq_pbp2	8838600	
EIEPTAHGKLPISK	Phospho (STY)	seq_pbp2	1285800	
EIEPTAHGKLPISKTLTK	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	8255100	
ERAEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M)	seq_pbp2	2686800000	27,53
ERAEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_pbp2	97604000	
ERAEDFPGITAEPMAVR	Unmodified	seq_pbp2	1087500000	30,35
ERAEDFPGITAEPMAVR	Phospho (STY)	seq_pbp2	35836000	
ETAAAKFER	Unmodified	seq_pbp2	10881000	
FAQVGWVPQDK	Unmodified	seq_pbp2	1621300000	
FAQVGWVPQDKIPMHAK	Oxidation (M)	seq_pbp2	2550200	
GKAGVTR	Unmodified	seq_pbp2	594540	
GSILDAR	Unmodified	seq_pbp2	1481300000	163,45
GSILDAR	Phospho (STY)	seq_pbp2	9062800	
GVALADNETR	Unmodified	seq_pbp2	985760	0,00
GVALADNETR	Phospho (STY)	seq_pbp2	210420000	
GVALADNETRLVV SASR	Phospho (STY)	seq_pbp2	1088800000	
GVALADNETRLVV SASRTDLLK	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	20748000	
IAYENCHS GNK	Unmodified	seq_pbp2	24594000	
IKTDGTLSPK	Unmodified	seq_pbp2	123190000	0,60
IKTDGTLSPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	203770000	
IPMHAKTGAEVYVK	Unmodified	seq_pbp2	1495500	
KALLPKPQASLPK	Unmodified	seq_pbp2	4810300	
KDGSYVEK	Unmodified	seq_pbp2	1733300	
LAGVLGMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	10685000	
LAGVLGMK	Unmodified	seq_pbp2	12736000	
LAGVLGMKPQDVIDK	Oxidation (M)	seq_pbp2	430410000	
LAGVLGMKPQDVIDK	Unmodified	seq_pbp2	140660000	
LAGVLGMKPQDVIDKVR	Oxidation (M)	seq_pbp2	1073600	
LCD AETPQ CWNGSPYQPIPVTD EATVK	Phospho (STY)	seq_pbp2	16980000	
LPISKTTLTK	Phospho (STY)	seq_pbp2	184420000	
LPISKTTLTKMDEALAGVASR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	1132500	
LSHQEWK	Unmodified	seq_pbp2	103400000	
LTGKDSNYPLLNR	Unmodified	seq_pbp2	5502200	

5. Anhang

LVVSASR	Unmodified	seq_pbp2	51755000	48,98
LVVSASR	Phospho (STY)	seq_pbp2	10566000	
LVVSASRTDLK	Unmodified	seq_pbp2	2298800	0,10
LVVSASRTDLK	Phospho (STY)	seq_pbp2	22160000	
LWYLIQR	Unmodified	seq_pbp2	67402000	
MDEALAGVASR	Unmodified	seq_pbp2	124470000	
MDEALAGVASR	Oxidation (M)	seq_pbp2	2240100000	
MDEALAGVASRGTAAWR	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq_pbp2	3705100	
MDEALAGVASRGTAAWR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	2093200	
MPKDVVK	Oxidation (M)	seq_pbp2	864340	
MTNIPETGR	Oxidation (M)	seq_pbp2	443020000	641,74
MTNIPETGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	690340	
MTNIPETGR	Unmodified	seq_pbp2	167980000	
MTNIPETGR	Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M)	seq_pbp2	14148000	
NFESANEGMITIGR	Oxidation (M)	seq_pbp2	677880000	51,18
NFESANEGMITIGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	13244000	
NFESANEGMITIGR	Unmodified	seq_pbp2	471910000	70,75
NFESANEGMITIGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	6669900	
NIYDALYGVSDGDIDPK	Unmodified	seq_pbp2	1477000000	1163,27
NIYDALYGVSDGDIDPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	1269700	
NIYDALYGVSDGDIDPKK	Unmodified	seq_pbp2	340940000	
NPHDYFYK	Unmodified	seq_pbp2	344160000	
NTNRITYEADAGAVVVMEAK	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	1601100	
PQASLPK	Unmodified	seq_pbp2	10984000	
PQDVIDK	Unmodified	seq_pbp2	1520400	
QDYWEANK	Unmodified	seq_pbp2	483040000	
QDYWEANKDAWCK	Unmodified	seq_pbp2	64655000	
QGDEYAEASGNHVQQVVQPATR	Unmodified	seq_pbp2	190490000	64,92
QGDEYAEASGNHVQQVVQPATR	Phospho (STY)	seq_pbp2	29344000	
QLQPDEK	Unmodified	seq_pbp2	14328000	
QTTSWFATYTK	Unmodified	seq_pbp2	334010000	15,83
QTTSWFATYTK	Phospho (STY)	seq_pbp2	21094000	
RYAAPGK	Unmodified	seq_pbp2	12991000	
SDQVGRGLER	Unmodified	seq_pbp2	1798400	0,03
SDQVGRGLER	Phospho (STY)	seq_pbp2	62104000	
SNTAQLVGLSPVTDEELQK	Unmodified	seq_pbp2	223370000	7,59
SNTAQLVGLSPVTDEELQK	Phospho (STY)	seq_pbp2	29417000	
TDGTLSPK	Unmodified	seq_pbp2	511600000	1,56
TDGTLSPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	328440000	
TDLKMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	9586700	
TDLKMK	Unmodified	seq_pbp2	4522300	
TGIDLPNEVTGR	Unmodified	seq_pbp2	2378800000	10,93
TGIDLPNEVTGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	207570000	
TGIDLPNEVTGR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	10104000	
TGIDLPNEVTGRVPDR	Unmodified	seq_pbp2	3463300	0,01
TGIDLPNEVTGRVPDR	Phospho (STY)	seq_pbp2	252980000	
TGIDLPNEVTGRVPDR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	30450000	
TGTAEVYGK	Unmodified	seq_pbp2	43489000	14,96
TGTAEVYGK	Phospho (STY)	seq_pbp2	2906700	
TNIPETGR	Unmodified	seq_pbp2	148040000	
TNIPETGR	Acetyl (Protein N-term)	seq_pbp2	98894000	
TNIPETGRSTR	Phospho (STY)	seq_pbp2	939510	
TNIPETGRSTR	Acetyl (Protein N-term)	seq_pbp2	894260	0,95
TTLTKMDEALAGVASR	Phospho (STY)	seq_pbp2	1600200	
TYEADAGAVVVMEAK	Oxidation (M)	seq_pbp2	236890000	
TYEADAGAVVVMEAK	Unmodified	seq_pbp2	4157400	
VAEYELNEAMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	10489000	
VAEYELNEAMK	Unmodified	seq_pbp2	1392200000	
VIGEAESDPGTPGSNLVTSIDAR	Unmodified	seq_pbp2	3949900000	10,22
VIGEAESDPGTPGSNLVTSIDAR	Phospho (STY)	seq_pbp2	379830000	
VIGEAESDPGTPGSNLVTSIDAR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	6663600	
VLESGKETAAAK	Unmodified	seq_pbp2	9715100	21,23
VLESGKETAAAK	Phospho (STY)	seq_pbp2	457590	
VVAMASNPDYDPNAWVGGISAK	Oxidation (M)	seq_pbp2	819910000	66,72
VVAMASNPDYDPNAWVGGISAK	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	12289000	
VVAMASNPDYDPNAWVGGISAK	Unmodified	seq_pbp2	836490000	368,73
VVAMASNPDYDPNAWVGGISAK	Phospho (STY)	seq_pbp2	2268600	
YAAPGKSNTAQVLGYSPTDEELQK	Unmodified	seq_pbp2	1474600	
YEVNLIQR	Unmodified	seq_pbp2	319780000	

5.5 Publikation

Das Bacterial Two Hybrid Experiment wurde von Felix Hezel durchgeführt und ausgewertet. Die massenspektrometrischen Messungen wurden von Mirita Franz-Wachtel, Boumediene Soufi und Boris Macek durchgeführt und durch mich ausgewertet. Alle übrigen Experimente wurden von mir durchgeführt und ausgewertet.

Die Publikation wurde von Günther Muth geschrieben und von mir korrigiert und diskutiert.

RESEARCH ARTICLE

Control of Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phosphorylation of MreC and PBP2

Nils Ladwig¹, Mirita Franz-Wachtel², Felix Hezel¹, Boumediene Soufi², Boris Macek², Wolfgang Wohlleben¹, Günther Muth^{1*}

1 Interfakultaeres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tuebingen IMIT, Mikrobiologie/ Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tuebingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tuebingen, Germany, **2** Proteome Center Tuebingen, Interfakultaeres Institut für Zellbiologie, Eberhard Karls Universität Tuebingen, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Germany

* gmuth@biotech.uni-tuebingen.de


 OPEN ACCESS

Citation: Ladwig N, Franz-Wachtel M, Hezel F, Soufi B, Macek B, Wohlleben W, et al. (2015) Control of Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phosphorylation of MreC and PBP2. PLoS ONE 10(4): e0125425. doi:10.1371/journal.pone.0125425

Academic Editor: Dirk-Jan Scheffers, University of Groningen, Groningen Institute for Biomolecular Sciences and Biotechnology, NETHERLANDS

Received: February 6, 2015

Accepted: March 23, 2015

Published: April 30, 2015

Copyright: © 2015 Ladwig et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), SFB-766.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

During morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2), the sporogenic aerial hyphae are transformed into a chain of more than fifty spores in a highly coordinated manner. Synthesis of the thickened spore envelope is directed by the *Streptomyces* spore wall synthesizing complex SSSC which resembles the elongasome of rod-shaped bacteria. The SSSC includes the eukaryotic type serine/threonine protein kinase (eSTPK) PkaI, encoded within a cluster of five independently transcribed eSTPK genes (*SCO4775-4779*). To understand the role of PkaI in spore wall synthesis, we screened a *S. coelicolor* genomic library for PkaI interaction partners by bacterial two-hybrid analyses and identified several proteins with a documented role in sporulation. We inactivated *pkal* and deleted the complete *SCO4775-4779* cluster. Deletion of *pkal* alone delayed sporulation and produced some aberrant spores. The five-fold mutant *NLD4775-4779* had a more severe defect and produced 18% aberrant spores affected in the integrity of the spore envelope. Moreover, overbalancing phosphorylation activity by expressing a second copy of any of these kinases caused a similar defect. Following co-expression of *pkal* with either *mreC* or *pbp2* in *E. coli*, phosphorylation of MreC and PBP2 was demonstrated and multiple phosphosites were identified by LC-MS/MS. Our data suggest that elaborate protein phosphorylation controls activity of the SSSC to ensure proper sporulation by suppressing premature cross-wall synthesis.

Introduction

The peptidoglycan (PG) sacculus, an elastic mesh of linear carbohydrate chains cross-linked by short peptides surrounds the bacterial cell [1,2]. This exoskeleton is the cell shape-maintaining element and allows the cell to withstand alterations in internal turgor due to changing environments. Only few bacterial species developed a life style devoid of a PG sacculus [3]. Whereas Gram-negative bacteria have a PG-monolayer, Gram-positive species have a thick multi-

layered cell wall that in addition contains large amounts of covalently bound anionic glycopolymers, called wall teichoic acids (WTA) [4,5]. Despite high conservation of the basic PG structure, various species specific modification including different amino acids in the stem peptide or variations in the interpeptide bridge or O-acetylation occur [6].

A major factor in cell shape determination is the site of PG-synthesis [7]. Cocci incorporate PG mainly at the division plane [8], generating a spherical morphology. Incorporation of PG at the lateral wall in a process called elongation growth [9,10], produces a rod-shaped morphology. A key determinant of elongation growth is the actin-like MreB protein [11], which has been originally suggested to form a dynamic helical filament underneath the surface to direct PG synthesis [12–14]. More recent studies do not support helical filaments and describe MreB patches that passively move along with the putative cell wall extension machinery [15,16]. Whereas Gram-negative bacteria have a single MreB protein, the Gram-positive *Bacillus subtilis* requires three MreB homologues, MreB, Mbl and MreBH, for growth [17]. Depletion of MreB, or its inhibition by the antibiotic A22, results in the loss of rod-shape and eventually cell death [17,18]. MreB forms a lateral wall synthesizing complex with MreC, MreD, the PBP2, RodA, and RodZ [19]. In *B. subtilis* also interactions with WTA-synthesizing proteins have been shown [20], suggesting that the lateral wall synthesizing complex might also be involved in the synthesis of WTAs.

Actinobacteria are a group of Gram-positive bacteria with different shapes, including spheres, rods and branched mycelium. Their mode of growth does not depend on Mre-proteins, as demonstrated by the absence of *mre* genes in most genera [21]. Instead they incorporate new PG at the cell poles, dependent on the DivIVA protein [22,23]. In mycelial *Streptomyces*, the hyphal growth at the tip is mediated by the polarisome which consists of the coiled-coil proteins DivIVA, Scy and FilP [24,25]. Although tip growth does not depend on Mre proteins, *Streptomyces* and related actinomycetes contain an *mre* gene cluster consisting of *mreBCD*, *pbp2*, and the *rodA* homolog *sfr* [21,26]. However these genes are not essential but affect synthesis of the thickened spore wall which makes *Streptomyces* spores resistant to detrimental environmental conditions [27,28].

Since the protein-protein interaction pattern of the *S. coelicolor* Mre proteins highly resembled the interaction pattern of Mre proteins forming the lateral wall synthesizing complex of rod-shaped bacteria, the term *Streptomyces* spore wall synthesizing complex SSSC was coined [28,29]. Screening of a genomic library for additional components of the SSSC identified SCO4778 (PkaI), encoding a eukaryotic type serine/threonine kinase (eSTPK) as an interaction partner of MreC, MreD, PBP2, and Sfr [28].

For a long time it was thought that signal transduction in bacteria relies only on histidine/aspartate phosphorylation via two-component systems, while protein phosphorylation by eSTPKs is limited to eukaryotes. But with the increasing availability of genomic data, more and more eSTPKs were identified in bacteria. For example, *S. coelicolor* contains more than 30 eSTPKs [30,31] and more than 50 eukaryotic-type protein phosphatases [32]. The catalytic domains of many bacterial eSTPKs are linked to additional domains. These domains can be extracellular and often mediate ligand binding or protein-protein interaction. The *M. tuberculosis* kinase PknB was shown to become activated by dimerization upon binding of its extracellular PASTA-domain to mucopeptides [33,34]. Regulation of proteins involved in cell division and cell wall synthesis by phosphorylation is well documented in different bacteria [35]. Phosphorylation can result in the activation of an enzyme or its inhibition. Whereas activity of the mucopeptide ligase MurC is inhibited in *Corynebacterium glutamicum*, when phosphorylated by PknA [36], GlmM of *E. coli*, involved in peptidoglycan precursor synthesis is activated by phosphorylation [37].

Phosphorylation of one of the Mre proteins has not been reported yet in any bacterium. Here we show that PkaI is able to multiply phosphorylate coexpressed MreC and PBP2 proteins, providing evidence that sporulation septation and the synthesis of the thickened *Streptomyces* spores wall by the SSSC is controlled by protein phosphorylation.

Results

Expression of *pkaI* is down-regulated during morphological differentiation

Interaction of PkaI with several SSSC proteins suggested a role of PkaI in sporulation [28]. PkaI is encoded in a cluster of five putative eSTPK genes, *SCO4775* (*pkaH*), *SCO4776*, *SCO4777* (*pkaD*), *SCO4778* (*pkaI*), *SCO4779* (*pkaJ*) in *S. coelicolor* M145 [31]; S1A Fig). The genomic organization of the eSTPK genes, with intergenic sequences between 93 bp and 173 bp, indicates that each gene is transcribed separately. This was confirmed by RT-PCR. Primer pairs designed to amplify the intergenic regions of each of these genes did not produce the respective fragments, when cDNA of *S. coelicolor* was used as a template (S1B Fig).

To elucidate a possible role in morphological differentiation, we characterized the expression profiles of *pkaI* and the other eSTPK genes at distinct stages of the *S. coelicolor* life cycle by semi-quantitative RT-PCR with gene-specific primer pairs (S1C Fig). Whereas expression of *pkaH* could not be detected in any growth phase, *SCO4776* was constitutively expressed throughout the whole life cycle. In contrast, *pkaD*, *pkaI*, and *pkaJ* showed highest transcription after 24 hours when mainly substrate mycelium was formed. During aerial mycelium formation, transcription of all three genes was down-regulated. This indicates that PkaD, PkaI, and PkaJ accomplish their function in hyphal growth before or at the onset of morphological differentiation.

The $\Delta pkaI$ mutant $N\Delta PkaI$ is affected in proper sporulation

To assess the putative role of the eSTPK PkaI in the SSSC, we generated an in frame deletion mutant of *pkaI* that had no polar effects on the downstream *pkaJ* (S2 Fig). The $N\Delta PkaI$ mutant showed normal growth in liquid culture. Only sporulation was slightly retarded on solid agar (S3A Fig). Whereas the parental M145 started to differentiate on SM agar after two days, white aerial mycelium of $N\Delta PkaI$ was not visible before the third day of incubation. After seven days, the sporulation of $N\Delta PkaI$ was nearly indistinguishable from that of M145. This delay in sporulation corresponded also to the generation of viable spore particles. After three days of incubation, 50 fold less spores could be isolated from a $N\Delta PkaI$ culture, compared to M145. After five days of incubation, the spore titers obtained from $N\Delta PkaI$ and M145 were similar (S3B Fig).

The effect of *pkaI* inactivation on spore morphology was studied by seeding cover slides in SM-agar with $N\Delta PkaI$ spores and inspecting the slides by phase contrast microscopy after 3–6 days of incubation. Whereas M145 mostly produced very regular spore chains, $N\Delta PkaI$ spore chains frequently contained some aberrant spores (Fig 1, arrows) which were enlarged and more spherical. Genetic complementation of $N\Delta PkaI$ by integrating an intact copy of *pkaI* together with its native promoter region into the PhiC31 attachment site ($N\Delta PkaI::pSET-pkaI$) restored the morphological defect. Both $N\Delta PkaI$ phenotypes, the delay in sporulation, as well as the formation of aberrant spores were complemented (Fig 1, S3A and S3B Fig). Whereas integration of *pSET-pkaI* in the $N\Delta PkaI$ chromosome complemented aberrant spore formation, integration of *pSET-pkaI* into the chromosome of the parental strain M145

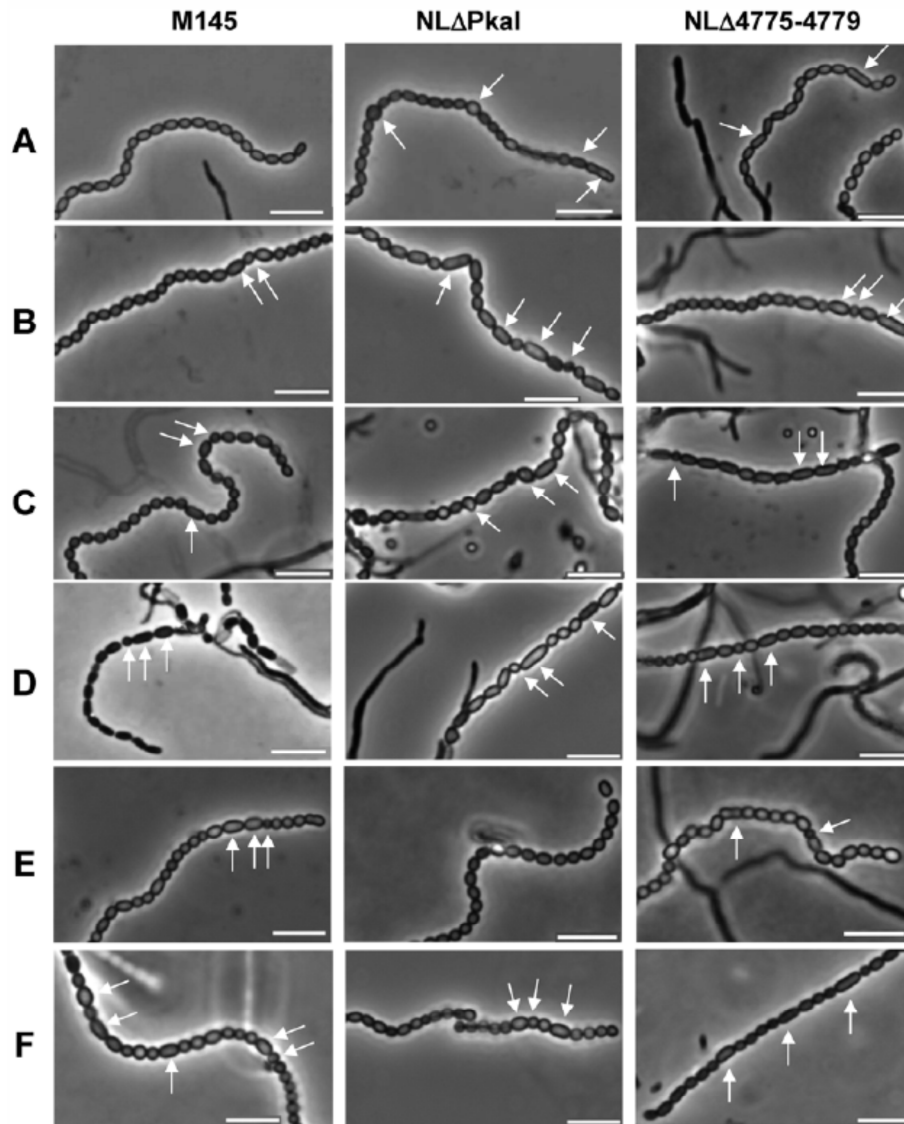


Fig 1. Effect of overbalancing phosphorylation activity on proper sporulation of *S. coelicolor*. Phase contrast microscopy of spore chains revealed the presence of aberrant spores (arrows) in eSTPK mutants NLΔPkaI and NLΔ4775–4779 (A). In contrast, spore chains of the parental M145 strain (A) and the complemented mutant NLΔPkaI::pSET-pkaI (E) contain mainly regular ovoid spores. Not only deletion, but also expression of a second copy of any eSTPK gene of cluster SCO4775–4779 causes a similar sporulation defect (B–F, white arrows) in *S. coelicolor* M145, NLΔPkaI, or NLΔ4775–4779. None of the eSTPK genes is able to complement aberrant sporulation of the five-fold mutant NLΔ4775–4779. A, no plasmid integrated; B, :: pSET152-pkaH; C, :: pSET152-SCO4776; D, :: pSET152-pkaD; E, :: pSET152-pkaI; F, :: pSET152-pkaJ. Bar = 5 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.g001

caused a similar sporulation defect as the deletion of *pkaI* in $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ (Fig 1). Obviously, over-expression of *pkaI* interfered with the control of proper sporulation.

