

**Die Rolle von Zellwandglykopolymeren bei der  
morphologischen Differenzierung von  
*Streptomyces coelicolor* A3(2)**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Nadja Steblau  
aus Omsk/ Russland

Tübingen  
2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.04.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Dr. Günther Muth

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Karl Forchhammer

# Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG .....	1
2. EINLEITUNG .....	2
<b>2.1 <i>Streptomyces coelicolor</i></b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Das Peptidoglykan und seine Biosynthese</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 Zellwandglykopolymere</b> .....	<b>11</b>
2.4.1 Wandteichonsäuren.....	11
2.4.2 Die Biosynthese von Wandteichonsäuren in <i>B. subtilis</i> .....	14
2.4.3 Teichuronsäuren .....	17
2.4.4 Teichulosonsäuren .....	18
2.4.5 Polydiglycosylphosphat und Kdn-beinhaltende Teichulosonsäure.....	19
<b>2.5 Die Funktionen von Wandteichonsäuren</b> .....	<b>22</b>
2.5.1 Wandteichonsäuren führen zu einer negativ geladenen Zelloberfläche .....	22
2.5.2 Wandteichonsäuren als Phosphatreserve .....	22
2.5.3 Wandteichonsäuren als Bindungsstelle für Phagen.....	23
2.5.4 Wandteichonsäuren binden Mg <sup>2+</sup> -Ionen .....	23
2.5.5 Wandteichonsäuren unterstützen die Faltungsrates bei sekretierten Proteinen .....	24
2.5.6 Wandteichonsäuren bei der nasalen Kolonisierung .....	25
2.5.7 Wandteichonsäuren als Schutz .....	25
<b>2.6 Putative Zellwandglykopolymer-Biosynthesegene in <i>Streptomyces coelicolor</i></b> .....	<b>26</b>
2.6.1 SCO2997 .....	27
2.6.2 SCO2578.....	29
2.6.3 SCO2589-90.....	31
2.6.4 SCO2594.....	32
3. MATERIAL UND METHODEN.....	35
<b>3.1 Bakterienstämme</b> .....	<b>35</b>

<b>3.2 Flüssigmedien und Agar</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4 Chemikalien und andere Materialien</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5 Methoden</b> .....	<b>41</b>
3.5.1 Gewinnung von Sporen.....	41
3.5.2 Gewinnung von Myzel.....	41
3.5.3 Isolieren von Zellwänden .....	42
3.5.4 Hayashi-Assay.....	43
3.5.5 Hydrolyse .....	44
3.5.6 Phosphat-Assay .....	45
3.5.7 Hexosamin-Assay .....	46
3.5.8 Kdn-Assay .....	47
3.5.9 HPLC-MS.....	48
3.5.10 Herstellung eines 20 % Polyacrylamid-Gels .....	49
3.5.11 Auswertung eines Polyacrylamid-Gels mittels HPLC-MS und Phosphat-Assay.....	52
3.5.12 Mikroskopie unter Verwendung von Ibidi-Dishes.....	53
3.5.13 Antibiotika-Test.....	55
3.5.14 Bestimmung der Größe von Einzelkolonien bei Bakterien.....	55
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1 Vergleichende Analyse der Zellwandglykopolymeren in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel bei <i>Streptomyces coelicolor</i> M145</b> .....	<b>56</b>
4.1.1 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden .....	56
4.1.2 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel .....	58
4.1.2.1 Phosphat-Assay.....	59
4.1.2.2 Hexosamin-Assay .....	60
4.1.2.3 Kdn-Assay.....	61
4.1.3 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der Zellwandglykopolymeren Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosensäure in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel .....	63
4.1.4 Bestimmung der Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel .....	70
4.1.5 Nachweis von Polydiglycosylphosphat im Polyacrylamid-Gel mittels HPLC-MS in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel .....	72
4.1.6 Analyse weiterer sich im Polyacrylamid-Gel befindlicher Polymer-Massen mittels HPLC-MS .....	76

<b>4.2 Rolle der mutmaßlichen CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase SCO2997 an der Zellwandglykopolymer-Synthese .....</b>	<b>78</b>
4.2.1 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden bei $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::pSET2997 .....	78
4.2.2 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel von $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::pSET2997 .....	79
4.2.2.1 Phosphat-Assay.....	80
4.2.2.2 Hexosamin-Assay .....	81
4.2.2.3 Kdn-Assay.....	82
4.2.3 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der relativen Verteilung der Zellwandglykopolymeren Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosonsäure in $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::pSET2997 .....	83
4.2.4 Einfluss der Mutation in dem Gen SCO2997 auf die Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel.....	86
<b>4.3 Charakterisierung der Mutationen in den Genen SCO2578, SCO2589-2590 und SCO2594, die vermutlich an der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren beteiligt sind .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Bestimmung der Größe der Bakterienkolonien in Abhängigkeit zu steigender Salzkonzentration .....	89
4.3.2 Morphologische Charakterisierung der Mutante SCO2594::TnpHL734 .....	90
4.3.2.1 Koloniemorphologie auf Agarplatten .....	90
4.3.2.2 Wachstumsverhalten auf Ibidi-Dishs .....	92
4.3.2.3 Erhöhte Vancomycinresistenz bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 .....	94
4.3.3 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden in $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 .....	95
4.3.4 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel von $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 .....	98
4.3.4.1 Phosphat-Assay.....	98
4.3.4.2 Hexosamin-Assay .....	100
4.3.4.3 Kdn-Assay.....	102
4.3.5 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der relativen Verteilung der Zellwandglykopolymeren Polydiglycosylphosphat und Kdn- Teichulosonsäure in $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 .....	104
4.3.6 Einfluss der Mutationen in den Genen SCO2578, SCO2589-90 und SCO2594 auf die Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel .....	109
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>112</b>
<b>5.1 Gram-positive Bakterien besitzen unterschiedliche Zellwandglykopolymeren .....</b>	<b>112</b>

5.2 Mögliche Rolle von Zellwandglykopolymeren bei der morphologischen Differenzierung von Streptomyceten .....	115
5.3 Sporen- und vegetative Myzelwände von <i>S. coelicolor</i> A3(2) unterscheiden sich in den Zellwandglykopolymeren.....	116
5.4 Versuch der Identifizierung von Biosynthesegenen der unterschiedlichen Zellwandglykopolymeren .....	119
5.5 SCO2997 hat keinen Einfluss auf die PDP- oder Kdn-Teichulosonsäure Synthese .....	120
5.6 SCO2578 (PdtA) spielt eine Rolle beim Hyphenwachstum, aber hat keinen Einfluss auf die PDP- und Kdn-Teichulosonsäure Synthese.....	122
5.7 Die Deletion der beiden CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase Gene <i>SCO2589/SCO2590</i> hat keinen Einfluss auf die PDP- und Kdn-Teichulosonsäure Synthese .....	124
5.8 SCO2594::TnpH734 zeigt ein aberrantes Längenwachstum und einen reduzierten PDP-Gehalt.....	127
5.9 Schlusswort .....	130
6. EIGENANTEIL.....	131
7. ANHANG .....	133
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	133
7.2 Abbildungsverzeichnis .....	135
7.3 Tabellenverzeichnis .....	139
8. LITERATURVERZEICHNIS .....	140

# 1. Zusammenfassung

Zweidrittel aller handelsüblichen Antibiotika werden von Gram-positiven myzelbildenden Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces* produziert. *Streptomyces coelicolor* A3(2) ist der Modellorganismus, bei dem die physiologische und die damit einhergehende morphologische Differenzierung weitgehend aufgeklärt wurde. Über die Dynamik der Zellwandzusammensetzung, insbesondere die der Zellwandglykopolymeren während des Differenzierungsprozesses ist jedoch noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Zellwandglykopolymeren von vegetativem Myzel und Sporen mit photometrischen Assays, HPLC-MS Analysen und hochauflösender PAGE analysiert und der Gehalt an Polydiglycosylphosphat (PDP) und Kdn-Teichulosonsäure quantifiziert. Es zeigte sich, dass Myzelwände (35 %) einen höheren Gehalt an Zellwandglykopolymeren besitzen als Sporenwände (20 %). Dabei war in den Zellwandglykopolymeren aus Myzelwänden sowohl der Phosphatgehalt (54 %) als auch der Kdn-Gehalt (29 %) gegenüber den Sporenwänden erhöht.

Ein Vergleich des Bandenmusters partiell hydrolysierter Zellwandglykopolymeren ergab gravierende Unterschiede zwischen den Polymeren aus Sporenwänden und vegetativen Myzelwänden. Nach Gelelektion konnten die Polymerfragmente aus vegetativen Myzelwänden durch HPLC-MS als PDP identifiziert werden, wohingegen die Fragmente aus Sporenwänden ein phosphatfreies Zellwandglykopolymer, möglicherweise eine bisher nicht identifizierte Teichuronsäure, darstellen.

Weiterhin wurde die Zellwandglykopolymer-Zusammensetzung verschiedener mutmaßlicher Zellwandglykopolymer-Synthese-Genmutanten untersucht. Die terminale Transferase Mutante  $\Delta SCO2578$ , und die vorhergesagten CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase Mutanten  $\Delta SCO2589-2590$  und  $\Delta SCO2997$  zeigten keine signifikante Beeinträchtigung der PDP- oder Kdn-Synthese. Dagegen wies die Exopolysaccharid-Phosphotransferase Mutante  $\Delta SCO2594$  einen reduzierten PDP-Gehalt auf. Dieser Defekt korrelierte mit einem drastischen Wachstumsdefekt, der sich in einer reduzierten Größe der Kolonien aufgrund aberranter Verzweigungen der Hyphen äußerte.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Streptomyces coelicolor*

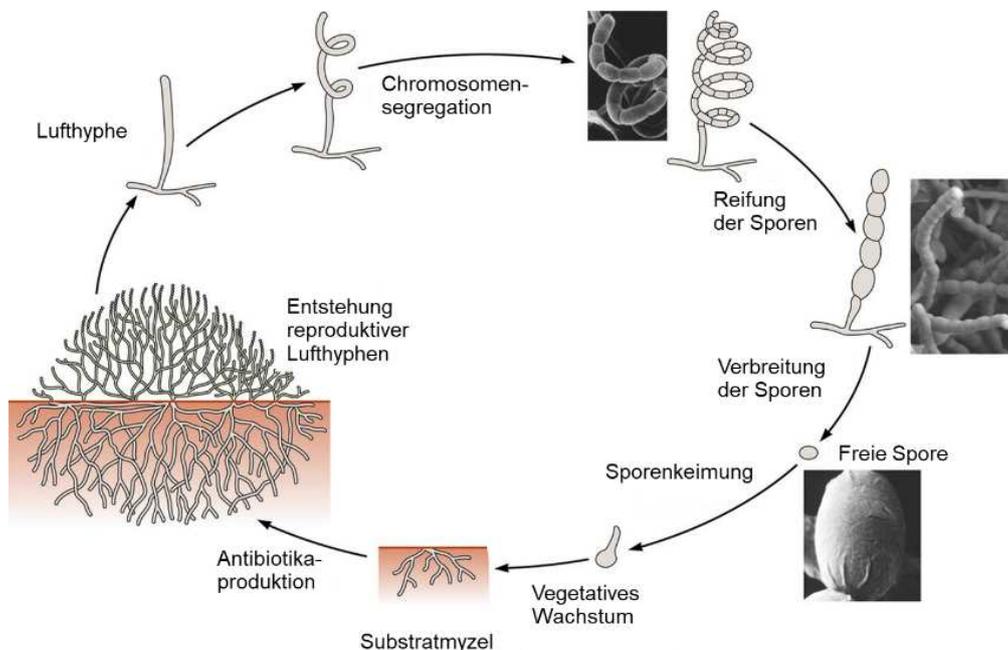
Streptomyceten gehören zu den im Boden lebenden filamentartigen Actinobakterien. Diese kolonisieren feuchte Substrate. Sie sind Gram-positiv und besitzen einen hohen GC-Gehalt in ihrer DNA (Claessen et al. 2002; McCormick und Flärdh 2012). Zweidrittel aller handelsüblichen wichtigen Antibiotika und eine große Vielfalt an Sekundärmetaboliten werden von Streptomyceten produziert (Santos-Beneit und Martín 2013).

Streptomyceten verfügen über einen einzigartigen und komplexen Lebenszyklus. Die physiologische und morphologische Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen läuft mit Hilfe einer koordinierten Entwicklung ab. Darunter zählt das Wachstum des Myzels und die interzelluläre Kommunikation.

Die vegetative Wachstumsphase beginnt mit einer ruhenden Spore (Abbildung 1). Bei geeigneten Umweltbedingungen beginnt die Spore anzuschwellen. Es kommt zum Auswachsen von einem oder mehreren Keimschläuchen, die sich zu Hyphen entwickeln (McCormick und Flärdh 2012). Die Hyphen bestehen aus verbundenen Kompartimenten, welche durch Querwände getrennt sind (Flärdh und Buttner 2009). Folgend entsteht durch Spitzenwachstum ein verzweigtes Myzel aus Multi-Nukleotiden-Hyphen, welches der Suche nach verfügbaren Nährstoffen dient (McCormick und Flärdh 2012; Claessen et al. 2002; Elliot et al. 2003). Das Myzelium gleicht eher einem filamentartigen Pilz als anderen einzelligen Bakterien (McCormick und Flärdh 2012).

Initiiert durch partielle Nährstofflimitation wächst ein spezieller Typ von Hyphen (Luftmyzel) aus der wässrigen Umgebung in die Luft. In den unverzweigten Lufthyphen wird das Chromosom repliziert und in den Hyphen verteilt (Chromosomensegregation). Dabei kommt es zur Kondensation und Trennung von Chromosomen sowie zum Einziehen von Querwänden. Dies geschieht synchron und hoch koordiniert (Noens et al. 2005). Während das vegetative Myzel ausschließlich durch apikales Spitzenwachstum gebildet wird, ähnelt die Differenzierung der klassischen Zellteilung anderer Bakterien.

Durch das multiple Einziehen von bis zu 100 Querwänden bilden sich aus den Luftmyzel-Ketten Sporen aus, welche über ein einziges Chromosom verfügen und durch Verdickung der Sporenhülle zu pigmentierten Sporen reifen, die dann durch Autolyse der Querwände freigesetzt werden (Claessen et al. 2002).

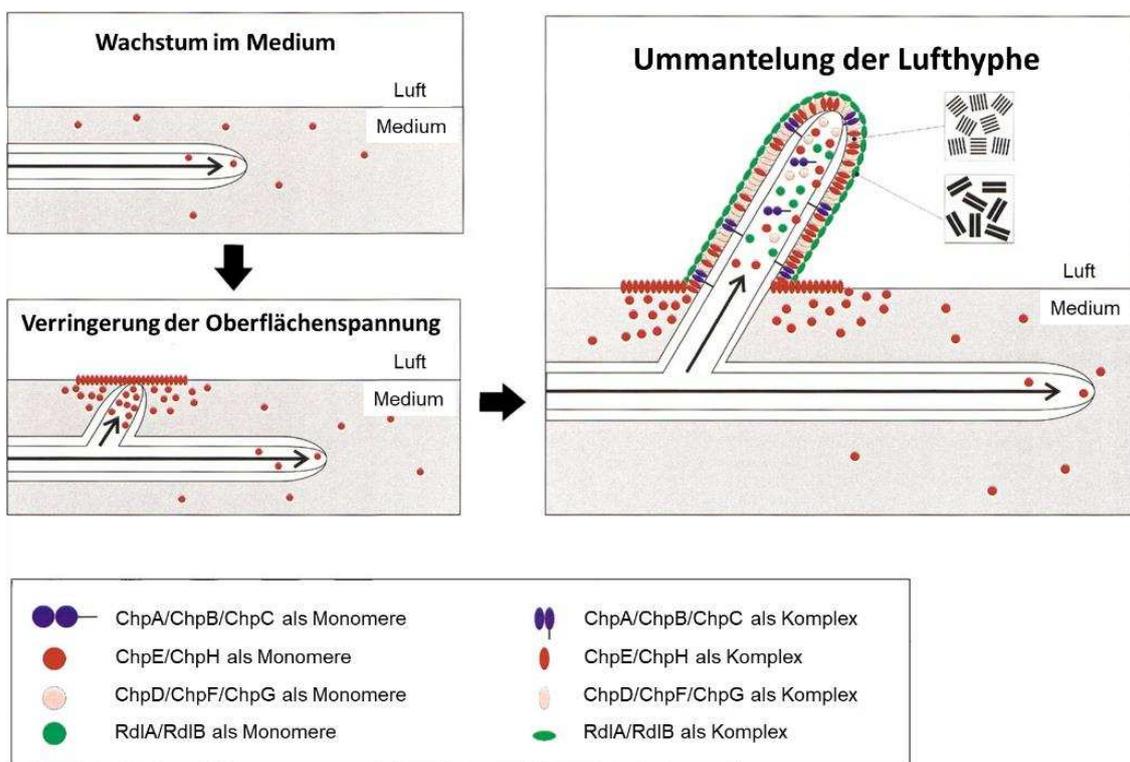


**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Streptomyceten (Barka et al. 2016, modifiziert).** Die Abbildung zeigt den gesamten Lebenszyklus von Streptomyceten, beginnend mit einer freien Spore (rechts unten), aus welcher sich ein vegetatives Myzel (links unten) bildet und dies schließlich zu einem Luftmyzel (links oben) mit anschließender Sporenreifung (rechts oben) führt.

Zudem verfügen die Sporen über eine hydrophobe Oberfläche (siehe unten) und enthalten in ihrer Membran Hopanoide. Sie schützen die Sporen vor Sauerstoff und Wasserverlust (Poralla et al. 2000). Dies trägt zur Stressresistenz der Sporen bei, die es Streptomyceten ermöglichen, Phasen des Nährstoffmangels zu überstehen und sich zu verteilen (Elliot et al. 2003).

Bei der morphologischen Entwicklung von Streptomyceten spielt der programmierte Zelltod (PCD) eine wichtige Rolle. Während der Ausbildung des Luftmyzels sterben Teile des vegetativen Myzels ab. Somit kann das Luftmyzel mit Nährstoffen versorgt werden. Sobald die Sporenbildung initiiert wird, sterben ebenfalls nicht sporulierende Bereiche des Luftmyzels ab (Miguélez et al. 1999).

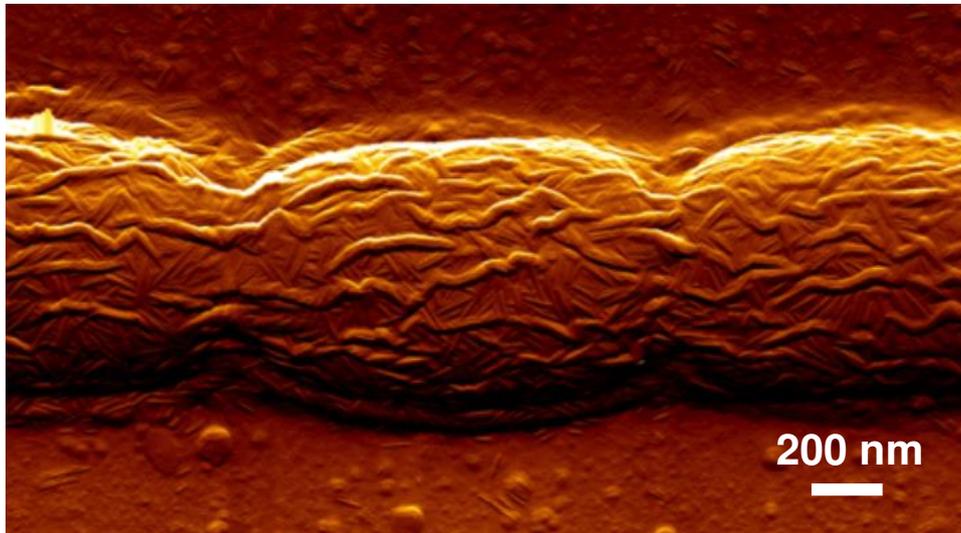
Während die vegetativen Hyphen von Streptomycceten, die in wässriger Umgebung ein Substratmyzel ausbilden, hydrophil sind, werden die Lufthyphen mit einer hydrophoben Umwelt konfrontiert (McCormick und Flärdh 2012). Streptomycceten besitzen die Fähigkeit, die Oberflächenschicht des filamentösen Myzels an die sich ändernde Umwelt anzupassen. Durch die Ausbildung einer hydrophoben Luftstruktur beim Luftmyzel ist es ihnen möglich, sich in einer hydrophoben Umgebung aufzuhalten (Abbildung 2) (Elliot et al. 2003). Diese hydrophobe Luftstruktur, auch Rodletschicht genannt, lässt sich auf dem Luftmyzel und auf den Sporen von Streptomycceten wiederfinden (Claessen et al. 2002; Wildermuth et al. 1971).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ausbildung einer Rodletschicht (Claessen et al. 2003, modifiziert).** Dargestellt ist das Wachstum einer aus dem Medium in die Luft herauswachsenden Hyphe. Beim Durchbrechen der Medium-Luft-Schnittstelle senken Chaplinproteine die Oberflächenspannung und ummanteln anschließend zusammen mit Rodlet-Proteinen die in die Luft wachsende Lufthyphe.

Die hydrophobe Rodletschicht wird aus den zwei homologen Proteinen RdlA und RdlB gebildet. Die *rdl* Gene werden beim wachsenden Luftmyzel exprimiert, jedoch nicht in Sporen (Claessen et al. 2002). Des Weiteren gibt es acht Chaplinproteine, welche amyloidähnliche Fibrillen formen. Diese senken die Wasseroberflächenspannung und erlauben es der Hyphe in die Luft zu wachsen (Claessen et al. 2003).

Die Schicht aus Fibrillen bleibt bei der nachfolgenden Differenzierung der Lufthyphen in den Sporen erhalten, sodass die Sporen im Vergleich zum vegetativen Substratmyzel ein kompakteres und organisiertes Muster aus Fibrillen besitzen (Abbildung 3) (Del Sol et al. 2007).



**Abbildung 3: Oberflächenstruktur der Sporen von Streptomyces (unveröffentlicht; S. Sigle, F. Oesterhelt und G. Muth; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen).** Mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (englisch: *atomic force microscope*) ist es möglich die Rodletschicht auf einer Sporenkette von *Streptomyces sp.* sichtbar zu machen.

Auch Pilze weisen auf Lufthyphen und Sporen eine Rodletschicht auf. Diese setzt sich, anders als es bei Streptomyces der Fall ist, aus Hydrophobinen zusammen. Hierbei handelt es sich um cysteinreiche Proteine (Claessen et al. 2002; Wosten et al. 1993). In Pilzen, sowie in Streptomyces, trägt die Rodletschicht einen wesentlichen Teil zur hydrophoben Oberfläche bei (Claessen et al. 2002). Dies führt dazu, dass Luftmyzel und Sporen über eine wasserabweisende Hülle verfügen (Claessen et al. 2004; Fisher und Richmond 1970). Ein daraus resultierender Vorteil ist, dass Lufthyphen nicht verklumpen und die Verbreitung der Sporen über die Luft gewährleistet ist (Gebink, M. F. B. G. et al. 2005). Des Weiteren schützt die Rodletschicht vor Dehydration (Faria et al. 2009).

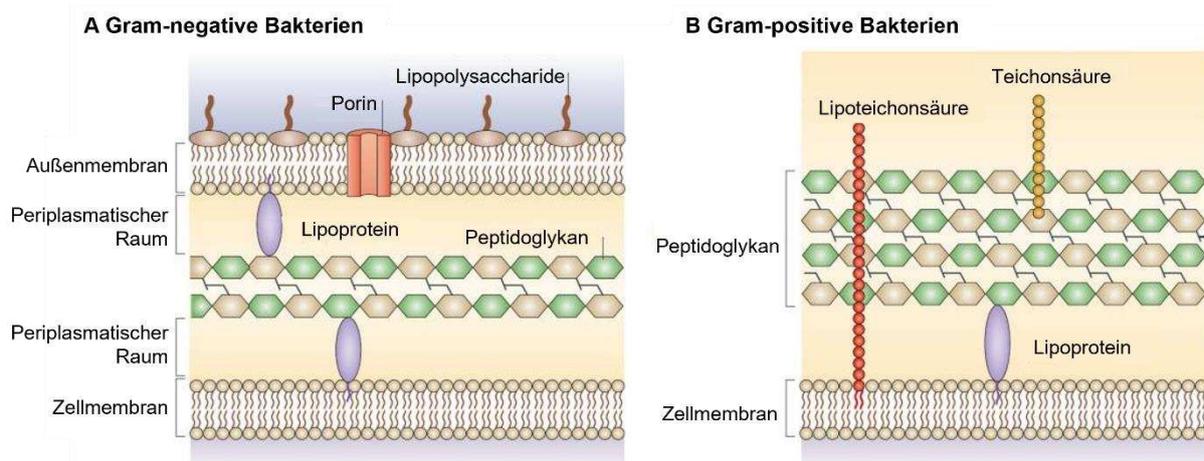
In einem Experiment wurde nachgewiesen, dass die beiden Proteine RdlA und RdlB, welche an der Formation der Rodletschicht beteiligt sind, ebenfalls die Bindung an hydrophoben Oberflächen unterstützen. Dies ermöglicht Streptomyces ein invasives Wachstum z.B. auf Holz. Pathogenen Streptomyces, wie *Streptomyces scabies*, wird dadurch die Anheftung an einen Wirt erleichtert (Claessen et al. 2002).

## 2.2 Die Zellwand von Gram-positiven Bakterien

Zellwände Gram-positiver Bakterien sind dynamisch variable und flexible Strukturen, welche die darunterliegende zytoplasmatische Membran schützen. Sie widerstehen dem Turgor, erhalten die Zellform und ermöglichen den Transport von Material in und aus der Zelle. Des Weiteren sind Zellwände beteiligt am Zellwachstum, bei der Zellteilung und Genom-Segregation, sowie an Interaktionen mit anderen Zellen und der Umwelt (Archibald et al. 1993).

Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien besitzen ein Peptidoglykan (PG), auch Murein genannt, welches sich in der chemischen Struktur ähnelt. Es besteht aus Wiederholungen von Disaccharidpeptiden, welche durch glykosidische Bindungen einen linearen Glykanstrang ergeben. Mehrere dieser Glykanstränge sind über die Peptidstämme an den Disacchariden zu einem Netzwerk verknüpft (Silhavy et al. 2010; Nanninga 1998).

Gram-negative Bakterien können eine oder einige Schichten PG besitzen, welches wenige Nanometer dick ist (Abbildung 4 A). Das PG ist zudem von einer Außenmembran umgeben, welche Lipopolysaccharide enthält. Das PG Gram-positiver Bakterien dagegen besteht aus mehreren Schichten und ist wesentlich dicker (Abbildung 4 B). Die Dicke kann 30-100 nm betragen. Gram-positive Bakterien besitzen zudem keine Außenmembran (Silhavy et al. 2010).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Brown et al. 2015, modifiziert).** **A:** Gram-negative Bakterien besitzen eine Außenmembran und verfügen über eine oder wenige Schichten PG. **B:** Gram-positive Bakterien besitzen mehrere Schichten PG an dem Teichonsäuren verankert sein können. Lipoteichonsäuren sind an die Zellmembran gebunden.

Des Weiteren sind Gram-positive Bakterien im Besitz sehr variabler schützender Oberflächenstrukturen, welche einer Außenmembran ähnlich sind. Hierbei kann es sich um eine weitere Schicht aus kapsulären Polysacchariden oder Protein-Anordnungen (S-Schicht) handeln (Weidenmaier und Peschel 2008). Typische Strukturen bei Gram-positiven Bakterien sind vor allem zusätzliche Glykopolymere. Diese gehören zur Zellwand und sind entweder an das PG oder an die Membranlipide verankert (Ward 1981).