Overbalancing kinase activity of *S. coelicolor* affects integrity of the spore envelope

Since *pkaI* is located in a genomic region consisting of five consecutive eSTPK genes and since clustering often indicates a functional relationship, we also deleted the complete cluster (S2 Fig). The five-fold eSTPK mutant $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ was viable and growth of its substrate mycelium was not affected. Microscopic analyses of $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ spore chains revealed beside normally ovoid spores also aberrant rod-shaped spores (Fig 1, arrows). The sporulation defect was even more obvious when testing viability of the spores by SYTO9/propidium iodide staining (Fig 2A, S3 Table). Whereas the wildtype M145 contained almost only (99.28%) viable spores (green), the spore chains of the deletion mutants $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ and $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$, respectively, also included dead (red) spores (4.29% and 16.81%) or sometimes spores even devoid of DNA (black). Moreover, germinating $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ spores showed an increased sensitivity towards vancomycin (Fig 3B and S4 Fig), suggesting an impaired spore wall. When vancomycin disks were applied at a later stage, when substrate mycelium has already been formed, $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ was as resistant as the $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ mutant and M145 (S3C Fig), demonstrating that only the spore wall of $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ was sensitive but not the cell wall of the substrate mycelium.

To identify the kinase responsible for the vancomycin sensitivity of the $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ spores, we inserted each kinase gene under control of its native promoter region into the ΦC31 attachment site of $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$, $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ and M145. Vancomycin resistance of spores of the five-fold mutant $\text{NL}\Delta 4775\text{--}4779$ as well as the aberrant morphology or the presence of non-viable spores could not be restored by any kinase gene (Figs 1 and 2, S3 Table), suggesting that activities of multiple kinases are required for proper sporulation. Consistent with this observation, introduction of a second copy of any of the kinase genes, with the notable exception of *pkaI*, into M145 or $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ caused aberrant spores (Figs 1, 2 and 3) with increased sensitivity to vancomycin (Fig 3B and S4 Fig). This phenotype was most severe, when *pkaI* was expressed in M145. Here, 59.5% of the spores were non-viable (Fig 3A, S3 Table). Presence of dead spores and vancomycin sensitivity of germinating spores clearly show a defect in the integrity of the spore envelope. Interestingly, vancomycin resistance was restored in all strains, when the spores were plated onto LB supplemented with 3 mM MgCl_2 (Fig 3B), known to rescue *B. subtilis* mutants impaired in cell wall synthesis [38].

These data demonstrate that the elaborated kinase activity of *S. coelicolor* is crucial for proper sporulation and any imbalance in the kinase activity by either deletion or over-expression of specific kinases affects sporulation.

The eSTPK PkaI phosphorylates MreC

Interaction of the Ser/Thr kinase PkaI with MreC [28] suggested that PkaI phosphorylates MreC, thereby controlling its activity. To demonstrate phosphorylation of MreC by PkaI, we simultaneously expressed both proteins in *E. coli* BL21. The respective genes were cloned under control of the P_{T7} promoter in pCDF-Duet1, generating translational fusions either to an N-terminal His-tag encoding sequence (*pkaI*), or a C-terminal S-tag (*mreC*). As controls, MreC_S-tag and His_PkaI were also expressed separately. Following induction of gene expression, MreC_S-tag was purified by S-tag-affinity chromatography and His_PkaI by Ni-NTA chromatography (Fig 4A). After staining the gels with the phosphoserine/phosphothreonine specific dye ProQ Diamond strong bands were visible that corresponded to His_PkaI and

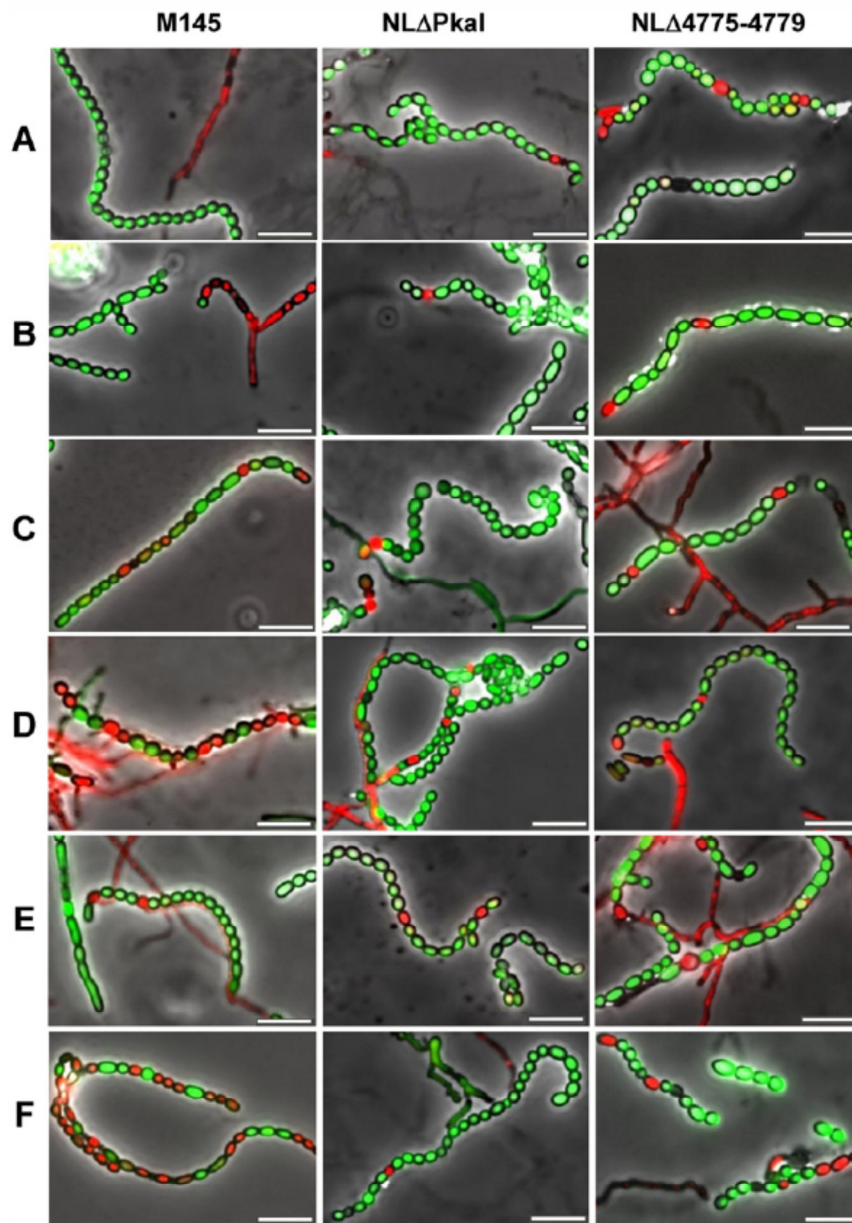


Fig 2. Effect of overbalancing phosphorylation activity on the integrity of spore envelopes. Live-dead staining of spore chains of the eSTPK mutants NLΔPkaI and NLΔ4775–4779 (A) revealed the presence of dead spores (red) or spores without DNA (black). In contrast, spore chains of the parental M145 strain (A) only contained viable spores (green). Expression of a second copy of any eSTPK gene of cluster SCO4775–4779 (B–F) caused a similar sporulation defect in *S. coelicolor* M145, NLΔPkaI, or NLΔ4775–4779. None of the eSTPK genes was able to complement aberrant sporulation of the five-fold mutant NLΔ4775–4779. A, no plasmid integrated; B, :: pSET152-pkaH; C, :: pSET152-SCO4776; D, :: pSET152-pkaD; E, :: pSET152-pkaI; F, :: pSET152-pkaJ. Bar = 5 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.g002

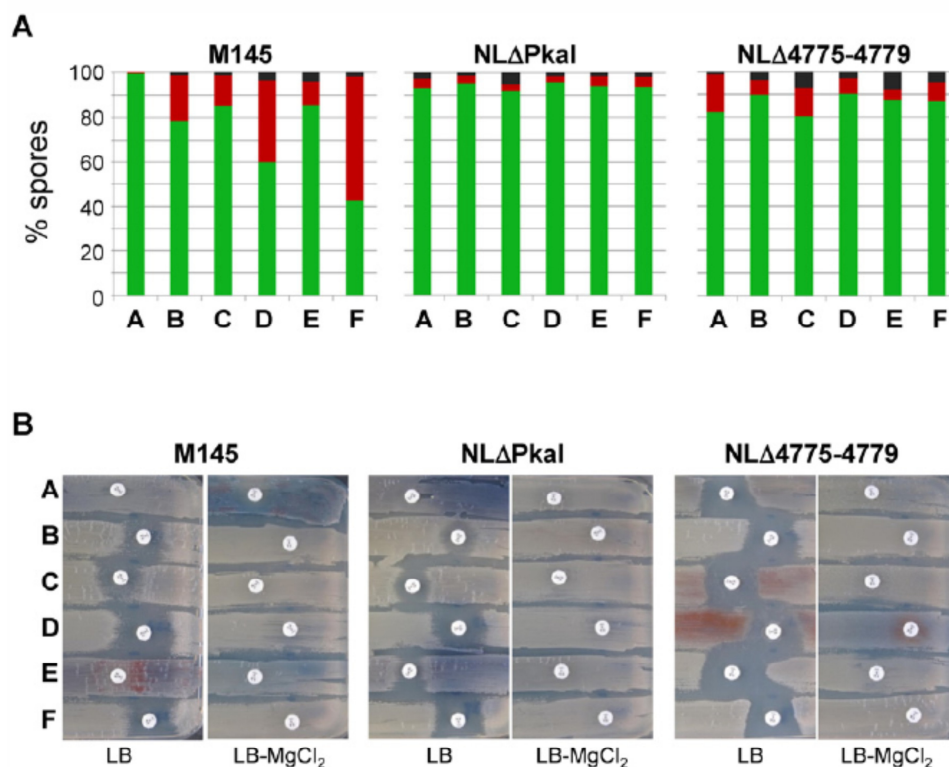


Fig 3. Effect of Ser/Thr kinases on the viability of spores (A) and the resistance of germinating spores to vancomycin (B). Spore chains were stained with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes) and observed by fluorescence microscopy. Percentage of viable (green), dead (red) and spores without DNA (black) is given for each strain. Spores of the different strains were plated onto LB agar and filter discs containing 5 μ g vancomycin were applied. Whereas, M145 and the *pkaI* mutant NLΔPkaI were resistant, NLΔ4775-4779 spores showed vancomycin sensitivity, suggesting an impaired spore wall. Vancomycin sensitivity of M145 or NLΔPkaI was also caused by expressing a second copy of each kinase gene, with the exception of *pkaI*. Supplementation of the agar plates with 3 mM MgCl₂, known to rescue mutants impaired in cell wall synthesis restored vancomycin resistance to all strains. A, no plasmid integrated; B, :: pSET152-pkaH; C, :: pSET152-SCO4776; D, :: pSET152-pkaD; E, :: pSET152-pkaI; F, :: pSET152-pkaJ.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.g003

MreC_S-tag, respectively, as demonstrated by immunoblotting. Interestingly, the S-tag affinity chromatography always led to two bands (Fig 4A, arrows), both of which were phosphorylated. Mass spectrometry analysis revealed that MreC_S-tag and His_PkaI were present in both bands; the upper band likely represents His_PkaI, which obviously has been co-purified with MreC_S-tag, forming the lower band.

To exclude that phosphorylation of MreC_S-tag occurred accidentally due to the over-expression of His_PkaI, we introduced an additional expression vector (pYT9-Crp) into BL21 carrying pCDF-PkaI-MreC. pYT9-CRP encodes the *S. tsukubaensis* Crp protein with a C-terminal Strep-tagII sequence (Crp_strep) under control of the rhamnose inducible P_{rham} promoter (S. Kocadinc, pers. communication). Following induction of gene expression by IPTG and rhamnose, Crp_strep was purified by Streptactin affinity chromatography. ProQ Diamond staining revealed that, in contrast to MreC_S-tag, purified Crp_strep was not phosphorylated (S5 Fig). This demonstrates that phosphorylation of MreC_S-tag by His_PkaI is specific and not caused by the non-physiological expression conditions in the heterologous host.

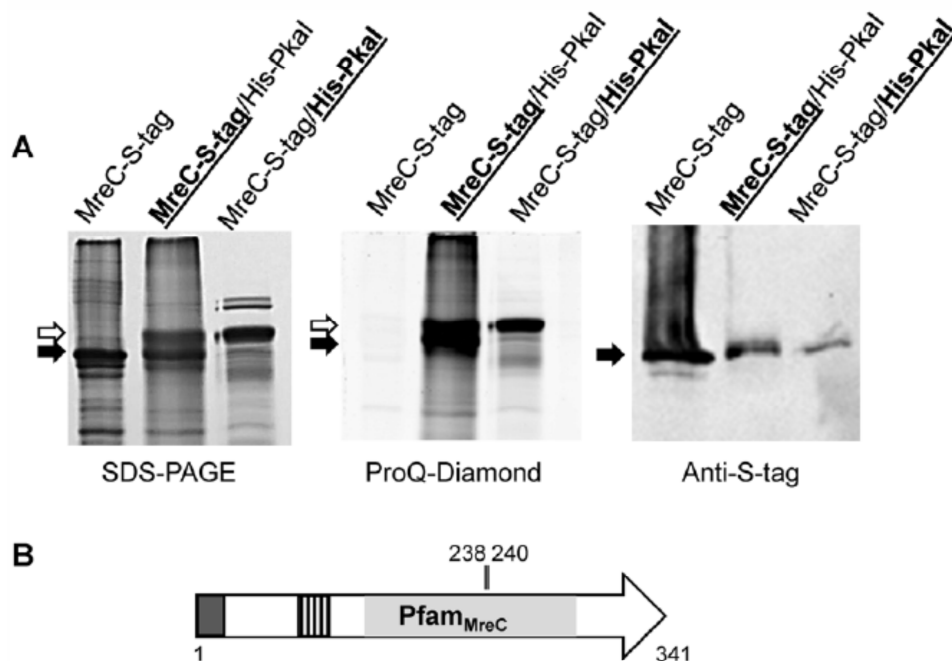


Fig 4. Phosphorylation of MreC by PkaI. *S. coelicolor* *mreC* with a S-tag encoding sequence was expressed in *E. coli* in the absence or presence of *pkaI* and purified by affinity chromatography (A). PkaI with an N-terminal His-tag was purified by Ni-NTA chromatography in the presence of *mreC*. Proteins (bold letters and underlining indicate, which protein was purified) were separated on a SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. Purified MreC_S-tag (black arrow) contained considerable amounts of co-purified PkaI (white arrow). Phosphorylated proteins were identified by ProQ Diamond staining. The white arrow indicates autophosphorylated His_PkaI, while the black arrow marks phosphorylated MreC_S-tag. Immunoblotting with Anti-S-tag antibodies confirmed the identity of MreC_S-tag. Domain architecture of *S. coelicolor* MreC and positions of the most likely phosphosites (B). Predicted Pfam_MreC domain, signal sequence (dark grey box), coil-coil region (hatched box) and position of phosphorylated T residues, identified by LC-MS/MS, are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.g004

The phosphosites of MreC were identified using purified MreC_S-tag from *E. coli* carrying pCDF-MreC-PkaI. The purified protein was run on a 12.5% SDS polyacrylamide gel, to separate it from contaminating proteins. Following staining of the gel with Coomassie blue, the band corresponding to MreC_S-tag was cut out from the gel and subjected to proteolytic digestion with either trypsin or endoproteinase GluC. Resulting peptide masses were analysed by LC-MS/MS (S4 Table). To discriminate specific phosphorylation sites from artificially phosphorylated residues, the intensities of the phosphorylated peptides were compared to the intensities of the corresponding non-modified peptides; only singly-phosphorylated peptides with at least 10-fold higher intensity than unmodified counterparts were considered. A single MreC-derived peptide was found to be more abundant in the phosphorylated form. The tryptic peptide LVTFGSQADKPFVPGVPGVp[**TIT**]RVDPNGGDLTR (bold residues indicate probable phosphorylation sites) comprising MreC₂₁₉₋₂₅₁ was detected 100-fold more abundant compared to the non-phosphorylated one (Table 1). The MreC phosphorylation site (Fig 4B) is localized within the Pfam_MreC domain (MreC₁₂₁₋₂₇₃). Analysis of the fragmentation spectrum did not lead to unambiguous localisation of the phosphorylation to one of the two threonine (T₂₃₈, T₂₄₀) residues.

Table 1. Prevalent singly phosphorylated peptides[§] in MreC, PBP2 and PkaI.

Protein	Peptide	Phospho site	Ratio
MreC*	LVTFGSQADKPFVPGVPV Gp [TT]RVDPNGGDLTR	T ₂₃₉ / T ₂₄₀	0.01
PBP2	GVALADNE p TR	T ₈₀	0.004
	LVVSA p SRTDLLK	S ₈₇	0.1
	SDQVGR p SGLER	S ₂₁₆	0.029
	AVVSPDGK p TVR	T ₅₅₈	0.007
PkaI	VL p TRGPVDAVEAAR	T ₁₁₃	0.02
	FGVAQVAGAp[TT]LTE	T _{173,174}	0.000

[§] Most probable phosphosites/phosphorylated region, as identified by LC-MS/MS, are highlighted by bold letters. Unlocalized phosphorylation sites are situated in regions marked with brackets. Phosphopeptide ratio represents intensity of non-phosphorylated peptide divided by the intensity of phosphorylated peptide.

* this MreC peptide was also observed in multiple phosphorylated versions, each with a low ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.t001

When MreC_S-tag was purified in the absence of PkaI, it was non-phosphorylated (Fig 4A). Also LC-MS analysis detected only non-phosphorylated peptides (data not shown). This demonstrated that MreC was specifically phosphorylated by PkaI and not by an endogenous *E. coli* kinase.

Detection of phosphorylation sites in PkaI

Purified MreC_S-tag also contained considerable amounts of His_PkaI, since S-tag purification obviously did not disrupt the His_PkaI-MreC_S-tag interaction (Fig 4A). Due to their similar size, MreC_S-tag and His_PkaI are not well separated by SDS-PAGE. Therefore, the MreC_S-tag band, which was eluted from the gel to determine the MreC-phosphosites also contained His_PkaI and among the MreC_S-tag peptides also His_PkaI peptides were identified. This further supports the strong interaction of PkaI and MreC, reported by Kleinschnitz et al. [28] and allowed an assignment of the phosphorylation sites not only to MreC but also to PkaI (Table 1 and S4 Table). Two phosphorylated peptides (PkaI₁₁₁₋₁₂₄ VL**p**TRGPVDAVEAAR, PkaI₁₆₄₋₁₇₇ FGVAQVAGAp[**TT**]LTE) were identified for PkaI. Both phosphorylation sites are located in the highly conserved S_TKc kinase domain. PkaI₁₆₄₋₁₇₇ corresponds to the so called activation loop of eSTPKs, involved in determining substrate specificity [39,40] and contains the conserved T residue, which becomes phosphorylated to activate the kinase.