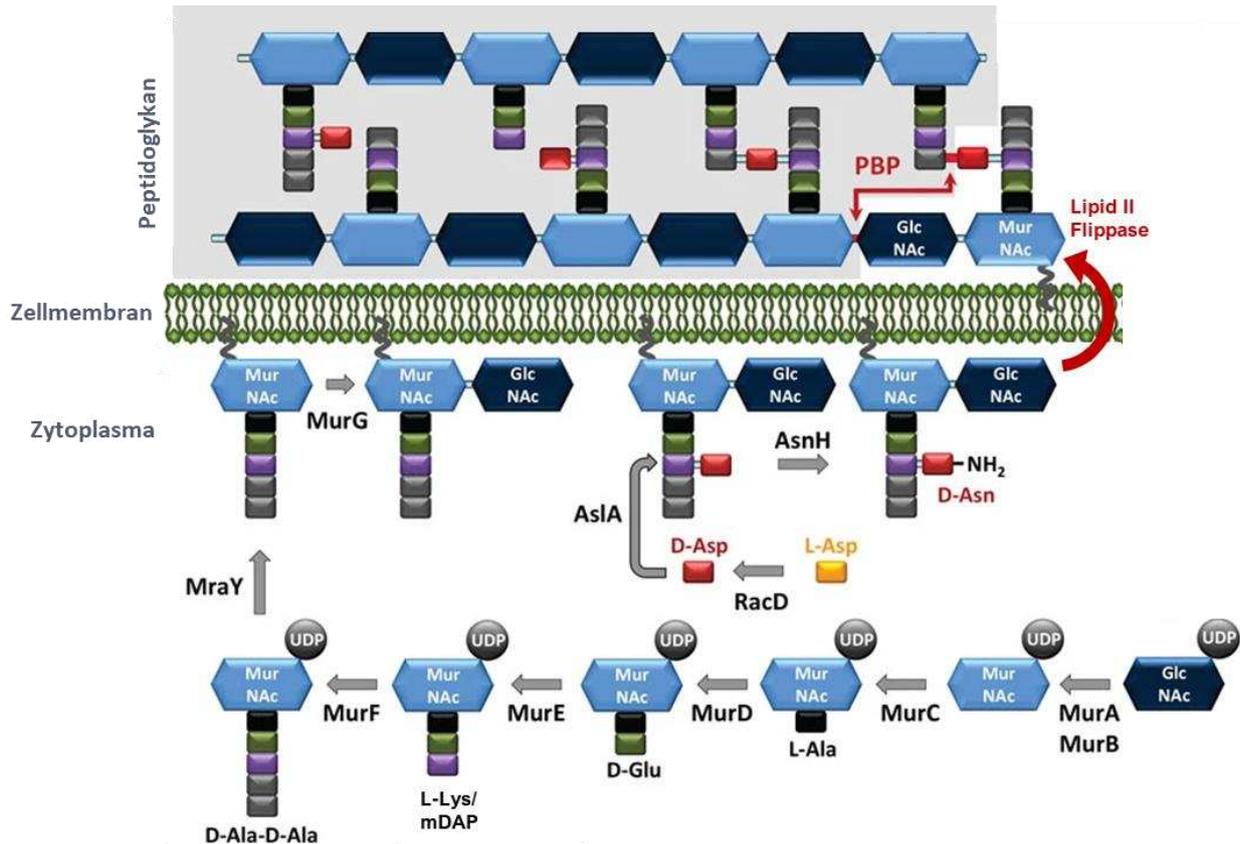
Wandteichonsäuren sind an die *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) des Peptidoglykans über Phosphodiesterbindungen gekoppelt. Lipoteichonsäuren sind in die Membran eingebettet und über Glycolipide an die Zellmembran verankert (Silhavy et al. 2010). In Gram-positiven Bakterien können polyanionische Polysaccharide und Teichonsäuren 60 % des Gewichts der Zellwand ausmachen (Weidenmaier und Peschel 2008; Hancock 1997).

### **2.3 Das Peptidoglykan und seine Biosynthese**

Die Biosynthese des Peptidoglykans findet mittels diverser Enzymreaktionen in verschiedenen Zellkompartimenten statt (Abbildung 5). Im Zytoplasma werden zunächst die Nukleotid-Vorstufen synthetisiert. Auf der Innenseite der zytoplasmatischen Membran findet anschließend die Synthese der lipidgebundenen Zwischenprodukte statt. Abschließend verläuft die Polymerisation auf der Außenseite der Zellmembran (Nanninga 1998).

Der erste Schritt der Biosynthese des PG ist die Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat in UDP-GlcNAc. Dies geschieht mittels der drei Enzyme GlmS (Glucosamin-6-Phosphat-Synthase), GlmM (Phosphoglucosamin-Mutase) und GlmU. GlmU ist ein bifunktionelles Enzym, welches die letzten beiden Schritte mit Glucosamin-1-Phosphat-Acetyltransferase und *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphat-Uridyltransferase ausführt (Barreteau et al. 2008).

Aus UDP-GlcNAc entsteht UDP-MurNAc mit Hilfe von MurA und MurB (Abbildung 5). Danach wird der Peptidstamm des PG durch vier Mur Ligasen (MurC, D, E and F) schrittweise zusammengebaut. L-Alanin wird mittels MurC und D-Glutaminsäure mittels MurD angeheftet. An der dritten Position wird eine Di-Aminosäure hinzugefügt. Hierbei kann es sich bei Gram-negativen Bakterien um Meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP) oder um L-Lysin bei Gram-positiven Bakterien handeln.



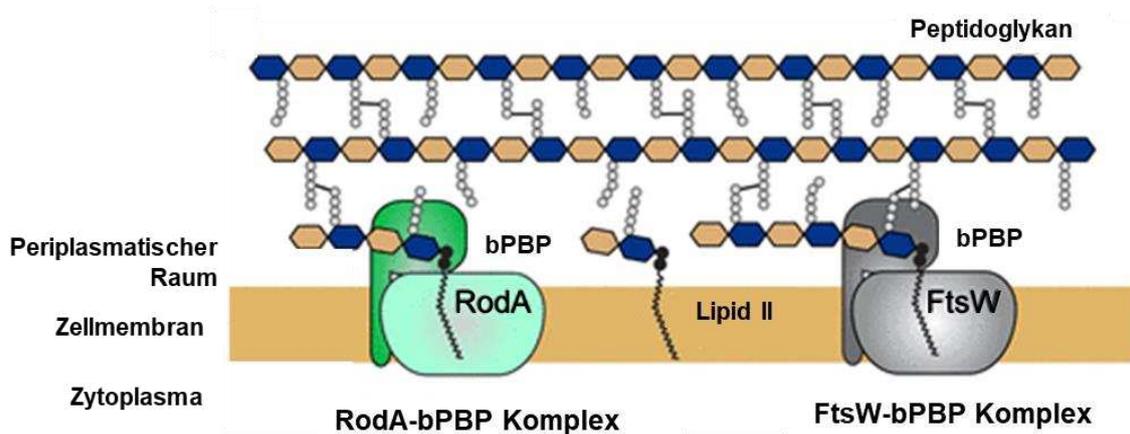
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Peptidoglykansynthese (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014, modifiziert).** Die Nucleotid-Vorstufen werden im Zytoplasma synthetisiert. Bei Gram-negativen Bakterien wird an der dritten Position Meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP) und bei Gram-positiven Bakterien L-Lysin eingebaut (Kumar et al. 2022). Anschließend wird die Nucleotid-Vorstufe an den Membranakzeptor Undecaprenylphosphat, welcher in der Zellmembran verankert ist (gebogene graue Linien), gebunden. Dadurch entsteht Lipid I. Durch das Anheften von GlcNAc entsteht Lipid II (Bouhss et al. 2008). Nach der darauffolgenden Modifikation des Peptidstammes, erfolgt die Translokation des Zellwandbausteins auf die andere Seite der Zellmembran mit Hilfe von Lipid II-Flippasen. Bei *E.coli* übernimmt dies MurJ. In Gram-positiven Bakterien ist das Enzym YtgP weitverbreitet. *B. subtilis* verfügt über Amj (Sham et al. 2014; Meeske et al. 2015; Kumar et al. 2022).

Das Ende des Peptidstamms bildet ein Dipeptid D-Ala-D-Ala, welches mittels MurF angeheftet wird (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014; Barreteau et al. 2008; Brown et al. 1995; Kumar et al. 2022).

MraY (Phospho-*N*-Acetylmuramoyl-Pentapeptid-Transferase) katalysiert die Transfer-Reaktion. Das MurNAC-Pentapeptid wird von der zytoplasmatischen Vorstufe UDP-MurNAC-Pentapeptid zu dem Membranakzeptor Undecaprenylphosphat (C<sub>55</sub>-P) transferiert. Dadurch entsteht Lipid I, auch Undecaprenyl-Pyrophosphoryl-MurNAC-Pentapeptid genannt. Anschließend katalysiert die Transferase MurG (UDP-*N*-Acetylglucosamin-*N*-Acetylmuramyl-(Pentapeptid)Pyrophosphoryl-Undecaprenol *N*-Acetylglucosamin-Transferase) den Transfer eines GlcNAC von UDP-GlcNAC zu Lipid I. Daraus ergibt sich Lipid II, auch bekannt als Undecaprenyl-Pyrophosphoryl-MurNAC-(Pentapeptid)-GlcNAC. Dies ist das Substrat für die Polymerisationsreaktion (Bouhss et al. 2008; Mengin-Lecreulx et al. 1991). Bevor die Translokation der Lipid-verankerten PG-Vorstufe auf die Außenseite der zytoplasmatischen Membran startet, wird der Peptidstamm modifiziert. AsIA (Aspartat-Ligase) heftet ein D-Asp an die dritte Aminosäure (L-Lys oder m-DAP) des Peptidstammes (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014). L-Lys kommt z.B. in *L. Lactis* (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014) und m-DAP in *E. coli* oder *B. subtilis* (Vollmer et al. 2008; Unsleber 2017) vor. In *Streptomyces coelicolor* wurde als dritte Aminosäure LL-DAP identifiziert (Andayani et al. 2015; van der Aart et al. 2018). Mit Hilfe einer Asparagin-Synthase (AsnH) erfolgt noch eine Aminierung von D-Asp (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014).

Anschließend erfolgt die Translokation. Bei *E. coli*, sowie in weiteren Gram-negativen Bakterien, übernimmt dies die Lipid II-Flippase MurJ. In Gram-positiven Bakterien ist das Enzym YtgP weitverbreitet und fungiert als Lipid II-Flippase. *B. subtilis* verfügt dagegen über Amj, welches ebenfalls eine Lipid II-Flippase Aktivität aufweist (Sham et al. 2014; Ruiz 2009; Meeske et al. 2015; Kumar et al. 2022). Die neuen Zellwandbausteine werden anschließend mit Hilfe von SEDS Proteinen (**S**hape **E**longation **D**ivision and **S**porulation) in das bereits bestehende Netzwerk eingebaut. Zu der Familie der SEDS zählen die beiden Peptidoglykan-Glycosyltransferasen RodA und FtsW, welche mit den beiden Transpeptidasen PBP2 bzw. FtsI (Klasse B Penicillin-bindende Proteine) zusammen agieren.

Der Komplex RodA-bPBP (Elongasom) kommt während des Zellwachstums zum Einsatz, während FtsW-bPBP (Divisom) bei der Zellteilung eine Rolle spielt (Abbildung 6). Die SEDS-bPBP Paare sind ebenfalls mit einem Aktinprotein verbunden (FtsA bzw. MreB) (Welsh et al. 2019; Li et al. 2021; Kumar et al. 2022).



**Abbildung 6: RodA-bPBP Komplex (Elongasom) und FtsW-bPBP Komplex (Divisom) (Welsh et al. 2019, modifiziert; Li et al. 2021).** Die beiden Peptidoglykan-Glycosyltransferasen RodA und FtsW gehören zu den SEDS Proteinen. Sie bilden zusammen mit PBP2 (RodA) und mit FtsI (FtsW) einen Komplex. PBP2 und FtsI sind Transpeptidasen und gehören zu den Penicillin-bindenden Proteinen der Klasse B (bPBP). Mit Hilfe der beiden Komplexe werden Zellwandbausteine in das bestehende Peptidoglykan während des Zellwachstums (Elongasom) und der Zellteilung (Divisom) eingebaut.

Abschließend wird bei der Transglycosylierung eine 1→4 glykosidische Bindung gebildet, während die Quervernetzung zwischen den Glykansträngen über eine Transpeptidation erfolgt (Sauvage et al. 2008; Brumfitt et al. 1958). Bei der Transpeptidation kommt es zur Verknüpfung zweier Peptiduntereinheiten, welche an die Polysaccharidketten gebunden sind (Meeske et al. 2016). Die Aminogruppe von m-DAP oder L-Lys an der Position 3 verbindet sich mit der Carboxylgruppe von D-Ala an der Position 4 einer anderen benachbarten Peptiduntereinheit (Schleifer und Kandler 1972; Vollmer und Bertsche 2008).

## 2.4 Zellwandglykopolymere

### 2.4.1 Wandteichonsäuren

Zu den Teichonsäuren zählen die membranverankerten Lipoteichonsäuren, sowie die an das Peptidoglykan geknüpften Wandteichonsäuren (WTA) (Brown et al. 2013; Schleifer und Kandler 1972). In den Zellwänden von *S. aureus* und *B. subtilis* machen Wandteichonsäuren 40-60 % der Masse aus. Bei *L. arabinosus* sind es mehr als 60 %. Daraus kann man schließen, dass Wandteichonsäuren das wesentliche Polymer in den Zellwänden dieser Bakterien sind (Armstrong et al. 1958). Schon zwischen Stämmen der gleichen Spezies kann die Struktur von Wandteichonsäuren variieren. *B. subtilis* 168 verfügt über ein Glycerolphosphatpolymer (GroP), während *B. subtilis* W23 ein Ribitolphosphatpolymer (RboP) besitzt (Qian et al. 2006). In *B. subtilis* W23 gibt es zwei Ribitolteichonsäuren: Polyribitolphosphat und Glycosylpolyribitolphosphat (Bertram et al. 1981).

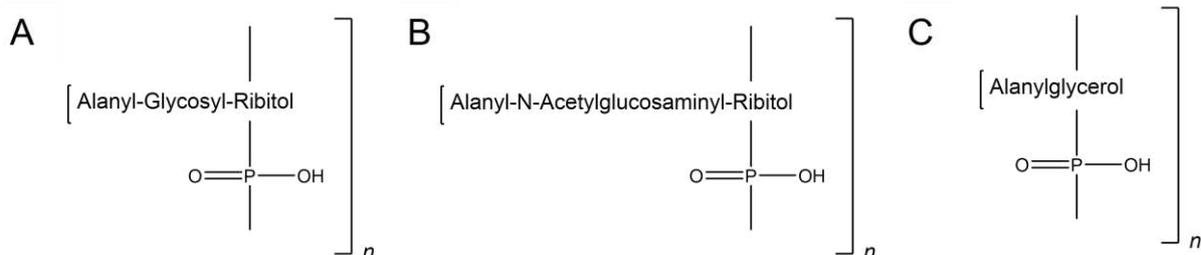
Anfänglich wurden Polymere aus Ribitolphosphateneinheiten, welche über Phosphatdiestergruppen verknüpft sind, als Teichonsäuren bezeichnet. Der Name Teichonsäuren kommt aus dem Griechischen (= Wand), und galt für Polymere mit und ohne Substituten (Armstrong et al. 1958). Folgend wurden ebenfalls Organismen mit einer anderen Art von Teichonsäuren entdeckt (Tabelle 1). Anstatt einer Ribitolphosphatkette, verfügen diese über eine Kette aus Glycerolphosphat.

Darauffolgend wurde die Nomenklatur erweitert und umfasst alle in Abbildung 7 abgebildeten Polymere der Typen 1, 2 und 3 (Armstrong et al. 1959).

*L. arabinosus* und *B. subtilis* besitzen Wandteichonsäuren mit einer Ribitolphosphatkette sowie Alanin- und Glycosylresten (Abbildung 7 A). In diesen Organismen wurden keine Polymere mit Glycerolphosphat nachgewiesen. *S. aureus* (Oxford und Duncan) sowie *Streptococcus faecalis* besitzen Wandteichonsäuren mit Ribitolphosphat, welche Alanin und *N*-Acetylglucosamin als Reste tragen (Abbildung 7 B). Sie verfügen jedoch ebenso über Polymere mit Glycerolphosphat (Tabelle 1). *L. casei* dagegen hat keine Wandteichonsäuren mit Ribitolphosphat, dafür jedoch Wandteichonsäuren mit Glycerolphosphat und Alaninresten (Abbildung 7 C). (Armstrong et al. 1959; Armstrong et al. 1958).

**Tabelle 1: Verteilung von Ribitol- und Glycerolresten in verschiedenen Bakterien (Armstrong et al. 1958).**

	Typ des Polymers	
	Glycerol	Ribitol
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	-	+
<i>L. casei</i> (A.T.C. 7469)	+	-
<i>L. delbrückii</i> (N.C.I.B. 8608)	+	-
<i>L. bulgaricus</i> (N.C.I.B. 76)	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> H	Spuren	+
<i>Staph. aureus</i> (Duncan)	Spuren	+
<i>Staph. aureus</i> (Oxford)	+	+
<i>Staph. citreus</i>	+	-
<i>Staph. albus</i> (N.C.T.C. 7944)	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative Form)	-	+
<i>Escherichia coli</i> (Typ B)	Spuren	-
<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	-
<i>Streptococcus faecalis</i> (A.T.C. 9790)	+	+

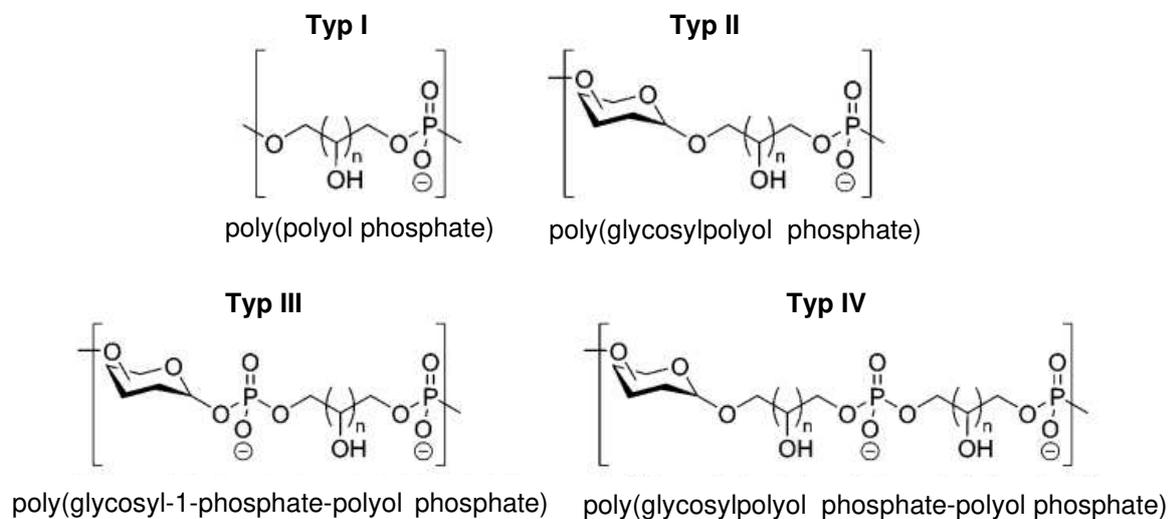


**Abbildung 7: Mögliche Strukturen von Wandteichonsäuren (Armstrong et al. 1959). A:** Ribitolphosphatkette mit Alanin- und Glucoseresten. **B:** Ribitolphosphatkette mit Alanin- und N-Acetylglucosaminresten. **C:** Glycerolphosphatkette mit Alaninresten.

Neben verschiedenen Arten von Teichonsäuren können Bakterien auch Exopolysaccharide produzieren, von denen einige Alditolreste und Phosphodiester aufweisen. Dadurch wird eine Klassifizierung von Wandteichonsäuren erschwert (van der Es et al. 2017).

2001 stellten Naumova et al. ebenfalls eine Klassifizierung für Wandteichonsäuren auf und listeten vier Klassen von WTA Typen auf (Abbildung 8).

WTA Typ I umfasst alle Poly(Polyolphosphate). Als Polyol dienen Glycerol, Mannitol, Ribitol, Arabitol oder Erythritol. Die Polyole sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft (z.B.: Poly(Ribitolphosphat) oder Poly(Mannitolphosphat)) und können ebenfalls O-d-Alanyl, O-l-Lysyl oder O-Acetyl enthalten. Das hierzu zählende Poly(Glycerolphosphat) ist die am häufigsten vorkommende Teichonsäuren in Zellwänden.



**Abbildung 8: Klassifizierung von Wandteichonsäuren nach Naumova et al. (2001) (van der Es et al. 2017).** Darstellung der einzelnen Einheiten der vier WTA Typen.

Bei WTA Typ II handelt es sich um Polymere aus Poly(Glycosylpolyolphosphat), bei denen sich die Hauptkette aus einem bestimmtem Polyol (Glycerin oder Ribitol) und einem Zucker zusammensetzt. Die Einheiten sind ebenfalls über Phosphodiesterbindungen verknüpft.

WTA Typ III besteht aus Glycosyl-1-Phosphaten und sich wiederholenden Einheiten von Typ I.

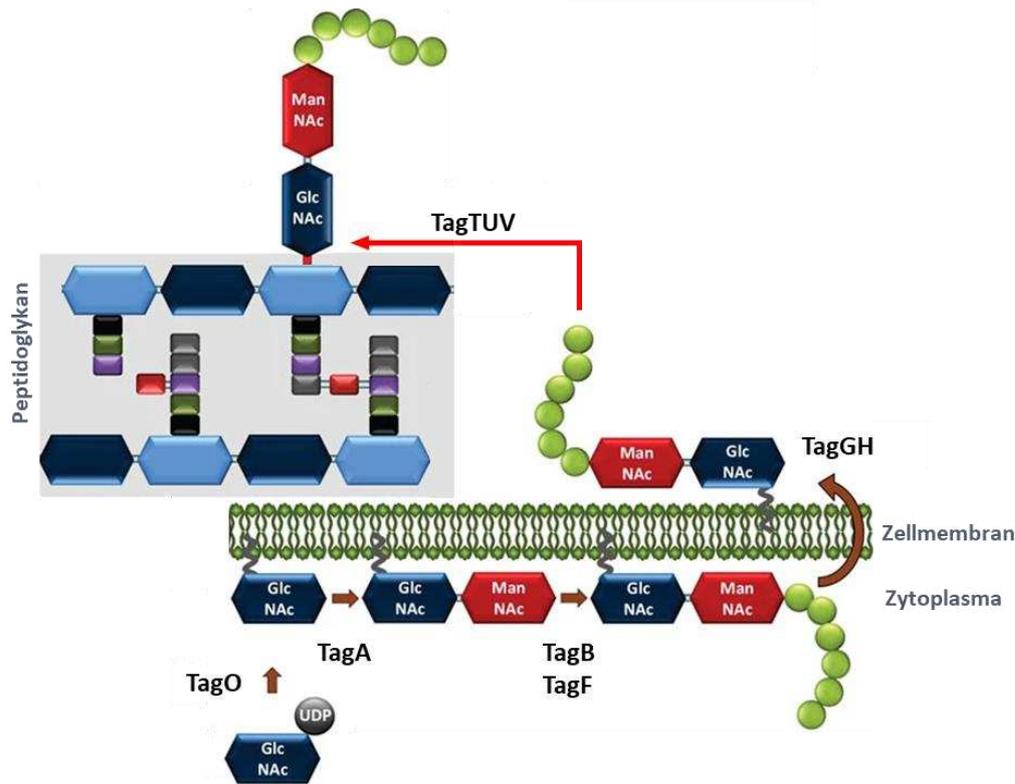
Typ IV kann sich dagegen aus Glycosyl-1-Phosphaten und sich wiederholenden Einheiten von Typ I oder Typ II zusammensetzen (Naumova et al. 2001; van der Es et al. 2017).

Glykosylierte Wandteichonsäuren sind über die Zellwand verteilt zu finden (Ward 1981). Dies konnte Bauer et al. (1974) anhand der Wandteichonsäuren von *Streptococcus faecalis* nachweisen. Diese Polymere sind zum Teil mit  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-Resten substituiert, welche spezifisch an Phytohemagglutinin Concanavalin A binden. Als Marker für Wandteichonsäuren dienten mit Quecksilber gelabeltes Concanavalin A und Concanavalin A beschichtetes kolloidales Gold. Anschließend wurde mit Hilfe eines Elektronenmikroskops die homogene Verteilung der Wandteichonsäuren über die Zellwand sichtbar gemacht (Bauer et al. 1974).

### 2.4.2 Die Biosynthese von Wandteichonsäuren in *B. subtilis*

Die meisten Zellwandglykopolymere weisen ähnliche Biosynthesewege auf. Diese beinhalten den Zusammenbau eines Polymers an dem universalen Isoprenoid-Lipid-Carrier Bactoprenol. Vorstufen dieser Polymere sind nukleotidaktivierte Zucker, so wie Uridin-Diphosphat-Glucose oder Cytosin-Diphosphat-Ribitol. Diese nukleotidaktivierten Zucker werden zu Bactoprenol transferiert. Dies geschieht an der Innenseite der zytoplasmatischen Membran. Zugeordnete Flippasen bringen das Polymer anschließend auf die Außenseite, wo es dann letztendlich zur Akzeptor-Seite vom PG oder Glycolipiden transferiert wird (Weidenmaier und Peschel 2008).

TagO ist eine *N*-Acetylglucosaminyl-1-P-Transferase und spielt eine Rolle bei der Synthese von anionischen Polymeren und Teichonsäuren von *B. subtilis*. TagO vermittelt den ersten Schritt bei der Biosynthese von WTA. Es katalysiert die Bildung von Undecaprenyl-PP-GlcNAc, indem es UDP-GlcNAc an das membrangebundene Undecaprenylphosphat bindet (Abbildung 9). In phosphatlimitiertem Medium wird *tagO* auch mehrere Stunden exprimiert. Dies bedeutet, dass es ebenfalls bei der Synthese von Teichuronsäuren (siehe unten) involviert ist, welche unter Phosphatmangel gebildet werden (Soldo et al. 2002; Janczura et al. 1961).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Biosynthese von Wandteichonsäuren (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014, modifiziert).** Wandteichonsäuren (Polymere) werden an der Innenseite der zytoplasmatischen Membran synthetisiert und sind über den universalen Isoprenoid-Lipid-Carrier Bactoprenol an die Zellmembran verankert. Anschließend werden die Polymere über Flippasen auf die Außenseite gebracht und mit dem Peptidoglykan verknüpft (Weidenmaier und Peschel 2008).

TagA katalysiert die Übertragung eines ManNAc (*N*-Acetylmannosamin) von UDP auf die Hydroxylgruppe an der Position C-4 von GlcNAc-PP. Dadurch entsteht das Disaccharid ManNAc- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc (Ginsberg et al. 2006).

Die CDP-Glycerol:*N*-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosaminyl-1,4-*N*-Acetyl-D-Glucosaminyldiphosphoundecaprenyl Glycerophosphotransferase TagB katalysiert den Transfer eines Glycerol-Phosphats von CDP-Glycerol auf die Hydroxylgruppe an der Position C-4 von ManNAc von dem Akzeptormolekül Undecaprenyl-Pyrophosphoryl-Disaccharid. Dabei handelt es sich um einen membrangebundenen Akzeptor (Bhavsar et al. 2005).

Bei TagF handelt es sich um eine CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase. Diese katalysiert die Polymerisation einer Diester-verknüpften Polyolphosphat-Kette (Pooley et al. 1992). In *B. subtilis* polymerisiert TagF die Polyglycerolphosphat-Kette von Teichonsäuren (Schertzer und Brown 2003).

TagE ist eine WTA-Glycosyltransferase in *B. subtilis* 168. Diese katalysiert die Reaktion einer  $\alpha$ -Glucose von einer UDP-Glucose an die C-2 Position eines Glycerols im Rückgrat des Polyglycerolphosphat-Polymers (Allison et al. 2011).

TagGH ist ein transmembranes Exportsystem von *B. subtilis* 168. Es wurde als typisches Zweikomponenten ABC-MSD System deklariert, aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Exportsystemen und der Organisation des Operons (Lazarevic und Karamata 1995).

Die LCP Proteine TagTUV katalysieren den letzten Schritt bei der Biosynthese (Kawai et al. 2011). Sie verknüpfen unter Freisetzung des Undecaprenylphosphat Carriers die Teichonsäuren und Teichuronsäuren an den *N*-Acetylmuraminsäure-Rest (MurNAc) des PG über Phosphodiesterverknüpfungen.

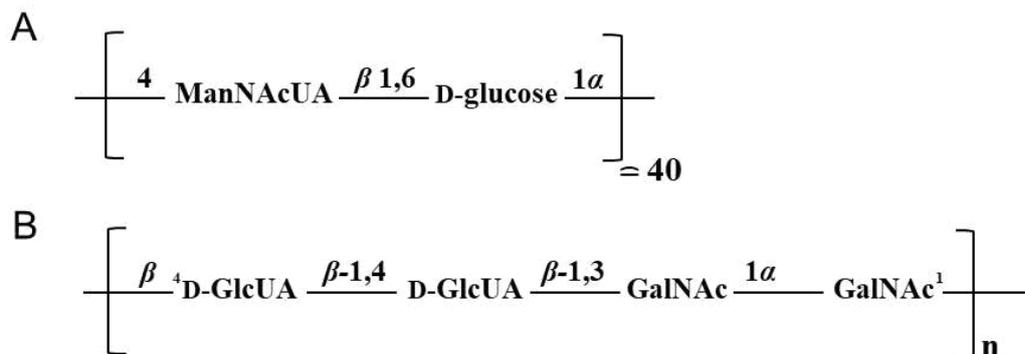
Es besteht ferner die Hypothese, dass es sich bei TagD, um das Strukturgen von Gro-PCT handelt (nicht in Abbildung 9 abgebildet). Dieses Enzym ist spezifisch für die Synthese von poly(GroP), dem hauptsächlichen anionischen Zellwandpolymer von *B. subtilis* (Pooley et al. 1991).

Teichonsäuren sowie Teichuronsäuren (siehe unten) werden nur an Glykopeptidketten verknüpft, welche zur selben Zeit wie die Polymere selbst synthetisiert werden. Der Anteil von Teichonsäuren und Teichuronsäuren in der Zellwand kann somit in Zellen anhand neu synthetisierter Glykopeptidketten reguliert werden. Dies wurde von Mauck und Glaser (1972) in einem Experiment nachgewiesen. Hierbei wurden Glykopeptidketten mit radioaktivem [ $^{14}\text{C}$ ] Glycosamin oder [ $^3\text{H}$ ] Glycosamin markiert. [ $^{14}\text{C}$ ] Glycosamin wurde *B. subtilis* während der logarithmischen Wachstumsphase, jedoch nicht während der stationären Phase, zugefüttert. Der während der stationären Phase entstehende Phosphatmangel führt zur Synthese von Teichuronsäuren. Glykopeptidketten, welche an die neu synthetisierten Teichuronsäuren verknüpft waren, wurden isoliert und enthielten somit kein [ $^{14}\text{C}$ ] Glycosamin. Bei einem weiteren Experiment hatte *B. subtilis* in phosphatarmen Medium nur Zugang zu [ $^3\text{H}$ ] Glycosamin. Nach der Übertragung in phosphatreiches Medium wurde zusätzlich [ $^{14}\text{C}$ ] Glycosamin zugefüttert. Nach der Inkubation konnte anschließend in den Glykopeptidketten, welche an die neu synthetisierten Teichonsäuren verknüpft waren, [ $^{14}\text{C}$ ] Glycosamin nachgewiesen werden (Mauck und Glaser 1972).

### 2.4.3 Teichuronsäuren

Teichuronsäuren sind Mucopolysaccharide, die mit Aminozuckern und neutralen Monosacchariden zu einem Polymer über glykosidische Bindungen verknüpft sind (Abbildung 10). Im Gegensatz zu Wandteichonsäuren besitzen Teichuronsäuren kein Phosphat. Dafür enthalten sie eine Uronsäure als unentbehrliche Komponente (Díaz-Mauriño und Perkins 1974; Janczura et al. 1961). Reste wie Aminosäuren oder Glycerolphosphat können an das Polymer verknüpft sein (Yoneyama et al. 1984).

Die sich wiederholenden Einheiten von Teichuronsäuren können aus linearen Disacchariden oder aus vier und mehr Monosaccharide in einer Einheit bestehen (Tul'skaya et al. 2011a).



**Abbildung 10: Mögliche Strukturen von Teichuronsäuren (Ward 1981).** A: Teichuronsäure von *Micrococcus luteus*. B: Teichuronsäure von *Bacillus licheniformis*.

Teichuronsäuren können ebenfalls als Ersatz in die Zellwand von Organismen eingebaut werden, welche nicht über Wandteichonsäuren verfügen. Da es sich bei der Zellwand um ein dynamisches Konstrukt handelt, kann sie als Reaktion auf Veränderungen in der Umwelt ihre chemische Zusammensetzung ändern (Ellwood und Tempest 1969). Einige Bakterien bauen Teichuronsäuren unter Phosphatmangel in die Zellwand ein (Ellwood und Tempest 1967). Somit kommt es unter geringem Phosphatgehalt nicht mehr zur Synthese von Teichonsäuren. In diesem Fall werden als Ersatz dagegen Teichuronsäuren synthetisiert (Janczura et al. 1961; Ellwood und Tempest 1967; Ellwood 1970). Grundsätzlich können Teichonsäuren durch Teichuronsäuren ersetzt werden und umgekehrt (Ellwood und Tempest 1969).

Die Funktion von Teichuronsäuren ist der von Teichonsäuren sehr ähnlich (Bhavsar et al. 2004).

#### 2.4.4 Teichulosonsäuren

2009 brachte Yuriy A. Knirel den Begriff Teichulosonsäuren ein, um Glykopolymere mit der Komponente Ald-2-Ulosonsäure in Zellwänden von Gram-positiven Bakterien zu bezeichnen (Knirel 2009).

Teichulosonsäuren enthalten Kdn-Reste. Die Oligomere sind aus  $\alpha$ -(2→4) verknüpften Kdn-Resten zusammengesetzt und besitzen am reduzierten Ende ein  $\beta$ -Kdn. An der Position O-9 können die Kdn-Einheiten alternativ mit Galactopyranose oder 3-O-Methylgalactopyranose verknüpft sein (Shashkov et al. 2002b).

Kdn ist die Abkürzung für **2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nononic Acid** und ist ein Mitglied der Sialinsäure-Familie. Es wurde erstmalig 1986 beschrieben und in Regenbogenforelleneiern nachgewiesen (Nadano et al. 1986). In Gram-negativen Bakterien und in Pflanzen wurde Kdo (2-Keto-3-Deoxy-D-Manno-Octulosonic Acid) gefunden (Angata und Varki 2002).

Kdn kommt als *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) in Vertebraten, in höheren Invertebraten und in einigen Bakterien, darunter auch Gram-negative Bakterien, vor. Es kann in Glykolipiden, Glykoproteinen und in kapsulären Polysacchariden vorkommen (Angata und Varki 2002; Inoue und Kitajima 2006; Shashkov et al. 2012). Die ursprüngliche Definition für Sialinsäure war „Neuraminsäure“ (5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-2-Nonulosonic Acid, Abk.: Neu) und dessen Derivate (Angata und Varki 2002). Diese Definition wurde erweitert als 3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-2-Nonulosonic Acid (oder 2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nononic Acid, Abk.: Kdn) gefunden wurde. Diese Verbindung trägt eine Hydroxylgruppe anstelle einer Aminogruppe an der C-5 Position (Inoue und Kitajima 2006).

Sialinsäuren sind in der Lage, mit anderen Zellen und Umweltfaktoren zu interagieren (Angata und Varki 2002). Sie befinden sich ebenfalls in den Zellwänden von Eukaryoten und sind Teil des Immunsystems (Vimr et al. 2004). Viele Bakterien, die Sialinsäuren produzieren, verursachen schwere Erkrankungen in Menschen und domestizierten Tieren. Es besteht die Vermutung, dass Sialinsäuren in der Zellwand

von Bakterien diese vor dem Immunsystem des Wirtes schützen, indem sie nicht erkannt und somit auch nicht attackiert werden (Angata und Varki 2002).

Die Gegenwart von Kdn beinhaltenden Komponenten auf der Zellwandoberfläche spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese. Die phytopathogene Adhäsion zur Wirtspflanze wird bevorzugt bei der Initialisierung der Infektion (Tul'skaya et al. 2011a; Shashkov et al. 2002a). Das für den Kartoffelschorf verantwortliche *Streptomyces sp.* VKM Ac-2124 besitzt eine Teichulosonsäure mit dem Rückgrat 3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-Ulosonic Acid (Kdn) als Monosaccharid-Bestandteil (Shashkov et al. 2002a). Des Weiteren besitzen Teichulosonsäuren wie Teichuronsäuren anionische Eigenschaften und spielen eine vergleichbare Rolle bei den lebensnotwendigen Aktivitäten (Tul'skaya et al. 2011a).

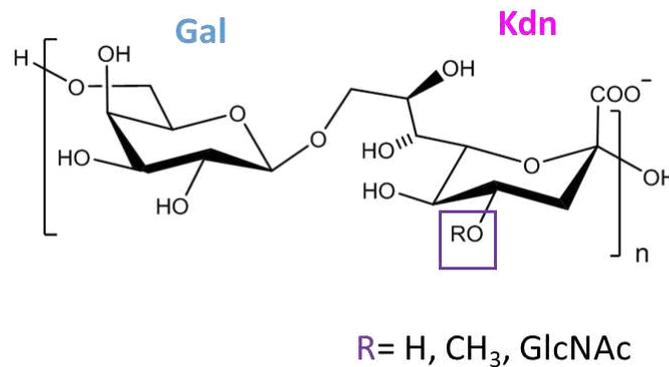
Teichulosonsäuren können statt Kdn auch über Pse-Reste verfügen. Teichulosonsäuren mit Pse-Resten kommen z.B. in Repräsentanten der Gattung *Kribbella* vor (Tul'skaya et al. 2011a; Tul'skaya et al. 2011b).

### 2.4.5 Polydiglycosylphosphat und Kdn-beihaltende Teichulosonsäure

In der Gattung *Streptomyces* wurde eine Vielzahl diverser anionischer Polymere in der Zellwand nachgewiesen bzw. deren Strukturen aufgeklärt (Shashkov et al. 2012).

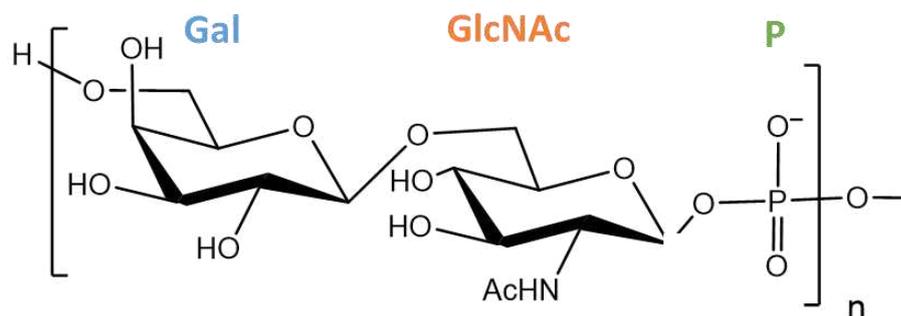
Im Folgenden werden vier Beispiele genannt:

- 1) In *Streptomyces coelicolor* M145 konnte eine Kdn-beihaltende Teichulosonsäure und ein phosphathaltiges Polymer in Myzelwänden nachgewiesen werden. Beide Polymere wurde 2012 von Shashkov et al. beschrieben. Bei der Kdn-Teichulosonsäure handelt es sich um ein Heteropolymer mit einer ungewöhnlichen Struktur, welches das hauptsächliche Glykopolymer von *S. coelicolor* darstellen soll (Abbildung 11). Das Monomer der Kdn-Teichulosonsäure besteht aus Galaktose und einem Kdn-Zucker (2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nononic Acid). An der Position C4 kann der Kdn-Zucker mit einem Wasserstoff, einer Methylgruppe oder einem Acetylglycosamin substituiert sein. Über glykosidische Bindungen können mehrere Einheiten miteinander verknüpft werden (Shashkov et al. 2012).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Monomers der Kdn-beinhaltenen Teichulosonsäure (angelehnt an: Shashkov et al. 2012).** Das Disaccharid besteht aus Galaktose und einem Kdn-Zucker (2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nononic Acid). Der Kdn-Zucker kann an der Position C4 mit den Resten -H, -CH<sub>3</sub> oder -GlcNAc substituiert sein.

Mit Hilfe von Genome-Mining und Knockout-Mutanten war es möglich, die für die Biosynthese von Teichulosonsäuren notwendigen Gene *sco4870-sco4882* zu ermitteln. Mutanten mit einzelnen Knockouts in den Genen *sco4879*, *sco4880* oder *sco4881* sind nicht mehr in der Lage das Kdn-beinhaltenende Polymer zu produzieren. In diesen Mutanten akkumuliert sich das phosphathaltige Polymer Polydiglycosylphosphat (PDP) in der Zellwand (Ostash et al. 2014).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Polydiglycosylphosphat-Monomers (angelehnt an: Shashkov et al. 2012).** Das Disaccharid besteht aus Galaktose sowie aus *N*-Acetylglucosamin und ist geknüpft an ein Phosphat. Über Phosphodiesterbindungen können bis zu 19 Einheiten [n] verknüpft sein (Shashkov et al. 2012).

Bei dem phosphatbeihaltenden Polymer handelt es sich um Polydiglycosylphosphat (PDP). Die Monomere von PDP setzen sich zusammen aus einem Disaccharid, bestehend aus Galaktose und *N*-Acetylglycosamin, sowie aus einem Phosphat (Abbildung 12). Sie sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft (Shashkov et al. 2012). Die Gene für die Biosynthese von Polydiglycosylphosphat sind bisher unbekannt.

- 2) *Streptomyces sp.* VKM Ac-2534, der Verursacher von Kartoffelschorf, besitzt zwei anionische Kohlenhydrat beihaltende Polymere. Das hauptsächliche Polymer ist eine Teichuronsäure mit der sich wiederholenden Disaccharideinheit: **→4)-β-D-ManpNAc3NAcyA-(1→3)- α-D-GalpNAc-(1→**, wobei es sich bei Acy um einen Rest von Essigsäure oder *L*-Glutaminsäure handelt. Das andere Polymer ist eine Teichonsäure mit der sich wiederholenden Einheit: **1,5-Poly(Ribitol-Phosphat)** (Tul'skaya et al. 2007).
- 3) *Streptomyces thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus* VKM Ac-1857 ist im Besitz mehrerer Polymere mit unterschiedlichen Strukturen in der Zellwand. Die hier vorhandene Teichonsäure besitzt die sich wiederholende Einheit: **- 1,3-Poly(Glycerol-Phosphat)**. Das Disaccharide-1-Phosphat-Polymer weist folgende sich wiederholende Einheit auf: **-6)-α-Galp-(1→6)-α-GlcpNAc-P-**. Des Weiteren ist ein Polysaccharid ohne Phosphat vorhanden mit der sich wiederholenden Einheit: **→6)-α-GalpNAc-(1→3)-β-GalpNAc-(1→** (Kozlova et al. 2006).
- 4) *Streptomyces sp.* VKM Ac-2124 besitzt drei anionische Glykopolymere. Die anwesende Teichuronsäure besitzt die sich wiederholenden Einheit: **→6)-α-D-Glcp-(1→4)-β-D-ManpNAc3NAcA-(1→**. Zudem besitzt *Streptomyces sp.* VKM Ac-2124 ein β-glykosyliertes Polymer mit der sich wiederholenden Einheit: **3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-Ulopyranosonic Acid** (Kdn) und ein weiteres mit: **1,5-Poly(Ribitol-Phosphat)** (Shashkov et al. 2002a).

## 2.5 Die Funktionen von Wandteichonsäuren

### 2.5.1 Wandteichonsäuren führen zu einer negativ geladenen Zelloberfläche

Wandteichonsäuren sowie Lipoteichonsäuren errichten ein Kontinuum aus anionischen Ladungen an der Oberfläche Gram-positiver Bakterien. Die negative Ladung der Zellwände ist in > 90 % der Studien auf die Gegenwart von Phosphorsäureresten von Teichonsäuren zurückzuführen. Beispiele hierfür wären Poly(Polyolphosphat), Poly(Glycosylpolyolphosphat) und Poly(Glycosyl-1-Phosphat). Das Kontinuum von negativen Ladungen hat eine essenzielle Bedeutung für Gram-positive Bakterien. Bakterien, welche unter phosphatlimitierenden Bedingungen wachsen oder denen entsprechende Biosynthesegene fehlen, sind nicht in der Lage, WTA auszubilden. Diese produzieren stattdessen andere polyanionische Polymere, wie z.B. Teichuronsäuren mit Carboxylgruppen oder Teichulosonsäuren, die durch ihre Ald-2-Ulosensäure zur negativen Ladung beitragen (Silhavy et al. 2010; Tul'skaya et al. 2011a). Auch der Besitz saurer Seitenketten, wie Glycerol, Phosphat, organische Säuren (Bsp. Brenztraubensäure und Bernsteinsäure) oder Sulfat führen ebenfalls zu einer negativen Ladung in der Zellwand (Schäffer und Messner 2005).

Die Anwesenheit großer elektronegativ geladener Moleküle könnte einen bedeutenden Einfluss auf die Permeabilität der Zellwand besitzen und somit auch auf den Export anderen Makromoleküle, wie Proteine, aus der Zelle (Janczura et al. 1961).

### 2.5.2 Wandteichonsäuren als Phosphatreserve

Verschiedene Studien in der Vergangenheit zeigten, dass unter Phosphatmangel Zellwände von *B. subtilis* einen geringeren Anteil an phosphathaltigen Teichonsäuren aufweisen als Zellen, welche Zugang zu Phosphat besitzen. Grund dafür ist, dass unter Phosphatmangel die Synthese phosphathaltiger Teichonsäuren eingestellt wird und stattdessen das alternative phosphatfreie anionische Polymer Teichuronsäure synthetisiert wird (Janczura et al. 1961; Ellwood und Tempest 1969; Rosenberger 1976; Glaser und Loewy 1979).

1979 zeigte Grant in einer Studie, dass phosphathaltige Wandteichonsäuren bei Mangel von anorganischem Phosphat auch als Phosphatreserve dienen können. Dies sei notwendig, um essenzielle Bestandteile, wie DNA, zu synthetisieren. Um dies nachzuweisen, wurde zunächst PL-Medium mit limitiertem anorganischem Phosphat mit *B. subtilis* 168 angeimpft. Anschließend wurde eine Wachstumskurve anhand der

Absorption (A600) erstellt. Das Ergebnis war eine biphasische Wachstumskurve. Zunächst zeigte sich eine erste rasante exponentielle Wachstumsphase, welche nachdem vollständigen Verbrauch des anorganischen Phosphats aus dem Medium abrupt endete. Nach einer kurzen Verzögerung kam es zu einer zweiten langsameren Wachstumsphase, welche für 3-4 Stunden anhielt. Diese ging anschließend in eine stationäre Phase über. Ein Vergleich zwischen der ersten und zweiten Wachstumsphase zeigte, dass Zellwände in der zweiten Wachstumsphase deutlich weniger Phosphat enthielten. Die phosphathaltigen Teichonsäuren aus den Zellwänden wurde auch nicht ans Medium abgegeben. Analysen ergaben, dass das tatsächlich im Medium vorkommende Phosphat geringer war als die erwartete Menge, welche durch die Abgabe von Teichonsäuren sich im Medium hätte befinden sollen. Diese Diskrepanz lässt darauf schließen, dass das Phosphat aus den Teichonsäuren direkt wieder von den Zellen aufgenommen wird. Bei einem weiteren Versuch wurden Teichonsäuren zu einer Kultur ohne Phosphat hinzugegeben. Auch dies stimulierte das Wachstum der Zellen (Grant 1979).

### **2.5.3 Wandteichonsäuren als Bindungsstelle für Phagen**

1971 beobachteten Archibald and Coapes, dass in *Bacillus subtilis* W23 die Bindungsfähigkeit des Phagen SP50 exponentiell anstieg, proportional zur vorhandenen Menge an Wandteichonsäuren in der Zellwand. Eine Bindung des Phagen wurde unter Phosphatmangel nicht beobachtet, da es hier anstelle von Teichonsäuren zur Produktion von Teichuronsäuren kommt (Archibald und Coapes 1971, 1976; Ellwood und Tempest 1969). Die Schlussfolgerung daraus lautete, dass der Rezeptor für den Phagen SP50 aus Teichonsäuren und Peptidoglykan besteht (Archibald und Coapes 1976).

### **2.5.4 Wandteichonsäuren binden Mg<sup>2+</sup>-Ionen**

Zur Aktivierung membrangebundener Enzyme und für weitere essenzielle Funktionen ist es für Zellen von Vorteil, eine hohe Konzentration an bivalenten Kationen nahe der Membran zu besitzen (Coleman 1969; Pal et al. 1990). Enzyme, welche an der Synthese vom PG und Teichonsäuren beteiligt sind, benötigen zur Aktivierung hohe Mengen an Magnesium (Chin et al. 1966; Brooks und Baddiley J. 1969). Solche Mg<sup>2+</sup>-Ionen können durch die Bindung an die Phosphatgruppen von Teichonsäuren angereichert werden (Heptinstall et al. 1970; Pal et al. 1990).

Dank der Phosphatgruppen in Teichonsäuren und der Carboxylgruppen in Teichuronsäuren sind die Zellwandpolymere in der Lage  $Mg^{2+}$ -Ionen zu binden. Diese Eigenschaft ist bei beiden Polymeren ähnlich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unter bestimmten Nährstoffbedingungen, Teichuronsäuren die Funktionen von Teichonsäuren ersetzen können.

Im isolierten Zustand zeigen beide Polymere jedoch eine geringere Bindungsfähigkeit bezüglich  $Mg^{2+}$ -Ionen als vergleichsweise zu zellwandgebundenen Polymeren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass zellwandgebundene Teichonsäuren und Teichuronsäuren  $Mg^{2+}$ -Ionen bivalent, in sogenannten anionischen Zentren, binden. Dies führt zu einer höheren Affinität. Des Weiteren binden Teichonsäuren im isolierten Zustand mehr  $Mg^{2+}$ -Ionen als vergleichsweise Teichuronsäuren. Dies bedeutet, dass das Phosphat in den isolierten Teichonsäuren über eine bessere Bindefähigkeit für  $Mg^{2+}$ -Ionen verfügt als die Carboxylgruppe von Teichuronsäuren (Heckels et al. 1977). Monovalente Ionen wie  $Na^+$  werden dagegen mit einer geringeren Effizienz an Teichonsäuren gebunden als bivalente Ionen wie  $Mg^{2+}$  (Pal et al. 1990).

### **2.5.5 Wandteichonsäuren unterstützen die Faltungsrage bei sekretierten Proteinen**

1999 postulierten Chambert und Petit-Glatron in ihrem Paper, dass Wandteichonsäuren als Kofaktor in die Faltung sekretierter Proteine involviert sind. In den durchgeführten Versuchen wurde Polyphosphat (PolyP) als Model verwendet, um die Eigenschaften von Teichonsäuren nachzubilden. Da  $Ca^{2+}$  als ein möglicher Kofaktor bei der Faltung von Proteinen agiert, wurden die Versuche mit und ohne Calcium durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Faltungsrage von Levansucrase in Anwesenheit von PolyP steigt. Dies konnte in und ohne die Gegenwart von Calcium nachgewiesen werden. Bei  $\alpha$ -Amylase zeigte sich dagegen keine Steigerung der Faltungsrage. Eine mögliche Hypothese dafür war, dass PolyP das freie Calcium aufgrund seiner Affinität bindet und somit  $\alpha$ -Amylase in einem ungefalteten Stadium fortbesteht. Dies konnte durch die Zugabe einer hohen Konzentration an Calcium bewiesen werden (Chambert und Petit-Glatron 1999).

### 2.5.6 Wandteichonsäuren bei der nasalen Kolonisierung

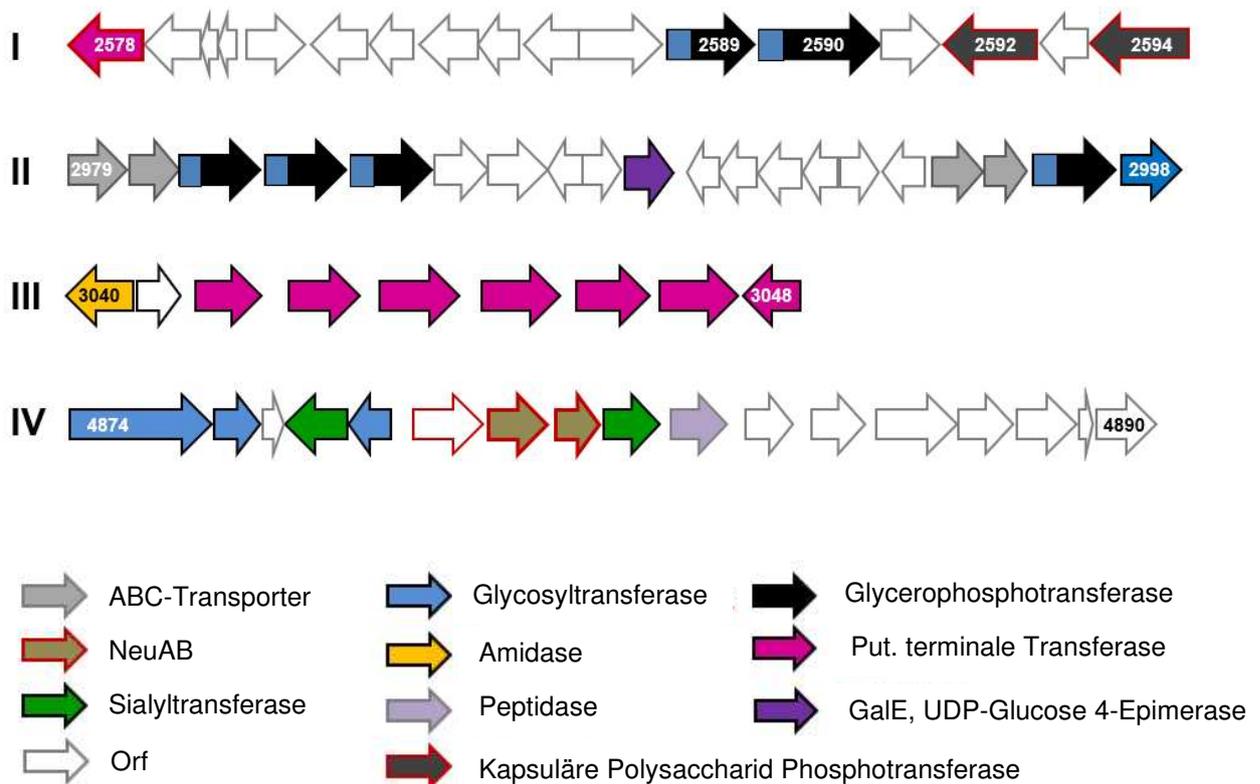
Für *Staphylococcus aureus* spielen die in der Zellwand verankerten Wandteichonsäuren bei der nasalen Kolonisierung eine wesentliche Rolle (Weidenmaier et al. 2004). Diese bestehen aus sich wiederholenden Ribitolphosphat-Einheiten, welche mit *N*-Acetylglycosamin und D-Alanin modifiziert sind (Baddiley et al. 1962). Weidenmaier et al. (2004) zeigten in einer Studie die essenzielle Bedeutung dieser Wandteichonsäuren für *S. aureus*. Hierfür wurde das *tagO*-Homolog in *S. aureus* SA113 inaktiviert (Weidenmaier et al. 2004). Das Enzym TagO katalysiert den ersten Schritt der WTA Synthese, indem es UDP-GlcNAc an das membrangebundene Carrier-Lipid bindet (Soldo et al. 2002). Die Mutante  $\Delta tagO$  von *S. aureus* verfügt über keine Wandteichonsäuren mehr. Zwischen Wildtyp und der  $\Delta tagO$  Mutante gab es in Hinblick auf die in der Zellwand verankerten Proteine jedoch keine Differenz. Dies impliziert, dass die Abwesenheit von Wandteichonsäuren in *S. aureus* SA113  $\Delta tagO$  keinen wesentlichen Einfluss auf die Oberflächenmoleküle besitzt. Anschließend wurden Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) mit dem Wildtyp und der  $\Delta tagO$  Mutante beimpft. Nach 7 Tagen waren nur Baumwollratten, welche den Wildtyp erhalten haben, mit *S. aureus* infiziert. Dies zeigt, dass Wandteichonsäuren die Interaktion mit nasalen Epithelzellen vermitteln und ein Defizit zu einer rasanten Eliminierung der Bakterien führt (Weidenmaier et al. 2004).