PkaI phosphorylates also PBP2

In order to study whether PkaI also phosphorylates other PkaI interaction partners, in addition to MreC, we expressed the monofunctional penicillin binding protein PBP2 together with PkaI. Interestingly, expression of PBP2_S-tag could not be achieved, when *pbp2* alone was inserted in pCDF-Duet1 (S6 Fig). However, in the presence of *his-pkaI*, expression of PBP2_S-tag was obtained in reasonable amounts. Obviously, PkaI had a stabilizing effect on PBP2 expression. Since purification of PBP2_S-tag was not satisfactorily under native conditions, PBP2_S-tag was denatured by the addition of 6 M urea and purified under denaturing conditions (Fig 5A). ProQ diamond staining and immunoblotting with anti-S-tag specific antibodies demonstrated that also purified PBP2_S-tag was phosphorylated. The PBP2_S-tag band was cut from a Coomassie stained polyacrylamide gel, digested with trypsin, and analysed by LC-MS/MS (S4 Table) to identify the phosphorylated peptides (Table 1). PBP2₇₂₋₈₁ (GVALADNE**p**TR), PBP2₈₂₋₉₃ (LVVSA**p**SRTDLLK), PBP2₂₁₀₋₂₂₀ (SDQVGR**p**SGLER), and PBP2₅₅₀₋₅₆₀

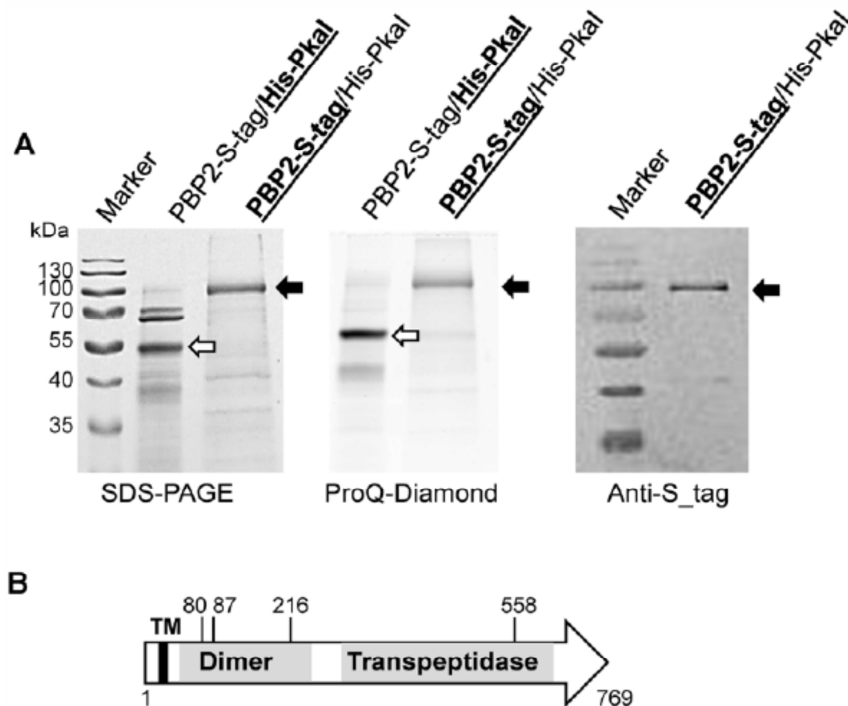


Fig 5. Phosphorylation of PBP2 by PkaI. *S. coelicolor pbp2* with a S-tag encoding sequence was co-expressed with *pkaI* in *E. coli*. PBP2_S-tag was purified under denaturing conditions by affinity chromatography. PkaI with an N-terminal His-tag was purified by Ni-NTA chromatography under native conditions. Purified His_PkaI and PBP2_S-tag proteins (bold letters and underlining indicate, which protein was purified) were separated on an SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue (A). Phosphorylated proteins were identified by ProQ Diamond staining. The white arrow indicates auto-phosphorylated His_PkaI, while the black arrow marks phosphorylated PBP2_S-tag. Immunoblotting with Anti-S-tag antibodies confirmed the identity of PBP2_S-tag. Domain architecture of PBP2 and positions of the most likely phosphosites (B). Predicted Pfam domains (PBP dimerization, dark grey, PBP transpeptidase, light grey), a transmembrane helix (TM) and the positions of phosphorylated S/T residues, identified by LC-MS/MS, are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0125425.g005

(AVVSPDGKpTVR) were the most prevalent phosphorylated PBP2 peptides (bold letters indicate the phosphosites). Whereas peptide PBP2₅₅₀₋₅₆₀ is located in the transpeptidase domain of PBP2 (Fig 5B), all other PBP2 phosphorylation sites are found in the N-terminal dimerization domain (PBP2₆₀₋₂₅₀), suggesting that PBP2 phosphorylation affects its dimerization. LC-MS/MS analyses of the phosphorylated peptides identified T80, S87, S216 and T558 as the residues phosphorylated by PkaI (Table 1).

PkaI interacts with further proteins involved in differentiation

Previous screening of a *S. coelicolor* genomic library for interaction partners of MreC and PBP2 identified PkaI₂₅₇₋₃₅₇ as the interacting domain [28]. To find additional target proteins of PkaI, we screened genomic libraries of *S. coelicolor* by bacterial two-hybrid analyses for interaction partners of PkaI. Full length *pkaI*, as well as the fragment encoding the putative interaction domain PkaI₂₅₇₋₃₅₇ were translationally fused to the T18 domain of the *Bordetella pertussis* adenylylate cyclase gene *cya*. The resulting plasmids were introduced into the *E. coli cya* mutant BTH101. Subsequently, these strains were transformed with genomic libraries of M145 made in the Cya-T25 domain encoding vector pKT25. In total, about 1.7×10^6 colonies were obtained

with the enzymatically generated library [28] and about 3×10^5 colonies with a library containing *S. coelicolor* DNA fragments generated by nebulization. Transformants encoding interacting fusion proteins were selected on minimal agar supplemented with lactose.

Whereas, not a single colony developed on minimal agar when full length PkaI was fused, numerous colonies grew on minimal agar, when only the PkaI₂₅₇₋₃₈₀ interaction domain was fused to the Cya-T18 domain. Sequence analyses of the pKT25 derivatives confirmed the in frame fusion of most inserts and identified the respective *S. coelicolor* proteins which interacted with PkaI (S5 Table).

About 30% of the interacting clones contained a fragment (SCO2097₂₁₋₁₂₀) of SCO2097. The 135 aa actinomycete signature protein SCO2097 [41] was previously identified as an interaction partner of MreC, MreD, PBP2, Sfr, FtsI and RodZ and was shown to have a role in proper sporulation [28]. Interestingly, several of the PkaI interaction partners, like the putative membrane protein SCO1403 which was isolated five times, or the FtsX-like proteins SCO3110 and SCO3754 have already been identified in the previous screens of SSSC proteins [28]. PkaI also showed self-interaction and interacted with the other eSTPKs PkaA (SCO2974) and PkaD (SCO4777). Moreover, PkaI interacted with several proteins that have a documented role in morphological differentiation, like CrgA (SCO3854), AfsQ1 (SCO4907), BldB (SCO5723) and the FtsH homologue SCO5587. This indicates that PkaI not only phosphorylates specific SSSC proteins but also has a more global role in the regulation of morphological differentiation.

Discussion

A crucial step in morphological differentiation of mycelial *Streptomyces* is the simultaneous formation of more than 50 septal cross walls in the unbranched aerial hyphae. Sporulation septation and the synthesis of the thickened spore wall involves, besides SsgA-like proteins and FtsZ [42–44], the SSSC, a multi-protein complex for spore envelope synthesis that highly resembles the elongasome of rod-shaped bacteria [28]. But whereas, rod-shaped bacteria build only a single septum during cell division, *Streptomyces* faces the problem, how to build dozens of septal cross walls at the same time [42]. For this process the membrane- and PG-synthesizing machineries have to be provided in sufficient quantities and positioned properly. Moreover, the activities of the complexes have to be controlled to prevent aberrant sporulation by sporadic formation of single cross walls in a non-coordinated manner.

In this study we are describing a route, how the control of sporulation septation and the synthesis of the spore wall could occur by protein phosphorylation.

The crucial role of the eSTPKs PkaH, SCO4776, PkaD, PkaI and PkaJ in sporulation was apparent in gene inactivation and overexpression studies. Deletion of *pkaI* or all five eSTPK genes, as well as expression of a second copy of any of these kinases produced aberrant spore chains, containing irregular-shaped spores. SYTO9/ propidium iodide staining revealed the presence of spores, which were considerably affected in the integrity of the spore envelope. Moreover the germinating spores of the five-fold deletion mutant and the over-expressing strains were highly sensitive to vancomycin, whereas the spores of the wildtype and the *pkaI* mutant NLΔPkaI were resistant, due to the presence of the *S. coelicolor* *vanHAX* resistance determinants. Although the rationale for the increased sensitivity of germinating spores of the SSSC mutants to different kinds of stress, including cell wall damaging agents, like lysozyme or vancomycin [27, 28, 29] is not understood, it suggests an impaired spore wall. Since the transpeptidase PBP2 is a key protein of the SSSC, the SSSC mutants are probably affected in the crosslinking of the spore wall. Reduced crosslinking of the PG-layer would correlate with an increase in the vancomycin binding sites (D-ala-D-ala). The increased amount of bound vancomycin then probably interferes with spore germination.

Phosphorylation of proteins as a regulatory mechanism to control their activity is well documented in many bacteria and various proteins of the divisome were shown to be phosphorylated [45]. For example, the mycobacterial kinase PknA was shown to affect septum formation by inhibiting the GTP-dependent polymerization of FtsZ [46]. PknA also phosphorylates the PG-synthesis ligase MurD [47] and the mycobacterial DivIVA homolog Wag31, crucial for polar growth [48]. Activity of DivIVA of *S. coelicolor*, which directs growth by apical tip extension and hyphal branching, is controlled by the protein kinase AfsK [22].

Here we show for the first time that MreC and PBP2, two important proteins in spore wall synthesis of *S. coelicolor* are specifically phosphorylated. In contrast, MreC and PBP2 of rod-shaped bacteria have not been reported to be phosphorylated. Neither recently published phosphoproteome studies [49,50], nor inspection of phospho-proteome databases (PhosSite and Phosida) of *B. subtilis* and *E. coli* indicated phosphorylation of MreC or any other Mre protein of *E. coli* or *B. subtilis*.

In vivo phosphorylation of MreC and PBP2 by PkaI was demonstrated in *E. coli*. Authenticity of MreC_S-tag phosphorylation is confirmed by the control experiments, which showed non-phosphorylation of Strep-tag_Crp and lack of MreC phosphorylation in the absence of *pkaI*. Direct detection of phosphorylated MreC or PBP2 in *S. coelicolor* was not possible, since over-expression of each of these proteins is toxic (unpublished results), preventing the production of sufficient amounts for the detection of phosphorylated peptides. In published datasets of *S. coelicolor* [51,52] MreC or PBP2 are not included, indicative of their low expression level. Expression of PBP2 in *E. coli* in this study was also problematic and could only be achieved in the presence of PkaI (S6 Fig), but not in the absence of *pkaI*. The stabilizing effect of *pkaI* on PBP2 could be due to toxicity of *pbp2* expression, probably caused by interference of PBP2 with the *E. coli* PG-synthesizing machinery. Since three of the four PBP2 phosphosites are located within the dimerization domain, it is tempting to speculate that phosphorylation of PBP2 prevents its dimerization, thus inactivating PBP2 and allowing its expression in *E. coli*.

On the first view, phosphorylation of extracellular MreC or PBP2 domains by the cytosolic kinase domain of PkaI seems to be implausible. But if the purpose of phosphorylation is to keep the synthesized proteins inactive, the topology of the phosphosites is of minor relevance. Moreover, the phosphosites of the penicillin binding protein PBPA of *Mycobacterium tuberculosis*, phosphorylated by the eSTPK PknB are also in the (extracellular) transpeptidase domain [31]. Here it was shown that phosphorylation affected positioning of PBPA at the septum, thereby regulating septal peptidoglycan biosynthesis.

Expression of PkaI (and PkaD, PkaJ) was found to be highest in the early growth phase and down regulated in later stages of differentiation. This expression profile is in agreement with microarray data of *S. coelicolor* [53], which confirm our semi-quantitative RT-PCR data. The only discrepancy concerns *pkaH*, which was highly expressed in the Yagüe-study [53], while its expression was hardly detectable under our growth conditions. However, the *pkaI* expression profile differs from the expression of *mreC* and *pbp2*, which are induced during morphological differentiation. The different expression profiles of the kinase PkaI and their substrates MreC and PBP2 do not seem to be consistent with the observed phosphorylation of MreC and PBP2 by PkaI. However, this apparent contradiction might be the key for understanding how sporulation septation is controlled by phosphorylation of SSSC proteins. As indicated by the inability to produce PBP2 in the absence of *pkaI*, phosphorylation of PBP2 might interfere with its activities, probably by affecting subcellular positioning, dimerization, or interaction with other proteins to assemble a functional SSSC. As consequence, the PkaI-mediated phosphorylation would prevent the premature formation of sporadic SSSC complexes unless outgrowth of aerial hyphae is finished and enough SSSC proteins have been synthesized to allow coordinated assembly of more than 50 SSSC complexes. Also, any imbalance in kinase activity, caused by

over-expression of single kinase genes interferes with proper sporulation by affecting the coordinated assembly of the SSSC. Control of morphological differentiation most probably also includes one of the 55 *S. coelicolor* phosphatases [32], able to activate phosphorylated SSSC proteins by dephosphorylation.

The role of PkaI in inhibition of sporadic SSSC complexes is strengthened by the observed interaction of PkaI with CrgA, a septation inhibitor protein that coordinates growth and cell division in aerial hyphae [54]. Interaction of PkaI with other sporulation proteins, like SCO2097, AfsQ, FtsH, FtsX-like proteins, and BldB suggests a more global role of PkaI in differentiation, besides controlling the SSSC. Overexpression of *bldB* blocked sporulation in aerial hyphae and evidence for the interaction of BldB with an unknown cellular constituent involved in differentiation was reported [55].

The proposed prominent role of PkaI in differentiation of *S. coelicolor* is in contrast to the quite mild phenotype of *pkaI* inactivation. However, single eSTPK mutants often only have a mild phenotype [56,57], probably due to the well documented cross reactivity of eSTPK proteins [45]. In *S. coelicolor*, other eSTPKs probably can substitute the missing PkaI activity. This is supported by the more severe phenotype of the five-fold mutant NLΔ4775–4779 and by our protein-protein interaction data which revealed interaction of PkaI with the other eSTPKs PkaA and PkaD. Moreover, deletion mutants of various SSSC proteins do not completely block sporulation but cause only spores with impaired envelopes [21,27,28], suggesting that the defects can be suppressed by redundant enzymatic activities. In agreement with this, at least four PBPs have been identified in the SSSC [28,29].

Clearly, further experimental work is required to support the proposed differentiation model. The phosphorylation of SSSC proteins should be confirmed in *S. coelicolor* to reflect their native environment and the biological effect of SSSC phosphorylation has to be demonstrated, e.g. by introducing phosphomimetic mutations. Unfortunately, no enzymatic assays are available for any SSSC protein to directly quantify the effects of protein phosphorylation on the activity of the respective protein.

Material and Methods

Bacterial strains and media

Cultivation of strains and procedures for DNA manipulation were performed as previously described [58,59]. Proteins were purified from BL21 (DE3) (Invitrogen). Plasmids and oligonucleotides are listed in S1 and S2 Tables.

RNA isolation and cDNA synthesis

M145 was grown on cellophane disks placed on SM agar plates. Plates were incubated for either 24, 48, 72 or 96 hours at 30°C. The mycelium was harvested and lysed in Kirby-Mix [59] with a Precellys homogenizer (Peqlab; 5 times program: 6500rpm 2 x 20sec). RNA isolation was carried out as described by Kieser et al. [59] with minor modifications. RevertAid RT Kit (Thermo) was used to synthesize cDNA from isolated RNA according to manufacturer's protocol.

Construction of mutants

To delete *pkaI* (SCO4778), a 1.6 kb upstream fragment (primer pair Up4778fwE/ Up4778revB) including the start codon of *sco4778* and a 1.6 kb downstream fragment (primer pair lo4778fwB/ lo4778revH) including the *sco4778* stop codon was amplified by PCR and cloned into pKT18, yielding pKO4778. After transformation of M145 and integration of the deletion vector pKO4778 by a single crossover (kanamycin-resistant), a Δ*pkaI* mutant was isolated by

selecting for the second crossover (kanamycin-sensitive). Correct gene replacement was confirmed by PCR-analyses and Southern-blotting. The hybridization probe was amplified with primers Up4778fwE/ Up4778revB.

To delete all five serine/threonine kinase genes, a 1.6 kb upstream fragment (primer pair Up4775Ef/Up2775Br) including the start codon of *SCO4775* and a 1.6 kb downstream fragment (primer pair Lo4779Bf/Lo4779Hr) including the *SCO4779* stop codon were amplified and cloned into pK18. Subsequently the knockout cassette was cut out with EcoRI/HindIII and inserted in pGus21, yielding pGusKO4775-4779.

pGusKO4775-4779 was introduced into *S. coelicolor* M145 by intergeneric conjugation [60] and apramycin resistant transconjugants were selected that carried pGusKO4775-4779 integrated via a single crossover (M145::pGusKO4775-4779). To screen for the second cross over, resulting in *SCO4775-SCO4779* deletion, M145::pGusKO4775-4779 was plated onto soya mannit (SM) agar without antibiotic and incubated for five days. Spores were harvested and appropriate dilutions were plated onto LB agar to obtain single colonies. After two days incubation at 30°C, plates were overlaid with 1 ml H₂O containing 2.5 mg X-gluc. Colonies that still carried pGusKO4775-4779 were surrounded by a blue halo due to the 4-Cl-3-Br-indigo production by the β -glucuronidase (GusA). Colonies that had lost pGusKO4775-4779 by the second cross over were identified by the lack of the blue halo. Deletion of *SCO4775-SCO4779* was confirmed by PCR analyses using primers Intern4778f/Intern4778r, Up4778K416/Lp4778K2240, and c4775-79fwEX/c4775-79revEX.

Spore production assay

Approximately 3×10^7 spores of the respective strain were plated on soya mannit (SM) agar. The plates were incubated at 30°C for 3 and 7 days, respectively, before harvesting the newly formed spores. Dilutions of the spore samples were plated in duplicate to determine the spore titer. 6 biological replicates were made from M145 and NLA Δ PkaI; 8 replicates from NLA Δ 4775-4779 and NLA Δ PkaI::pSET-pkaI.

Heterologous co-expression

pkaI (*SCO4778*), *mreC* (*SCO2610*) and *pbp2* (*SCO2608*) were amplified using the primers listed in S2 Table, digested with the respective enzymes, and cloned into the vector pCDFDuet1 (Merck/Novagen). The resulting plasmids (S1 Table) were transferred into *E. coli* BL21 (DE3) for protein production. Expression of the proteins was performed as described by [61]. Briefly, cells were grown in LB medium containing 100 μ g spectinomycin/ml at 37°C until an OD₆₀₀ of 0.6–0.8. Then expression was induced with IPTG at a final concentration of 0.5 mM for 3 h at 37°C. Purification of S-tagged MreC protein was carried out according to the manufacturers protocol (Novagen) with minor modifications. His-tagged PkaI was purified via Ni-NTA sepharose gravity flow columns using the manufacturers protocol (IBA). As lysis, washing and elution buffer we used 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5 with 150 mM NaCl and 0.1% Triton X100. PBP2-S-tag was purified under denaturing conditions by adding urea to the buffer to a final concentration of 6 M.

Expression of the Strep-tagII-Crp protein of *Streptomyces tsukubaensis* (*STSU_15619* gene), used as a negative control, was induced with rhamnose at a final concentration of 0.02%. Strep-tagII-CRP was purified using an Äkta purifier (GE Healthcare) with a StrepTrap HP columns following the manufacturers protocol (GE Healthcare). Identity of the purified proteins was confirmed by immunoblotting. Following protein transfer (45 minutes at 400 mA) to nitrocellulose membranes, the membranes were incubated, washed and developed according to the

protocol for the respective antibody (Anti-S-tag-HRP, Novagen; Anti-Strep-tag-HRP, Biorad; Anti-His6 HRP, Bethyl Laboratories, Inc)

Phospho-serine and -threonine detection

Purified proteins were run on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. To detect phosphorylation on serine or threonine residues the gels were stained with ProQ Diamond (Molecular Probes) according to the manufacturers recommendations.

Microscopy

About 10^6 spores were plated onto MS agar and sterile coverslips were inserted in a certain angle of 45° . After five to seven days of incubation at 30°C the coverslips were removed and mounted on slides coated with 1% agarose in PBS.

To detect dead spores, SYTO9 and propidium iodide stains of the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes) were used. The staining solution was prepared by mixing 1.5 μl of component A and B in 1 ml of water. Spores were incubated on the agar plate with 20 μl of staining solution for 15 minutes, then coverslips were removed and mounted on slides coated with 1% agarose in PBS. Images were taken with an Olympus System Microscope BX60 equipped with a F-view II camera (Olympus), using TxRed and eGFP filtersets for detection of the fluorescent markers. Fiji version v.149b was used for image processing and the Cell Counter Plugin for spore counting. Live-dead percentage was calculated from the analyses of ~700–1800 spores from each strain (S3 Table).

Nano LC-MS/MS analysis

Samples were loaded on a NuPAGE Bis-Tris 4%–12% gradient gel (Invitrogen) and the Coomassie stained bands were pooled and in gel digested with trypsin and GluC, respectively, as described elsewhere [62]. LC-MS analyses of the peptides were done on an EasyLC nano-HPLC (Proxeon Biosystems) coupled to an LTQ Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Scientific) as described elsewhere [63]. MS data were processed using the software suite MaxQuant, version 1.2.2.9 [64] and searched using Andromeda search engine [65] against a target-decoy *E. coli* database containing 4,311 forward protein sequences, the sequences of the tagged and overexpressed proteins and 248 frequently observed protein contaminants. Trypsin or GluC, were set as proteases in which two missed cleavage sites were allowed. Carbamidomethylation of cysteine was set as fixed modification; N-terminal acetylation, methionine oxidation and serine/threonine/tyrosine phosphorylation were set as variable modifications. Initial precursor mass tolerance was set to 6 parts per million (ppm) at the precursor ion and 20 ppm at the fragment ion level. False discovery rates were set to 1% at peptide, phosphorylation site, and protein group level.