### 2.5.7 Wandteichonsäuren als Schutz

Wandteichonsäuren schützen *S. aureus* vor den antimikrobiellen Fettsäuren der menschlichen Haut (Kohler et al. 2009). Zudem hindern sie Lysozym daran, an das Peptidoglykan zu binden und tragen somit zur Lysozym-Resistenz bei (Bera et al. 2007).

## 2.6 Putative Zellwandglykopolymer-Biosynthesegene in *Streptomyces coelicolor*

In *Streptomyces coelicolor* wurden vier Gencluster identifiziert, welche eine putative Rolle bei der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren spielen (Abbildung 13). Interessanterweise ist Cluster I (SCO2578-2594) nur ca. 20 kb vom *mre*-Gencluster (SCO2607-2611) lokalisiert, welches die Hauptkomponenten des **S**treptomyces **S**poore Wall **S**ynthesizing **C**omplex (SSSC) kodiert. Mehrere Proteine, welche von Cluster I und Cluster II kodiert werden, weisen Sequenzähnlichkeiten zu *B. subtilis* Proteinen (TagF, TagV, TagG/TagH) auf, die an der Synthese von glycerolhaltigen Wandteichonsäuren beteiligt sind, bzw. auf Proteinebene mit Komponenten des SSSC interagieren (Kleinschnitz et al. 2011b).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der vier Gencluster, welche eine putative Rolle bei der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren spielen (Sigle et al. 2015, modifiziert).**

Die Inaktivierung des TagV-Homologs SCO2578 (PdtA) (Sigle et al. 2016b), SCO2584 (Kleinschnitz et al. 2011b), der mutmaßlichen Polysaccharidphosphotransferasen SCO2592 und SCO2594 (Santos-Beneit et al. 2014; Vollmer et al. 2019) sowie des TagF-Homologs SCO2997 (Kleinschnitz et al. 2011b) führte zu einer beeinträchtigten Sporulation.

Cluster III besteht aus einer Ansammlung von putativen terminalen Transferasen, die Ähnlichkeiten zu TagUV besitzen und vermutlich Zuckerpolymeren über Phosphodiesterbindungen kovalent mit dem Mureinsäure-Rest des Peptidoglykans verknüpfen.

Cluster IV kodiert Gene für die Synthese der Neuraminsäureuntereinheit der Teichulosonsäure. Eine Inaktivierung von SCO4879, SCO4890 und SCO4881 führte dazu, dass *S. coelicolor* M145 das Teichulosonsäure-Zellwandglykopolymer nicht mehr synthetisieren konnte (Ostash et al. 2014).

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Mutanten von *SCO2997* (Kleinschnitz et al. 2011b), *SCO2578* (Sigle et al. 2016b) und *SCO2594* (Santos-Beneit et al. 2014) erzeugt und teilweise charakterisiert.

Im dieser Doktorarbeit werden die Auswirkung der Geninaktivierungen der putativen Zellwandglykopolymer-Gene *SCO2997*, *SCO2578*, *SCO2589-2590* und *SCO2594* bzw. der jeweiligen Komplementationskonstrukte analysiert.

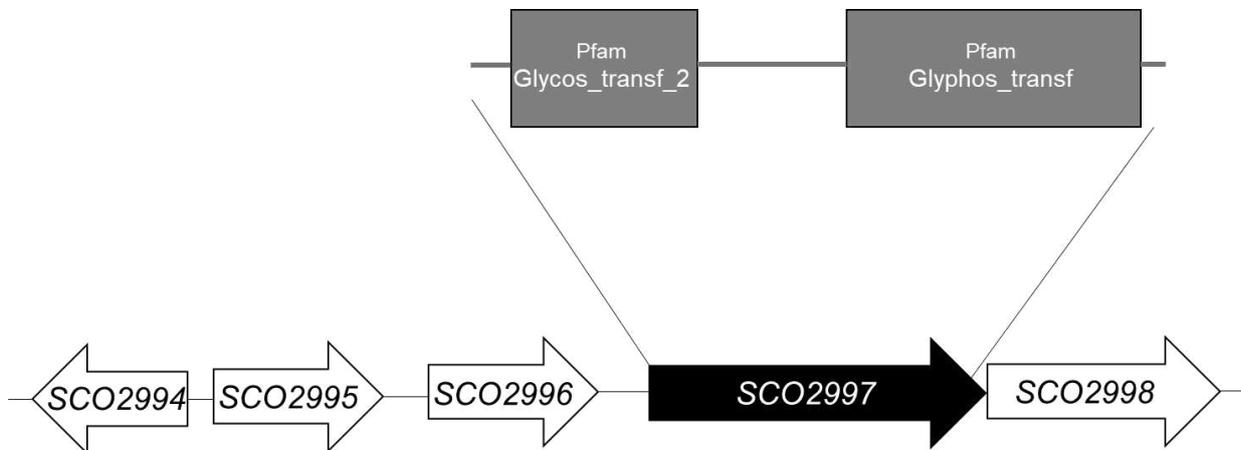
### 2.6.1 SCO2997

Aufgrund seiner Größe und seiner Sequenzähnlichkeit wurde SCO2997 als eines von sechs TagF-Homologen in *S. coelicolor* identifiziert (Tabelle 2).

SCO2997 besitzt neben der für TagF Proteine charakteristischen Glycerophosphotransferase-Domäne auch eine N-terminale Glycosyltransferase-Domäne, welche vermutlich eine Rolle bei der Polymerisation eines Zellwandglykopolymeren spielt (Abbildung 14). Darüber hinaus entspricht die Lokalisation von *SCO2997* direkt neben den *tagG/tagH*-ähnlichen ABC-Transporter Genen *SCO2995* und *SCO2996* der genetischen Organisation von *B. subtilis* und *S. aureus* (Kleinschnitz et al. 2011b).

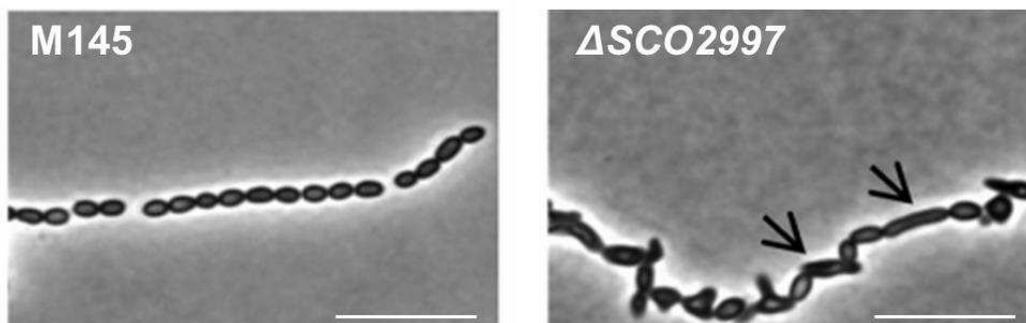
**Tabelle 2: TagF-ähnliche Proteine in *S. coelicolor* A3(2) M145:** Die Pfam-Domänen wurden mit Hilfe von Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) vorhergesagt. Zum Vergleich ist ebenfalls die Domänenarchitektur von TagF und TagB von *B. subtilis* angegeben.

Name	Größe (aa)	Glycos_transf_2 Domäne		Glyphos_transf Domäne	
		Position	Score	Position	Score
SCO2589	743	005-171	6.9 e -34	348-713	6.8 e -136
SCO2590	1197	006-173	1.5 e -35	827-1192	2.1 e -113
SCO2981	765	009-181	1.0 e -37	358-720	2.2 e -121
SCO2982	736	005-181	5.0 e -20	343-708	2.9 e -135
SCO2983	745	005-169	1.6 e -34	342-717	8.8 e -120
SCO2997	746	014-154	8.9 e -07	348-718	4.1 e -135
TagF	746	-	-	369-744	4.6 e -144
TagB	381	-	-	018-378	2.1 e -107



**Abbildung 14: Genetische Umgebung von *SCO2997* und schematische Darstellung der vorhergesagten PFAM-Domänen (SMART-embI).** *SCO2997* liegt im Genom zwischen den TagGH-ähnlichen ABC-Transporter Genen *SCO2995* sowie *SCO2996* und dem Glycosyltransferase Gen *SCO2998*. *SCO2997* verfügt über eine Glycosyltransferase- sowie über eine Glycerophosphotransferase-Domäne.

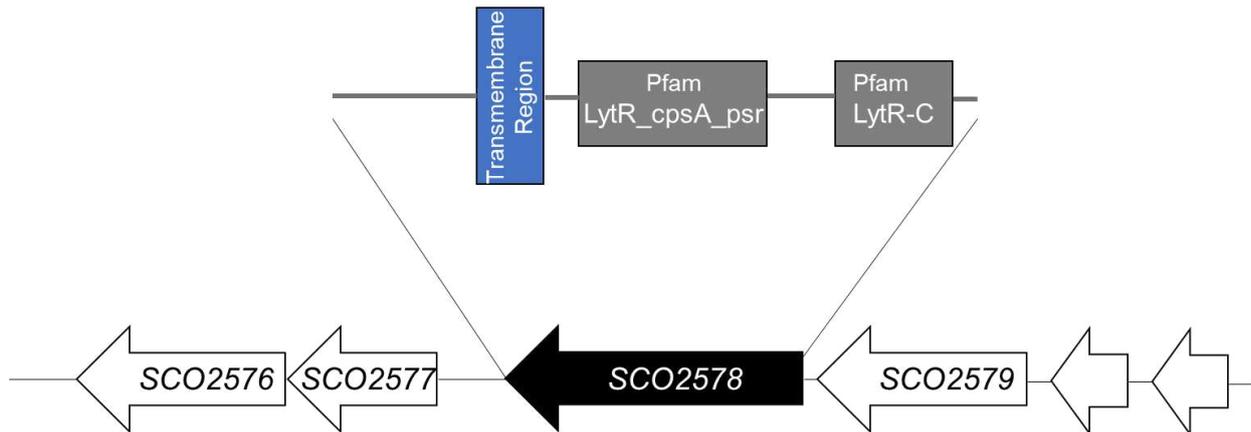
2011 wurde von Kleinschnitz et al. die Inaktivierung und die Charakterisierung von *SCO2997* sowie die Herstellung einer Deletionsmutante beschrieben. Das Gen ist zwar nicht essenziell für das Überleben von *Streptomyces coelicolor*, die Inaktivierung führte jedoch zu einem verzögerten Wachstum und beeinträchtigte die Sporulation. Im Vergleich zu den regelmäßig geformten Sporen des Wildtyps M145 wiesen die Sporen der Mutante eine größere Variation ihre Sporenlänge betreffend auf (Abbildung 15). Zudem wies die Mutante Abweichungen und Veränderungen in der Dicke der Zellwand auf. Die genetische Komplementation mit dem in die chromosomale Attachment Site des Aktinophagen  $\Phi$ C31 integrierten Plasmids pSET2997 konnte die unregelmäßige Sporengröße nur teilweise komplementieren (Kleinschnitz et al. 2011b).



**Abbildung 15: Sporengröße beim Wildtyp M145 und bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 von *Streptomyces coelicolor* (Kleinschnitz et al. 2011b).** Die Mutante  $\Delta$ SCO2997 verfügt über unregelmäßige Sporen, welche sich von denen des Wildtyps M145 deutlich unterscheiden (Maßstab = 10  $\mu$ m).

### 2.6.2 SCO2578

Die Polydiglycosyltransferase PdtA (SCO2578) gehört zur LytR-CpsA-Psr (LCP) Familie (Abbildung 16) von TagV-ähnlichen Glykopolymertransferasen (Sigle et al. 2016b). Neben PdtA gibt es noch 10 zusätzliche LCP-Homologe. Sieben Gene (SCO3042-3048) davon bilden ein Cluster aus *tagT*, *tagU* oder *tagV*-ähnlichen Transferase Genen.

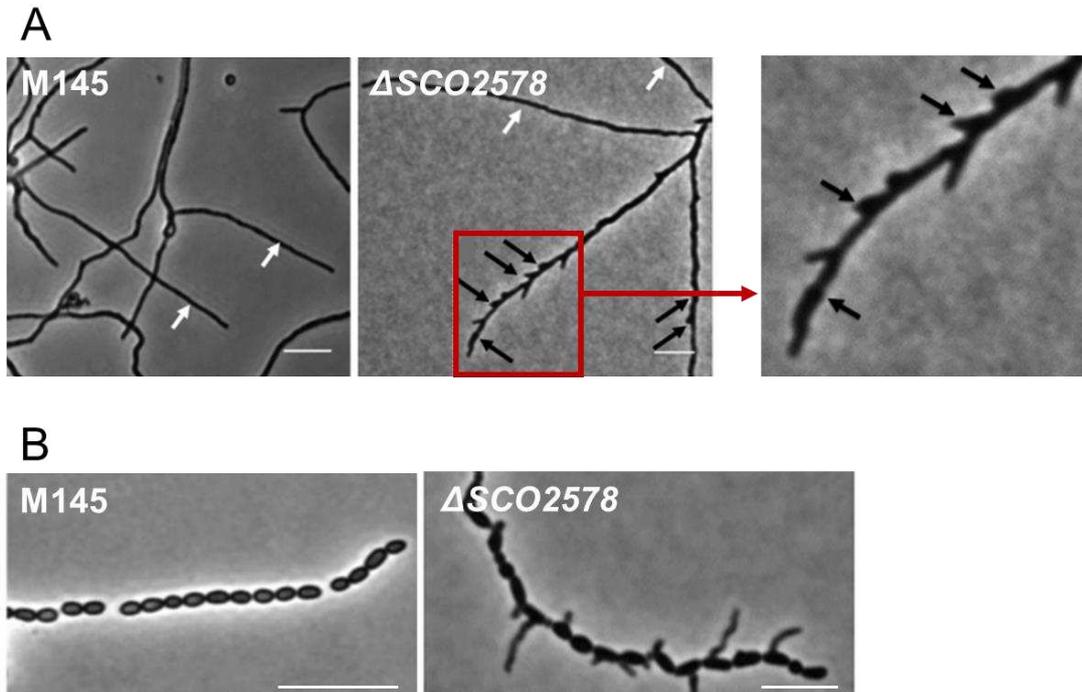


**Abbildung 16: Genetische Umgebung von *SCO2578* (*pdtA*) und schematische Darstellung der vorhergesagten Protein-Domänen (SMART-embI).** *SCO2578* verfügt über eine transmembrane Region (blau) sowie über zwei LytR-Cps-Psr-Domänen, von denen eine am C-Terminus sitzt.

*SCO2578* wurde beim Screening einer genomischen Bibliothek als Interaktionspartner der SSSC-Proteine MreC, MreD und Sfr (RodA) identifiziert. Des Weiteren interagiert *SCO2578* auch mit RodZ und dem Penicillin-binde Proteinen PBP2, FtsI und *SCO3580*. Aufgrund dieser Interaktionen liegt es nahe, dass *SCO2578* ebenfalls an der Synthese der Sporenhülle beteiligt ist (Kleinschnitz et al. 2011a).

Zur Inaktivierung von *pdtA* (*SCO2578*) wurde der gesamte Kodierbereich durch die Hexanukleotidsequenz GGATCC ersetzt. Die *pdtA* Mutante ( $\Delta$ *SCO2578*) bildete irreguläre Sporenketten (Abbildung 17) aus, bei denen häufig die Integrität der Sporenhülle beeinträchtigt war. Im LIVE/DEAD Assay waren 34 % der Sporen abgestorben und die überlebenden Sporen wiesen beim Auskeimen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Salzstress auf. Darüber hinaus war im vegetativen Substratmyzel das apikale Spitzenwachstums sowie die Verzweigung des Myzels beeinträchtigt. Diese Defekte korrelierten mit einem verringerten Phosphat- und Hexosamingehalt in der Sporenwand, was auf eine Reduktion von Polydiglycosylphosphat in der Sporenwand hindeutete.

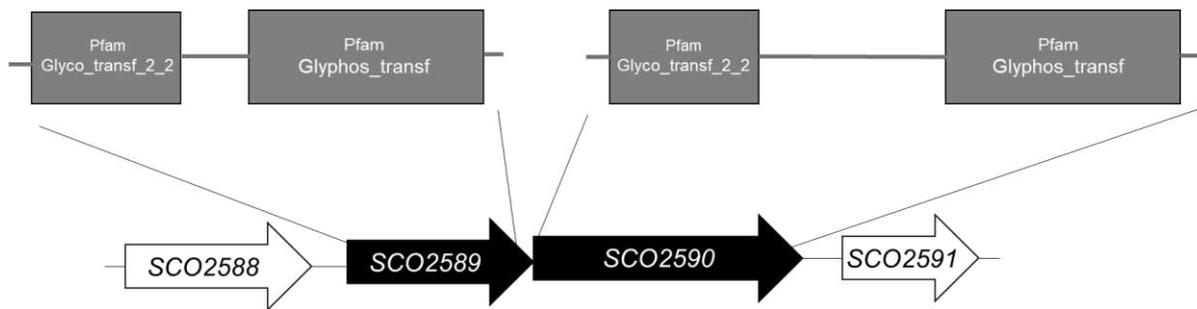
Die Defekte der *pdtA* Mutante ( $\Delta$ *SCO2578*) ließen sich mit einem Plasmid komplementieren, welches PdtA mit zwei zusätzlichen Aminosäuren (RS) am C-Terminus kodierte (pRMpdtAc bzw. pRM2578c) (Sigle et al. 2016b).



**Abbildung 17: Phänotyp von Myzel und Sporen im Wildtyp M145 und in der Mutante  $\Delta$ SCO2578 von *Streptomyces coelicolor*.** **A:** Im Vergleich zum Wildtyp M145 verfügen die Myzelhyphen der Mutante  $\Delta$ SCO2578 über aberrante Verzweigungen (Maßstab = 5  $\mu$ m, Sigle et al. 2016). **B:** Die Sporenketten der Mutante  $\Delta$ SCO2578 (Maßstab = 5  $\mu$ m, unveröffentlicht; Steffen Sigle und Günther Muth; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen) sind nicht nur unregelmäßig, sie keimen auch früher aus als die Sporen des Wildtyps M145 (Maßstab = 10  $\mu$ m, Kleinschnitz et al. 2011b).

### 2.6.3 SCO2589-90

Die genomische Organisation legt nahe, dass SCO2589 und SCO2590 ein Zellwandglykopolymer polymerisieren, welches dann durch SCO2578 an das Peptidoglykan angeheftet wird. Die beiden putativen Glycerophosphotransferase Gene *SCO2589* und *SCO2590* befinden sich in Cluster I und verfügen zusätzlich jeweils über eine N-terminale Glycosyltransferase-Domäne (Abbildung 18).

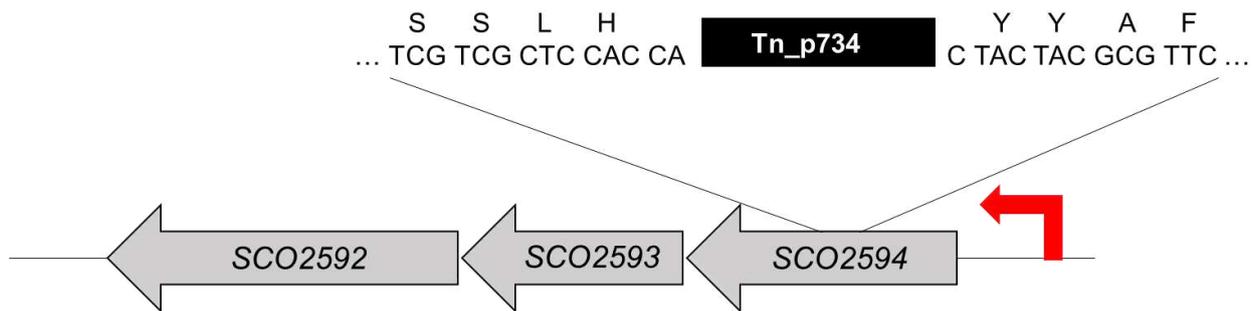


**Abbildung 18: Genetische Umgebung von *SCO2589* und *SCO2590* und schematische Darstellung der vorhergesagten PFAM-Domänen (SMART-embI). *SCO2589* sowie *SCO2590* verfügt jeweils über eine Glycosyltransferase- sowie über eine Glycerophosphotransferase-Domäne.**

In der Literatur wurden die beiden Gene *SCO2589* und *SCO2590* oder entsprechende Mutanten noch nicht beschrieben und charakterisiert. Bei der in dieser Arbeit angewendeten Mutante  $\Delta SCO2589-90$  wurde der gesamte Kodierbereich von *SCO2589* und *SCO2590* durch homologe Rekombination deletiert und durch die Sequenz GGATCC ersetzt (unveröffentlicht; Latus und Muth; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen). Zur genetischen Komplementation wurde *SCO2589* bzw. *SCO2590* in pSET152 kloniert und in die chromosomale Attachment Site des Aktinophagen PhiC31 inseriert (unveröffentlicht; Latus und Muth; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen).

#### 2.6.4 *SCO2594*

Die Mutante *SCO2594::TnpHL734* wurde im Rahmen einer Transposon-Mutagenese von *S. coelicolor* M145 aufgrund einer veränderten Koloniemorphologie isoliert (Schmid 2019; Vollmer et al. 2019). In der Mutante wurde das Gen *SCO2594* durch die Insertion des pHL734 Mini-Transposon an Position 2.809040 unterbrochen (Abbildung 19). *SCO2594* bildet zusammen mit *SCO2593* und *SCO2592* ein Operon. Der Promotor befindet sich vor dem Gen *SCO2594*. Darüber hinaus besitzen die Gene *SCO2594* und *SCO2593* überlappende Start- und Stopcodons (...GAC **TGATG** AAA...) und weisen somit eine translationale Kopplung auf. Obwohl das Mini-Transposon in der Orientierung inseriert ist, dass der *aac* Promotor downstream liegende Gene ablesen könnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertion des Transposons einen polaren Effekt hat und die Expression von *SCO2593* und *SCO2592* beeinträchtigt.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Operons der Gene *SCO2592*, *SCO2593* und *SCO2594*.** Der gemeinsame Promotor befindet sich vor dem Gen *SCO2594*, welches durch das Transposon pHL734 unterbrochen wird.

Laut BLAST handelt es sich bei *SCO2594* und *SCO2592* um putative Exopolysaccharid-Phosphotransferasen von *Streptomyces coelicolor* M145. *SCO2594* sowie *SCO2592* würden somit über die molekulare Funktion einer Phosphotransferase verfügen und wären in der Lage, den Transfer von phosphathaltigen Gruppen an das Peptidoglykan zu katalysieren. Dadurch würden *SCO2592* und *SCO2594* eine wesentliche Rolle bei der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren spielen.

*SCO2594* und *SCO2592* sind im Besitz von vier Stealth-Domänen, die charakteristisch sind für Polysaccharid-Phosphotransferasen, welche an der Synthese von Exopolysaccharid-Schleimkapseln beteiligt sind. Die Stealth-Domänen verfügen über vier CR-Regionen und sind Teil einer Proteinfamilie, welche von Bakterien bis zu höheren Eukaryoten konserviert ist. Die ersten Familienmitglieder wurden in Mikroben entdeckt. Sie ermöglichen es Pathogenen, dem angeborenen Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Mikrobielle Stealth Proteine sind ebenfalls bei der Biosynthese von Exopolysacchariden involviert. Es besteht die Hypothese, dass Stealth Proteine als Hexose-1-Phosphoryltransferase agieren können (Sperisen et al. 2005).

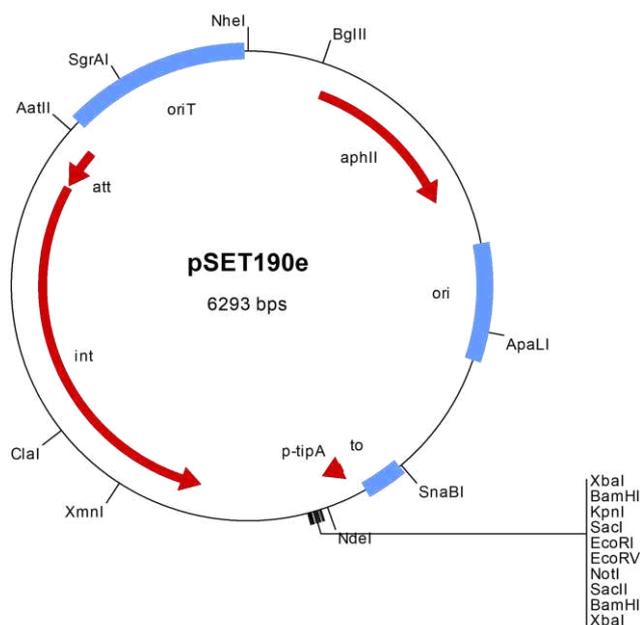
*SCO2592* besitzt zusätzlich auch eine PFAM Glycosyltransferase-Domäne. Da *SCO2593* keine Sequenzähnlichkeit zu einem bekannten Protein aufweist, lässt sich die molekulare Funktion von *SCO2593* bei der Zellwandglykopolymer-Synthese nicht vorhersagen.

Zur genetischen Komplementation wurde das Genfragment von SCO2594 in den integrativen Vektor pSET190e (Abbildung 20) mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und EcoRI kloniert (unveröffentlicht; Latus et al.; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen).

A

Bezeichnung Primer	Sequenz	Fragmente
UpP_2594Nde	TGCGCATATGTTTCGAGCCGTTCTGAG	2050bp
Up2594Nde	TGCGCATATGCGAAATCCTGAAG	1800 bp
Rev2594E	GCACGGAATTCATCAGTCGTCTGC	

B



C

NdeI	HindIII	XbaI	BamHI	KpnI	EcoRI
GGACATATGAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGATAT					
CGCGCGCGGCCGCGGATCCTCTAGAGTCG					

**Abbildung 20: Genetische Komplementation von SCO2594::TnpHL734 mit SCO2594 in pSET190e. A:** Verwendete Forward und Reverse Primer. **B:** Verwendetes Plasmid pSET190e. **C:** Zielfragment in pSET190e.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenzen
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. coelicolor</i> M145	prototroph, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup>	(Kieser et al. 1982)
$\Delta$ SCO2997	SCO2997-Deletionsmutante von M145	(Kleinschnitz et al. 2011b)
$\Delta$ SCO2997::pSET2997	$\Delta$ SCO2997 komplementiert mit pSET2997	(Kleinschnitz et al. 2011b)
$\Delta$ SCO2578	SCO2578 ( <i>pdtA</i> )-Deletionsmutante von M145	(Sigle et al. 2016b)
$\Delta$ SCO2578::pRM2578c	$\Delta$ SCO2578 ( $\Delta$ <i>pdtA</i> ) komplementiert mit pRM2578c (pRM <i>pdtAc</i> )	(Sigle et al. 2016b)
$\Delta$ SCO2589-90	SCO2589-90-Deletionsmutante von M145	(unveröffentlicht; Latus und Muth, Tübingen)
$\Delta$ SCO2589-90::pSET2589-90	$\Delta$ SCO2589-90 komplementiert mit pSET2589-90	(unveröffentlicht; Latus und Muth, Tübingen)
SCO2594::TnpHL734	Transposon-Mutagenese bei SCO2594 von M145	(unveröffentlicht; Latus und Muth, Tübingen)
SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594)	SCO2594::TnpHL734 komplementiert mit pSET2594	(unveröffentlicht; Latus und Muth, Tübingen)

### 3.2 Flüssigmedien und Agar

Tabelle 4: Verwendete Flüssigmedien und Agar

	Bestandteil	Menge
HA-Medium (pH 7,3)	Malzextrakt	10 g/L
	Hefeextrakt	4 g/L
	Glucose	4 g/L
Soja-Mannit-Agar	Mannitol	20 g/ L
	Sojamilch fettreduziert	20 g/ L
	Agar-Agar	17 g/ L
LB-Agar	LB Broth mit Agar	35 g/ L

### 3.3 Puffer und Lösungen

**Tabelle 5: Zellwandisolation (Schäberle et al. 2011)**

Lösungen	Konzentration
Tris/HCL (pH 7,0)	50 mM
SDS	4 %
NaCl	1 M
Tris/ HCL (pH 7,5)	100 mM
+ MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	20 mM
+ DNase	10 µg/ml
+ RNase	50 µg/ml
+ CaCl <sub>2</sub>	10 mM
+ Trypsin	100 µg/ml
SDS	10 %
LiCl	8 M
EDTA	100 mM (pH 7,0)
Aceton p.A.	99,89 %

**Tabelle 6: Hayashi-Assay (Hayashi 1975)**

Lösungen	Konzentration
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,7 M (pH 7,2)
Methylenblau	0,5 %

Anschließend erfolgt die Zugabe von Chloroform, welches sich in Gegenwart von SDS blau färbt.

**Tabelle 7: Hydrolyse (Sigle et al. 2016a)**

Lösungen	Konzentration
HCL	50 mM
NaOH	1 M

**Tabelle 8: Phosphat-Assay (Chen et al. 1956)**

Lösungen	Konzentration
Perchlorsäure	70-72 %
Ammonium-Molybdat	1,25 %
L-Ascorbinsäure	5 %

Die Ammonium-Molybdat-Lösung und die L-Ascorbinsäure-Lösung müssen lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden und dürfen nicht älter als 2 Wochen sein.

**Tabelle 9: Hexosamin-Assay (Smith und Gilkerson 1979)**

Lösungen	Konzentration
HCL	1 M
Natriumnitrit	2,5 %
Ammoniumamidosulfonat	12,5 %
MBTH	0,25 %
Eisen(III)-chlorid	0,5 %

**Tabelle 10: Kdn-Assay (Matsuno und Suzuki 2008)**

Lösungen	Konzentration
Natriumperiodat	10 mM
Natriumthiosulfat	50 mM
Ammoniumacetat	4 M (pH 7,5)
Acetoacetanilid	100 mM in EtOH

Der Test ist sehr sensitiv. Daher sollten alle Lösungen in unbenutzten Zentrifugenröhrchen frisch angesetzt werden. Des Weiteren sollten die Lösungen vor dem Gebrauch im Eisbad gekühlt werden.

**Tabelle 11: Lösungen zum Ansetzen eines Fix- und Lauf-Polyacrylamid-Gels (20 % Gel)**

Lösungen	Konzentration	Menge für Lauf-Gel (x 2)	Menge für Fix-Gel (x 0,25)
Acrylamid (37, 5:1)	30 %	93,2 ml	11,65 ml
3xTBE-Buffer (pH 8,26)		23,4 ml	2,93 ml
+ Tris	0,6 M		
+ Borsäure	0,6 M		
+ EDTA	6 mM		
ddH <sub>2</sub> O	/	23,4 ml	2,93 ml
APS	10 %	560 µl	140 µl
TEMED	/	56 µl	7 µl

APS und TEMED starten die Polymerisation des Gels und sollten vorausschauend erst kurz vor dem Befüllen der Gel-Apparatur hinzugefügt werden.

**Tabelle 12: Lösungen für die Silbernitratfärbung (Blum et al. 1987; Heckels et al. 1977)**

Lösungen	Bestandteil	Menge/ Konzentration
Fix	MeOH	50 %
	AcOH	12 %
	HCOH	0,5 ml 37 %/ L
Wash mit Ethanol	EtOH	50 %
Pretreat (Vorbehandlung)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,2 g/ L
Impregnate (Imprägnieren)	AgNO <sub>3</sub>	2 g/ L
	HCOH	0,75 ml 37 %/ L
Develop (Entwickeln)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	60 g/ L
	HCOH	0,5 ml 37 %/ L
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	4 mg/ L
Stop	MeOH	50 %
	AcOH	12 %
Wash mit Methanol	MeOH	50 %

Vor der Färbung mit Silbernitrat wird das Polyacrylamid-Gel über Nacht in ein Färbebad mit Alcianblau (1 mg/ ml in ddH<sub>2</sub>O) gelegt.

Tabelle 13: Buffer für die HPLC-Analysen

Lösungen	Bestandteil	Konzentration
Buffer A	HCOH	0,1 %
	Ammoniumformiat	0,05 %
	ddH <sub>2</sub> O	99,85 %
Buffer B	Acetonitil	5 %

### 3.4 Chemikalien und andere Materialien

Tabelle 14: Chemikalien und Materialien

Chemikalien	Anbieter
Acetoacetanilid	Merck
Aceton p.a.	Sigma Aldrich
Acetonitil	Merck
AcOH	Roth
Acrylamid	Roth
Agar-Agar	Roth
AgNO <sub>3</sub>	Roth
Alcianblau 8 GX	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumamidosulfonat	Merck
Ammoniumformiat	Merck
Ammonium-Molybdat	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Riedel-de Haën
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Chloroform	Roth
EDTA (Triplex III)	Merck
Eisen(III)-chlorid	Roth
EtOH	Roth
Gene Frame (65 µl)	Thermo Fisher
Glasperlen (Ø 0,1-0,5 mm)	Roth
Glucose	Sigma Aldrich

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien	Anbieter
Glyzerin	Roth
HCL	Sigma Aldrich
HCOH	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
L-Ascorbinsäure	Applichem
LB Broth mit Agar	Sigma Aldrich
LiCl	Sigma Aldrich
Malzextrakt	Oxoid
Mannitol	Merck
MBTH	Merck
MeOH	Roth
Methylenblau	Merck
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
NaCl	Riedel-de Haën
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	Roth
NaOH	Merck
Natriumnitrit	Roth
Natriumperiodat	Merck
Perchlorsäure	Roth
SDS	Serva
Sojamilch fettreduziert	Hensel
TEMED	Roth
Trizma Base	Sigma Aldrich
Vancomycin-Plättchen (5 µg)	Oxoid
Wattepads	dm

**Tabelle 15: Enzyme**

Enzym	Anbieter
DNase	Sigma Aldrich
RNase	Sigma Aldrich
Trypsin	Oxoid

## 3.5 Methoden

### 3.5.1 Gewinnung von Sporen

Um für Zellwandglykopolymer-Analysen genügend Sporen von *S. coelicolor* zu gewinnen, sind 100-120 MS-Agar-Platten notwendig. Je MS-Agar-Platte werden 5  $\mu$ l einer  $10^8$  Sporensuspension ausgestrichen und für acht Tage bei 29 °C inkubiert. Anschließend werden die Sporen geerntet. Auf jede Platte werden jeweils 4 ml ddH<sub>2</sub>O gegossen. Darauffolgend wird jede Platte einzeln mit einem gefalteten sterilen Wattepad abgeschwemmt. Pro Platte wird jeweils ein neues Wattepad verwendet. Nach dem Abschwemmen wird die Suspension von den Platten durch das jeweils verwendete Wattepad mit einer 5 ml Spritze gesogen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Dieses muss während der Sporenernte auf Eis stehen damit die Sporen nicht auskeimen. Volle Falconröhrchen werden für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet, welches Zellen samt Zellwände enthält, wird weiter verwendet oder nach der Sporenernte bei -18 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

### 3.5.2 Gewinnung von Myzel

Das Myzel von *S. coelicolor* wird aus 2 L HA-Medium gewonnen. Das Medium wird auf 10 x 500 ml Erlenmeyerkolben verteilt, welche anschließend mit 200 ml HA-Medium befüllt werden. 5  $\mu$ l einer  $10^8$  Sporensuspension werden jedem Erlenmeyerkolben hinzugefügt. Die Erlenmeyerkolben werden für drei Tage bei 600 rpm und 29 °C inkubiert. Anschließend wird das im HA-Medium gewachsene Myzel durch Zentrifugation gewonnen. Dafür wird das Medium samt Myzel auf 50 ml Falconröhrchen verteilt und 10 min bei 5000 rpm (25 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet, welches Zellen samt Zellwände enthält, wird weiter verwendet oder nach der Myzelernte bei -18 °C zur Aufbewahrung eingefroren. Für die weitere Verarbeitung zur Zellwandisolation sollte jedes Falconröhrchen um die 5 ml Myzel enthalten.

### 3.5.3 Isolieren von Zellwänden

Die Zellwände der Sporen sowie des Myzels von *S. coelicolor* werden mit Hilfe ausgewählter Reagenzien und Zentrifugation isoliert (Schäberle et al. 2011). Hierfür werden 5 ml Zellen von Sporen oder von Myzel in 30 ml 50 mM Tris/HCL pH 7,0 resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension tröpfchenweise zu 120 ml kochender 4 %iger SDS-Lösung hinzugegeben. Diese muss auf einem Magnetrührer ständig gerührt werden. Die restliche Zellsuspension in den Falconröhrchen muss während dieses Arbeitsschrittes auf Eis gestellt werden. Das Hinzufügen der Zellsuspension zur SDS-Lösung dauert 30 bis 40 Minuten. Anschließend wird 15 min weitergekocht. Während dieser Zeit muss die SDS-Lösung heiß bleiben. Sie darf jedoch nicht überschäumen. Nach dem Kochen wird die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und in 50 ml Falconröhrchen überführt. Es wird bei 13 000 g für 10 min (25 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird darauffolgend zweimal mit jeweils 40 ml 1 M NaCl 15 min bei 13 000 g (25 °C) nach dem Waschen pelletiert. Folgend wird mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen bis kein SDS mehr vorhanden ist. Hierbei wird das Pellet mit 40 ml warmen ddH<sub>2</sub>O für 20 min bei 13 000 g (25 °C) zentrifugiert. Dies kann bis zu 15 Waschschrte benötigen. Mit dem Hayashi-Assay (3.5.4.) ist es möglich nachzuweisen, ob SDS noch vorhanden ist.

Sofern kein SDS mehr im Präparat vorhanden ist, wird das Pellet in 2-4 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und in 5 ml PreCellys-Gefäße überführt. Glasperlen (Durchmesser von 0,1-0,5 mm) werden zur Suspension hinzugefügt. Die Glasperlen sollten ca. 1/3 der Lösung ausmachen, dabei sollte die Lösung viskos bleiben, sodass die Glasperlen die Zellbestandteile zerschlagen können. Das verwendete Programm der PreCellys schließt bei 6800 rpm für 30 sec die Zellbestandteile auf. Das Programm wird fünf Mal mit jeweils 5 min Pause dazwischen durchgeführt. In der Pause müssen die Proben auf Eis gestellt werden.

Nach dem Aufschluss mit der PreCellys müssen die Glasperlen entfernt werden. Dabei wird die Lösung aus Glasperlen und den aufgeschlossenen Zellbestandteilen in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bis 20 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Damit sich die Glasperlen absetzen wird das Falconröhrchen für 3 sec auf 700 rpm beschleunigt. Anschließend wird die obere Schicht der Lösung ohne die Glasperlen abgenommen. Dieser Schritt sollte drei Mal durchgeführt werden um möglichst viele Zellbestandteile aus den Glasperlen heraus zu waschen und Verluste der Probe zu vermeiden.

Um die Zellwände zu sammeln erfolgt nachträglich eine Zentrifugation für 15 min bei 25 000 rpm (25 °C). Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 3 ml 100 mM Tris/HCL pH 7,5 20 mM MgSO<sub>4</sub> gelöst. Nachfolgend erfolgt die Zugabe von DNase (Endkonzentration 10 µg/ ml = 5 µl) und RNase (Endkonzentration 50 µg/ ml = 25 µl). Nach der Zugabe von DNase und RNase wird die Zellwandsuspension für zwei Stunden bei 600 rpm und 37 °C inkubiert. Darauffolgend wird 1 M CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 10 mM = 50 µl) und 100 µg/ ml Trypsin (50 µl) hinzugegeben. Es folgt eine weitere Inkubation für 18 Stunden bei 600 rpm und 37 °C.

Nach der Inkubation wird zu der Zellwandsuspension 10 %ige SDS-Lösung (Endkonzentration 1 %) hinzugefügt. Es wird für 15 min bei 80 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wird mit ddH<sub>2</sub>O bis auf 20 ml aufgefüllt und bei 25 000 g für 30 min (25 °C) zentrifugiert.

Das Pellet wird in 10 ml 8 M LiCl resuspendiert und 15 min bei 600 rpm und 37 °C inkubiert. Die Probe wird danach mit ddH<sub>2</sub>O bis auf 20 ml aufgefüllt und bei 25 000 g für 30 min (25 °C) zentrifugiert.

Das gewonnene Pellet wird in 10 ml 100 mM EDTA ph 7,0 resuspendiert und 15 min bei 600 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe erneut mit ddH<sub>2</sub>O bis auf 20 ml aufgefüllt und bei 25 000 g für 30 min (25 °C) zentrifugiert.

Darauffolgend wird die Probe jeweils noch einmal mit 20 ml ddH<sub>2</sub>O und 20 ml Aceton gewaschen. Es wird jeweils bei 25 000 g für 30 min (25 °C) zentrifugiert.

Zum Schluss erfolgen fünf weitere Waschrritte mit jeweils 40 ml ddH<sub>2</sub>O für 20 min bei 25 000 g (25 °C).

Das saubere aus Zellwänden bestehende Pellet wird je nach Menge in 1-3 ml in ddH<sub>2</sub>O gelöst und eingefroren. Anschließend wird es für 2 Tage lyophilisiert. Die lyophilisierten Zellwände werden bei -18 °C gelagert.

#### **3.5.4 Hayashi-Assay**

Der Hayashi-Assay dient dazu Rückstände von SDS festzustellen (Hayashi 1975). Dafür wird beim Waschen der Probe mit ddH<sub>2</sub>O nach der Zentrifugation 335 µl vom Überstand entnommen. Dieser wird anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Als Kontrolle wird parallel eine Wasserprobe bei der Durchführung des Assays mitgeführt. Der erste Schritt ist das Hinzufügen von 170 µl 0,7 M Natriumphosphat pH 7,2 und 7 µl 0,5 % Methylenblau zur Probe. Zusätzlich wird 1 ml

Chloroform beigefügt und die Lösung wird für 30 sec gevortext. Die Chloroformphase befindet sich unten und wird in Gegenwart von SDS blau. Ist diese jedoch farblos oder leicht pink deutet dies auf die Abwesenheit von SDS hin.

Fortführend kann man die untere Chloroformphase vorsichtig mit einer Pipette abnehmen und in eine Küvette für eine photometrische Messung überführen. Die Lösung wird bei einer OD von 655 nm gemessen. Ein Wert unter 0,1 nm deutet auf die Abwesenheit von SDS hin.

Anschließend muss das Chloroform aus der Küvette möglichst schnell entfernt werden, da es diese zersetzt.

#### **3.5.5 Hydrolyse**

Bei der Hydrolyse werden durch die Salzsäure Phosphodiesterbindungen aufgebrochen. Lange Glykopolymerketten, welche Phosphat enthalten, werden dabei in kleinere Einheiten zerlegt. Je länger die Hydrolyse andauert, desto kleiner werden die Polymerketten, bis sie schließlich zu den einzelnen Einheiten zerlegt werden. Bei Polydiglycosylphosphat besteht eine einzelne Einheit aus Galaktose, *N*-Acetylglycosamin und Phosphat. Da die Spaltung zufällig geschieht, entstehen bei unterschiedlicher Hydrolysedauer unterschiedlich lange Glykopolymerketten.

Vor der Durchführung einer Hydrolyse werden das Gewicht der eingesetzten Zellwände, sowie das leere 1,5 ml Eppendorfgefäß für nachfolgende Analysen notiert. Es werden 5 mg bzw. 10 mg lyophilisierte Zellwände von Myzel sowie von Sporen auf einer Analysewaage in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß abgemessen. Die Zellwände werden anschließend in 600 µl 50 mM HCL gelöst. Die Suspension wird danach bei 90 °C inkubiert.

Die Länge der Inkubationszeit hängt vom jeweiligen nachfolgenden Versuch ab. Für die Anfertigung eines Polyacrylamid-Gels und die anschließende Gel-Elektrophorese werden die Zellwände für 15 min hydrolysiert. Werden Polymerfragmente für chemische Assays benötigt, werden die Zellwände für 90 min hydrolysiert.

Nachfolgend wird mit 30 µl 1 M NaOH neutralisiert. Nach der Neutralisation wird die Suspension bei 21 000 g für 30 min und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die abgespaltenen in ddH<sub>2</sub>O gelösten Zellwandglykopolymere können für chemische

Assays, für Gel-Elektrophoresen und für HPLC-MS-Analysen verwendet werden. Das Pellet, welches nur noch das Peptidoglykan enthält, kann verworfen werden.

#### 3.5.6 Phosphat-Assay

Um Phosphat in Zellwänden zu detektieren, wurde der Phosphat-Assay nach Chen et al. (1956) angewendet. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen Ammonium-Molybdat und anorganischem Phosphat, welcher anschließend durch Ascorbinsäure unter der Bildung eines blauen Farbkomplexes reduziert wird (Chen et al. 1956).

Für den Phosphat-Assay werden die hydrolysierten Proben mit 10 mg verwendet. Zunächst ist es notwendig eine Standardgerade zu erstellen. Hierfür werden 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nmol einer 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in HPLC-Gläschen gefüllt. Ebenfalls werden 10  $\mu\text{l}$  der hydrolysierten und in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelösten Zellwandglykopolymeren in HPLC-Gläschen gefüllt.

Danach werden die gefüllten HPLC-Gläschen mit der Standardgerade und mit den Proben bei geöffnetem Deckel bei 100 °C getrocknet. Hierbei muss die Flüssigkeit vollständig austrocknen. Dies dauert im Schnitt 40 bis 60 min. Nach dem Trocknen werden die eingetrockneten Proben kurz zum Abkühlen stehen gelassen. Die nachfolgenden Schritte werden anschließend unter einem Abzug mit Laborbrille, Handschuhen und Laborkittel durchgeführt. Es erfolgt die Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  70-72 % Perchlorsäure zu den getrockneten Proben. Dadurch soll das Phosphat aus den Monomeren des Polymers gelöst werden. Die HPLC-Gläschen werden danach verschlossen und kurz gevortext. Anschließend werden die verschlossenen Proben für zwei Stunden bei 120 °C inkubiert und darauffolgend, vor dem Entfernen des Deckels, erneut kurz abkühlen gelassen. 250  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{l}$  1,25 % Ammonium-Molybdat-Lösung und 100  $\mu\text{l}$  5 % L-Ascorbinsäure-Lösung werden hinzugefügt. Die HPLC-Gläschen werden leicht geschwenkt, um die Lösung zu vermischen. Nachfolgend werden die Proben erneut offen bei 100 °C für 10 min inkubiert. In Anwesenheit von Phosphat wird sich hierbei ein blauer Farbkomplex entwickeln.

In eine 96-Well-Platte werden 150  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  und 50  $\mu\text{l}$  der Proben gefüllt. Die Absorption wird bei 750 nm im Microplatten-Reader ausgelesen.

Normiert wird mit der 0-Probe aus der Standardreihe. Liegen die Messwerte oberhalb von eins oder es erscheint eine Fehlermeldung, müssen die Proben verdünnt werden. Die gemessenen Werte werden zum Schluss auf die ursprüngliche eingesetzte Menge an Zellwänden bezogen und ausgewertet.

Berechnung:

Anhand der Standardreihe wird die Steigung  $m$  berechnet. Danach wird von den gemessenen Werten der Proben die Nullprobe der Standardreihe subtrahiert. Die Nullprobe ist mit dem Hintergrundrauschen gleichzusetzen.

Um den neuen errechneten Werten der Proben nmol-Mengen zuzuordnen, müssen diese anschließend durch die Steigung  $m$  der Standardgeraden dividiert werden.

Da im Assay 10  $\mu\text{l}$  der Proben eingesetzt wurde, wird der Wert danach mit 10 multipliziert.

Um letztendlich die Menge an Phosphat in nmol/ mg zu erhalten, muss noch durch die eingesetzte mg Menge der jeweiligen Probe dividiert werden.

#### **3.5.7 Hexosamin-Assay**

Der Hexosamin-Assay nach Smith und Gilkerson (1979) beginnt mit der Deaminierung von Hexosamin. Die dabei entstehende 2,5-Anhydrohexose formt anschließend unter milden sauren Bedingungen einen blauen Farbkomplex mit MBTH (Smith und Gilkerson 1979).

Für den Hexosamin-Assay werden die hydrolysierten Proben mit 10 mg verwendet. Vor der Durchführung des Hexosamin-Assays wird eine Standardreihe erstellt. Diese setzt sich zusammen aus 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 nmol einer Glucosamin-Lösung, welche in HPLC-Gläschen gefüllt wird. Ebenfalls werden 10  $\mu\text{l}$  der hydrolysierten in ddH<sub>2</sub>O gelösten Zellwandglykopopolymere in HPLC-Gläschen gefüllt. Anschließend werden die HPLC-Gläschen der Standardgerade sowie der Proben bis auf 100  $\mu\text{l}$  mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1 M HCL werden die HPLC-Gläschen verschlossen, gevortext und bei 100 °C für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Die nachfolgenden Arbeitsschritte werden unter einem Abzug durchgeführt. Zunächst erfolgt die Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  2,5 % NaNO<sub>2</sub> mit anschließendem Vortexen und einer Inkubation von

15 min bei Raumtemperatur. Danach werden 200 µl 12,5 % Ammoniumamidosulfonat vorsichtig hinzugetropft. Hierbei kann es zur Schaumbildung kommen. Die Proben werden gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl 0,25 % MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinonhydrazon-Hydrochlorid Hydrat) werden die Proben erneut gevortext und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Letztendlich werden 200 µl 0,5 % FeCl<sub>3</sub> hinzugegeben. Die Proben werden danach gevortext und 5 min bei 37 °C inkubiert.

Zum Schluss werden in eine 96-Well-Platte 150 µl ddH<sub>2</sub>O und 50 µl der Proben gefüllt. Die Absorption wird bei 650 nm im Microplatten-Reader ausgelesen.

Normiert wird mit der 0-Probe aus der Standardreihe. Liegen die Messwerte oberhalb von eins oder es erscheint eine Fehlermeldung, müssen die Proben verdünnt werden. Die gemessenen Werte werden zum Schluss auf die ursprüngliche eingesetzte Menge an Zellwänden bezogen und ausgewertet.

Berechnung:

Die Berechnung des Hexosamin-Gehalts in nmol/ mg erfolgt ebenso wie die Berechnung des Phosphat-Gehalts in Kapitel 3.5.6.

#### 3.5.8 Kdn-Assay

Mit Hilfe des Kdn-Assays nach Matsuno und Suzuki (2008) wird der Kdn-Anteil indirekt über die freiwerdende Menge an Formaldehyd detektiert, welches sich vom C-9-Atom der Sialinsäure abspaltet. Diese Reaktion dient zur Generierung eines fluoreszierenden Stoffes im weiteren Verlauf des Assays (Matsuno und Suzuki 2008). Für den Kdn-Assay werden die hydrolysierten Proben mit 5 mg verwendet.

Zunächst wird eine Standardgerade mit folgenden Werten: 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 nmol einer *N*-Acetylneuraminsäure-Lösung erstellt. Die Standardreihe wird in HPLC-Gläschen gefüllt. Ebenfalls werden 10 µl der hydrolysierten in ddH<sub>2</sub>O gelösten Zellwandglykopolymere in HPLC-Gläschen überführt und auf 100 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Zu den Proben, einschließlich der Standardgeraden, werden 10 µl 10 mM Natriumperodat hinzugefügt. Dadurch wird Formaldehyd freigesetzt. Danach werden die Proben für 45 min in einem Eisbad inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe

von 50 µl 50 mM Natriumthiosulfat gestoppt. Daraufgehend erfolgt die Zugabe von 250 µl 4 M Ammoniumacetat (pH 7,5) und 200 µl 100 mM Acetoacetanilide. Mit Hilfe dieser beiden Reagenzien wird ein fluoreszierendes Molekül generiert. Nachdem die Proben anschließend für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkelheit inkubiert wurden, werden davon 50 µl in eine 96-Well Platte überführt. Zu jeder 50 µl Probe werden zusätzlich 150 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugefügt.

Mit Hilfe des Microplatten-Reader wird die Fluoreszenz der Proben detektiert. Diese werden zunächst mit 388 nm angeregt. Nachfolgend wird die Emission bei 471 nm gemessen. Normiert wird mit der 0-Probe aus der Standardreihe. Liegen die Messwerte oberhalb von eins oder es erscheint eine Fehlermeldung, müssen die Proben verdünnt werden. Die gemessenen Werte werden auf die eingesetzte Menge an Zellwänden bezogen und ausgewertet.

Berechnung:

Die Berechnung des Kdn-Gehalts in nmol/ mg erfolgt ebenso wie die Berechnung des Phosphat-Gehalts in Kapitel 3.5.6.

#### **3.5.9 HPLC-MS**

Zellwandglykopopolymere unterschiedlicher Kettenlänge, welche durch Hydrolyse gewonnen wurden, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels HPLC-ESI-TOF-MS (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Elektronenspray-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) analysiert.

Hierfür wurde das MicrOTOF II System von Bruker Daltonics verwendet. Dieses war an ein UltiMate 3000 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)-System (Dionex) gekoppelt. Es wurde im positiven Ionenmodus ( $m/z^{+1}$ ) gemessen. Für die Messung wurden 5 µl der zu analysierenden Probe in eine Gemini C18 Säule (150 x 4,6 mm; [2,5] 5 µm; 110 Å; Phenomenex) injiziert.

Um die Komponenten zu separieren wird ein 45 minütiges Programm bei einer Durchflussrate von 0,2 ml/ min genutzt. Zunächst wird die Säule ins Gleichgewicht gebracht (Equilibrieren). Dies erfolgt für 5 min mit 100 % Buffer A (0,1 % Ameisensäure, 0,05 % Ammoniumformiat, 99,85 % ddH<sub>2</sub>O). Daraufhin erfolgt ein linearer Gradientenverlauf für 30 min von 0 % bis 50 % mit Buffer B (5 % Acetonitril).

Der Gradienten-Delay erfolgt für 5 min mit 40 % Buffer B. Das Re-Equilibrieren findet für 5 min mit 100 % Buffer A statt.

Die Daten werden mit Hilfe des Programms Bruker Compass DataAnalysis 4.0 ausgewertet. Die Fläche unter der Kurve wird mit dem Programm PRISM berechnet.

#### **3.5.10 Herstellung eines 20 % Polyacrylamid-Gels**

##### A) Zusammensetzung:

Für die Herstellung eines 40 cm langen Polyacrylamid-Gels werden zwei Glasplatten verwendet. Die Glasplatten sind jeweils 40 cm und 42 cm lang. Zunächst werden die Glasplatten mit 70 % Ethanol und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O geputzt. Das Abwischen erfolgt mit einem fusselreien Tuch. Spacer (44 cm lang und 2 cm breit) werden links und rechts auf der längeren Glasplatte mit Versiegelungsgel fixiert. Es sollte genügend Versiegelungsgel aufgetragen werden, sodass die Spacer dicht sind. Das Versiegelungsgel darf jedoch nicht über die Spacer hinaustreten, da es ansonsten während der Gel-Elektrophorese in das Polyacrylamid-Gel miteinlaufen kann. Danach wird die kürzere Platte auf die Spacer fixiert. Die beiden Glasplatten werden auf beiden Seiten durch Klammern zusammengeklemt. Am unteren Ende werden die Glasplatten mit einer Verschlussfolie aus Paraffin-Wachs fixiert, um ein Auslaufen der Gel-Lösung zu verhindern. Die Glasplatten werden anschließend für das Gießen aufrecht aufgestellt.

##### B) Gießen:

Während der Herstellung eines Polyacrylamid-Gels müssen Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel getragen werden.