Bacterial two-hybrid interaction assays

pkal and a *pkal* fragment encoding only the putative PkaI interaction domain (PkaI₂₅₇₋₃₈₀) were amplified with primers (listed in S2 Table) containing XbaI and KpnI sites, respectively. Subsequently, PCR fragments were cloned with XbaI/KpnI into plasmid pUT18c to generate translational fusions with the catalytic T18 domain of the *B. pertussis* adenylate cyclase [66] and introduced into the *E. coli cya* mutant BTH101. These strains were electroporated with the *S. coelicolor* genomic libraries, either constructed by cloning 250 bp–2000 bp DNA fragments obtained by a partial BfuCI digest [28], or 250–1000 bp fragments generated by shearing the chromosomal DNA in a nebulizer device (Invitrogen) (Teszgzi & Muth, unpublished), into

pKT25. Transformation mixes were plated onto M63 minimal agar containing kanamycin and ampicillin to select for the presence of pUT18c-4778 and a library derived pKT25 derivative. The ability of co-transformants to use lactose resulting in growth on minimal agar is based on a functional adenylate cyclase due to the interaction of the fusion proteins. From growing colonies plasmid DNA was isolated and used in retransformation experiments of BTH101 (pUT18c-4778) to confirm the interaction. From still positive clones, pKT25 was isolated and sequenced to identify the encoded protein and to confirm in frame fusion to the T25 domain.

Supporting Information

S1 Fig. Organisation and expression profile of the *SCO4775-4779* cluster encoding five eSTPKs involved in morphological differentiation. Schematic drawing of the *SCO4775-SCO4779* genes in *S. coelicolor* M145 (A). Sizes of intergenic regions (grey triangles) are given. Analyses of the operon structure (B) and expression profile (C) during the *S. coelicolor* life cycle. Cultures of *S. coelicolor* M145 were grown on cellophane discs on SM agar for different time periods representing distinct stages of the life cycle (indicated in C). Following RNA isolation and cDNA synthesis, the intergenic regions of *SCO4775-SCO4779* were amplified by PCR (B) using primers, indicated in the schematic drawing. The absence of a PCR product indicates that each gene is transcribed separately. 1: 24h, 2: 48h, 3: 96h, 4: 168h, D: M145 genomic DNA, M: 1kb ladder, Fermentas. Using gene specific primers (listed in [S2 Table](#)), the amounts of transcripts during the life cycle were compared by PCR. Amount of 16 S RNA served as an internal control. (EPS)

S2 Fig. Confirmation of $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ and $\text{NL}\Delta 4775-4779$ genotypes by Southern blotting and PCR analyses. Total DNA of M145 and two clones of $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ were digested with *SmaI* and hybridized with a probe corresponding to the upstream region of *pkaI*. A. Schematic drawing. The black bar indicates the probe. Only relevant *SmaI* sites (S) are given. The grey dotted line indicates the hybridising *SmaI* fragment. B. Southern blot. 1: pKO-4778, 2: M145 DNA, 3: $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ -clone 1, 4: $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ -clone 2, 5: M145 DNA, M: DigVII Standard, Roche. The sizes of the hybridising bands (arrows) are given.

Total DNA of M145 (1), $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ (2) and $\text{NL}\Delta 4775-4779$ (3) were used to amplify an internal *pkaI* fragment using primers Intern4778f/Intern4778r (Af/Ar) (C), the complete *pkaI* with 428 bp upstream and 154 bp downstream region (primers Up4778K416/Lp4778K2240; Bf/Br) (D), or the eSTPK gene cluster comprising *SCO4775-SCO4779* with primers c4775-79fw/c4775-79rev (Cf/Cr) (E). M: 1 kb ladder, Fermentas, 1: M145-DNA, 2: $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ -DNA, 3: $\text{NL}\Delta 4775-4779$ -DNA. Primer binding sites are indicated (arrows) in the schematic drawing (A). (EPS)

S3 Fig. Sporulation ability of the eSTPK mutants $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ and $\text{NL}\Delta 4775-4779$. Spores of M145 and the mutants $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ and $\text{NL}\Delta 4775-4779$ were plated on SM-agar. After 2, 3 and 7 days of incubation, photos were taken (A). While $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ is delayed in sporulation, differentiation of $\text{NL}\Delta 4775-4779$ does not visibly differ from that of M145. Genetic complementation of $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$ restored sporulation proficiency. 1: *S. coelicolor* M145, 2: $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$, 3: $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$::pSET-pkaI, 4: $\text{NL}\Delta 4775-4779$, 5: $\text{NL}\Delta 4775-4779$::pSET-pkaI. The delay in sporulation is consistent with the amount of spores that could be isolated after 3 and 7 days of incubation, respectively (B). Whereas resistance of germinating spores to lysozyme and vancomycin was not affected in $\text{NL}\Delta\text{PkaI}$, $\text{NL}\Delta 4775-4779$ spores showed an increased sensitivity (D), suggesting an

impaired spore wall. In contrast, vancomycin resistance of vegetative mycelium of NLA4775-4779 was indistinguishable from that of M145 (right panel).
(EPS)

S4 Fig. Effects of unbalancing phosphorylation activity on vancomycin and lysozyme resistance. About 10^5 spores were streaked on LB agar and serial dilutions of vancomycin and lysozyme spotted. Plates were incubated for three days at 30°C. Whereas resistance of germinating spores to lysozyme was not dramatically affected, spores of the five-fold mutant NLA4775-4779, as well as the kinase overexpressing strains (with the exception of *pkaI*) were highly sensitive to vancomycin.
(EPS)

S5 Fig. Controls for specificity of PkaI phosphorylation. *pkaI* and *mreC* of *S. coelicolor* were cloned into pCDFDUE1 under control of the T7 promoter. *crp* of *S. tsukubaensis* was inserted into pYT9 under control of the rhamnose inducible P_{rham} promoter (A). *E. coli* BL21 was co-transformed with both plasmids. Following induction of gene expression by 1 mM IPTG and 0.2% rhamnose, His-PkaI, MreC-S-tag, and CRP-Strep-tag were purified by affinity chromatography. Purified proteins were loaded to an SDS polyacrylamide gel (B) and phosphorylated proteins were identified by ProQ Diamond (Molecular Probes) staining (C). The black arrow mark phosphorylated His-PkaI and MreC-S-tag proteins, while the white arrow indicates Crp which was not phosphorylated. PkaI specifically phosphorylates MreC but does not phosphorylate Crp of *S. tsukubaensis*. 1: PkaI purified via His-tag, 2: MreC purified via S-tag, 3: Crp purified via Strep-tag from BL21 (pCDF-pkaI/pYT9-Crp), 4: Crp purified via Strep-tag from BL21 (pCDF-pkaI-MreC/pYT9-Crp).
(EPS)

S6 Fig. Lack of PBP2-S-tag expression in the absence of PkaI. Pellet and supernatant fractions of *E. coli* BL21 carrying either pCDF-PkaI or pCDF-PkaI-PBP2 were analysed for the presence of PBP2-S-tag (arrow) by immunoblotting with Anti-S-tag specific antibodies, after induction with 1 mM IPTG for 0.5 and 2 h, respectively.
(EPS)

S1 Table. Plasmids.
(DOCX)

S2 Table. Primer.
(DOCX)

S3 Table. Live-dead.
(XLSX)

S4 Table. Phosphorylated peptides.
(XLSX)

S5 Table. *S. coelicolor* interaction partners of the eSTPK PkaI.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank A. Luzhetskyy for providing the *gusA* cassette, S. Kocadinc for plasmid pYT9-CRP, M. Butter for sharing a set of eSTPK mutants of *S. coelicolor* M600 and helpful discussions, A. Latus for assistance in mutant constructions and S. Wahl, J. Madlung and I. Droste-Borel for assistance with proteomic analysis and the DFG (SFB766) for financial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NL BM WW GM. Performed the experiments: NL MF-W FH BS. Analyzed the data: NL MF-W FH BS BM WW GM. Wrote the paper: NL MF-W BM WW GM.

References

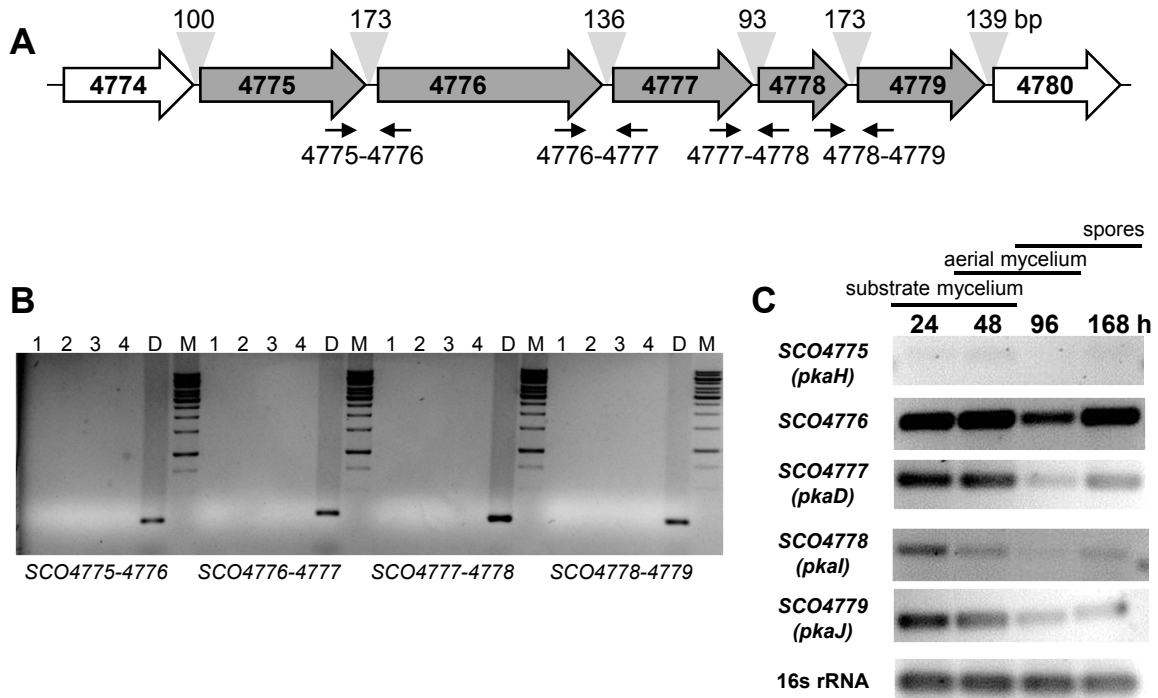
- Glauner B, Holtje JV, Schwarz U (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 10088–10095. PMID: [3292521](#)
- Schleifer KH, Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36: 407–477. PMID: [4568761](#)
- Maniloff J (1983) Evolution of wall-less prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 37: 477–499. PMID: [6195959](#)
- Brown S, Santa Maria JP Jr., Walker S (2013) Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 67: 313–336. doi: [10.1146/annurev-micro-092412-155620](#) PMID: [24024634](#)
- Chin T, Burger MM, Glaser L (1966) Synthesis of teichoic acids. VI. The formation of multiple wall polymers in *Bacillus subtilis* W-23. *Arch Biochem Biophys* 116: 358–367. PMID: [4960203](#)
- Vollmer W (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* 32: 287–306. PMID: [18070068](#)
- Cabeen MT, Charbon G, Vollmer W, Born P, Ausmees N, Weibel DB et al. (2009) Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth. *EMBO J* 28: 1208–1219. doi: [10.1038/emboj.2009.61](#) PMID: [19279668](#)
- Pinho MG, Kjos M, Veening JW (2013) How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 11: 601–614. doi: [10.1038/nrmicro3088](#) PMID: [23949602](#)
- Carballido-Lopez R, Errington J (2003) The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell* 4: 19–28. PMID: [12530960](#)
- Daniel RA, Errington J (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* 113: 767–776. PMID: [12809607](#)
- van den Ent F, Amos LA, Lowe J (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413: 39–44. PMID: [11544518](#)
- Carballido-Lopez R, Errington J (2003) A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13: 577–583. PMID: [14573351](#)
- Defeu Soufo HJ, Graumann PL (2004) Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep* 5: 789–794. PMID: [15272301](#)
- Kim SY, Gitai Z, Kinkhabwala A, Shapiro L, Moerner WE (2006) Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10929–10934. PMID: [16829583](#)
- Dominguez-Escobar J, Chastanet A, Crevenna AH, Fromion V, Wedlich-Soldner R, Carballido-Lopez R (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* 333: 225–228. doi: [10.1126/science.1203466](#) PMID: [21636744](#)
- Gamer EC, Bernard R, Wang W, Zhuang X, Rudner DZ, Mitchison T (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* 333: 222–225. doi: [10.1126/science.1203285](#) PMID: [21636745](#)
- Kawai Y, Asai K, Errington J (2009) Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 73: 719–731. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06805.x](#) PMID: [19659933](#)
- Bean GJ, Flickinger ST, Westler WM, McCully ME, Sept D, Weibel DB et al. (2009) A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry* 48: 4852–4857. doi: [10.1021/bi900014d](#) PMID: [19382805](#)
- Kruse T, Bork-Jensen J, Gerdes K (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol* 55: 78–89. PMID: [15612918](#)
- Fomstone A, Carballido-Lopez R, Noirot P, Errington J, Scheffers DJ (2008) Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 190: 1812–1821. PMID: [18156271](#)
- Mazza P, Noens EE, Schirner K, Grantcharova N, Mommaas AM, Koerten HK, et al. (2006) MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol Microbiol* 60: 838–852. PMID: [16677297](#)

22. Hempel AM, Wang SB, Letek M, Gil JA, Flardh K (2008) Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 190: 7579–7583. doi: [10.1128/JB.00839-08](https://doi.org/10.1128/JB.00839-08) PMID: [18805980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805980/)
23. Flardh K (2003) Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 49: 1523–1536. PMID: [12950918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12950918/)
24. Fuchino K, Bagchi S, Cantlay S, Sandblad L, Wu D, Bergman J, et al. (2013) Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1889–1897. doi: [10.1073/pnas.1305358110](https://doi.org/10.1073/pnas.1305358110) PMID: [23641002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23641002/)
25. Holmes NA, Walshaw J, Leggett RM, Thibessard A, Dalton KA, Gillespie MD, et al. (2013) Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E397–406. doi: [10.1073/pnas.1210657110](https://doi.org/10.1073/pnas.1210657110) PMID: [23297235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297235/)
26. Burger A, Sichler K, Kelemen G, Buttner M, Wohlleben W (2000) Identification and characterization of the mre gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* 263: 1053–1060. PMID: [10954092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10954092/)
27. Heichlinger A, Ammelburg M, Kleinschnitz EM, Latus A, Maldener I, Flardh K, et al. (2011) The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol* 193: 1533–1542. doi: [10.1128/JB.01100-10](https://doi.org/10.1128/JB.01100-10) PMID: [21257777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21257777/)
28. Kleinschnitz EM, Heichlinger A, Schirner K, Winkler J, Latus A, Maldener I, et al. (2011) Proteins encoded by the mre gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Mol Microbiol* 79: 1367–1379. doi: [10.1111/j.1365-2958.2010.07529.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07529.x) PMID: [21244527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21244527/)
29. Sigle S, Ladwig N, Wohlleben W, Muth G (2014) Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*. *Int J Med Microbiol*. 305:183–189 doi: [10.1016/j.ijmm.2014.12.014](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.014) PMID: [25595023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25595023/)
30. Petrickova K, Petricek M (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* 149: 1609–1621. PMID: [12855714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855714/)
31. Urabe H, Aoyagi N, Ogawara H, Motojima K (2008) Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 778–785. PMID: [18323658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18323658/)
32. Shi L, Zhang W (2004) Comparative analysis of eukaryotic-type protein phosphatases in two streptomycete genomes. *Microbiology* 150: 2247–2256. PMID: [15256567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256567/)
33. Cole JL (2007) Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem Sci* 32: 57–62. PMID: [17196820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17196820/)
34. Mir M, Asong J, Li X, Cardot J, Boons GJ, Husson RN (2011) The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS Pathog* 7: e1002182. doi: [10.1371/journal.ppat.1002182](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002182) PMID: [21829358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21829358/)
35. Fleurie A, Manuse S, Zhao C, Campo N, Cluzel C, Lavergne JP, et al. (2014) Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* 10: e1004275. doi: [10.1371/journal.pgen.1004275](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004275) PMID: [24722178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722178/)
36. Fiuza M, Canova MJ, Patin D, Letek M, Zanella-Cleon I, Becchi M, et al. (2008) The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* 283: 36553–36563. doi: [10.1074/jbc.M807175200](https://doi.org/10.1074/jbc.M807175200) PMID: [18974047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18974047/)
37. Jolly L, Ferrari P, Blanot D, Van Heijenoort J, Fassy F, Mengin-Lecreux D, (1999) Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 262: 202–210. PMID: [10231382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10231382/)
38. Fomstone A, Errington J (2005) A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55: 1646–1657. PMID: [15752190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752190/)
39. Huse M, Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275–282. PMID: [12015977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12015977/)
40. Pereira SF, Goss L, Dworkin J (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 192–212. doi: [10.1128/MMBR.00042-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-10) PMID: [21372323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21372323/)
41. Chandra G, Chater KF (2014) Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiol Rev* 38: 345–379. doi: [10.1111/1574-6976.12047](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12047) PMID: [24164321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24164321/)
42. Jakimowicz D, van Wezel GP (2012) Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Mol Microbiol* 85: 393–404. doi: [10.1111/j.1365-2958.2012.08107.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08107.x) PMID: [22646484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22646484/)
43. Noens EE, Mersinias V, Traag BA, Smith CP, Koerten HK, van Wezel GP (2005) SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 58: 929–944. PMID: [16262781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16262781/)

44. Grantcharova N, Ubhayasekera W, Mowbray SL, McCormick JR, Flardh K (2003) A missense mutation in *ftsZ* differentially affects vegetative and developmentally controlled cell division in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 47: 645–656. PMID: [12535067](#)
45. Molle V, Kremer L (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* 75: 1064–1077. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.07041.x](#) PMID: [20487298](#)
46. Thakur M, Chakraborti PK (2006) GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J Biol Chem* 281: 40107–40113. PMID: [17068335](#)
47. Thakur M, Chakraborti PK (2008) Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *Biochem J* 415: 27–33. doi: [10.1042/BJ20080234](#) PMID: [18557704](#)
48. Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* 19: 1692–1704. PMID: [15985609](#)
49. Soares NC, Spat P, Krug K, Macek B (2013) Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J Proteome Res* 12: 2611–2621. doi: [10.1021/pr3011843](#) PMID: [23590516](#)
50. Ravikumar V, Shi L, Krug K, Derouiche A, Jers C, Cousin C, et al. (2014) Quantitative phosphoproteome analysis of *Bacillus subtilis* reveals novel substrates of the kinase PrkC and phosphatase PrpC. *Mol Cell Proteomics* 13: 1965–1978. doi: [10.1074/mcp.M113.035949](#) PMID: [24390483](#)
51. Manteca A, Ye J, Sanchez J, Jensen ON (2011) Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *J Proteome Res* 10: 5481–5492. doi: [10.1021/pr200762y](#) PMID: [21999169](#)
52. Parker JL, Jones AM, Serazetdinova L, Saalbach G, Bibb MJ, Naldrett MJ, (2010) Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics* 10: 2486–2497. doi: [10.1002/pmic.201000090](#) PMID: [20432484](#)
53. Yague P, Rodriguez-Garcia A, Lopez-Garcia MT, Martin JF, Riomasas B, Sanchez J, et al. (2013) Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS One* 8: e60665. doi: [10.1371/journal.pone.0060665](#) PMID: [23555999](#)
54. Del Sol R, Mullins JG, Grantcharova N, Flardh K, Dyson P (2006) Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 188: 1540–1550. PMID: [16452438](#)
55. Eccleston M, Willems A, Beveridge A, Nodwell JR (2006) Critical residues and novel effects of overexpression of the *Streptomyces coelicolor* developmental protein BldB: evidence for a critical interacting partner. *J Bacteriol* 188: 8189–8195. PMID: [16963568](#)
56. Nariya H, Inouye S (2005) Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Mycococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* 58: 367–379. PMID: [16194226](#)
57. Petrickova K, Tichy P, Petricek M (2000) Cloning and characterization of the *pknA* gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2), coding for the Mn²⁺ dependent protein Ser/Thr kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 942–948. PMID: [11162454](#)
58. Sambrook JM T.; Russel D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
59. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
60. Flett F, Mersinias V, Smith CP (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 155: 223–229. PMID: [9351205](#)
61. Molle V, Leiba J, Zanella-Cleon I, Becchi M, Kremer L (2010) An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. *Proteomics* 10: 3910–3915. doi: [10.1002/pmic.201000316](#) PMID: [20925060](#)
62. Borchert N, Dieterich C, Krug K, Schutz W, Jung S, Nordheim A, et al. (2010) Proteogenomics of *Pristionchus pacificus* reveals distinct proteome structure of nematode models. *Genome Res* 20: 837–846. doi: [10.1101/gr.103119.109](#) PMID: [20237107](#)

63. Conzelmann M, Williams EA, Krug K, Franz-Wachtel M, Macek B, Jekely G, (2013) The neuropeptide complement of the marine annelid *Platynereis dumerilii*. BMC Genomics 14: 906. doi: [10.1186/1471-2164-14-906](https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-906) PMID: [24359412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24359412/)
64. Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol 26: 1367–1372. doi: [10.1038/nbt.1511](https://doi.org/10.1038/nbt.1511) PMID: [19029910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029910/)
65. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M., (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. J Proteome Res 10: 1794–1805. doi: [10.1021/pr101065j](https://doi.org/10.1021/pr101065j) PMID: [21254760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21254760/)
66. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 5752–5756. PMID: [9576956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9576956/)

Figure S1



Schematic drawing of the *SCO4775-SCO4779* genes in *S. coelicolor* M145 (A). Sizes of intergenic regions (grey triangles) are given. Analyses of the operon structure (B) and expression profile (C) during the *S. coelicolor* life cycle. Cultures of *S. coelicolor* M145 were grown on cellophane discs on SM agar for different time periods representing distinct stages of the life cycle (indicated in C). Following RNA isolation and cDNA synthesis, the intergenic regions of *SCO4775-SCO4779* were amplified by PCR (B) using primers, indicated in the schematic drawing. The absence of a PCR product indicates that each gene is transcribed separately. 1. 24h, 2: 48h, 3: 96h, 4: 168h, D: M145 genomic DNA, M: 1kb ladder, Fermentas. Using gene specific primers (listed in S2 Table), the amounts of transcripts during the life cycle were compared by PCR. Amount of 16 S RNA served as an internal control.

Table S1. Plasmids used in this study

Name	Characteristics	Source
pCDF-Duet1	2x P _{T7} , <i>aad</i> , simultaneous expression of two proteins	Novagen
pKT18	Cloning vector, <i>aphII</i>	Pridmore, 1987
pGUS21	Cloning vector, <i>aac(3)IV</i> , <i>gusA</i>	Muth, unpublished
pKO4778	pKT18 derivative, deletion vector for <i>SCO4778</i> , <i>aphII</i>	Present study
pGus-KO4775-4779	pGus21 derivative, deletion vector for <i>SCO4775-4779</i> , <i>aac(3)IV</i>	Present study

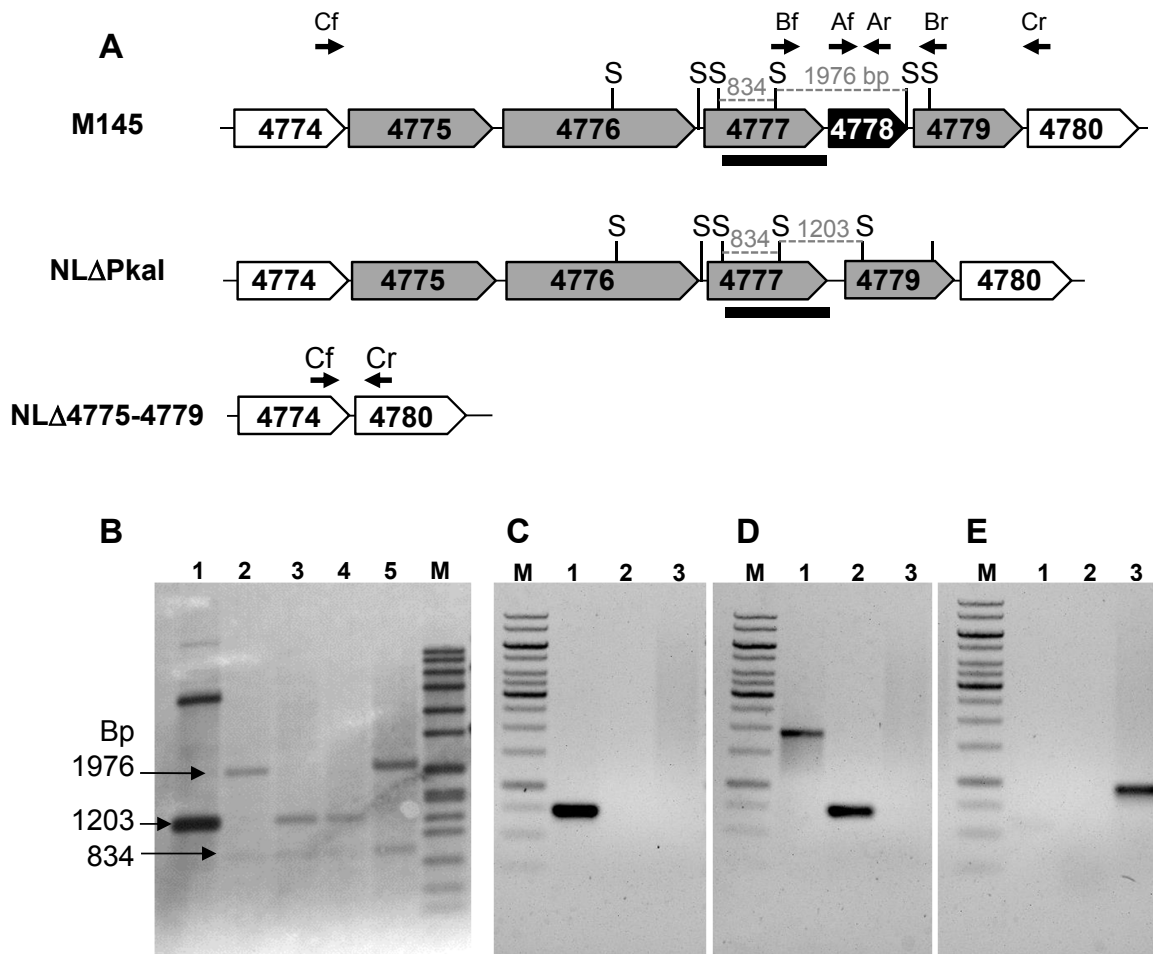
pSET152	Cloning vector, <i>aac(3)IV</i> , integrative, Φ C31 <i>attP</i>	Bierman et al., 1992
pSET-pkaH	<i>pkaH</i> complementation plasmid	Present study
pSET-4776	<i>SCO4776</i> complementation plasmid	Present study
pSET-pkaD	<i>pkaD</i> complementation plasmid	Present study
pSET-pkaI	<i>pkaI</i> complementation plasmid	Present study
pSET-pkaJ	<i>pkaJ</i> complementation plasmid	Present study
pCDF-PkaI	<i>pkaI</i> N-terminal His-tag	Present study
pCDF-PkaI-MreC	<i>pkaI</i> N-terminal His-tag, <i>mreC</i> C-terminal S-tag	Present study
pCDF-MreC	<i>mreC</i> C-terminal S-tag	Present study
pCDF-PBP2	<i>pbp2</i> C-terminal S-tag	Present study
pCDF-PkaI-PBP2	<i>pkaI</i> N-terminal His-tag, <i>pbp2</i> C-terminal S-tag	Present study
pYT9-Crp	STSU_15619 n-terminal Strep-tag II, P_{Rham} , <i>bla</i>	S. Kocadinc, pers. communication
pUT18c	<i>bla</i> , <i>cya</i> -T18	Karimova et al., 1998
pUT18c-4778	<i>bla</i> , <i>cya</i> -T18, <i>SCO4778</i>	Present study
pUT18c-4778 ₂₅₇₋₃₈₀	<i>bla</i> , <i>cya</i> -T18, <i>SCO4778</i> ₂₅₇₋₃₈₀	Present study

Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Nagaraja-Rao R, Schonert BE. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**: 43-49.

Pridmore RD. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**, 309-312.

Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.

Figure S2



Total DNA of M145 and two clones of NLΔPkaI were digested with Smal and hybridized with a probe corresponding to the upstream region of *pkaI*. **A**. Schematic drawing. The black bar indicates the probe. Only relevant Smal sites (S) are given. The grey dotted line indicates the hybridizing Smal fragment. **B**. Southern blot. 1: pKO-4778, 2: M145 DNA, 3: NLΔPkaI-clone 1, 4: NL-PkaI-clone 2, 5: M145 DNA, M: DigVII Standard, Roche. The sizes of the hybridizing bands (arrows) are given. Total DNA of M145 (1), NLΔPkaI (2) and NLΔ4775_4779 (3) were used to amplify an internal *pkaI* fragment using primers Intern4778f/Intern4778r (Af/Ar) (**C**), the complete *pkaI* with 428 bp upstream and 154 bp downstream region (primers Up4778K416/Lp4778K2240; Bf/Br) (**D**), or the eSTPK gene cluster comprising *SCO4775-SCO4779* with primers c4775-79fw/c4775-79rev (Cf/Cr) (**E**). M: 1 kb ladder, Fermentas, 1: M145-DNA, 2: NLΔPkaI-DNA, 3: NLΔ4775-4779-DNA. Primer binding sites are indicated (arrows) in the schematic drawing (**A**).

Table S2. Primers* used in this study

Name	Sequence	Application
Intern4778f	TCATCGTTCGTGCACGA	Control <i>pkaI</i> deletion
Intern4778r	ATCTCCTCGGTGACCA	
Up4778K416	CTCTACCTGCCCGAGAACTG	
Lo4778K2240	GGTTGCAGGTCAAACCTCGT	

5. Anhang

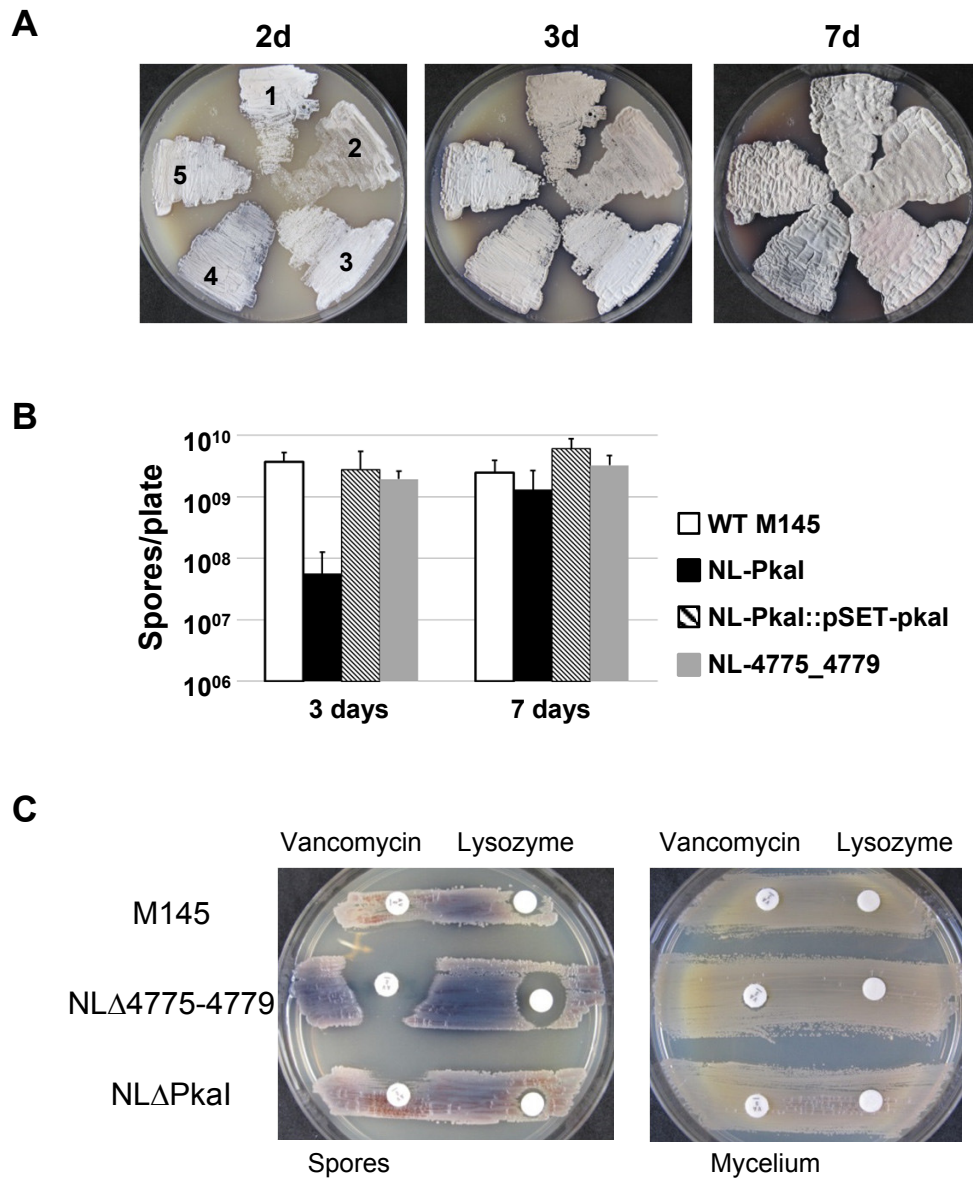
Up4778fwE	CCGAATTCGATTGTGATGGAGCTG	<i>pkaI</i> deletion
Up4778revB	AAGGATCCCATCATGCCCCACCGG	
lo4778fwB	GCGGATCCTAACGCGGAGATAAGC	
lo4778revH	GGAAGCTTAGACGACCGTGTTCTC	
c4775-79fw	TCGGGTGAGGGACAATGAAG	Control <i>SCO4775-4779</i> deletion
c4775-79rev	AGCACGACCTGGAAGACCTC	
Up4775Ef	AAGAATTCGGA CTGCTTCTGGAAC	<i>SCO4775-4779</i> deletion
Up4775Br	CCGGATCCCATGCGTCCCCTCAT	
Lo4779Bf	GGGGATCCAATCTGGACATCGACG	
Lo4779Hr	AAAAGCTTCTCGTTGATGTTGACG	
4778DuUpBg	CCAGATCTGATGGGGCGCATGGTGA	
4778DuLoH	GGAAGCTTGACGCACGATGCCGC	Expression of <i>PkaI</i>
PBP2DuUpN	AACATATGACCAACATCCCCGAGAC	Expression of <i>PBP2</i>
PBP2DuLoX	AACTCGAGTACGCGTGCCCTCCG	
MreCDuUpN	GGCATATGAGGGACACGAAAGAGAGC	Expression of <i>MreC</i>
MreCDuLoK	AAGGTACCCGGCTCGGGCTGCTCGTTCT	
pSet4775fwXbal	GGTCTAGAGAGATCGAGCACTACGAGAAG	Expression of <i>pkaH</i> in M145 and $NL\Delta 4775-4779$
pSet4775revEco	TTGAATTC GCAACCACTCACGATAC	
pSet4776fwXbal	GGTCTAGACTTCGAACCCAAGTCCTGAG	Expression of <i>SCO4776</i> in M145 and $NL\Delta 4775-4779$
pSet4776revEco	TTGAATTCCTTGTCAGGGTCAGACTAGG	
pSet4777fwXbal	GGTCTAGATCGGCCACCTACCAGTACAC	Expression of <i>pkaD</i> in M145 and $NL\Delta 4775-4779$
pSet4777revEco	TTGAATTCGTT CAGCCGGTCTCCTCCT	
Up4778XSet	GGTCTAGAGTACGCCCTCAACATGAC	Expression of <i>pkaI</i> in M145, Complementation of $NL\Delta PkaI$
Lo4778ESet	GGGAATTCATGCCGTTATCTCCC	
pSet4779fwXbal	GGTCTAGACGGTACGCCGACCAGTTC	Expression of <i>pkaJ</i> in M145 and $NL\Delta 4775-4779$
pSet4779revEco	TTGAATTC TGAGCCG CAGGGTATGAC	
RT4775fw	ACATCCCGTACGGACAAGAG	RT-PCR
RT4775re	GACGAGTTCCATCACGATCC	
RT4776fw	CGAGTACGAACTCACCGAGA	RT-PCR
RT4776re	CGAAGACGTCGAAGACCTG	
RT4777fw	GGATTGTGATGGAGCTGGTC	RT-PCR
RT4777re	GATGCCGAAGTCGGTGAG	
RT4778fw	GCGTACATGGTCATGGA ACT	RT-PCR
RT4778re	GGTGTACTCGGGGGAACC	
RT4779fw	TGGATCGTGATGGA ACTCGT	RT-PCR
RT4779re	GTGTCGGTCAGGCTGGTC	

5. Anhang

RT-in75+76.fw	CTTCGAACCCAAGTCCTGAG	RT-PCR
RT-in75+76.rev	GGGTCTCGGTGAGTTCGTA	
RT-in76+77.fw	TCGGCCACCTACCAGTACAC	RT-PCR
RT-in76+77.rev	GCGGTCAACTCCTTGATGG	
RT-in77+78.fw	GTCGAGTACGCCCTCAACAT	RT-PCR
RT-in77+78.rev	GCTCATGGAGCCGGTAAC	
RT-in78+79.fw	GGCACCTAAACGGGAGATAA	RT-PCR
RT-in78+79.rev	GTACGACCTGGGTCGGTGT	
2H4778fwX	<i>ACTCTAGAGCGCATGGTGACCGAG</i>	BTH
2H4778revE	<i>ATGAATTC</i> CCGTTTAGGTGCCGT	BTH
2H4778.257fwX	<i>ACTCTAGACCTGCTGGAGCGCGATC</i>	BTH

*Restriction sites indicated in italics

Figure S3



Spores of M145 and the mutants NLΔPkal and NLΔ4775–4779 were plated on SM-agar. After 2, 3 and 7 days of incubation, photos were taken (**A**). While NLΔPkal is delayed in sporulation, differentiation of NLΔ4775–4779 does not visibly differ from that of M145. Genetic complementation of NLΔPkal restored sporulation proficiency. 1: *S. coelicolor* M145, 2: NLΔPkal, 3: NLΔPkal::pSET-pkal, 4: NLΔ4775–4779, 5: NLΔ4775–4779::pSET-pkal. The delay in sporulation is consistent with the amount of spores that could be isolated after 3 and 7 days of incubation, respectively (**B**). Whereas resistance of germinating spores to lysozyme and vancomycin was not affected in NLΔPkal, NLΔ4775–4779 spores showed an increased sensitivity (**D**), suggesting an impaired spore wall. In contrast, vancomycin resistance of vegetative mycelium of NLΔ4775–4779 was indistinguishable from that of M145 (right panel).

Table S3 Results of Live/Dead Staining

Strain	M145	%	M145+4775	%	M145+4776	%	M145+4777	%	M145+4778	%	M145+4779	%
Alive (green)	984	99,29%	1076	72,31%	939	85,05%	422	59,69%	1473	85,39%	412	42,56%
Dead (red)	7	0,71%	409	27,49%	151	13,68%	260	36,78%	181	10,49%	538	55,58%
Without DNA			3	0,20%	14	1,27%	25	3,54%	71	4,12%	18	1,86%
Total	991		1488		1104		707		1725		968	
Strain	NL-Pkal	%	NL-Pkal+4775	%	NL-Pkal+4776	%	NL-Pkal+4777	%	NL-Pkal+4778	%	NL-Pkal+4779	%
Alive (green)	1539	92,99%	1466	95,32%	1179	91,75%	1461	95,74%	1547	93,99%	957	93,64%
Dead (red)	71	4,29%	52	3,38%	42	3,27%	39	2,56%	70	4,25%	43	4,21%
Without DNA	45	2,72%	20	1,30%	64	4,98%	26	1,70%	29	1,76%	22	2,15%
Total	1655		1538		1285		1526		1646		1022	
Strain	NL-4775-9	%	NL-4775-9+4775	%	NL-4775-9+4776	%	NL-4775-9+4777	%	NL-4775-9+4778	%	NL-4775-9+4779	%
Alive (green)	1485	82,13%	701	89,99%	1023	80,42%	1540	90,38%	1032	87,61%	1025	87,01%
Dead (red)	304	16,81%	50	6,42%	157	12,34%	116	6,81%	54	4,58%	99	8,40%
Without DNA	19	1,05%	28	3,59%	92	7,23%	48	2,82%	92	7,81%	54	4,58%
Total	1808		779		1272		1704		1178		1178	

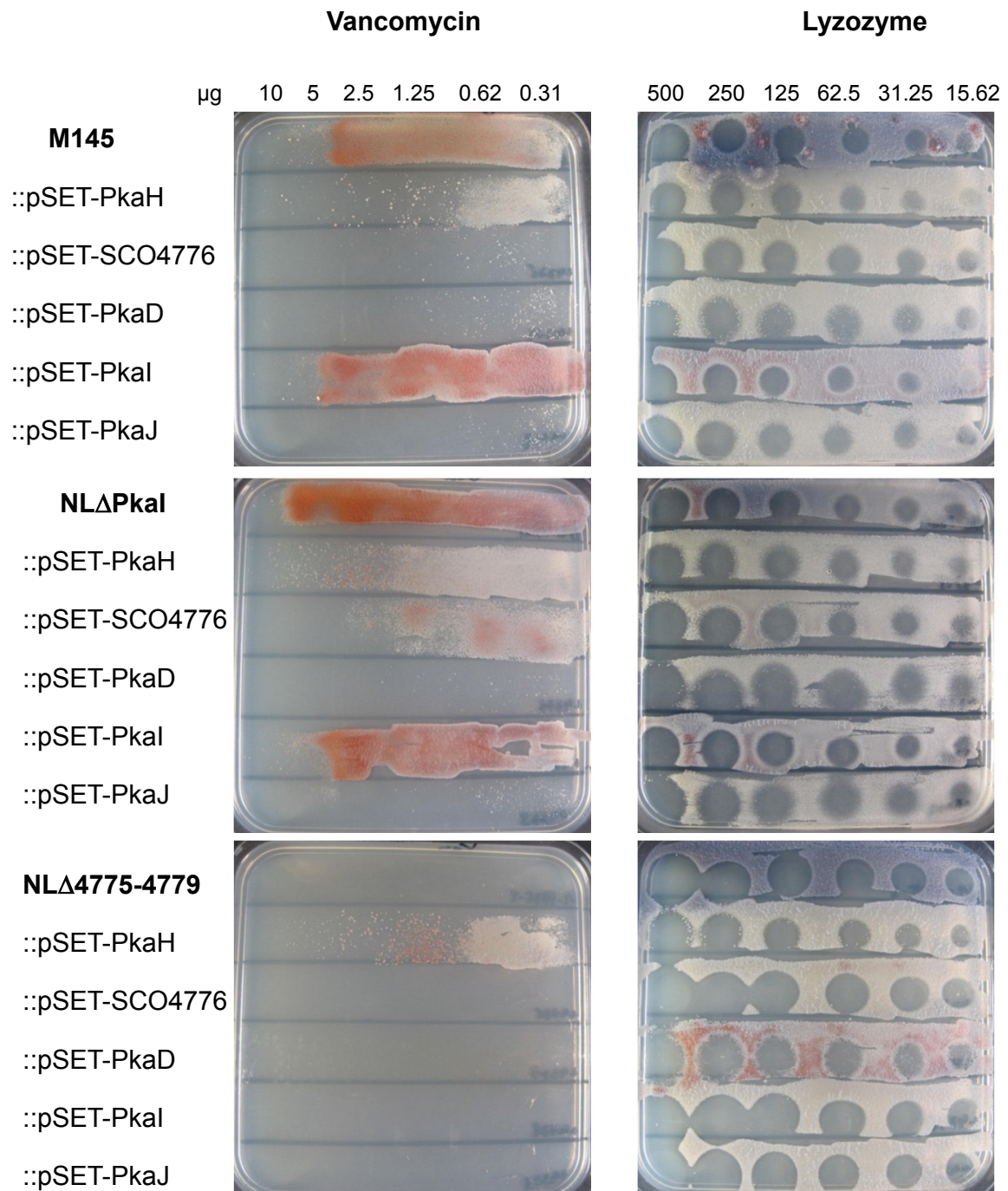
5. Anhang

Strain	M145	M145+4775	M145+4776	M145+4777	M145+4778	M145+4779
Alive (green)	984	1076	939	422	1473	412
Dead (red)	7	409	151	260	181	538
Without DNA		3	14	25	71	18
Total	991	1488	1104	707	1725	968

Strain	NL-Pkal	NL-Pkal+4775	NL-Pkal+4776	NL-Pkal+4777	NL-Pkal+4778	NL-Pkal+4779
Alive (green)	1539	1466	1179	1461	1547	957
Dead (red)	71	52	42	39	70	43
Without DNA	45	20	64	26	29	22
Total	1655	1538	1285	1526	1646	1022

Strain	NL-4775-9	NL-4775-9+4775	NL-4775-9+4776	NL-4775-9+4777	NL-4775-9+4778	NL-4775-9+4779
Alive (green)	1485	701	1023	1540	1032	1025
Dead (red)	304	50	157	116	54	99
Without DNA	19	28	92	48	92	54
Total	1808	779	1272	1704	1178	1178

Figure S4



About 10^5 spores were streaked on LB agar and serial dilutions of vancomycin and lysozyme spotted. Plates were incubated for three days at 30°C. Whereas resistance of germinating spores to lysozyme was not dramatically affected, spores of the five-fold mutant NLΔ4775–4779, as well as the kinase overexpressing strains (with the exception of *pkaI*) were highly sensitive to vancomycin.