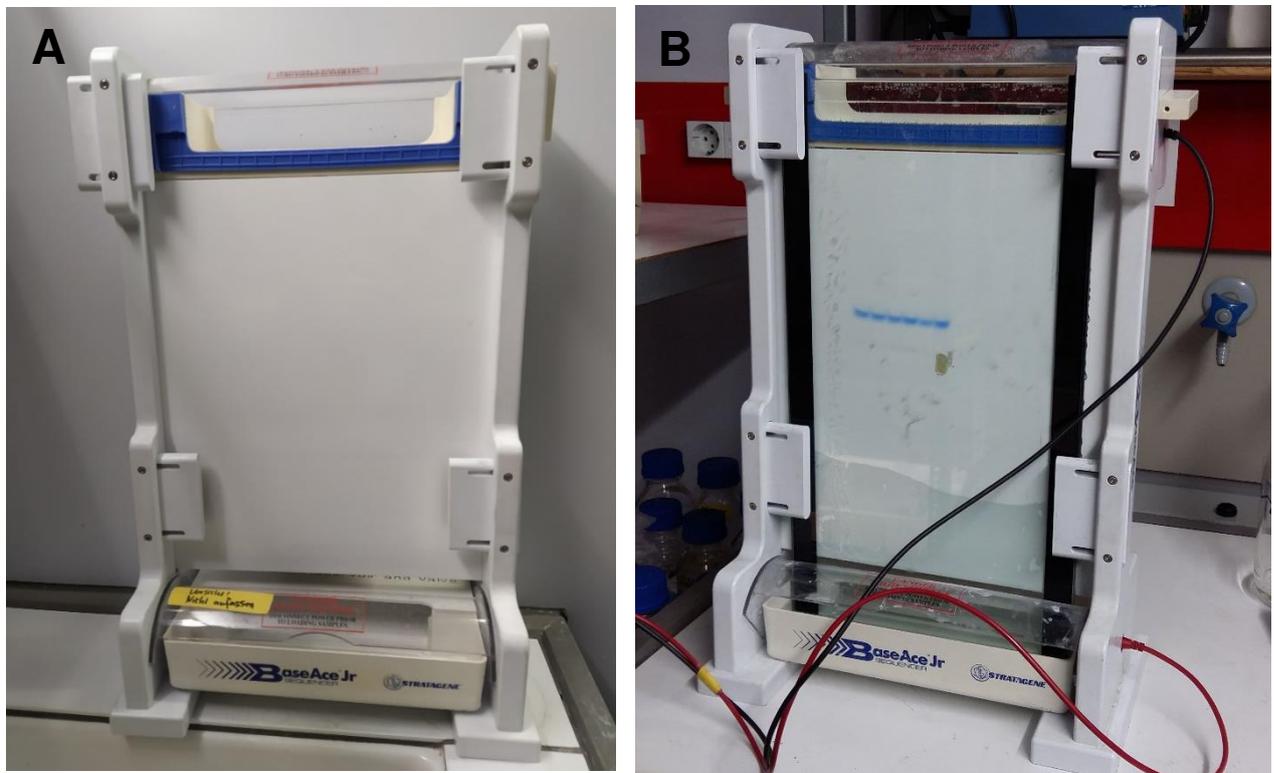
Es werden zwei Lösungen angesetzt. Dies geschieht bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer. Von der Fix-Gel-Lösung werden 17,7 ml angesetzt und von der Lauf-Gel-Lösung 140,6 ml. Die Zugabe vom 10 % APS oder TEMED führt zur Polymerisation des Gels.

Die Fix-Gel-Lösung wird als erstes eingegossen und soll 1,5 cm des unteren Teils des Polyacrylamid-Gels ausmachen. Sie polymerisiert innerhalb von 30 min aus und soll am unteren Ende der Glasplatten das Auslaufen der weiteren Lauf-Gel-Lösung verhindern. Nachdem der untere Streifen ausgehärtet ist, wird die Lauf-Gel-Lösung mit Hilfe einer 20 ml Pipette bis zum oberen Rand der kürzeren Platte eingefüllt. Danach

### 3. MATERIAL UND METHODEN

wird der Kamm eingesetzt. Das Polyacrylamid-Gel steht zunächst 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in Ruhe. In dieser Zeit startet die Polymerisation. Anschließend wird das Polyacrylamid-Gel über Nacht im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt, wo es vollständig auspolymerisiert.

Vor der Gel-Elektrophorese werden die seitlichen Klammern sowie die Verschlussfolie entfernt und die Glasplatten werden in die Elektrophorese-Einrichtung eingesetzt (Abbildung 21). Die obere und untere Kammer werden mit 1,5 x TBE Buffer gefüllt. Anschließend wird der Kamm vorsichtig entfernt. Die Taschen des Kamms können danach befüllt werden. 10 µl der in ddH<sub>2</sub>O gelösten Zellwandglykopoliere werden mit 2 µl Ladepuffer (Methylenblau) gemischt und in die Taschen pipettiert.



**Abbildung 21: Gelkammer (BaseAce Jr Sequencer) von STRATAGENE für die vertikale Gel-Elektrophorese mit größeren Polyacrylamid-Gelen. A: Gelkammer nicht beladen. B: Gelkammer mit Polyacrylamid-Gel während Gel-Elektrophorese.**

#### C) Gel-Elektrophorese

Das Polyacrylamid-Gel läuft bei 18 mA für 7-8 Stunden im Kühlraum bei 4 °C. Dies soll unnötiges Erhitzen minimieren. Die ersten drei Stunden dienen dem Einlaufen der Proben und sollten bei 800 V stattfinden. Danach kann auf 1200 V erhöht werden. Der Ladepuffer ist als blaue Lauffront sichtbar, jedoch zeigt diese Lauffront nicht die letzten

Banden der Proben an. Um das gesamte Spektrum an Banden zu erhalten, sollte die Gel-Elektrophorese gestoppt werden, wenn die blaue Lauffront ca. 2/3 des Polyacrylamid-Gels durchlaufen hat.

#### D) Färben und Dokumentieren des Polyacrylamid-Gels

Das Polyacrylamid-Gel wird vorsichtig aus der Elektrophorese-Einrichtung entnommen und in eine von der Größe passende Wanne gelegt. Bei allen Färbeschritten müssen Handschuhe getragen werden. Während das Polyacrylamid-Gel in den für die Färbung angesetzten Lösungen inkubiert, wird dieses auf einem Schüttler leicht geschwenkt, sodass die Lösungen das gesamte Polyacrylamid-Gel mehrmals überschwemmen. Dies geschieht bei Raumtemperatur. Aufgrund von Geruchsbelästigung sollte die Wanne samt Polyacrylamid-Gel abgedeckt sein. Die Lösungen werden nach der jeweiligen Behandlung immer verworfen.

Zunächst wird das Polyacrylamid-Gel über Nacht in einer Alcianblau-Lösung inkubiert. Die Dauer sollte zwischen 10 bis 15 Stunden betragen. Die Alcianblau-Lösung wird danach abgekippt. Das Polyacrylamid-Gel wird für eine Stunde mit einer Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wird das Polyacrylamid-Gel dreimal für jeweils 20 min mit 50 % Ethanol gewaschen. Das Polyacrylamid-Gel wird dann für exakt 1 min in einer Pretreat-Lösung geschwenkt und darauffolgend dreimal für exakt jeweils 20 sec mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach erfolgt die Behandlung mit der Impregnate-Lösung für 20 min. Diese Lösung enthält Silbernitrat und sollte gesondert entsorgt werden. Erneut erfolgen zwei Waschschriffe für exakt jeweils 20 sec mit ddH<sub>2</sub>O. Nachfolgend wird das Polyacrylamid-Gel mit der Developpe-Lösung für 7-10 min behandelt. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Banden mit der Zeit erscheinen. Bei längerer Inkubation wird das gesamte Polyacrylamid-Gel dunkler. Die Developpe-Lösung wird entfernt, sobald die Banden deutlich erkennbar sind. Nachfolgend wird zweimal für jeweils 2 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. In der Stop-Lösung sollte das Polyacrylamid-Gel 10 min geschwenkt und anschließend für mindestens 20 min mit 50 % Methanol behandelt werden. Das Polyacrylamid-Gel kann ebenfalls in der 50 % Methanol-Lösung aufbewahrt werden.

Das Polyacrylamid-Gel wird auf einer Weißlichtplatte platziert und in eine abgedunkelte Geldokumentationskammer gelegt. Die zusätzliche Lichtquelle durch die

Weißlichtplatte lässt die Banden deutlicher erscheinen. Mit Hilfe der Imaging Software von Nippon Genetics Europe wird das Polyacrylamid-Gel dokumentiert.

#### **3.5.11 Auswertung eines Polyacrylamid-Gels mittels HPLC-MS und Phosphat-Assay**

Für die Analysen wird ein Polyacrylamid-Gel wie in Kapitel 3.5.10 „Herstellung eines 20 % Polyacrylamid-Gels“ beschrieben, hergestellt (A, B). Die zu analysierenden Proben werden anschließend mit Hilfe von Gel-Elektrophorese aufgetrennt (C).

Proben, welche nach der Gel-Elektrophorese mittels HPLC-MS und Phosphat-Assay analysiert werden, werden aus dem Polyacrylamid-Gel herausgeschnitten. Sie setzen sich aus 40 µl Probe und 10 µl 50 % Glycerin zusammen. Bei diesen Proben wird kein Ladepuffer (Bromphenolblau) verwendet, wie es in Kapitel 3.5.10 Abschnitt C beschrieben ist. Damit sollen ungewollte Artefakte minimiert werden. Zwischen den Proben werden immer zwei Bahnen frei gelassen, sodass es beim nachfolgenden Ausschneiden auch nicht zu Überlappungen zwischen den Proben kommt. Die Referenzproben laufen parallel und werden wie in Kapitel 3.5.10 Abschnitt C und D gehandhabt.

Nachdem die Proben durch das Polyacrylamid-Gel gelaufen sind, werden die Bahnen mit den Proben herausgeschnitten. Dies geschieht mit einem sauberen phosphatfreien Skalpell. Der obere Teil des Polyacrylamid-Gels mit den Taschen wird entfernt. Danach wird jede Bahn in vier Teile zerteilt. Jedes Gel-Fragment wird in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, mit 20 ml ddH<sub>2</sub>O vermengt und für drei Tage bei 600 rpm und 37 °C inkubiert.

Die Referenzproben werden wie in Kapitel 3.5.10 Abschnitt C gefärbt. Beim Färben kann es dazu kommen, dass sich die Maße des Polyacrylamid-Gels verändern. Aus diesem Grund müssen die Bahnen der Referenzproben vor dem Färben ebenfalls an denselben Stellen, wie die nicht zu färbenden Gel-Fragmente, zerschnitten werden. Dies dient dazu, um die anschließende Zuordnung der Banden je Gel-Fragment zu gewährleisten.

Nach 3 Tagen werden die zu analysierenden Gel-Fragmente aus den Falconröhrchen entfernt. Am Boden des Falconröhrchen sammeln sich aus dem Polyacrylamid-Gel herausgelöste Bestandteile als weiße Flocken an. Die Lösung wird ohne Flocken in

ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt und für zwei Tage lyophilisiert. Das daraus entstandene Pulver wird in 150 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Davon werden die oberen 100 µl entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die oberen drei Fragmente jeder Bahn werden erneut lyophilisiert und wie in Kapitel 3.5.5. erneut für 75 min hydrolysiert.

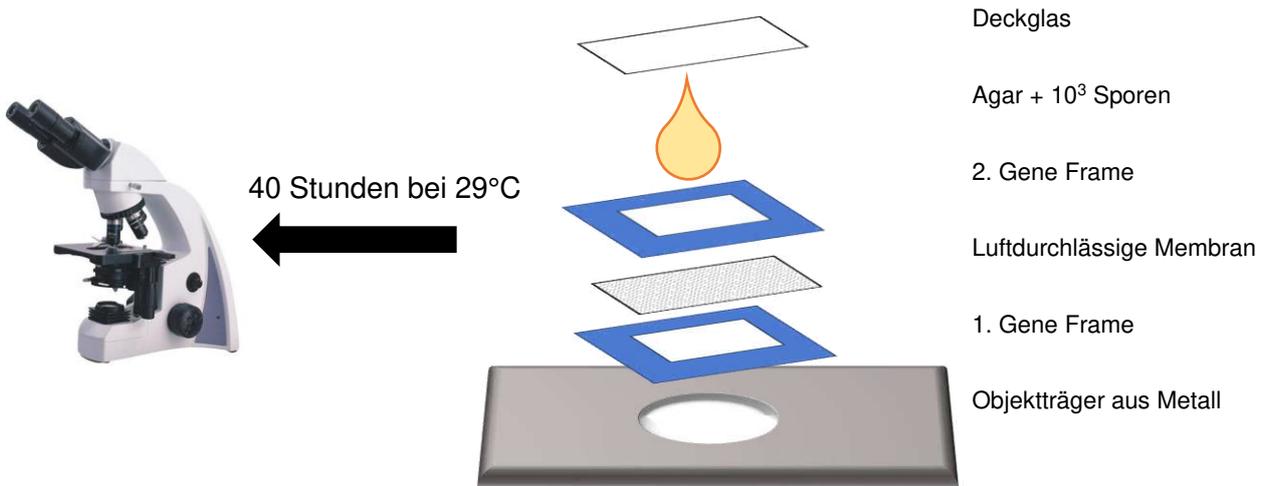
Die gewonnene Lösung der Proben aus dem Polyacrylamid-Gel kann für den Phosphat-Assay (3.5.6) sowie für die HPLC-MS (3.5.9) verwendet werden.

#### **3.5.12 Mikroskopie unter Verwendung von Ibidi-Dishs**

Der Zusammenbau des Ibidi-Dishs (Abbildung 22) kann ohne Clean Bench erfolgen. Zunächst wird eine luftdurchlässige Membran vorbereitet. Diese wird in Stücke (2 x 2 cm) geschnitten. Um die Membran-Stücke zu sterilisieren, werden diese in 70 % Ethanol und nachfolgend in sterilem ddH<sub>2</sub>O für einige Minuten geschwenkt. Anschließend werden die Membran-Stücke getrocknet.

Danach wird ein Metallträger, welcher als Objektträger dient, vorbereitet. Der Metallträger verfügt in der Mitte über eine Öffnung (Durchmesser 1 cm). Über diese Öffnung wird ein beidseitig selbstklebender Rahmen mit einer inneren Kammer (Gene Frame) platziert. Die Maße der inneren Kammer betragen 1,5 x 1,6 cm.

Zum Schutz vor Verschmutzung verfügt der selbstklebende Gene Frame auf beiden Seiten jeweils über eine Schutzfolie. Auf der einen Seite bedeckt die Schutzfolien den Rahmen samt der inneren Kammer. Auf der anderen Seite verfügt die Schutzfolie über eine Öffnung direkt über der inneren Kammer.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung des Zusammenbaus eines Ibidi-Dishs**

Um den Gene Frame auf dem Metallträger zu fixieren wird die Schutzfolie von einer beliebigen Seite des Rahmens entfernt. Die innere Kammer des Gene Frames muss mit dem Loch des Metallträgers übereinstimmen. Nachfolgend wird die zweite sich oben befindende Schutzfolie des Gene Frames entfernt. Darauf wird die vorbereitete luftdurchlässige Membran fixiert. Um eine Mulde auf der Membran für den nachfolgenden Agar zu schaffen, wird ein zweiter Gene Frame auf die luftdurchlässige Membran geklebt. Hierbei ist es wichtig darauf zu achten, dass beim zweiten Gene Frame zuerst die Schutzfolie ohne die Öffnung entfernt wird. In diesem Fall würde dann die obere Seite des Gene Frames die Schutzfolie mit Öffnung aufweisen. In die darauf entstandene Mulde werden 70  $\mu$ l Agar gegossen. Mit einem Objektträger wird der Agar vorsichtig zerdrückt und gleichzeitig gleichmäßig verteilt. Vorher sollte der Objektträger ebenfalls mit 70 % Ethanol und sterilem ddH<sub>2</sub>O sterilisiert werden. Der Agar muss eine Stunde bei 4°C aushärten. Nach dem Aushärten des Agars, wird der Objektträger durch seitliches ziehen vorsichtig entfernt. Danach werden 5  $\mu$ l einer Sporensuspension ( $10^3$ ) auf den Agar getropft und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Zum Beschleunigen des Trocknungsprozesses kann eine Clean Bench verwendet werden. Ist die Sporensuspension getrocknet, wird die obere Schutzfolie (mit der Öffnung) des zweiten Gene Frames entfernt. Darauf wird ein Deckglas platziert. Das Deckglas sollte ebenfalls vorher mit 70 % Ethanol und sterilem ddH<sub>2</sub>O sterilisiert werden. Das Konstrukt samt Sporen wird für 40 Stunden bei 29 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die Auswertung sowie die Dokumentation erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskops und dem Programm analySIS docu von Olympus.

#### 3.5.13 Antibiotika-Test

Der Antibiotika-Test wird auf Platten mit LB-Agar und einer definierten Anzahl an Sporen durchgeführt. Hierfür werden LB-Platten in drei gleichgroße Abschnitte aufgeteilt. Jeder Abschnitt wird mit  $5 \times 10^5$  Sporen innokuliert und anschließend mit einem Antibiotika-Plättchen versehen. Das Antibiotika-Plättchen muss pro Abschnitt mittig platziert werden. Nach 3 Tagen Wachstum bei 29 °C wird der Hemmhof ausgemessen.

#### 3.5.14 Bestimmung der Größe von Einzelkolonien bei Bakterien

Bestimmung der Größe von Einzelkolonien bei Bakterien in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Salzkonzentrationen:

Um den Durchmesser der Bakterienkolonien des Wildtyps M145 und der Mutanten von *S. coelicolor* zu bestimmen, werden quadratische Petrischalen (12 x 12 cm) verwendet. Diese werden in sechs gleichgroße Abschnitte unterteilt. Jeder Abschnitt wird mit  $10^4$  Sporen innokuliert. Die Platten werden 6 Tage bei 29 °C inkubiert. Anschließend werden die Durchmesser mit dem Programm Fiji ausgemessen. Die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm festgehalten.

Des Weiteren werden LB-Platten mit 3 % und 6 % NaCl verwendet. Es wird derselbe Versuchsaufbau wie bei LB-Platten ohne Salzkonzentration durchgeführt. Die Durchmesser werden mit dem Programm Fiji ausgemessen und die Ergebnisse in einem Balkendiagramm festgehalten.

Optische Bewertung:

Bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 findet zudem eine optische Bewertung in Hinblick auf die Größe und die Morphologie der Bakterienkolonien statt. Dies dient der Bestimmung eines deutlichen Phänotyps. LB-Platten werden in drei gleichgroße Abschnitte unterteilt. Jeder Abschnitt wird mit  $10^2$  Sporen innokuliert und für 3 Tage bei 29 °C inkubiert. Nach 3 Tagen erfolgt die optische Bewertung der Größe von den Einzelkolonien der Bakterien mit Hilfe eines Stereomikroskops. Die Ergebnisse werden fotografisch festgehalten.

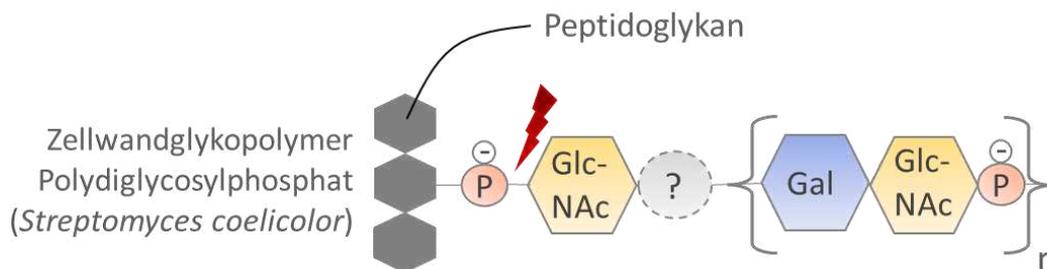
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vergleichende Analyse der Zellwandglykopolymere in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel bei *Streptomyces coelicolor* M145

Da Streptomyceten Sporen eine erhöhte Resistenz gegenüber Austrocknung aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sich die Zusammensetzung der Sporenwand von der Zellwand des vegetativen Myzels unterscheidet. Eine wesentliche Komponente hierbei könnten die Zellwandglykopolymere darstellen. Für *Streptomyces coelicolor* sind hierzu eine Kdn-beinhaltende Teichulosonsäure und das phosphathaltige Polymer Polydiglycosylphosphat (PDP) beschrieben (Shashkov et al. 2012; Sigle et al. 2016b).

#### 4.1.1 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden

Bei *Streptomyces coelicolor* handelt es sich um ein Gram-positives Bodenbakterium. Dessen Myzel- sowie Sporenwände verfügen über ein mehrschichtiges Peptidoglykan (PG), an welches Zellwandglykopolymere (ZWG) verankert sind. Um die über Phosphodiesterbindungen an den C-6 Rest der Muraminsäure im PG gebundenen ZWG abzuspalten (Kojima et al. 2022), wurde unter milden Bedingungen (50 mM HCl) eine saure Hydrolyse des PG durchgeführt. Unter diesen Hydrolysebedingungen werden ausschließlich Phosphodiesterbindungen, nicht aber glykosidische Bindungen, z.B. innerhalb des PG, gespalten (Abbildung 23). Für die Untersuchungen wurden 10 mg isolierte Zellwände von Sporen sowie vom vegetativen Myzel von *S. coelicolor* verwendet. Diese wurden jeweils für 5 min und 90 min hydrolysiert. Während bei der 5 minütigen Hydrolyse überwiegend die Phosphodiesterbindungen zur Muraminsäure betroffen sind, sollten bei längerer Hydrolysedauer auch Phosphodiesterbindungen innerhalb der ZWG angegriffen werden (Sigle et al. 2016a; Unsleber 2017).

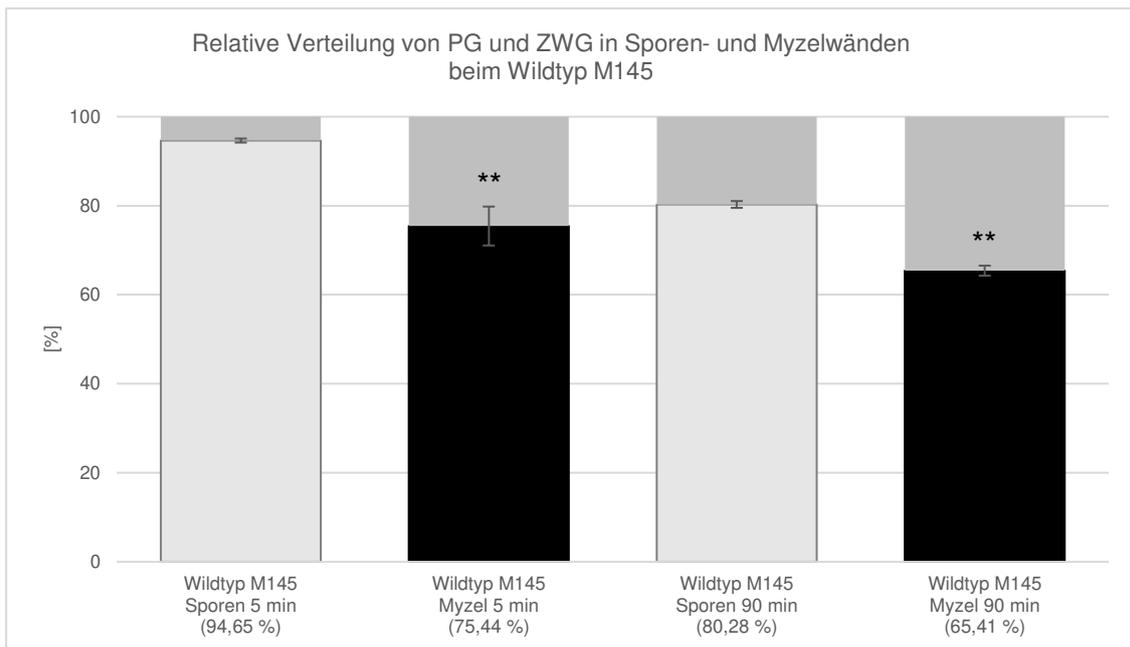


**Abbildung 23: Schematische Darstellung eines an das Peptidoglykan gebundenen Polydiglycosylphosphats (angelehnt an: Weidenmaier und Peschel 2008).** Das dargestellte PDP ist über eine Phosphodiesterbindung an die C-6 Position des Muraminsäure-Rests an das PG verknüpft. Roter Pfeil: Mit Hilfe einer milden sauren Hydrolyse lässt sich die Phosphodiesterbindungen aufspalten (Unsleber 2017).

Anschließend wurde das Gewicht des unlöslichen PG, welches als Pellet zurückblieb, mit den ursprünglich eingesetzten 10 mg isolierten Zellwänden verglichen. Die sich daraus ergebene Differenz stellte die Menge der abgespalteten ZWG dar. Nach 5 min Hydrolyse wurden aus den Sporenwänden 6 % ZWG freigesetzt (Abbildung 24). Nach 90 min Hydrolyse waren es insgesamt 20 % abhydrolysierte ZWG. Zwischen 5 min und 90 min Hydrolyse wurden somit noch zusätzliche 14 % ZWG abgespalten.

In den Myzelwänden wurden bereits nach 5 min Hydrolyse 25 % ZWG abhydrolysiert. Nach 90 min Hydrolyse wurden hingegen 35 % abgespalten. Dies bedeutet, dass nach 5 min Hydrolyse aus vegetativen Myzelwänden 4,6 x mehr ZWG abhydrolysiert wurden als aus Sporenwänden. Nach 90 min Hydrolyse waren es in Myzelwänden 1,75 x mehr abgespaltete ZWG.

Zusammenfassend verfügen Myzelwände über mehr ZWG als Sporenwände. Des Weiteren lassen sich ZWG aus Sporenwänden schlechter abspalten und benötigen eine längere Hydrolysedauer verglichen mit den ZWG aus Myzelwänden. Die in dieser Arbeit festgestellten Werte stimmen mit den Literaturwerten überein (Sigle et al., 2016).



**Abbildung 24: Anteil an Peptidoglykan (unterer Bereich) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Bereich) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg (= 100 %) isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 5 min und für 90 min hydrolysiert. Anschließend wurde das Pellet (PG) gewogen und prozentual verrechnet. In Myzelwänden wurde nach 5 min Hydrolyse 4,6 x mehr ZWG abgespalten als in Sporenwänden. Nach 90 min wurden 1,75 x mehr ZWG abhydrolysiert (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel

2012 wurde von Shashkov et al. als Hauptpolymer eine Kdn-beinhaltende Teichulosonsäure und als „minor polymer“ Polydiglycosylphosphat (PDP) beschrieben. Diese beiden Polymere wurden aus vegetativen Myzelwänden von *S. coelicolor* M145 isoliert. Das Monomer der Kdn-beinhaltenden Teichulosonsäure besteht aus Galaktose und einem Kdn-Zucker (2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galactonoic Acid). An der Position C4 kann der Kdn-Zucker zudem mit Wasserstoff, einer Methylgruppe oder *N*-Acetylglucosamin substituiert sein. Über glykosidische Bindungen können mehrere Einheiten miteinander verknüpft werden (Shashkov et al. 2012). Bei dem phosphathaltigen PDP setzen sich die Monomere aus Galaktose, *N*-Acetylglucosamin und einem Phosphatrest zusammen. Die Monomere sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft.