Table S4 Phosphorylated peptides

MreC

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Intensity R11GluC	Intensity R11trypsin	Ratio (Intensities)
AKLGS DER	Unmodified	seq1_mrec	10968000	0	10968000	19,68
AKLGS DER	Phospho (STY)	seq1_mrec	557210	0	557210	
DMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M)	seq1_mrec	19382000000	0	19382000000	4,91
DMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq1_mrec	3943800000	0	3943800000	
DMTVLNGDGLVGR	Unmodified	seq1_mrec	719050000	0	719050000	0,45
DMTVLNGDGLVGR	Phospho (STY)	seq1_mrec	1594400000	0	1594400000	
DMTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDP DFTVGR	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq1_mrec	2611100	0	2611100	
DPRD TVLPEK	Phospho (STY)	seq1_mrec	238150000	0	238150000	
DPRD TVLPEK	Unmodified	seq1_mrec	33250000	0	33250000	0,08
DPRD TVLPEK	Phospho (STY)	seq1_mrec	159720000	0	159720000	
DSGDRHRLAR	Unmodified	seq1_mrec	675710	0	675710	
DSPVDGARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	18344000	18344000	0	
DTVLP EK	Unmodified	seq1_mrec	33695000000	0	33695000000	10,92
DTVLP EK	Phospho (STY)	seq1_mrec	750690000	0	750690000	
DTVLP EK	Unmodified	seq1_mrec	11057000000	0	11057000000	
DTVLP EK	Phospho (STY)	seq1_mrec	3347000000	0	3347000000	
ELGFASGQGSRLRVE	Unmodified	seq1_mrec	8949000	8949000	0	8,03
ELGFASGQGSRLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1114800	1114800	0	
FTVGRME	Oxidation (M)	seq1_mrec	26250000	26250000	0	
FTVGRMESGDE	Oxidation (M)	seq1_mrec	28164000	28164000	0	
GARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	21439000	21439000	0	
GARQAAANVFGPIENGVS AVDPVGN AVSAVRD	Unmodified	seq1_mrec	2801300	2801300	0	
GDRLVTFGSQADKPFVPGVPGTITR	Unmodified	seq1_mrec	70251000	0	70251000	
GGEDSPVDGAR	Unmodified	seq1_mrec	53541000000	0	53541000000	1306,42
GGEDSPVDGAR	Phospho (STY)	seq1_mrec	40983000	0	40983000	
GLVGRVTVGPNTATVLLANDP DFTVGRME	Oxidation (M)	seq1_mrec	6628700	6628700	0	
ILDVTPFVSFTK	Unmodified	seq1_mrec	50582000000	0	50582000000	3,19
ILDVTPFVSFTK	Phospho (STY)	seq1_mrec	15853000000	0	15853000000	
ILDVTPFVSFTK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	742070000	0	742070000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSK	Unmodified	seq1_mrec	1257300000	0	1257300000	3,70
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSK	Phospho (STY)	seq1_mrec	339480000	0	339480000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	156480000	0	156480000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPR	Unmodified	seq1_mrec	3093100000	0	3093100000	0,54
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPR	Phospho (STY)	seq1_mrec	5767800000	0	5767800000	
ILDVTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	1928300000	0	1928300000	
IVGVVQAPSKDPRD	Unmodified	seq1_mrec	6076700	6076700	0	50,79
IVGVVQAPSKDPRD TVLPE	Unmodified	seq1_mrec	789080000	789080000	0	
IVGVVQAPSKDPRD TVLPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	14529000	14529000	0	
IVGVVQAPSKDPRD TVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5414600	5414600	0	
IVGVVQAPSKDPRD TVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1125500	1125500	0	
IVGVVQAPSKDPRD TVLPEKKQPKPTPTVTVTPGADPE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	726790	726790	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	Unmodified	seq1_mrec	388010000	388010000	0	3,20
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	121220000	121220000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	72867000	72867000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	4191600	4191600	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	Unmodified	seq1_mrec	62066000	62066000	0	1,08
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	Phospho (STY)	seq1_mrec	57682000	57682000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	210650000	210650000	0	
KKQPKPTPTVTVTPGADPEGQTRNDE	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	8314100	8314100	0	
KPFVPGVPGTITRVDPNNGDLTRILD	Unmodified	seq1_mrec	7952200	7952200	0	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	4362400000	0	4362400000	1,02
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	4260100000	0	4260100000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	1114000000	0	1114000000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	1390100000	0	1390100000	
KQPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	10675000	0	10675000	
LARLETENAALK	Unmodified	seq1_mrec	7962700	0	7962700	
LDIVGVVQAPSK	Unmodified	seq1_mrec	21186000000	0	21186000000	4293,35
LDIVGVVQAPSKDPR	Unmodified	seq1_mrec	28209000000	0	28209000000	
LDIVGVVQAPSKDPR	Phospho (STY)	seq1_mrec	11505000	0	11505000	
LDIVGVVQAPSKDPRD TVLPEK	Unmodified	seq1_mrec	294700000	0	294700000	0,35
LDIVGVVQAPSKDPRD TVLPEK	Phospho (STY)	seq1_mrec	852480000	0	852480000	
LETENAALK	Unmodified	seq1_mrec	65067000000	0	65067000000	5,07
LETENAALK	Phospho (STY)	seq1_mrec	12897000000	0	12897000000	
LETENAALKAK	Unmodified	seq1_mrec	363550000	0	363550000	
LG FASGQGSRLRVE	Unmodified	seq1_mrec	1751800000	1751800000	0	1,56
LG FASGQGSRLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	1121200000	1121200000	0	
LG FASGQGSRLRVE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	107980000	107980000	0	
LKQFDKMLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	6457500	0	6457500	
LLNGKAD	Unmodified	seq1_mrec	2603800	2603800	0	
LLNGKADVKKGD	Unmodified	seq1_mrec	103070000	103070000	0	
LLNGKADVKKGDRLVTFGSQAD	Unmodified	seq1_mrec	123360000	123360000	0	
LVTFGSQADK	Unmodified	seq1_mrec	2326900000	0	2326900000	12,81
LVTFGSQADK	Phospho (STY)	seq1_mrec	181650000	0	181650000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITR	Unmodified	seq1_mrec	71456000000	0	71456000000	2,25
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITR	Phospho (STY)	seq1_mrec	31798000000	0	31798000000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5112400000	0	5112400000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	454840000	0	454840000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITRVDPNNGDLTR	Unmodified	seq1_mrec	21528000	0	21528000	0,01
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITRVDPNNGDLTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	3204400000	0	3204400000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITRVDPNNGDLTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	1086500000	0	1086500000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITRVDPNNGDLTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	1322700000	0	1322700000	
LVTFGSQADKPFVPGVPGVGTITRVDPNNGDLTR	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	69356000	0	69356000	

5. Anhang

MESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M)	seq1_mrec	44467000000	0	44467000000	84,38
MESGDELGFASGQGSR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	526990000	0	526990000	
MESGDELGFASGQGSR	Unmodified	seq1_mrec	16263000000	0	16263000000	105,04
MESGDELGFASGQGSR	Phospho (STY)	seq1_mrec	154830000	0	154830000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M)	seq1_mrec	24130000000	0	24130000000	3,66
MESGDELGFASGQGSRPLR	Unmodified	seq1_mrec	60256000000	0	60256000000	8,19
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	65961000000	0	65961000000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Phospho (STY)	seq1_mrec	7352900000	0	7352900000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	4573200000	0	4573200000	
MESGDELGFASGQGSRPLR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	351610000	0	351610000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M)	seq1_mrec	2507500000	0	2507500000	0,91
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	2748000000	0	2748000000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	306860000	0	306860000	
MESGDELGFASGQGSRPLRVELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	139910000	0	139910000	
MLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	55779000000	0	55779000000	
MLGLAGAGQYGIK	Unmodified	seq1_mrec	17507000000	0	17507000000	
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGRME	2 Oxidation (M)	seq1_mrec	304450000	304450000	0	6,32
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGRME	2 Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	48210000	48210000	0	
MTVLNGDGLVGRVTVGPNTATVLLANDPFTVGRME	2 Oxidation (M),2 Phospho (STY)	seq1_mrec	429320	429320	0	
NAALKAKLGSDE	Unmodified	seq1_mrec	2189900000	2189900000	0	309,47
NAALKAKLGSDE	Unmodified	seq1_mrec	3830700000	3830700000	0	
NAALKAKLGSDE	Phospho (STY)	seq1_mrec	130860000	130860000	0	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGK	Unmodified	seq1_mrec	48981000000	0	48981000000	18,07
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGK	Phospho (STY)	seq1_mrec	2709900000	0	2709900000	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	Unmodified	seq1_mrec	7094000000	0	7094000000	1,87
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	Phospho (STY)	seq1_mrec	3789400000	0	3789400000	
NDEAGQDEAAGQNDATGQNDQTEQQNEQPEPGLTESGKETAATAAK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	420830000	0	420830000	
NGVSSAVDPVGNVAVSRVD	Unmodified	seq1_mrec	1265700000	1265700000	0	25,07
NGVSSAVDPVGNVAVSRVD	Phospho (STY)	seq1_mrec	504890000	504890000	0	
PFVPGVPVGTITR	Unmodified	seq1_mrec	729120000	0	729120000	3,08
PFVPGVPVGTITR	Phospho (STY)	seq1_mrec	2369000000	0	2369000000	
PFVPGVPVGTITRDPNGGDLTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	763560000	0	763560000	
PFVPGVPVGTITRDPNGGDLTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	334920000	0	334920000	
PLRVELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	4449200000	0	4449200000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	53261000000	0	53261000000	1,87
PTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	28420000000	0	28420000000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	27237000000	0	27237000000	
PTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	992840000	0	992840000	
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVD	Unmodified	seq1_mrec	209150000000	0	209150000000	3,39
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVD	Phospho (STY)	seq1_mrec	61762000000	0	61762000000	
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVD	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	588970000	0	588970000	
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVDSGDR	Unmodified	seq1_mrec	2538100000	0	2538100000	22,67
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVDSGDR	Phospho (STY)	seq1_mrec	111980000	0	111980000	
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVDSGDRHDR	Unmodified	seq1_mrec	3141300000	0	3141300000	1,46
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVDSGDRHDR	Phospho (STY)	seq1_mrec	2149000000	0	2149000000	
QAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVDSGDRHDR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	800650000	0	800650000	
QFDKMLGLAGAGQYGIK	Oxidation (M)	seq1_mrec	2481700000	0	2481700000	
QHMDSSSTAA	Oxidation (M)	seq1_mrec	144710000	0	144710000	
QHMDSSSTAA	Unmodified	seq1_mrec	321690000	0	321690000	13,99
QHMDSSSTAA	Phospho (STY)	seq1_mrec	229940000	0	229940000	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Unmodified	seq1_mrec	132310000000	0	132310000000	1,46
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	212550000000	0	212550000000	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	90829000000	0	90829000000	
QPKPTPTVTVTPGADPEGQTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	116350000000	0	116350000000	
QQNEQPEPGLTE	Unmodified	seq1_mrec	752520000	752520000	0	60,54
QQNEQPEPGLTE	Phospho (STY)	seq1_mrec	124310000	124310000	0	
QTEQQNEQPEPGLTE	Unmodified	seq1_mrec	503040000	503040000	0	
RDMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M)	seq1_mrec	23690000000	0	23690000000	0,89
RDMTVLNGDGLVGR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	26706000000	0	26706000000	
RDMTVLNGDGLVGR	Unmodified	seq1_mrec	44908000000	0	44908000000	12,93
RDMTVLNGDGLVGR	Phospho (STY)	seq1_mrec	347260000	0	347260000	
RGRSRLKQFD	Unmodified	seq1_mrec	188630000	188630000	0	
RHDRLARLE	Unmodified	seq1_mrec	2692800000	2692800000	0	
RHDRLARLETE	Unmodified	seq1_mrec	167940000	167940000	0	
RLARLETE	Unmodified	seq1_mrec	896150000	896150000	0	
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRDPNGGDLTRILD	Unmodified	seq1_mrec	232100000	232100000	0	0,17
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRDPNGGDLTRILD	Phospho (STY)	seq1_mrec	132850000	132850000	0	
RLVTFGSQADKPFVPGVPVGTITRDPNGGDLTRILD	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	320350000	320350000	0	
RQHMDSSSTAA	Oxidation (M)	seq1_mrec	317550000	317550000	0	
RQHMDSSSTAA	Unmodified	seq1_mrec	577200000	577200000	0	
SGDELGFASGQGSRPLRVE	Unmodified	seq1_mrec	20598000000	20598000000	0	3,39
SGDELGFASGQGSRPLRVE	Phospho (STY)	seq1_mrec	608140000	608140000	0	
SGDELGFASGQGSRPLRVE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	388400000	388400000	0	
SGDRHDLARLE	Unmodified	seq1_mrec	6772400000	6772400000	0	
SGKETAALKFE	Unmodified	seq1_mrec	147760000	147760000	0	0,02
SGKETAALKFE	Phospho (STY)	seq1_mrec	8168200000	8168200000	0	
SPVDGARQAAANVFGPIE	Unmodified	seq1_mrec	217110000	217110000	0	
SPVDGARQAAANVFGPIENGSSAVDPVGNVAVSRVD	Unmodified	seq1_mrec	121920000	121920000	0	
SRLKQFDK	Unmodified	seq1_mrec	289110000	0	289110000	
TAAAKFE	Unmodified	seq1_mrec	4159800000	4159800000	0	
TAAAKFERQHMDSSSTAA	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq1_mrec	137060000	137060000	0	
TENAALKAKLGSDE	Unmodified	seq1_mrec	1365600000	1365600000	0	60,41
TENAALKAKLGSDE	Phospho (STY)	seq1_mrec	226050000	226050000	0	

5. Anhang

VDPNGGDLTR	Unmodified	seq1_mrec	2954400000	0	2954400000	1,53
VDPNGGDLTRLDVTPFVSFTK	Phospho (STY)	seq1_mrec	1933700000	0	1933700000	
VDPNGGDLTRILDVTPFVSFTK	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	2109800000	0	2109800000	
VELLNGK	Unmodified	seq1_mrec	31222000000	0	31222000000	
VELLNGKADV	Unmodified	seq1_mrec	48678000	0	48678000	
VELLNGKADV	Unmodified	seq1_mrec	0	0	0	
VTPFVSFTKLD	Unmodified	seq1_mrec	1062300000	1062300000	0	965,11
VTPFVSFTKLD	Phospho (STY)	seq1_mrec	1100700	1100700	0	
VTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPRD	Unmodified	seq1_mrec	13583000	13583000	0	
VTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPRDVLPE	Unmodified	seq1_mrec	329830000	329830000	0	4,26
VTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPRDVLPE	Phospho (STY)	seq1_mrec	77512000	77512000	0	
VTPFVSFTKLDIVGVVQAPSKDPRDVLPE	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	20355000	20355000	0	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTR	Unmodified	seq1_mrec	25782000000	0	25782000000	2,30
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTR	Phospho (STY)	seq1_mrec	11210000000	0	11210000000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTR	2 Phospho (STY)	seq1_mrec	5787700000	0	5787700000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTR	3 Phospho (STY)	seq1_mrec	806560000	0	806560000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGS	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq1_mrec	156810000	0	156810000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGS	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq1_mrec	282050000	0	282050000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGS	Oxidation (M), 3 Phospho (STY)	seq1_mrec	276480000	0	276480000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGS	Oxidation (M), 4 Phospho (STY)	seq1_mrec	84469000	0	84469000	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGS	4 Phospho (STY)	seq1_mrec	707450	0	707450	
VTTVGPNTATVLLANDPFTVTRMESGDELGFASGQGSRPLR	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq1_mrec	10074000	0	10074000	

Pkal

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Intensity R11GluC	Intensity R11trypsin	Ratio (Intensities)
AARIGVALLD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	165170000	165170000	0	
AARIGVALLDALD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	136320000	136320000	0	
AARIGVALLDALDTAHASGILHRD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	111090000	111090000	0	
AASAQRMLRAFLSTGRTPATPEE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	152430000	152430000	0	
AFLSTGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	27671000000	0	27671000000	16,26
AFLSTGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1702100000	0	1702100000	
AFLSTGRTPATPEEATAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1552400000	0	1552400000	
AFLSTGRTPATPEEATAARPLR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	703170000	0	703170000	
AFLSTGRTPATPEEATAARPLR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	174220000	0	174220000	
ALDTAHASGILHRD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	6544200	6544200	0	
ALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	54094000000	0	54094000000	6,57
ALPLDELSAAEAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	8234900000	0	8234900000	
ALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	113070000	0	113070000	0,06
ALPLDELSAAEAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	178880000	0	178880000	
ARAVAQRLRHPHIVVHDVVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	162180000	162180000	0	
ARAVAQRLRHPHIVVHDVVED	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	894950	894950	0	
ATDQLLAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	29324000000	0	29324000000	35,47
ATDQLLAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	826800000	0	826800000	
AYMVMEVDGGSLADR	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	29425000000	0	29425000000	114,87
AYMVMEVDGGSLADR	2 Oxidation (M), Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	256170000	0	256170000	
AYMVMEVDGGSLADR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	45521000000	0	45521000000	
AYMVMEVDGGSLADR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	760730000	0	760730000	
DDGRAYMME	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	29798000	29798000	0	
DGRAYMME	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	5523000	5523000	0	
DSLGGVLHAVVTEIR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	9833100	0	9833100	
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	25496000000	0	25496000000	1,57
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	16274000000	0	16274000000	
DSLGGVLHAVVTEIRPPAQAGPLPVVR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	352820000	0	352820000	
DVKPSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	36202000000	0	36202000000	2021,33
DVKPSNVLVADDGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	17910000	0	17910000	
EIRPPAQAGPLPVVRGLLE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4965400	4965400	0	
EVAVKALPLDELSAAEAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	328210000	0	328210000	
FGVAQVAGATTLE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	6939000	6939000	0	
FGVAQVAGATTLE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	0	0	0	0,00
GAGGRVIAGRYRLHE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1137300000	1137300000	0	
GGMGIVWR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	15893000000	0	15893000000	
GGMGIVWR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4895000000	0	4895000000	
GGSLADRVLTRGPVDAVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	69179000	69179000	0	
GLLERDPR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11262000000	0	11262000000	
GPVDAVEAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	44622000000	0	44622000000	
HPHVIVVHDVVEDDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	11160000000	0	11160000000	
HPHVIVVHDVVEDDGRAYMMEVDGGSLADR	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	23361000	0	23361000	
IGVALLDALDTAHASGILHR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	35064000000	0	35064000000	17,82
IGVALLDALDTAHASGILHR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1967500000	0	1967500000	
IGVALLDALDTAHASGILHR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	116010000	0	116010000	
IGVALLDALDTAHASGILHRDVKPSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	110000000	0	110000000	
IRPPAQAGPLPVVRGLLE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	192030000	192030000	0	
LDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	729650000	0	729650000	20,11
LDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	36283000	0	36283000	
LMGRMVTE	2 Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	11580000	11580000	0	
LVDDGGSLADRVLTRGPVD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	36758000	36758000	0	
MVTEGAGGR	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	600020000	0	600020000	10,19
MVTEGAGGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	58879000	0	58879000	
MVTEGAGGR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	143220000	0	143220000	
PSNVLVADDGR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1269200000	0	1269200000	

5. Anhang

RLDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	3671900000	0	3671900000	44,19
RLDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	83097000	0	83097000	
RLGRGGMGIVWRATDQLLARE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	208770000	208770000	0	34,13
RLGRGGMGIVWRATDQLLARE	Oxidation (M),Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	6117700	6117700	0	
RRLDAASAQR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	154620000	0	154620000	34,34
RRLDAASAQR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	4502900	0	4502900	
RVLTRGPVDAVE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	26295000	26295000	0	
SGSFVGSPE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	18640000	18640000	0	
SGSFVGSPEYTAPE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	2311200	2311200	0	
SLGGVLHAVVTE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	1558100	1558100	0	
SLGGVLHAVVTEE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	6419300	6419300	0	5,91
SLGGVLHAVVTEE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	1086400	1086400	0	
TPATPEEATAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	27014000000	0	27014000000	13,01
TPATPEEATAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2077100000	0	2077100000	
TPATPEEATAAR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	33019000	0	33019000	
TPATPEEATAARPLR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	22972000000	0	22972000000	1,21
TPATPEEATAARPLR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	19038000000	0	19038000000	
TPATPEEATAARPLR	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	756950000	0	756950000	
VAVKALPLD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	42253000	42253000	0	
VAVKALPLDE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	901530000	901530000	0	
VAVKALPLDESLAAE	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	295230000	295230000	0	0,43
VAVKALPLDESLAAE	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	686070000	686070000	0	
VKPSNVLVADD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	3274100	3274100	0	
VKPSNVLVADDGRVVLTD	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	4125800	4125800	0	
VLTRGPVDAVEAAR	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	82476000	0	82476000	0,02
VLTRGPVDAVEAAR	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	4304900000	0	4304900000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGSFVGSPEYTAPER	Unmodified	>SCO4778 (394AA)	2894800000	0	2894800000	1,38
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGSFVGSPEYTAPER	Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2099500000	0	2099500000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGSFVGSPEYTAPER	2 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	2055100000	0	2055100000	
VVLTDFGVAQVAGATTLTESGSFVGSPEYTAPER	3 Phospho (STY)	>SCO4778 (394AA)	226690000	0	226690000	
YTAPERMSGAGTGPE	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	99427000	99427000	0	
YTAPERMSGAGTGPESD	Oxidation (M)	>SCO4778 (394AA)	68865000	68865000	0	

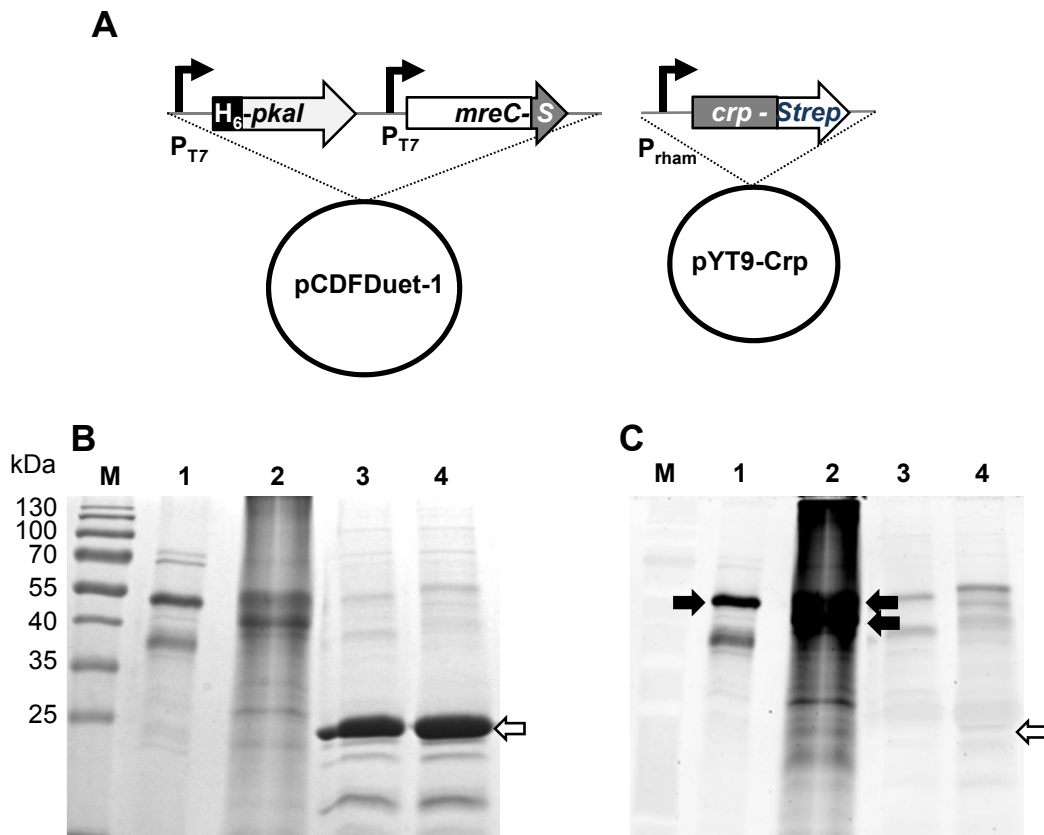
BPB2

Sequence	Modifications	Proteins	Intensity	Ratio (Intensities)
AAHQFGLGAK	Unmodified	seq_bpb2	306990000	
AAHQFGLGAKTGIDLPNEVTGR	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	6827800	
AAHQFGLGAKTGIDLPNEVTGRVPDR	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	11725000	
AEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M)	seq_bpb2	1451600000	36,82
AEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_bpb2	39425000	
AEDFPGITAEPMAVR	Unmodified	seq_bpb2	526730000	39,60
AEDFPGITAEPMAVR	Phospho (STY)	seq_bpb2	13302000	
AGVTRYEVNDLGR	Phospho (STY)	seq_bpb2	221890000	
ALELSCDTVFYR	Unmodified	seq_bpb2	1244000000	1,24
ALELSCDTVFYR	Phospho (STY)	seq_bpb2	994950000	
ALELSCDTVFYR	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	8879800	
ALLPKQASLPK	Unmodified	seq_bpb2	37163000	10,58
ALLPKQASLPK	Phospho (STY)	seq_bpb2	3511400	
AQDTSPLYR	Phospho (STY)	seq_bpb2	6292100	
AQDTSPLYR	Unmodified	seq_bpb2	1905900000	302,90
AQDTSPLYRSDQVGR	Phospho (STY)	seq_bpb2	2158800	
ASPDEEYAVVEEGDQPATTPNQNGENR	Unmodified	seq_bpb2	179080000	
ATQGQAA PGSIFK	Unmodified	seq_bpb2	3274700000	60,62
ATQGQAA PGSIFK	Phospho (STY)	seq_bpb2	53219000	
ATQGQAA PGSIFK	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	802850	
AVLTKLAGVLGMKPKQDVIDK	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_bpb2	2068600	
AVVSPDGK	Unmodified	seq_bpb2	25462000	
AVVSPDGKTVR	Unmodified	seq_bpb2	770400	0,01
AVVSPDGKTVR	Phospho (STY)	seq_bpb2	97132000	
DGSYVEK	Unmodified	seq_bpb2	4884800	
DSNYPLNLR	Unmodified	seq_bpb2	795410000	
DYSIVMTISQGGTGS GASGPAVR	Oxidation (M)	seq_bpb2	182330000	114,50
DYSIVMTISQGGTGS GASGPAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_bpb2	1592400	
DYSIVMTISQGGTGS GASGPAVR	Unmodified	seq_bpb2	72890000	
EIEPTAHGK	Unmodified	seq_bpb2	29928000	3,32
EIEPTAHGK	Phospho (STY)	seq_bpb2	8838600	
EIEPTAHGKLPISK	Phospho (STY)	seq_bpb2	1285800	
EIEPTAHGKLPISKTLTK	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	8255100	
ERAEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M)	seq_bpb2	2686800000	27,53
ERAEDFPGITAEPMAVR	Oxidation (M),Phospho (STY)	seq_bpb2	97604000	
ERAEDFPGITAEPMAVR	Unmodified	seq_bpb2	1087500000	30,35
ERAEDFPGITAEPMAVR	Phospho (STY)	seq_bpb2	35836000	
ETAALKFER	Unmodified	seq_bpb2	10881000	
FAQVGVWPQDK	Unmodified	seq_bpb2	1621300000	
FAQVGVWPQDKIPMHAKE	Oxidation (M)	seq_bpb2	2550200	
GKAGVTR	Unmodified	seq_bpb2	594540	
GSILDAR	Unmodified	seq_bpb2	1481300000	163,45
GSILDAR	Phospho (STY)	seq_bpb2	9062800	
GVALADNETR	Unmodified	seq_bpb2	985760	0,00
GVALADNETR	Phospho (STY)	seq_bpb2	210420000	
GVALADNETRLVVSASR	Phospho (STY)	seq_bpb2	1088800000	
GVALADNETRLVVSASRTDLK	2 Phospho (STY)	seq_bpb2	20748000	
IAYENCHSGNK	Unmodified	seq_bpb2	24594000	

5. Anhang

IKTDGTILSPK	Unmodified	seq_pbp2	123190000	0,60
IKTDGTILSPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	203770000	
IPMHAKTGTAEVYVK	Unmodified	seq_pbp2	1495500	
KALLPKQASLPK	Unmodified	seq_pbp2	4810300	
KDGSVYVK	Unmodified	seq_pbp2	1733300	
LAGVLGMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	10685000	
LAGVLGMK	Unmodified	seq_pbp2	12736000	
LAGVLGMKQDVIDK	Oxidation (M)	seq_pbp2	430410000	
LAGVLGMKQDVIDK	Unmodified	seq_pbp2	140660000	
LAGVLGMKQDVIDKVR	Oxidation (M)	seq_pbp2	1073600	
LCDAETPQP CWNGSPYQPIPVTDATVK	Phospho (STY)	seq_pbp2	16980000	
LPISKITLTK	Phospho (STY)	seq_pbp2	184420000	
LPISKITLTKMDEALAGVASR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	1132500	
LSHQEWK	Unmodified	seq_pbp2	103400000	
LTGKDSNYPILNR	Unmodified	seq_pbp2	5502200	
LVSASR	Unmodified	seq_pbp2	517550000	48,98
LVSASR	Phospho (STY)	seq_pbp2	10566000	
LVSASRTDLK	Unmodified	seq_pbp2	2298800	0,10
LVSASRTDLK	Phospho (STY)	seq_pbp2	22160000	
LWYLQIR	Unmodified	seq_pbp2	674020000	
MDEALAGVASR	Unmodified	seq_pbp2	1244700000	
MDEALAGVASR	Oxidation (M)	seq_pbp2	2240100000	
MDEALAGVASRGTAAWR	Oxidation (M), 2 Phospho (STY)	seq_pbp2	3705100	
MDEALAGVASRGTAAWR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	2093200	
MPKDVVK	Oxidation (M)	seq_pbp2	864340	
MTNIPETGR	Oxidation (M)	seq_pbp2	443020000	641,74
MTNIPETGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	690340	
MTNIPETGR	Unmodified	seq_pbp2	167980000	
MTNIPETGR	Acetyl (Protein N-term), Oxidation (M)	seq_pbp2	141480000	
NFESANEGMITIGR	Oxidation (M)	seq_pbp2	677880000	51,18
NFESANEGMITIGR	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	13244000	
NFESANEGMITIGR	Unmodified	seq_pbp2	471910000	70,75
NFESANEGMITIGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	6669900	
NIYDALYGVSDGDIDPK	Unmodified	seq_pbp2	1477000000	1163,27
NIYDALYGVSDGDIDPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	1269700	
NIYDALYGVSDGDIDPKK	Unmodified	seq_pbp2	340940000	
NPHDYFYK	Unmodified	seq_pbp2	344160000	
NTNRRTYADAGAVVMEAK	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	1601100	
PQASLPK	Unmodified	seq_pbp2	10984000	
PQDVIDK	Unmodified	seq_pbp2	1520400	
QDYWEANK	Unmodified	seq_pbp2	483040000	
QDYWEANKDAWCK	Unmodified	seq_pbp2	64655000	
QGDEYAEASGNHVQVQVQPTR	Unmodified	seq_pbp2	1904900000	64,92
QGDEYAEASGNHVQVQVQPTR	Phospho (STY)	seq_pbp2	29344000	
QLQPDEK	Unmodified	seq_pbp2	14328000	
QTTSWFATYTK	Unmodified	seq_pbp2	334010000	15,83
QTTSWFATYTK	Phospho (STY)	seq_pbp2	21094000	
RYAAPGK	Unmodified	seq_pbp2	12991000	
SDQVGRSGLER	Unmodified	seq_pbp2	1798400	0,03
SDQVGRSGLER	Phospho (STY)	seq_pbp2	621040000	
SNTAQLVGLSPVTDEELQK	Unmodified	seq_pbp2	223370000	7,59
SNTAQLVGLSPVTDEELQK	Phospho (STY)	seq_pbp2	29417000	
TDGTILSPK	Unmodified	seq_pbp2	511600000	1,56
TDGTILSPK	Phospho (STY)	seq_pbp2	328440000	
TDLLKMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	9586700	
TDLLKMK	Unmodified	seq_pbp2	4522300	
TGIDLPEVTGR	Unmodified	seq_pbp2	2378800000	10,93
TGIDLPEVTGR	Phospho (STY)	seq_pbp2	207570000	
TGIDLPEVTGR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	10104000	
TGIDLPEVTGRVPDR	Unmodified	seq_pbp2	3463300	0,01
TGIDLPEVTGRVPDR	Phospho (STY)	seq_pbp2	252980000	
TGIDLPEVTGRVPDR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	30450000	
TGTAEVYVK	Unmodified	seq_pbp2	43489000	14,96
TGTAEVYVK	Phospho (STY)	seq_pbp2	2906700	
TNIPETGR	Unmodified	seq_pbp2	148040000	
TNIPETGR	Acetyl (Protein N-term)	seq_pbp2	98894000	
TNIPETGRSTR	Phospho (STY)	seq_pbp2	939510	
TNIPETGRSTR	Acetyl (Protein N-term)	seq_pbp2	894260	0,95
TTLTKMDEALAGVASR	Phospho (STY)	seq_pbp2	1600200	
TYEADAGAVVMEAK	Oxidation (M)	seq_pbp2	236890000	
TYEADAGAVVMEAK	Unmodified	seq_pbp2	4157400	
VAEYELNEAMK	Oxidation (M)	seq_pbp2	10489000	
VAEYELNEAMK	Unmodified	seq_pbp2	139220000	
VIGEAESDPGTPGNSLVTSIDAR	Unmodified	seq_pbp2	3949900000	10,22
VIGEAESDPGTPGNSLVTSIDAR	Phospho (STY)	seq_pbp2	379830000	
VIGEAESDPGTPGNSLVTSIDAR	2 P phospho (STY)	seq_pbp2	6663600	
VLESGKETAAAK	Unmodified	seq_pbp2	9715100	21,23
VLESGKETAAAK	Phospho (STY)	seq_pbp2	457590	
VVAMASNPDYDPNAAVGGISAK	Oxidation (M)	seq_pbp2	819910000	66,72
VVAMASNPDYDPNAAVGGISAK	Oxidation (M), Phospho (STY)	seq_pbp2	12289000	
VVAMASNPDYDPNAAVGGISAK	Unmodified	seq_pbp2	836490000	368,73
VVAMASNPDYDPNAAVGGISAK	Phospho (STY)	seq_pbp2	2268600	
YAAPGKSNTAQLVGLSPVTDEELQK	Unmodified	seq_pbp2	1474600	
YEVDNLGR	Unmodified	seq_pbp2	319780000	

Figure S5



pkal and *mreC* of *S. coelicolor* were cloned into pCDFDUET1 under control of the T7 promoter. *crp* of *S. tsukubaensis* was inserted into pYT9 under control of the rhamnose inducible P_{rham} promoter (**A**). *E. coli* BL21 was co-transformed with both plasmids. Following induction of gene expression by 1 mM IPTG and 0.2% rhamnose, His-Pkal, MreC-S-tag, and CRP-Strep-tag were purified by affinity chromatography. Purified proteins were loaded to an SDS polyacrylamide gel (**B**) and phosphorylated proteins were identified by ProQ Diamond (Molecular Probes) staining (**C**). The black arrow mark phosphorylated His-Pkal and MreC-S-tag proteins, while the white arrow indicates Crp which was not phosphorylated. Pkal specifically phosphorylates MreC but does not phosphorylate Crp of *S. tsukubaensis*. 1: Pkal purified via His-tag, 2: MreC purified via S-tag, 3: Crp purified via Strep-tag from BL21(pCDF-pkal/pYT9-Crp), 4: Crp purified via Strep-tag from BL21 (pCDF-pkal-MreC/pYT9-Crp).

Table S5 *S. coelicolor* interaction partners of the eSTPK PkaI

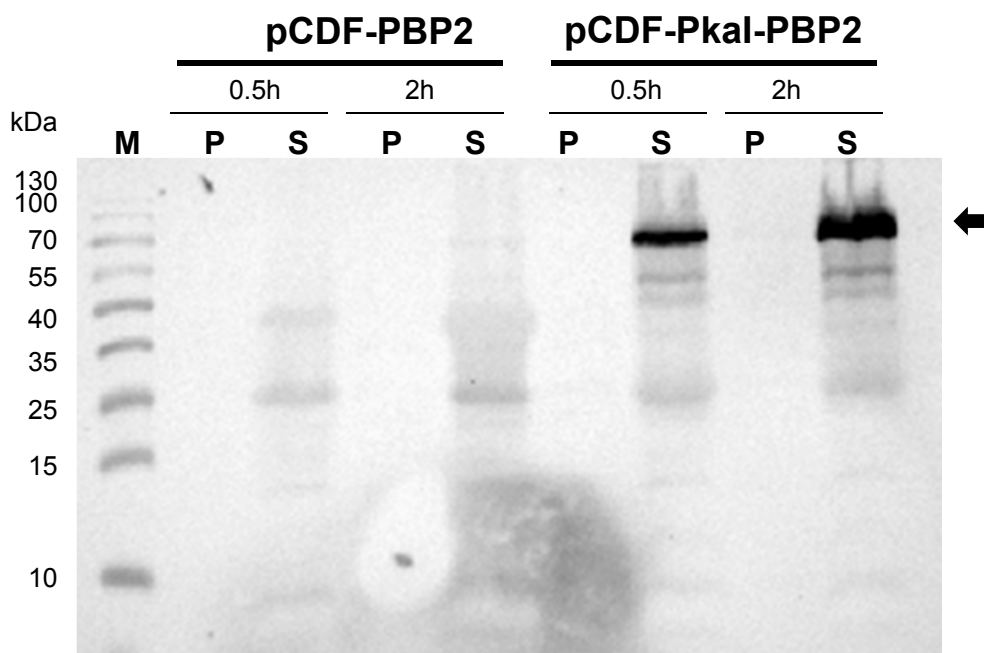
Category	Protein	Times found/ library ^s	Putative function/ characteristics
Differentiation	SCO1403*	5 E	putative membrane protein, interacts with MreC and RodZ
	SCO2097*	35 E	Actinomycetes signature protein, part of <i>dcw</i> cluster, role in sporulation, interacts with MreC, MreD, PBP2, Sfr, FtsI, RodZ
	SCO2897	1 N	probable secreted penicillin-binding protein
	SCO3110*	1 N	FtsX-like ABC transporter int. membrane subunit, interacts with MreC
	SCO3754*	1 N	FtsX-like ABC transporter int. membrane subunit interacts with MreC, MreD
	SCO3854 (CrgA)	1 N	Septation inhibitor protein, coordinates growth and cell division in aerial hyphae
	SCO4907(AfsQ1)	1 N	pleiotropic transcriptional regulator
	SCO5587 (FtsH)	1 N	cell division protein, zinc metalloprotease
	SCO5723 (BldB)	1 N	transcriptional regulator, differentiation
	SCO6494*	2 E	put. membrane protein, interacts with MreD
eSTPK	SCO2974 (PkaA)	2 N	serine/threonine protein kinase
	SCO4777 (PkaD)	2 N	serine/threonine protein kinase
	SCO4778* (PkaI)	1 E	serine/threonine protein kinase, interacts with MreC, MreD, PBP2, Sfr, FtsI, RodZ
	SCO7326	1 E	serine/threonine phosphatase
Other	SCO1058 (UgpE)	1 N	ABC transporter, transmembrane subunit
	SCO4140 (PstA)	1 N	phosphate ABC transport system permease
	SCO6374	1 N	putative sugar transferase
Hypothetical proteins	SCO1465	1 E	putative secreted protein
	SCO1829	2 N	putative membrane protein
	SCO2169	2 N	putative integral membrane protein
	SCO2255	1 N	putative membrane protein
	SCO3146	1 N	putative secreted protein
	SCO3218	1 N	conserved hypothetical protein
	SCO3855	1 E	putative membrane protein
	SCO3940	1 N	putative transmembrane protein
SCO4431	3 N	putative integral membrane protein	

	SCO4641	1 N	putative transmembrane efflux protein
	SCO4846	1 E	putative integral membrane protein
	SCO5013	3 N	putative secreted protein
	SCO5148	1 N	putative membrane protein
	SCO5485	1 N	small hydrophobic membrane protein
	SCO5587	1 N	large hypothetical protein
	SCO5935	1 N	putative membrane protein
	SCO5993	1 N	putative membrane protein
	SCO6074	1 E	putative integral membrane protein
	SCO6614	1 N	putative membrane protein
	SCO6899	1 E	putative membrane protein
	SCO7482	1 E	putative integral membrane protein

§ E: enzymatically generated library; N: nebulized library

* Previously identified as components of the SSSC (Kleinschnitz et al., 2011)

Figure S6



Pellet and supernatant fractions of *E. coli* BL21 carrying either pCDF-Pkal or pCDF-Pkal-PBP2 were analysed for the presence of PBP2-S-tag (arrow) by immunoblotting with Anti-S-tag specific antibodies, after induction with 1 mM IPTG for 0.5 and 2 h, respectively.