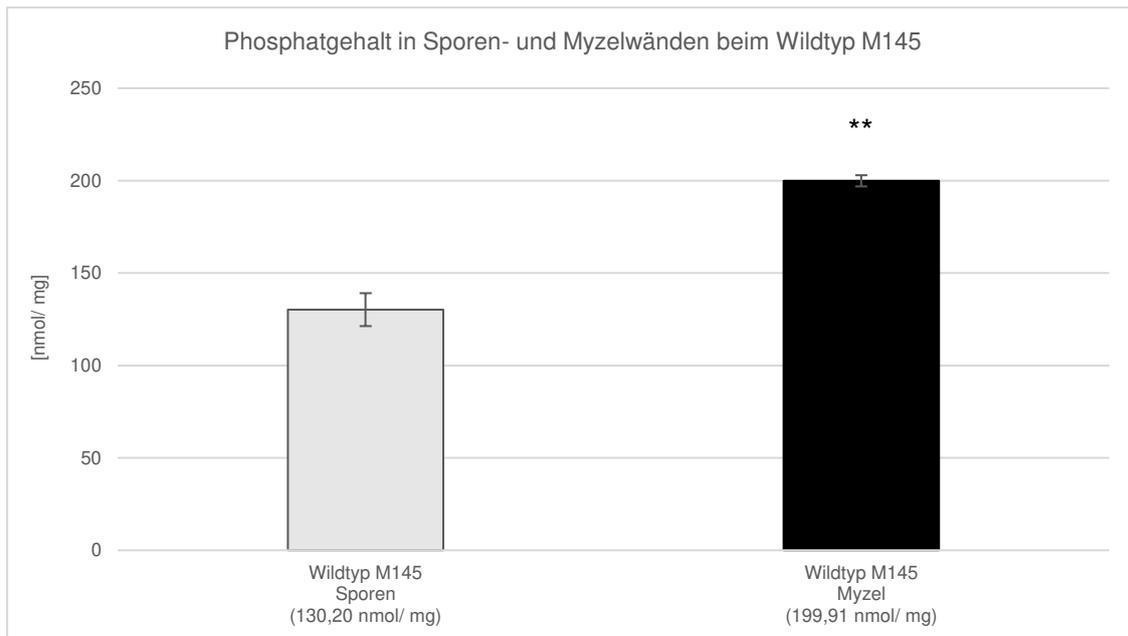
Die unterschiedlichen Komponenten, aus welchen sich die Zellwandglykopolymere zusammensetzen, ermöglichen eine Untersuchung der quantitativen Verteilung. Hierzu wurden die einzelnen Komponenten mit Hilfe von drei spezifischen Assays detektiert und quantifiziert.

### 4.1.2.1 Phosphat-Assay

Da die Hauptzellwandglykopolymer Komponente Teichulosonsäure nur über eine einzige Phosphodiesterbindung an das Peptidoglykan gebunden ist, sollte nach der Hydrolyse die Hauptmenge an freigesetztem Phosphat auf PDP zurückzuführen sein. Um die Menge an PDP zu ermitteln, wurde daher der zellwandgebundene Phosphatgehalt mit dem Phosphat-Assay nach Chen et al. (1956) bestimmt.

Für die Durchführung des Phosphat-Assays wurden 10 mg isolierte Myzel- sowie Sporenwände von *S. coelicolor* verwendet. Die Zellwände wurden für 90 min hydrolysiert. Nach der Hydrolyse befanden sich die abgespaltenen ZWG im Überstand und wurden lyophilisiert. Anschließend wurde mit diesen der Phosphat-Assay durchgeführt (Abbildung 25).

In Myzelwänden war der Phosphatgehalt mit 199,91 nmol/ mg um 54 % höher als in Sporenwänden (130,2 nmol/ mg). Der höhere Phosphatgehalt deutet darauf hin, dass in Zellwänden des vegetativen Myzels mehr PDP (oder ein anderes, noch unbekanntes phosphathaltiges Polymer) vorkommt, als es in Sporenwänden der Fall ist.



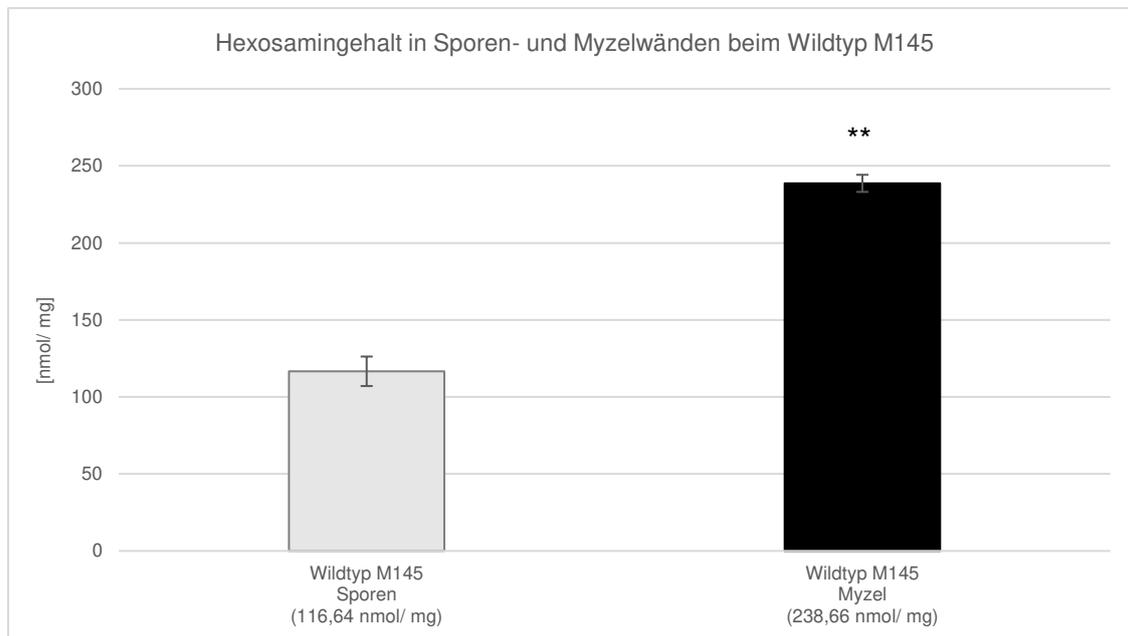
**Abbildung 25: Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Phosphat-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Phosphat wird in nmol/ mg angegeben. Der Phosphatgehalt ist in Myzelwänden um 54 % höher als in Sporenwänden (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2.2 Hexosamin-Assay

Der Hexosamin-Assay ist hochspezifisch für Aminozucker, wie *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc). *N*-Acetylglucosamin kommt in der Kdn-beinhaltenden Teichulosonsäure als Rest sowie in PDP als Hauptbestandteil des Monomers vor. Mit Hilfe des Hexosamin-Assays ist es möglich die Menge zu ermitteln, jedoch nicht zwischen den beiden ZWG zu differenzieren. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere ZWG mit abweichenden Aminozuckern abgespaltet und detektiert werden. Im weiteren Verlauf des Kapitels, welcher sich auf die Detektion von Hexosamin bezieht, wird sich weiterführend auf den allgemeinen Terminus „Hexosamin“ und nicht „*N*-Acetylglucosamin“ bezogen.

Für den Hexosamin-Assay wurden 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände von *S. coelicolor* für 90 min hydrolysiert. Die abgespaltenen lyophilisierten ZWG wurden anschließend für den Hexosamin-Assay verwendet.

Der Hexosamingehalt in Sporenwänden betrug 116,64 nmol/ mg (Abbildung 26). Zellwände des vegetativen Myzels wiesen dagegen mit 238,66 nmol/ mg einen etwa doppelt so hohen Hexosamingehalt auf.

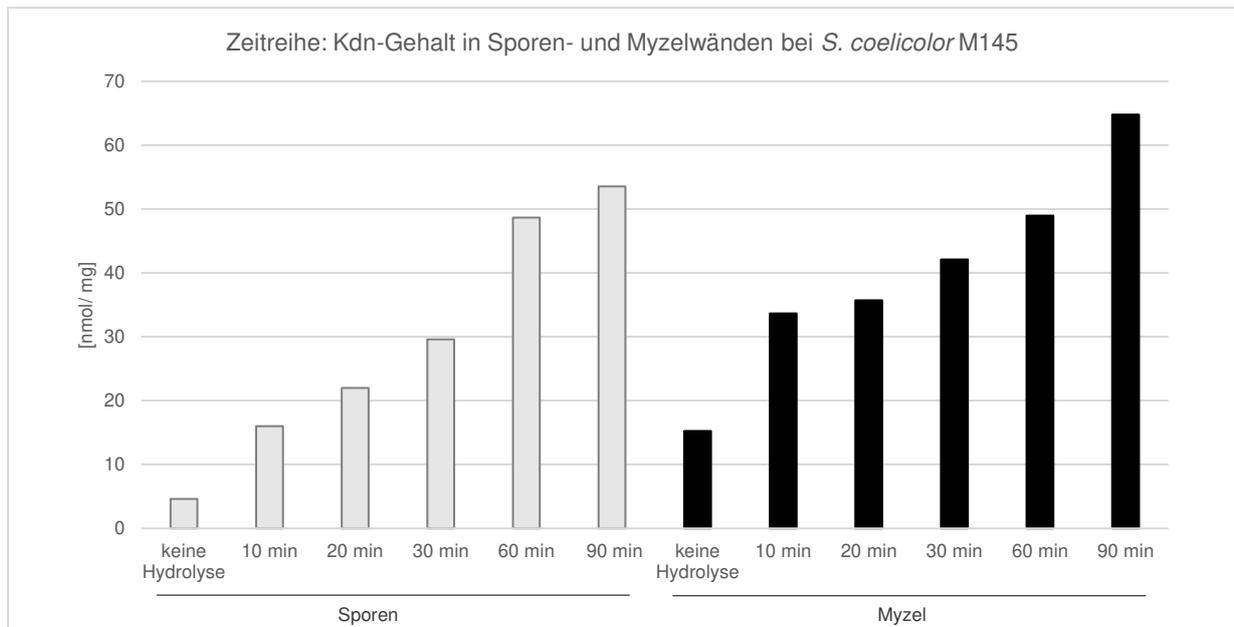


**Abbildung 26: Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Hexosamin-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Hexosamin wird in nmol/ mg angegeben. Der Hexosamingehalt ist in Myzelwänden um 105 % höher als in Sporenwänden (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2.3 Kdn-Assay

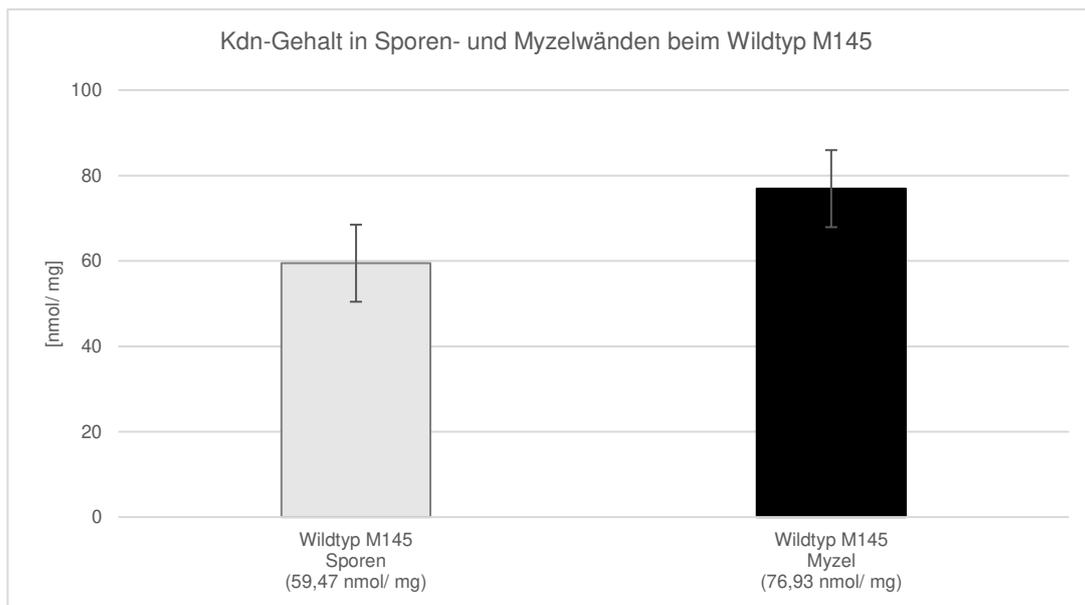
Eine Aussage über die in der Zellwand vorkommende Menge an Kdn-beinhaltender Teichulosonsäure kann mit Hilfe des Kdn-Assays von Matsuno und Suzuki (2008), getroffen werden. Obwohl dieser Assay entwickelt wurde, um Sialinsäure in Glykoproteinen zu detektieren (Inoue und Inoue 1999; Inoue und Kitajima 2006), kann er auch als Nachweis von Teichulosonsäure verwendet werden, da es sich bei Kdn ebenfalls um einen Vertreter der Sialinsäure-Familie handelt. Der Kdn-Anteil wird indirekt über die freiwerdende Menge an Formaldehyd detektiert, welches sich vom C-9-Atom der Sialinsäure abspaltet. Diese Reaktion ist notwendig für die Generierung eines fluoreszierenden Stoffes im weiteren Verlauf des Assays (Matsuno und Suzuki 2008). Für den Versuch wurden 5 mg isolierte Sporen- und Myzelwände von *S. coelicolor* für 90 min hydrolysiert. Die abgespaltenen ZWG befanden sich nach der

Hydrolyse im Überstand und wurden nach der Lyophilisation für den Kdn-Assay verwendet. Da die Kdn-beihaltende Teichulosonsäure über keine Phosphodiesterbindungen verfügt, wurde eine Zeitreihe durchgeführt, um eine Aussage darüber zu treffen, ob das Polymer durch die milde saure Hydrolyse gespalten wird (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Zeitreihe des Kdn-Gehalts von Zellwandglykopolymeren aus Sporen- und Myzelwänden vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 1].** 5 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden 10 min, 20 min, 30 min, 60 min und 90 min hydrolysiert. Jeweils eine Probe von Sporen- und Myzelwänden wurde nicht hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Kdn-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Kdn wird in nmol/ mg angegeben. Über die Länge der Hydrolyse steigt der detektierbare Kdn-Anteil in Sporen- und Myzelwänden.

Myzelwände wiesen über einen höheren Kdn-Gehalt auf als Sporenwände. In den Zellwänden der Sporen wurden 59,47 nmol/ mg Kdn detektiert (Abbildung 28). In den Zellwänden des vegetativen Myzels betrug der Anteil an Kdn 76,93 nmol/ mg und war somit um 29 % höher.



**Abbildung 28: Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 5 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Kdn-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Kdn wird in nmol/ mg angegeben. Der Kdn-Gehalt ist in Myzelwänden um 29 % höher als in Sporenwänden (Mann-Whitney Test, ns = p ≤ 0,05).

#### 4.1.3 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der Zellwandglykopolymer Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosonsäure in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel

Um das Verhältnis von PDP und Kdn-Teichulosonsäure zu quantifizieren, wurden Sporen- und Myzelwände von *S. coelicolor* mittels HPLC-MS analysiert. Dies war möglich, da die Untereinheiten (Monomere) der genannten Polymere bekannt waren (Shaskov et al. 2012).

Die Masse eines PDP-Monomers beträgt  $[M+H]^+ = 464,116$ . Sie setzt sich zusammen aus einem Phosphat und einem Disacharid, bestehend aus Galaktose und *N*-Acetylglycosamin. Ein PDP-Dimer besitzt eine Masse von  $[M+H]^+ = 909,215$ . Das PDP-Trimer weist eine Masse von  $[M+H]^+ = 1354,313$  auf.

Das Monomer der Kdn-beihaltenden Teichulosonsäure kann in drei unterschiedlichen Variationen auftreten. Diese sind abhängig vom jeweiligen Rest, mit welchem die Position C4 des Kdn-Zuckers substituiert ist. Ein Monomer, welches

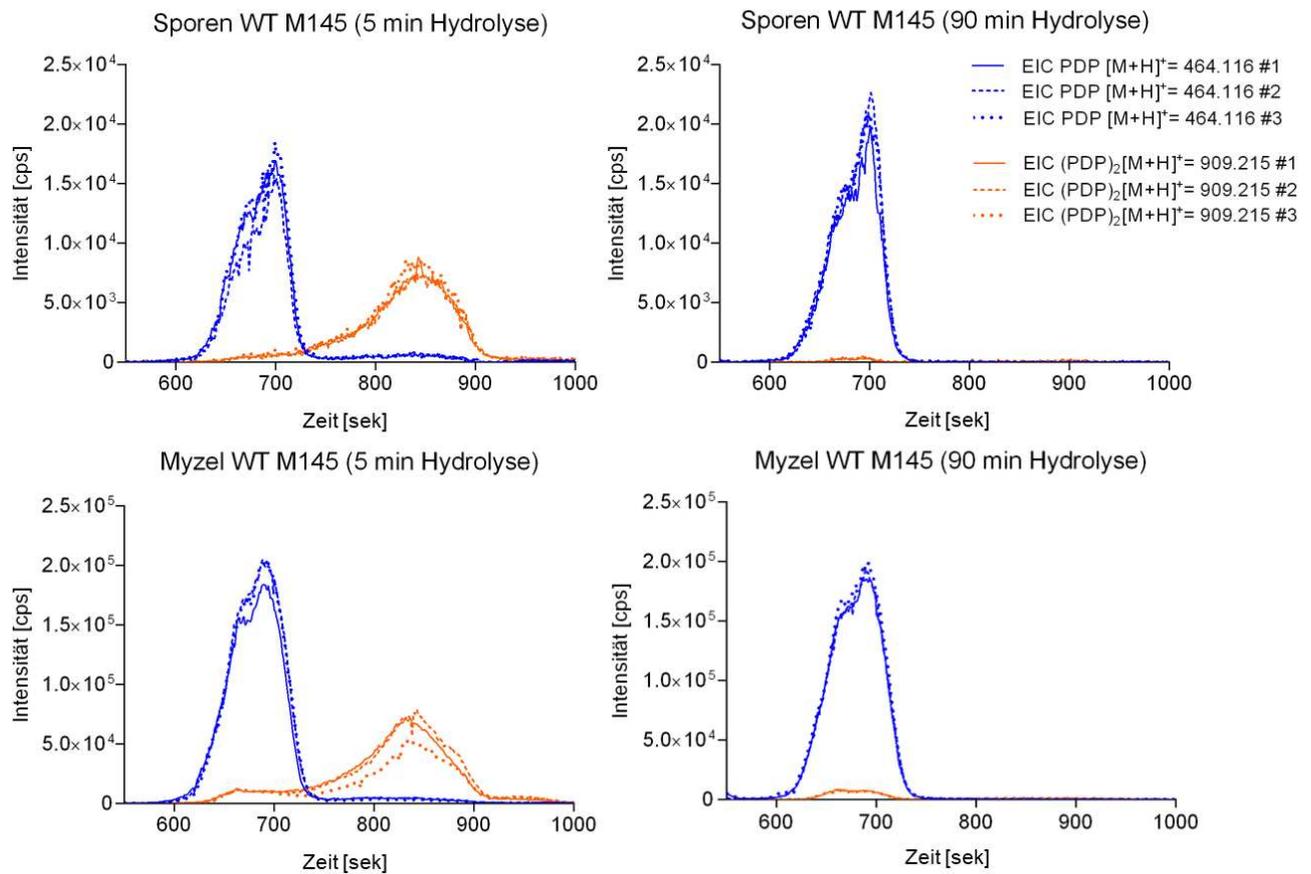
einen Wasserstoff-Rest trägt, besitzt die Masse  $[M+H]^+ = 431,141$ . Handelt es sich bei dem Rest um eine Methylgruppe, beträgt die Masse des Monomers  $[M+H]^+ = 445,155$ . Ist die Position C4 mit einem *N*-Acetylglycosamin substituiert, ergibt sich die Masse  $[M+H]^+ = 634,219$ .

Für die Analysen wurden 10 mg isolierte Myzel- sowie Sporenwände für 5 min und 90 min hydrolysiert. Nach der Hydrolyse befanden sich die abgespaltenen Zellwandglykopopolymere im Überstand. Diese wurden lyophilisiert und mittels HPLC-MS analysiert.

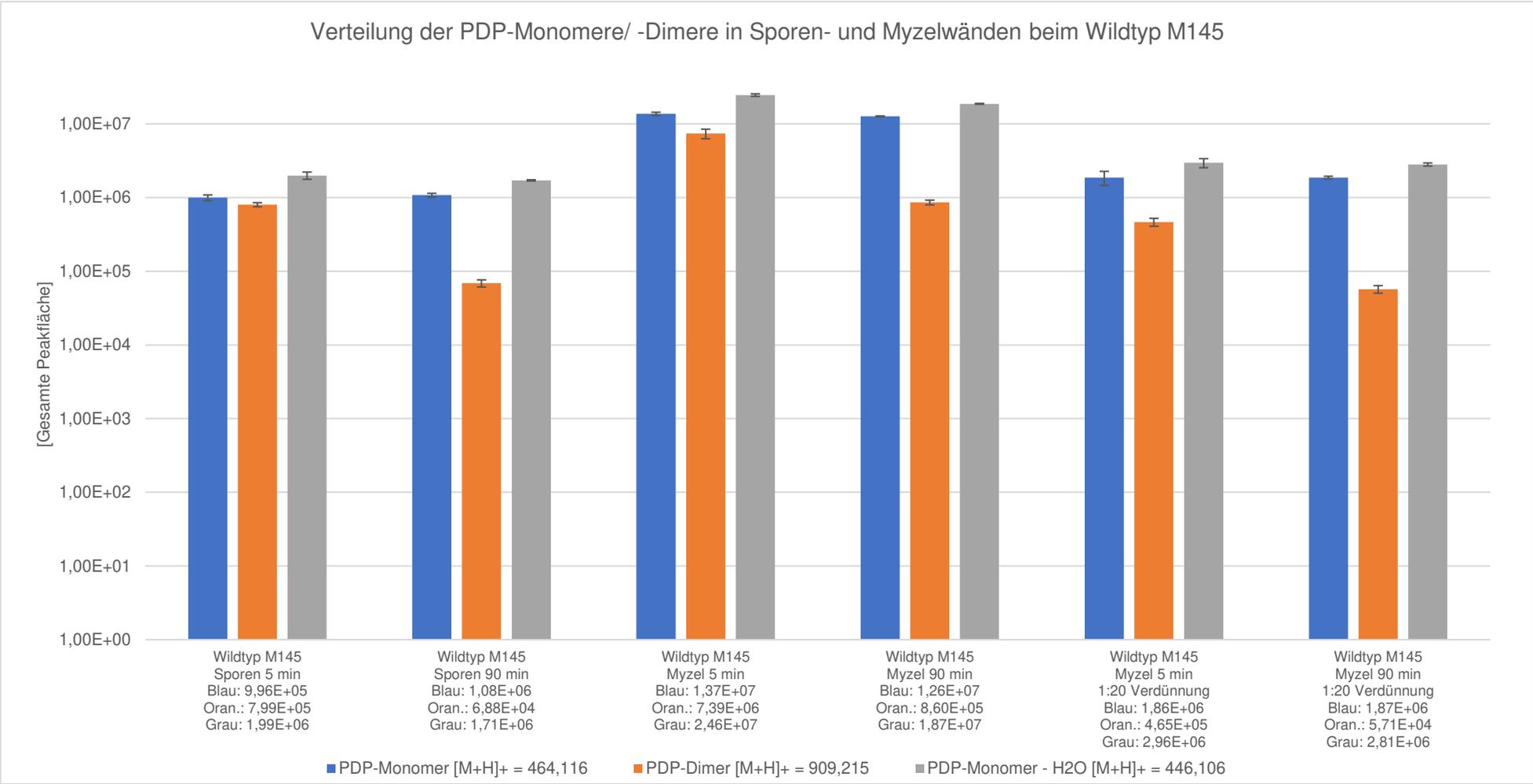
Unter Berücksichtigung des Trennbereichs, des Gerätetyps und der Säule war es möglich, das PDP-Monomer sowie -Dimer in sichtbaren Mengen mittels HPLC-MS zu detektieren. Des Weiteren konnte ein PDP-Monomer mit abgespaltenem  $H_2O$  ( $[M+H]^+ = 446,106$ ) detektiert werden. Das PDP-Trimer ( $[M+H]^+ = 1354,313$ ) lag hingegen in nur sehr geringen Mengen vor. Höhere PDP-Oligomere (PDP-Tetramer ( $[M+H]^+ = 1799,412$ )) wurden nicht detektiert. Von der Kdn-Teichulosonsäure wurden nur die Monomere mit den drei unterschiedlichen Resten detektiert ( $[M+H]^+ = 431,141$ ;  $[M+H]^+ = 445,155$ ;  $[M+H]^+ = 634,219$ ).

Bei der HPLC-MS werden „Treffer pro Sekunde“ (counts per second= [cps]) gemessen. Diese werden über die Zeit in Form einer Kurve dargestellt (Abbildung 29, Abbildung 31). In den Zellwänden des vegetativen Myzels sind mehr PDP-Monomere vorhanden als in Sporenwänden (Abbildung 29). Des Weiteren nimmt das PDP-Dimer über die Hydrolysedauer ab. Aufgrund eines fehlenden Referenzstoffes war eine absolute Quantifizierung der Polymermengen nicht möglich. Da jedoch alle Proben (Sporen- und Myzelwände) innerhalb eines HPLC-Laufs gemessen und analysiert wurden, ist es möglich, das Verhältnis der Proben miteinander zu vergleichen.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Menge an PDP-Monomeren sowie -Dimeren wurden die „Treffer pro Sekunde“ unter der jeweiligen Kurve berechnet. Anschließend wurden die sich daraus ergebenden Werte (Total Peak Area = Gesamte Peakfläche) in einem Balkendiagramm festgehalten (Abbildung 30).



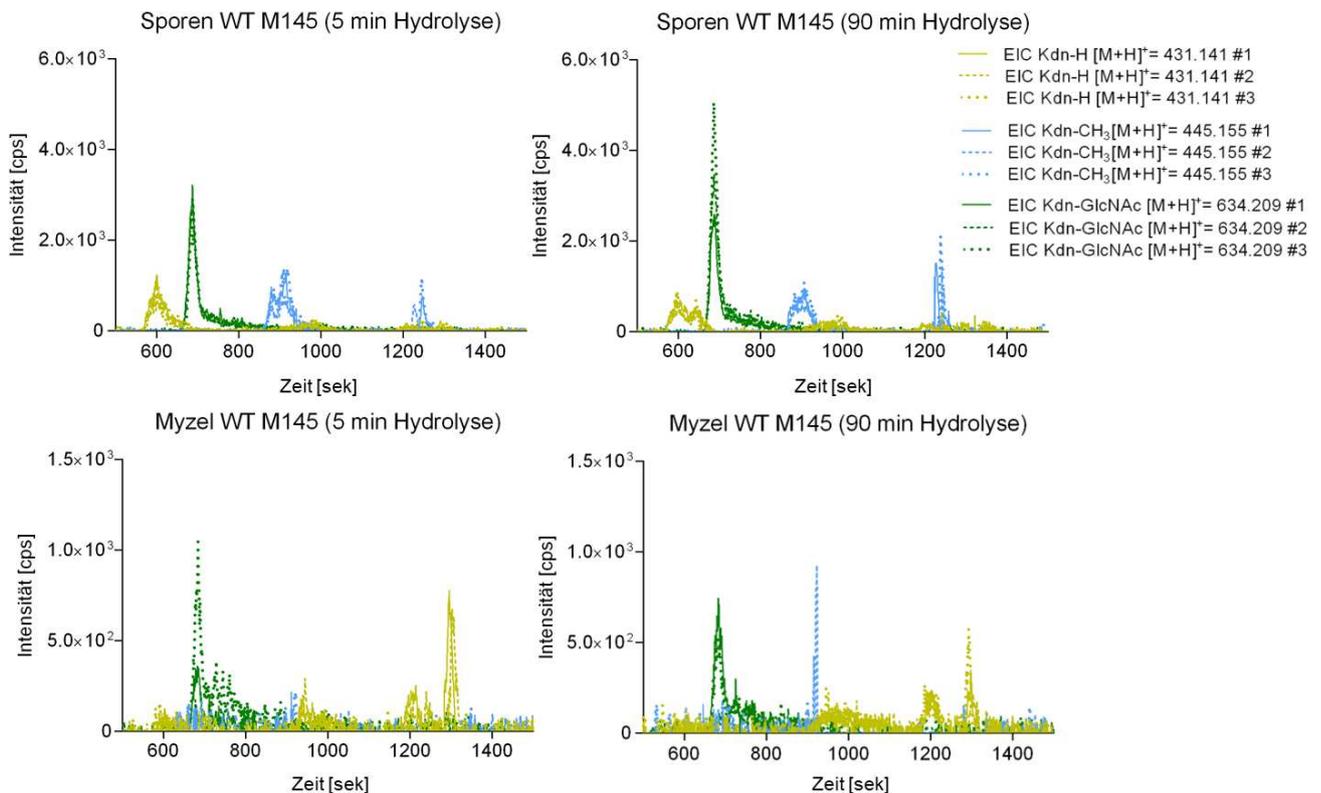
**Abbildung 29: Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden 5 min und 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Die ermittelten „Treffer pro Sekunde“ (counts per second= [cps]) wurden anhand von Kurven dargestellt. Jede Kurve entspricht einer Probe: 3 x Blau: PDP-Monomer ( $[M+H]^+ = 464,116$ ), 3 x Orange: PDP-Dimer ( $[M+H]^+ = 909,215$ ). Das PDP-Monomer wird in Myzel- und in Sporenwänden nach 5 min und nach 90 min Hydrolyse in größeren Mengen detektiert als vergleichsweise das PDP-Dimer.