5.6 Verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BTH	Bacterial-Two-Hybrid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Centimeter
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
eSTPK	eukaryotenähnliche Serin/Threoninkinase
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
His	Histidin-Anhang
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IQR	Interquartilabstand
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MAD	mittlere absolute Abweichung bezüglich des Medians
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometer

nl	Nanoliter
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RT	Raumtemperatur
S-Tag	S-Protein-Anhang
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSSC	Streptomycessporenwandsynthesekomplex
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6. Literatur

Baer, C. E., A. T. Iavarone, T. Alber and C. M. Sassetti. (2014). "Biochemical and spatial coincidence in the provisional Ser/Thr protein kinase interaction network of *Mycobacterium tuberculosis*." *Journal of Biological Chemistry* **289**(30): 20422-20433.

Basell, K., A. Otto, S. Junker, D. Zuhlke, G. M. Rappen, S. Schmidt, C. Hentschker, B. Macek, K. Ohlsen, M. Hecker and D. Becher (2014). "The phosphoproteome and its physiological dynamics in *Staphylococcus aureus*." *Int J Med Microbiol* **304**(2): 121-132.

Bennett, J. A., R. M. Aimino and J. R. McCormick. (2007). "Streptomyces coelicolor genes *ftsL* and *divIC* play a role in cell division but are dispensable for colony formation." *J Bacteriol* **189**(24): 8982-8992.

Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao and B. E. Schoner (1992). "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." *Gene* **116**(1): 43-49.

Bimboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* **7**(6): 1513-1523.

Borchert, N., C. Dieterich, K. Krug, W. Schutz, S. Jung, A. Nordheim, R. J. Sommer and B. Macek (2010). "Proteogenomics of *Pristionchus pacificus* reveals distinct proteome structure of nematode models." *Genome Res* **20**(6): 837-846.

Brown, S., J. P. Santa Maria and S. Walker. (2013). "Wall teichoic acids of gram-positive bacteria." *Annu Rev Microbiol* **67**: 313-336.

Bullock, W. O., J. M. Fernandez and J. M. Short (1987). "XL1-Blue-a high-efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection." *Biotechniques* **5**(3): 367-379.

Burger, A., K. Sichler, G. Kelemen, M. Buttner and W. Wohlleben (2000). "Identification and characterization of the *mre* gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Mol Gen Genet.* **263**(6):1053-60.

- Cabeen, M. T. and C. Jacobs-Wagner (2005). "Bacterial cell shape." Nat Rev Microbiol **3**(8): 601-610.
- Carballido-López, R. and J. Errington (2003). "A dynamic bacterial cytoskeleton." Trends in Cell Biology **13**(11): 577-583.
- Carballido-Lopez, R. and A. Formstone (2007). "Shape determination in *Bacillus subtilis*." Curr Opin Microbiol **10**(6): 611-616.
- Carpy, A., K. Krug, S. Graf, A. Koch, S. Popic, S. Hauf and B. Macek (2014). "Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (Fission Yeast)." Mol Cell Proteomics **13**(8): 1925-1936.
- Chater, K. F. (2001). "Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?" Curr Opin Microbiol **4**(6): 667-673.
- Claessen, D., W. de Jong, L. Dijkhuizen and H. A. B. Woesten. (2006). "Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!" Trends Microbiol **14**(7): 313-319.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-2114.
- Conzelmann, M., E. A. Williams, K. Krug, M. Franz-Wachtel, B. Macek and G. Jekely (2013). "The neuropeptide complement of the marine annelid *Platynereis dumerilii*." BMC Genomics **14**: 906.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." Nat Biotechnol **26**(12): 1367-1372.
- Cox, J., N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen and M. Mann (2011). "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment." J Proteome Res **10**(4): 1794-1805.
- Cozzone, A. J. (1988). "Protein phosphorylation in prokaryotes." Annu Rev Microbiol **42**: 97-125.

- Daniel, R. A. and J. Errington (2003). "Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell." cell **113**(6): 767-776.
- Dasgupta, A., P. Datta, M. Kundu and J. Basu. (2006). "The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division." Microbiology **152**(Pt 2): 493-504.
- Davis, N. K. and K. F. Chater (1990). "Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics." Mol Microbiol **4**(10): 1679-1691.
- Defeu Soufo, H. J. and P. L. Graumann (2004). "Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells." EMBO Rep **5**(8): 789-794.
- Del Sol, R., J. G. Mullins, N. Grantcharova, K. Flårdh and P. Dyson. (2006). "Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor*." J Bacteriol **188**(4): 1540-1550.
- Deutscher, J. and M. H. Saier, Jr. (2005). "Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established." J Mol Microbiol Biotechnol **9**(3-4): 125-131.
- Dominguez-Escobar, J., A. Chastanet, A. H. Crevenna, V. Fromion, R. Wedlich-Soeldner and R. Carbadillo-López. (2011). "Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria." Science **333**(6039): 225-228.
- Donachie, W. D. (2001). "Co-ordinate regulation of the *Escherichia coli* cell cycle or The cloud of unknowing." Mol Microbiol **40**(4): 779-785.
- Eckhardt, T. (1978). "A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria." Plasmid **1**(4): 584-588.
- Egan, A. J. and W. Vollmer (2013). "The physiology of bacterial cell division." Ann N Y Acad Sci **1277**: 8-28.

- Elliot, M. A. and N. J. Talbot (2004). "Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi." Curr Opin Microbiol **7**(6): 594-601.
- Ensign, J. C. (1978). "Formation, properties, and germination of actinomycete spores." Annu Rev Microbiol **32**: 185-219.
- Errington, J. (2015). "Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix." Nat Rev Microbiol.
- Fisher, D. J., N. E. Adams and A. T. Maurelli. (2015). "Phosphoproteomic Analysis of the *Chlamydia caviae* Elementary Body and Reticulate Body Forms." Microbiology.
- Fiuza, M., M. J. Canova, D. Patin, M. Letek, I. Zanella-Cléon, M. Becchi, L. M. Mateos, D. Mengin-Lecreux, V. Molle and J. A Gil. (2008). "The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*." Journal of Biological Chemistry **283**(52): 36553-36563.
- Flärdh, K. (2003a). "Growth polarity and cell division in *Streptomyces*." Current Opinion in Microbiology **6**(6): 564-571.
- Flärdh, K. (2003b). "Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **49**(6): 1523-1536.
- Flärdh, K. (2010). "Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*." Curr Opin Microbiol **13**(6): 758-765.
- Flärdh, K. and M. J. Buttner (2009). "Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium." Nature Reviews Microbiology **7**(1): 36-49.
- Flärdh, K., D. M. Richards, A. M. Hempel, M. Howard and M. J. Buttner. (2012). "Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*." Curr Opin Microbiol **15**(6): 737-743.
- Flett, F., V. Mersinias and C. P. Smith (1997). "High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes." FEMS Microbiol Lett **155**(2): 223-229.

- Fortuin, S., G. G. Tomazella, N. Nagaraj, S. L. Sampson, N. C. Gey van Pittius, N. C. Soares, H. G. Wiker, G. A. de Souza and R. M. Warren (2015). "Phosphoproteomics analysis of a clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolate: expanding the mycobacterial phosphoproteome catalog." Front Microbiol **6**: 6.
- Fuchino, K., S. Bagchi, S. Cantlay, L. Sandblad, D. Wu, J. Bergman, M. Kamali-Moghaddam, K. Flårdh and N. Ausmees. (2013). "Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(21): E1889-1897.
- Gonzalez, M. D. and J. Beckwith (2009). "Divisome under construction: distinct domains of the small membrane protein FtsB are necessary for interaction with multiple cell division proteins." J Bacteriol **191**(8): 2815-2825.
- Grantcharova, N., U. Lustig and K. Flårdh. (2005). "Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **187**(9): 3227-3237.
- Grenga, L., A. Rizzo, L. Paolozzi and P. Ghelardini. (2013). "Essential and non-essential interactions in interactome networks: the Escherichia coli division proteins FtsQ-FtsN interaction." Environ Microbiol **15**(12): 3210-3217.
- Haiser, H. J., M. R. Yousef and M. A. Elliot. (2009). "Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*." J Bacteriol **191**(21): 6501-6512.
- Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." Science **241**(4861): 42-52.
- Heichlinger, A., M. Ammelburg, E. M. Kleinschnitz, A. Latus, I. Maldener, K. Flårdh, W. Wohlleben and G. Muth. (2011). "The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis." J Bacteriol **193**(7): 1533-1542.

- Hempel, A. M., S. Cantlay, V. Molle, S.-B. Wang, M. J. Naldrett, J. L. Parker, D. M. Richards, Y.-G. Jung, M. J. Buttner and K. Flärdh. (2012). "The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(35): E2371-2379.
- Hobbs, G., C. Frazer, D. J. Gardner, J. Cullum and S. Oliver (1989). "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture." Appl Microbiol Biotechnol **31**(3).
- Holmes, N. A., J. Walshaw, R. M. Leggett, A. Thibessard, K. A. Dalton, M. D. Gillespie, A. M. Hemmings, Bertolt Gust and G. H. Kelemen. (2013). "Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(5): E397-406.
- Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 181-203.
- Jakimowicz, D. and G. P. van Wezel (2012). "Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere?" Mol Microbiol **85**(3): 393-404.
- Kang, C. M., D. W. Abbott, S. T. Park, C. C. Dascher, L. C. Cantley and R. N. Husson. (2005). "The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape." Genes Dev **19**(14): 1692-1704.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann and D. Ladant (1998). "A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5752-5756.
- Kawai, Y., K. Asai and J. Errington (2009). "Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **73**(4): 719-731.
- Kennelly, P. J. (2014). "Protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation in the Archaea." Journal of Biological Chemistry **289**(14): 9480-9487.

- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater and D. A. Hopwood (2000). Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Kirby, K. S., E. Fox-Carter and M. Guest (1967). "Isolation of deoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria." Biochem J **104**(1): 258-262.
- Kleinschnitz, E. M., A. Heichlinger, K. Schirner, J. Winkler, A. Latus, I. Maldener, W. Wohlleben and G. Muth (2011). "Proteins encoded by the mre gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis." Mol Microbiol **79**(5): 1367-1379.
- Kleinschnitz, E. M., A. Latus, S. Sigle, I. Maldener, W. Wohlleben and G. Muth (2011). "Genetic analysis of *SCO2997*, encoding a TagF homologue, indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **193**(21): 6080-6085.
- Krueger, R., D. Kuebler, R. Pallissé, A. Burkovski and W. D. Lehmann. (2006). "Protein and proteome phosphorylation stoichiometry analysis by element mass spectrometry." Anal Chem **78**(6): 1987-1994.
- Kruse, T., J. Bork-Jensen and K. Gerdes. (2005). "The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex." Mol Microbiol **55**(1): 78-89.
- Ladwig, N., M. Franz-Wachtel, F. Hezel, B. Soufi, B. Macek, W. Wohlleben and G. Muth. (2015). "Control of Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phosphorylation of MreC and PBP2." PLoS One **10**(4): e0125425.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Leaver, M. and J. Errington (2005). "Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **57**(5): 1196-1209.
- Lim, S., E. Marcellin, S. Jacobs and L. K. Nielsen. (2015). "Global dynamics of *Escherichia coli* phosphoproteome in central carbon metabolism under changing culture conditions." J Proteomics **126**: 24-33.

Lovering, A. L. and N. C. Strynadka (2007). "High-resolution structure of the major periplasmic domain from the cell shape-determining filament MreC." J Mol Biol **372**(4): 1034-1044.

MacNeil, D. J., J. L. Occi, K. M. Gewain, T. MacNeil, P. H. Gibbons, C. L. Ruby and S. J. Danis (1992). "Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase." Gene **115**(1-2): 119-125.

Manteca, A., J. Ye, J. Sanchez and O. N. Jensen (2011). "Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation." J Proteome Res **10**(12): 5481-5492.

Margolin, W. (2005). "FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 862-871.

Mazza, P., E. E. Noens, K. Schirner, N. Grantcharova, A. M. Mommaas, H. K. Koerten, G. Muth, K. Flårdh, G. P. van Wezel and W. Wohlleben. (2006). "MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores." Mol Microbiol **60**(4): 838-852.

Mijakovic, I. and B. Macek (2012). "Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology." FEMS Microbiol Rev **36**(4): 877-892.

Mikkat, S., S. Fulda and M. Hagemann. (2014). "A 2D gel electrophoresis-based snapshot of the phosphoproteome in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Microbiology **160**(Pt 2): 296-306.

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Cold Spring Harbor.

Mohammadi, T., V. van Dam, R. Sijbrandi, T. Vernet, A. Zapun, A. Bouhss, M. Diepeveen-de Bruin, M. Ngyen-Distèche, B. de Kruijff and E. Breukink. (2011). "Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane." EMBO J **30**(8): 1425-1432.

Molle, V. and L. Kremer (2010). "Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: Mycobacterium shows the way." Mol Microbiol **75**(5): 1064-1077.

Molle, V., J. Leiba, I. Zanella-Cleon, M. Becchi and L. Kremer (2010). "An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates." Proteomics **10**(21): 3910-3915.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Munshi, T., A. Gupta, D. Evangelopoulos, J. D. Guzman, S. Gibbons, N. H. Keep and S. Bhakta. (2013). "Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis." PLoS One **8**(3): e60143.

Noens, E. E., V. Mersinias, B. A. Traag, C. P. Smith, H. K. Koerten and G. P. van Wezel. (2005). "SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of Streptomyces coelicolor." Mol Microbiol **58**(4): 929-944.

Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa (1974). "Formation and Reversion of Streptomyces Protoplasts: Cultural Condition and Morphological Study." Journal of General Microbiology **80**(2): 389-400.

Olsen, J. V. and B. Macek (2009). "High accuracy mass spectrometry in large-scale analysis of protein phosphorylation." Methods Mol Biol **492**: 131-142.

Parandhaman, D. K., P. Sharma, D. Bisht and S. Narayanan. (2014). "Proteome and phosphoproteome analysis of the serine/threonine protein kinase E mutant of Mycobacterium tuberculosis." Life Sci **109**(2): 116-126.

Parikh, A., S. K. Verma, S. Khan, B. Prakash and V. K. Nandicoori. (2009). "PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity." J Mol Biol **386**(2): 451-464.

Pereira, S. F. F., L. Goss and J. Dworkin. (2011). "Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS **75**(1): 192-212.

Pichoff, S., B. Shen, B. Sullivan and J. Lukenhaus. (2012). "FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins." Mol Microbiol **83**(1): 151-167.

Pinho, M. G., M. Kjos and J. W. Veening. (2013). "How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria." Nature Reviews Microbiology **11**(9): 601-614.

Pridmore, R. D. (1987). "New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker." Gene **56**(2-3): 309-312.

Rappsilber, J., M. Mann and Y. Ishihama (2007). "Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips." Nat Protoc **2**(8): 1896-1906.

Ravikumar, V., L. Shi, K. Krug, A. Derouiche, C. Jers, C. Cousin, A. Kobir, I. Mijakovic and B. Macek (2014). "Quantitative phosphoproteome analysis of *Bacillus subtilis* reveals novel substrates of the kinase PrkC and phosphatase PrpC." Mol Cell Proteomics **13**(8): 1965-1978.

Rico, A. I., M. García-Ovalle, P. Palacios, M. Casanova and M. Vicente. (2010). "Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring." Mol Microbiol **76**(3): 760-771.

Saalbach, G., A. M. Hempel, M. Vigouroux, K. Flardh, M. J. Buttner and M. J. Naldrett (2013). "Determination of phosphorylation sites in the DivIVA cytoskeletal protein of *Streptomyces coelicolor* by targeted LC-MS/MS." J Proteome Res **12**(9): 4187-4192.

Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Schirner, K. and J. Errington (2009). "Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*." Microbiology **155**(Pt 11): 3611-3621.
- Schleifer K.H., K., O. (1972). "Peptidoglycan Types of Bacterial Cell-Walls and Their Taxonomic Implications." Bacteriological Reviews **36**(4): 407-477.
- Schroeder, M. J., J. Shabanowitz, J. C. Schwartz, D. F. Hunt and J. J. Coon (2004). "A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry." Anal Chem **76**(13): 3590-3598.
- Schultz, C., A. Niebisch, A. Schwaiger, U. Viets, S. Metzger, M. Bramkamp and M. Bott. (2009). "Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases." Mol Microbiol **74**(3): 724-741.
- Shu, D., L. Chen, W. Wang, Z. Yu, C. Ren, W. Zhang, S. Yang, Y. Lu and W. Jiang. (2009). "afsQ1-Q2-sigQ is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*." Appl Microbiol Biotechnol **81**(6): 1149-1160.
- Sigle, S., N. Ladwig, W. Wohlleben and G. Muth. (2015). "Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*." Int J Med Microbiol **305**(2): 183-189.
- Slater, M. and M. Schaechter (1974). "Control of cell division in bacteria." Bacteriological Reviews **38**(2): 199-221.
- Soares, N. C., P. Spat, K. Krug and B. Macek (2013). "Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium." J Proteome Res **12**(6): 2611-2621.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-517.

Spat, P., B. Macek and K. Forchhammer. (2015). "Phosphoproteome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its dynamics during nitrogen starvation." Front Microbiol **6**: 248.

Steiner, W., G. Liu, W. D. Donachie and P. Kuempel. (1999). "The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers." Mol Microbiol **31**(2): 579-583.

Strakova, E., J. Bobek, A. Zikova, P. Rehulka, O. Benada, H. Rehulkova, O. Kofronova and J. Vohradsky. (2013). "Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*." J Proteome Res **12**(1): 525-536.

Strakova, E., J. Bobek, A. Zikova and J. Vohradsky. (2013). "Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination." PLoS One **8**(9): e72842.

Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.

Szwedziak, P. and J. Lowe (2013). "Do the divisome and elongasome share a common evolutionary past?" Curr Opin Microbiol **16**(6): 745-751.

Thakur, M. and P. K. Chakraborti (2008). "Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis." Biochem J **415**(1): 27-33.

Thompson, C. J., J. M. Ward and D. A. Hopwood (1982). "Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes." J Bacteriol **151**(2): 668-677.

Tsang, M. J. and T. G. Bernhardt (2014). "A role for the FtsQLB complex in cytokinetic ring activation revealed by an ftsL allele that accelerates division." Mol Microbiol.

Urabe, H., N. Aoyagi, H. Ogawara and K. Motojima. (2008). "Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD." Biosci Biotechnol Biochem **72**(3): 778-785.

Urabe, H., H. Ogawara and K. Motojima. (2015). "Expression and characterization of *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaE." Biosci Biotechnol Biochem: 1-8.

van den Ent, F., L. A. Amos and J. Loewe. (2001). "Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton." Nature **413**(6851): 39-44.

van den Ent, F., M. Leaver, F. Benedezu , J. Errington , P. de Boer and J. Loewe. (2006). "Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications." Mol Microbiol **62**(6): 1631-1642.

Vinella, D., R. D'Ari, A. Jaffé and P. Bouloc. (1992). "Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced." EMBO J **11**(4): 1493-1501.

Wachi, M., M. Doi, Y. Okada and M. Matsushashi. (1989). "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells." J Bacteriol **171**(12): 6511-6516.

Wachi, M. and M. Matsushashi (1989). "Negative Control of Cell-Division by MreB, a Gene That Functions in Determining the Rod Shape of *Escherichia-Coli*-Cells." J Bacteriol **171**(6): 3123-3127.

White, C. L., A. Kitich and J. W. Gober. (2010). "Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD." Mol Microbiol **76**(3): 616-633.

Willemse, J., J. W. Borst, E. de Waal, T. Bisseling and G. P. van Wezel. (2011). "Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*." Genes Dev **25**(1): 89-99.

Yague, P., A. Rodriguez-Garcia, M. T. Lopez-Garcia, J. F. Martin, B. Rioseras, J. Sanchez and A. Manteca (2013). "Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes." PLoS One **8**(3): e60665.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben für die anregenden Diskussionen, die gute Organisation des Lehrstuhls und die Überlassung dieses interessanten Projektes.

Dr. Günther Muth für die hervorragende Betreuung, gewinnbringende Diskussionen und gute Führung.

Der gesamten AG Wohlleben für Tipps und Tricks für dieses oder jenes Problem und eine sehr angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Meiner Frau Alice und meiner Tochter Marie für Abwechslung und Erholung vom Laboralltag.

Meiner Familie und meinen Freunden für Unterstützung jeglicher Art.