**Abbildung 30: Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 5 min und für 90 min hydrolysiert. Die Myzelproben wurden zusätzlich 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Blau: PDP-Monomer ([M+H]<sup>+</sup> = 464,116), Orange: PDP-Dimer ([M+H]<sup>+</sup> = 909,215). Zellwände des vegetativen Myzels weisen einen höheren Anteil an PDP-Monomer und -Dimer auf als Sporenwände.

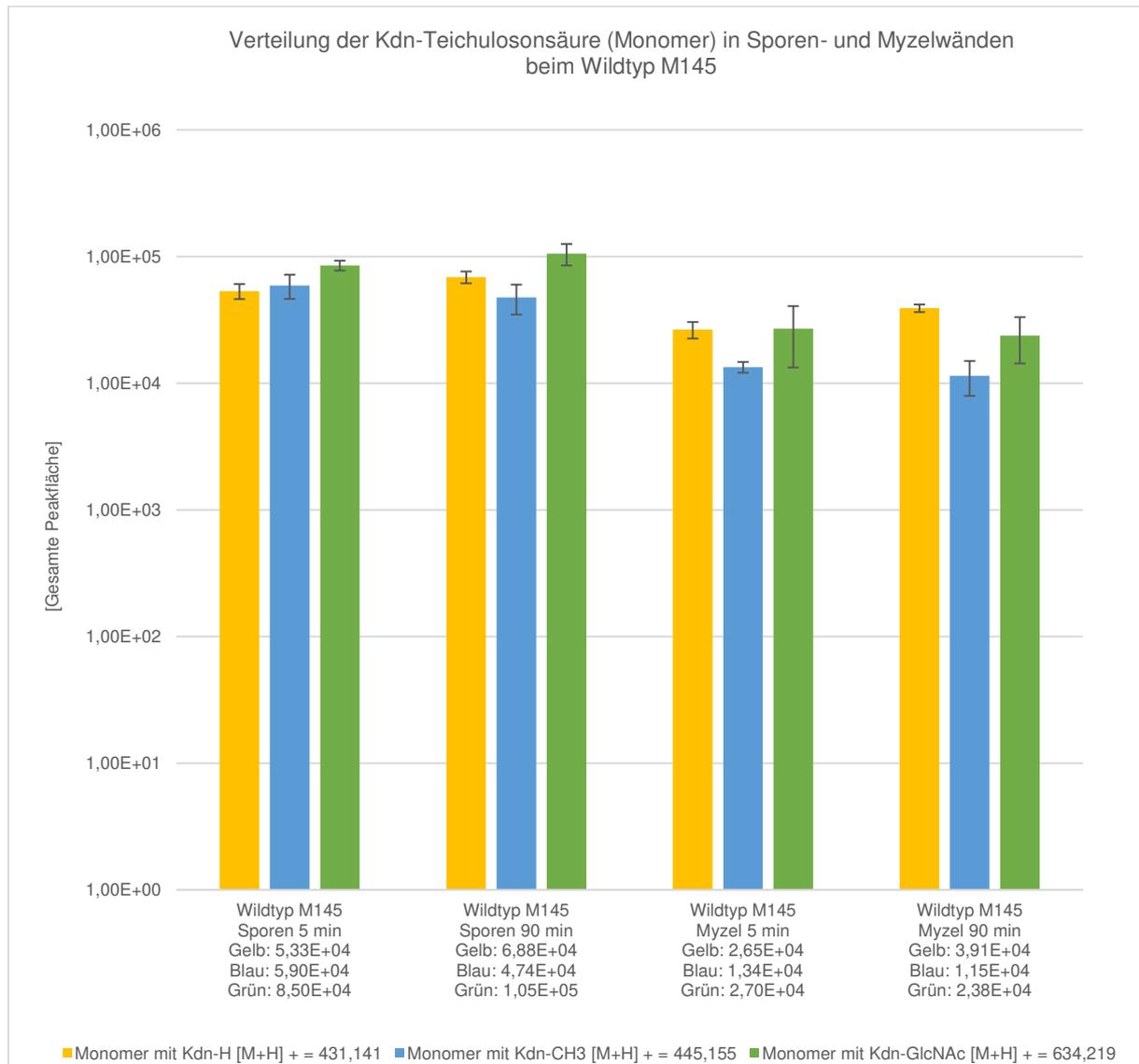
Vergleicht man die PDP-Mengen zwischen 5 minütiger und 90 minütiger Hydrolysedauer, sieht man keinen signifikanten Unterschied. Lediglich der Anteil an PDP-Dimeren nimmt nach 90 min Hydrolysedauer etwa um den Faktor 10 ab (Abbildung 30), was auf die Spaltung der Dimere in Monomere zurückzuführen ist. Dies bestätigt, dass 5 min Hydrolysedauer ausreichen, um das PDP-Polymer nahezu vollständig in seine Bausteine aufzuspalten. Da der Phosphatgehalt in Myzelwänden um 53 % höher als in Sporenwänden war (Abbildung 25), wurden die Hydrolysate der Myzelwände auch in einer 1:20 Verdünnung gemessen, um eine Übersättigung der HPLC Säulen auszuschließen.

Die Monomere der Kdn-Teichulosonsäure wurden ebenfalls mittels HPLC-MS in allen drei Konstellationen (Rest: Wasser ( $[M+H]^+ = 431,141$ ); Methylgruppe ( $[M+H]^+ = 445,155$ ); *N*-Acetylglycosamin ( $[M+H]^+ = 634,219$ )) detektiert (Abbildung 31). Dabei war ersichtlich, dass es bezüglich der Kdn-Teichulosonsäure in den Zellwänden von Sporen sowie vom vegetativen Myzel keine erwähnenswerten Unterschiede gibt.



**Abbildung 31: Verteilung der Kdn-Teichulosonsäure (Monomer mit drei unterschiedlichen Resten) in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden 5 min und 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Die ermittelten „Treffer pro Sekunde“ (counts per second= [cps]) wurden anhand von Kurven dargestellt. Jede Kurve entspricht einer Probe: 3 x Hellgrün: Kdn-H ([M+H]<sup>+</sup> = 431,141), 3 x Blau: Kdn-CH<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup> = 445,155), 3 x Grün: Kdn-GlcNAc ([M+H]<sup>+</sup> = 634,219).

Obwohl Sporenwände über einen niedrigeren Anteil an ZWG als Zellwände des vegetativen Myzels verfügen (Abbildung 24), weisen Sporenwände einen höheren Anteil an Kdn-beinhaltenender Teichulosonsäure im Vergleich zu Myzelwänden auf (Abbildung 32). Während die mit Wasserstoff substituierte Teichulosonsäure nur um den Faktor 1,76 erhöht war, waren die mit -CH<sub>3</sub>, bzw. -GlcNAc substituierten Teichulosonsäuren um den Faktor 4,1 bzw. 4.4 erhöht (90 min Hydrolyse).



**Abbildung 32: Verteilung Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden 5 min und 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Gelb: Kdn-H ([M+H]<sup>+</sup> = 431,141), Blau: Kdn-CH<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup> = 445,155), Grün: Kdn-GlcNAc ([M+H]<sup>+</sup> = 634,219). Sporenwände wiesen nach 5 min und nach 90 min Hydrolyse einen 2,9-fachen Anteil an Kdn-Teichulosonsäure-Monomeren auf, als vergleichsweise Myzelwände.

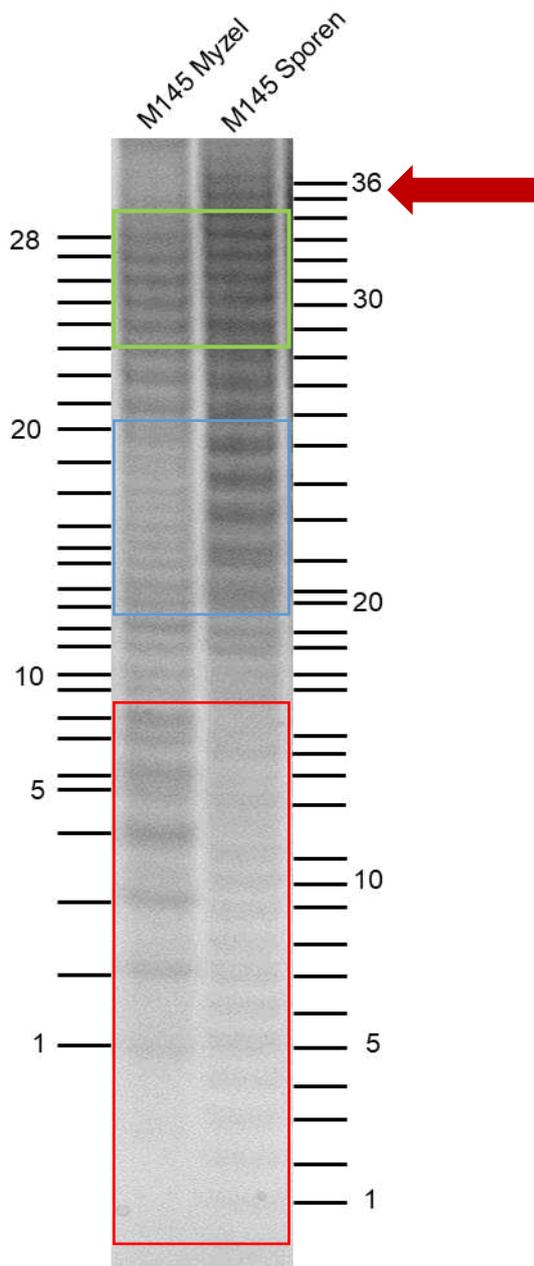
#### 4.1.4 Bestimmung der Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel

Sigle et al. (2016) hatten versucht, die Kettenlänge des Zellwandglykopolymeren PDP aus Sporen- und vegetativen Myzelwänden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zu bestimmen. Bei der eingeschränkten Auflösung der von Sigle et al. verwendeten Gelapparaturen (Hofer mighty small SE250) konnten in dem partiellen Hydrolysat des vegetativen Myzel 19 Banden gezählt werden, wobei in dem Sporenwandhydrolysat zusätzliche nicht mehr auftrennbare Fragmente im oberen Bereich des Polyacrylamid-Gels zu erkennen waren (Sigle et al. 2016a).

Um die elektrophoretische Auftrennung der Polymerfragmente zu optimieren, wurde in dieser Arbeit ein 40 cm langes Polyacrylamid-Gel verwendet sowie die Laufzeit erhöht, um eine effektivere Auftrennung der Hydrolyseprodukte über einen größeren Bereich zu gewährleisten.

Bei der verbesserten Auftrennung (Abbildung 33) war nun zum ersten Mal erkennbar, dass die Proben aus Sporen- und Myzelwänden zum einen identische ZWG-Fragmente aufwiesen sowie auch unterschiedliche. Im oberen Gelbereich wandern die Polymerfragmente aus den Proben der Sporen und des Myzels auf gleicher Höhe (grüner Rahmen), wobei in den Sporenwänden auch größere Fragmente (Pfeil) zu erkennen sind, verglichen mit den Proben der Myzelwände.

Im unteren Bereich des Polyacrylamid-Gels unterschied sich das Bandenmuster der ZWG aus Zellwänden des Myzels von dem der Sporen deutlich (roter Rahmen). Bei den Proben aus den Myzelwänden sind die Abstände zwischen den Banden im unteren Bereich des Polyacrylamid-Gels wesentlich größer als bei den Banden der Sporenwände. Das Bandenmuster der ZWG aus den Sporen entspricht allgemein nicht der Erwartung, dass die Abstände zwischen den Banden nach unten hin zum Gel immer größer werden. In der Mitte des Polyacrylamid-Gels ist außerdem zu erkennen, dass die Banden der Sporenwände dicker ausgeprägt sind als die Banden der vegetativen Myzelwände auf derselben Höhe des Polyacrylamid-Gels (blauer Rahmen).



**Abbildung 33: Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten (Bandenmuster).** 10 mg isolierte Zellwände von vegetativem Myzel und Sporen von *S. coelicolor* M145 wurden 15 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach der anschließenden kombinierten Färbung aus Alcianblau und Silbernitrat wurden die ZWG-Fragmente als Bandenmuster im Polyacrylamid-Gel sichtbar.

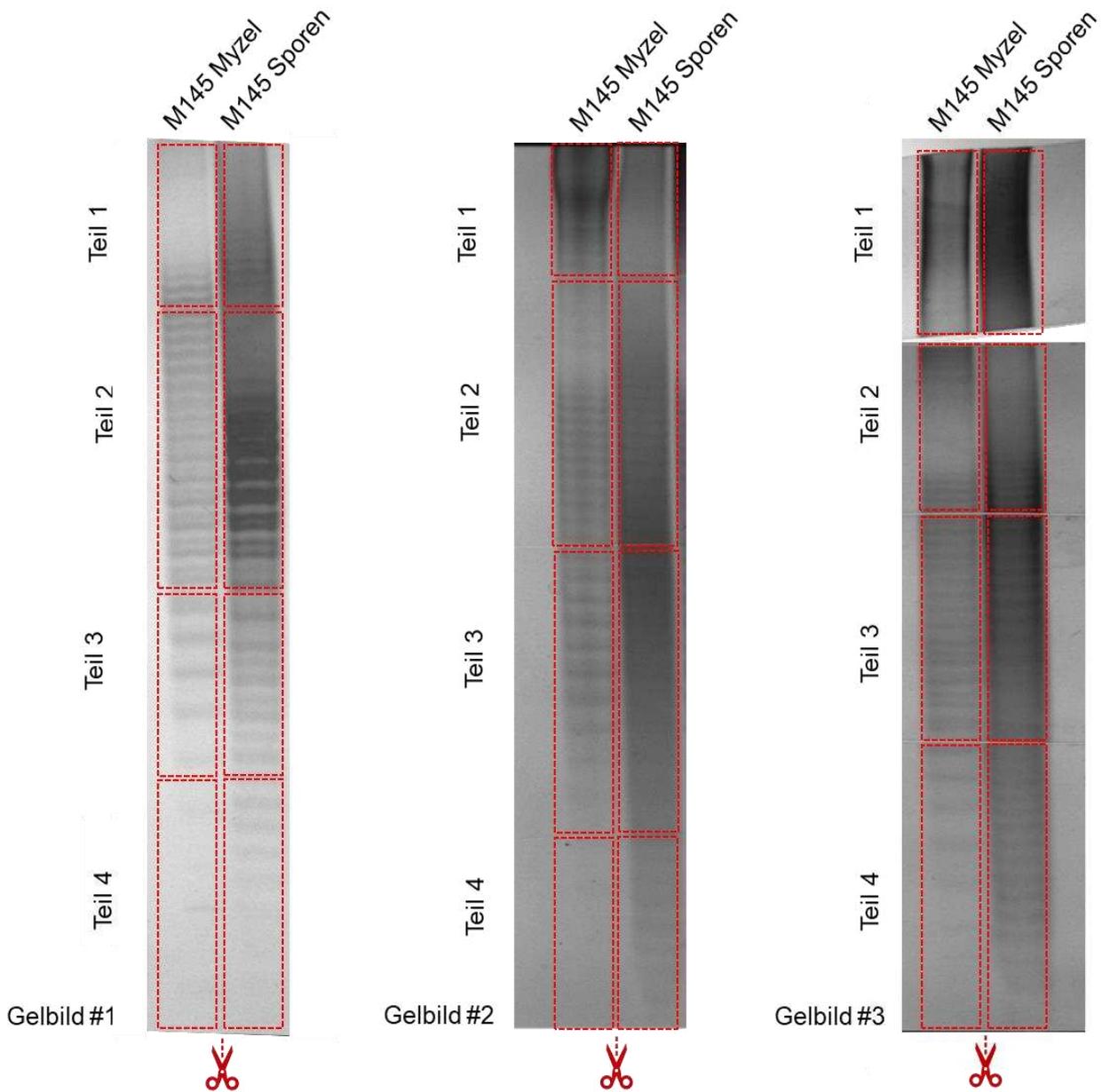
Darüber hinaus ist in dem Polyacrylamid-Gel (Abbildung 33) zu erkennen, dass die Probe, welche ZWG aus Myzelwänden enthielt, mehr als 19 Banden aufweist. Es ist sogar möglich bis zu 28 unterschiedliche Banden aufzulösen. In der Probe der Sporenwände waren sogar 36 Banden zählbar. Allerdings deuten die entsprechenden Bandenmuster darauf hin, dass sie durch Überlagerung unterschiedlicher ZWG zustande kommen.

#### **4.1.5 Nachweis von Polydiglycosylphosphat im Polyacrylamid-Gel mittels HPLC-MS in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel**

Sigle et al. (2016a) postulierten, dass es sich bei den sichtbaren Banden im Polyacrylamid-Gel um PDP-Polymere unterschiedlicher Kettenlänge handelte. Um dies nachzuweisen, wurden Banden aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mittels Phosphat-Assay und HPLC-MS analysiert.

Für dieses Experiment wurden 10 mg Sporen- und Myzelwände von *S. coelicolor* M145 für 15 min hydrolysiert. Es wurden jeweils drei Proben angefertigt. Anschließend wurden die Proben auf drei Polyacrylamid-Gele jeweils in zweifacher Ausführung aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese wurden die Lysate, bestehend aus unterschiedlich langen Zellwandglykopolymer-Fragmenten, der Größe nach aufgetrennt. Darauffolgend wurde jedes Polyacrylamid-Gel waagrecht in vier Teile unterteilt.

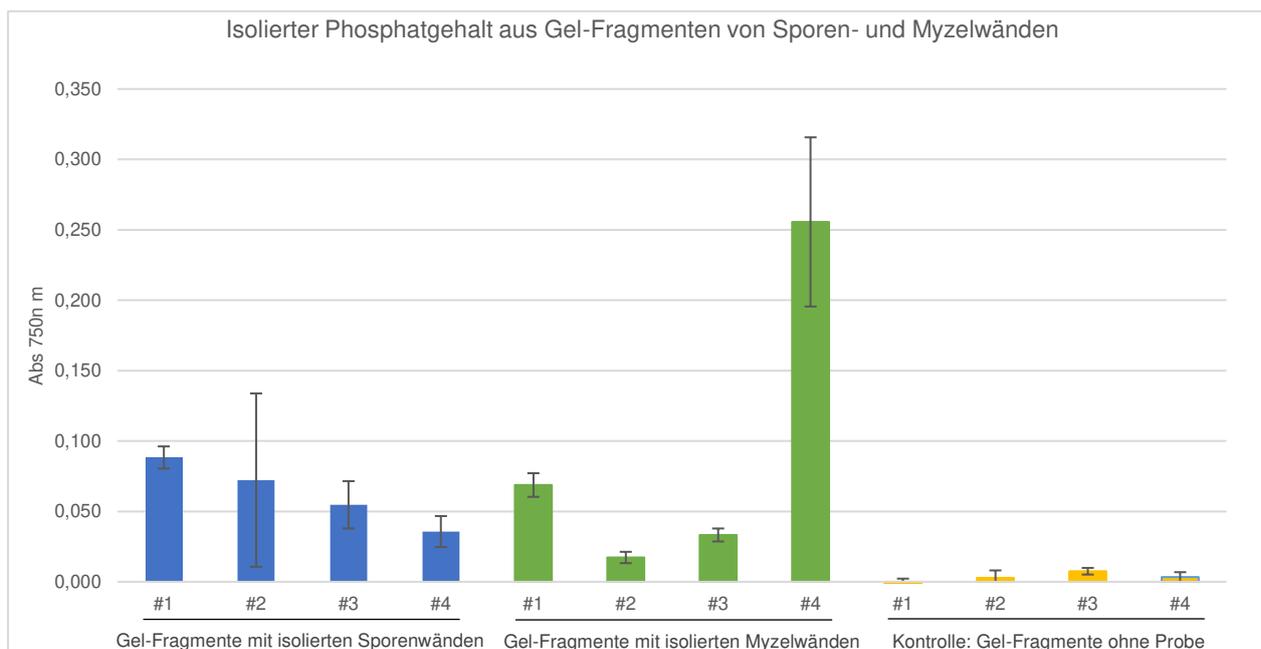
Die erste Ausführung der Proben war mit Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt und wurde mittels Alcianblau und Silbernitrat angefärbt (Abbildung 34). Sie diente zur Visualisierung und Lokalisation der Banden. Die zweite Ausführung der Proben wurde ohne Bromphenolblau aufgetragen. Die Gel-Fragmente blieben ungefärbt, um jegliche Artefakte auszuschließen. Die ausgeschnittenen Gel-Fragmente wurden einzeln in bidestilliertes Wasser eingelegt, um die darin eingeschlossenen Polymer-Fragmente zu extrahieren. Der Überstand wurde anschließend lyophilisiert. Nachfolgend wurden die ersten drei Gel-Fragmente von jeder Probe erneut für 75 min hydrolysiert, um die längeren Polymer-Fragmente in ihre Untereinheiten zu zerlegen. Anschließend erfolgte der Phosphat-Assay (Abbildung 35) und die HPLC-MS-Analyse (Abbildung 36).



**Abbildung 34: Polyacrylamid-Gele mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten.** 10 mg isolierte Zellwände von vegetativem Myzel und Sporen von *S. coelicolor* M145 wurden 15 min hydrolysiert, um ZWG unterschiedlicher Kettenlänge zu erhalten. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden auf drei Polyacrylamid-Gele aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde jedes Gel in vier waagrechte Teile unterteilt. Nach der kombinierten Färbung aus Alcianblau und Silbernitrat wurden die ZWG-Fragmente als Bandenmuster in den Polyacrylamid-Gele sichtbar.

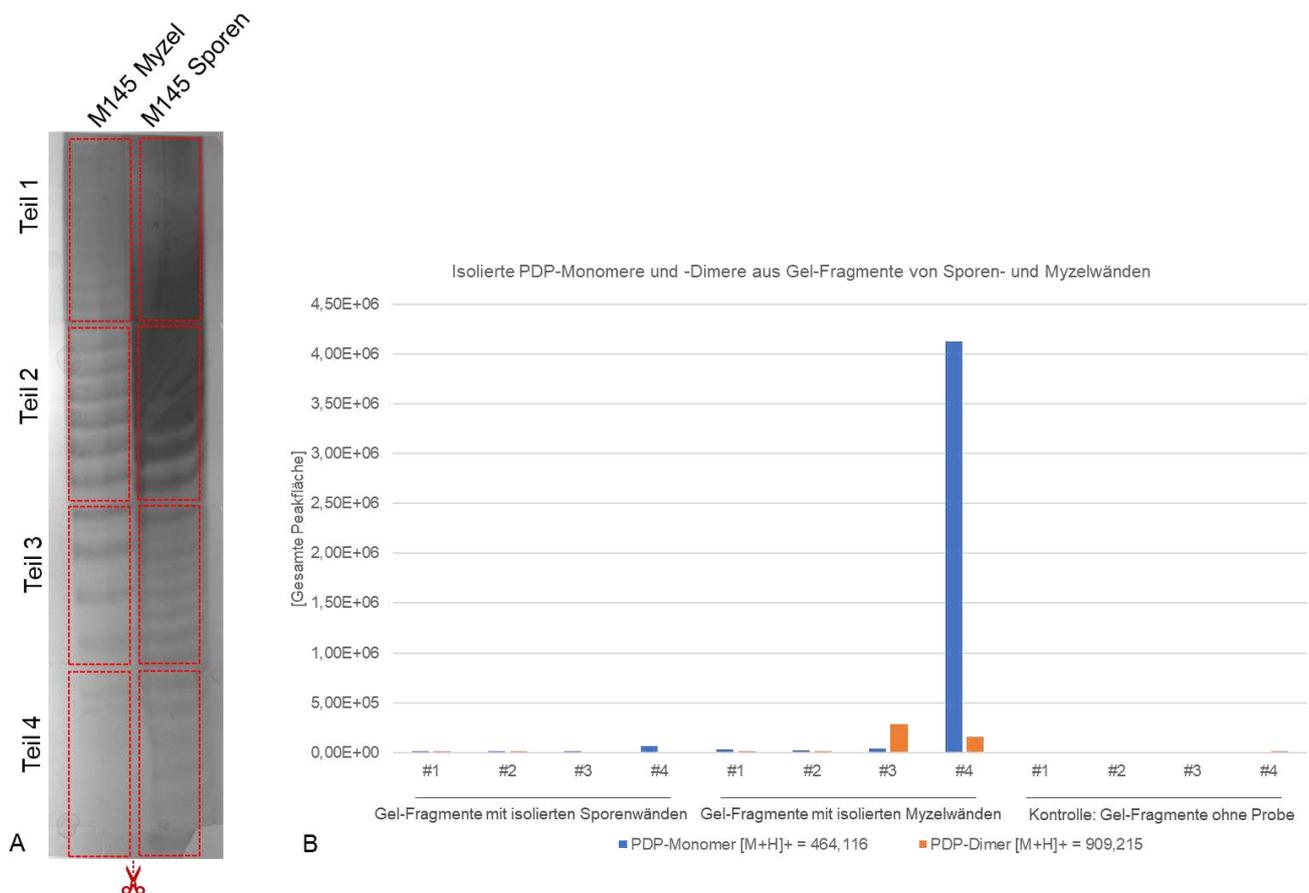
Mit Hilfe des Phosphat-Assays wurde für jedes Gel-Fragment der Phosphatgehalt bestimmt (Abbildung 35). Gel-Fragmente, welche als Kontrolle dienten, enthielten weder Hydrolysat noch Ladepuffer und liefen parallel leer mit. In diesen Kontroll-Gelstücken ließ sich kein Phosphat bzw. nur in Spuren detektieren. Dabei handelte es sich vermutlich um Verunreinigungen, welche beim Ausschneiden der Gel-Fragmente entstanden sind.

Alle vier Gel-Fragmente der Sporenproben wiesen einen niedrigen Phosphatgehalt auf. Auffallend ist zudem, dass der Phosphatgehalt vom ersten Gel-Fragment (größere Polymer-Fragmente) bis zum vierten Gel-Fragment (kleinere Polymer-Fragmente) über die Länge des Polyacrylamid-Gels hinweg kontinuierlich sinkt (Abbildung 35). Im Gegenteil dazu wurde in den vierten Gel-Fragmenten (unterer Gelbereich) der Myzelproben (Abbildung 34, Myzelproben, Teil 4) eine deutlich höhere Phosphatmenge detektiert.



**Abbildung 35: Phosphatgehalt über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 3].** ZWG-Fragmente aus den Zellwänden des vegetativen Myzels und Sporen von *S. coelicolor* M145 wurden in zweifacher Ausführung auf drei Polyacrylamid-Gele aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Jedes Polyacrylamid-Gel wurde in vier waagrechte Teile unterteilt. Die erste Ausführung der Proben wurde mittels Alcianblau und Silbernitrat angefärbt (Abbildung 34). Die zweite Ausführung der Proben wurde ungefärbt für den Phosphat-Assay verwendet. Dieser detektierte im vierten Gel-Fragment der Proben von den Myzelwänden den höchsten Phosphatgehalt.

Um zu untersuchen, ob das detektierte Phosphat auf das PDP-Polymer zurückzuführen ist, wurden die Gel-Fragmente mittels HPLC-MS analysiert (Abbildung 36). Das PDP-Monomer ( $[M+H]^+ = 464,116$ ) sowie das PDP-Dimer ( $[M+H]^+ = 909,215$ ) ließen sich in der Probe der Myzelwände im dritten sowie im vierten Gel-Fragment detektieren. Das vierte Gel-Fragment verfügte über den höchsten detektierbaren Wert an PDP-Monomer. Damit ist gezeigt, dass die ZWG-Banden im unteren Gelbereich auf PDP zurückzuführen sind.



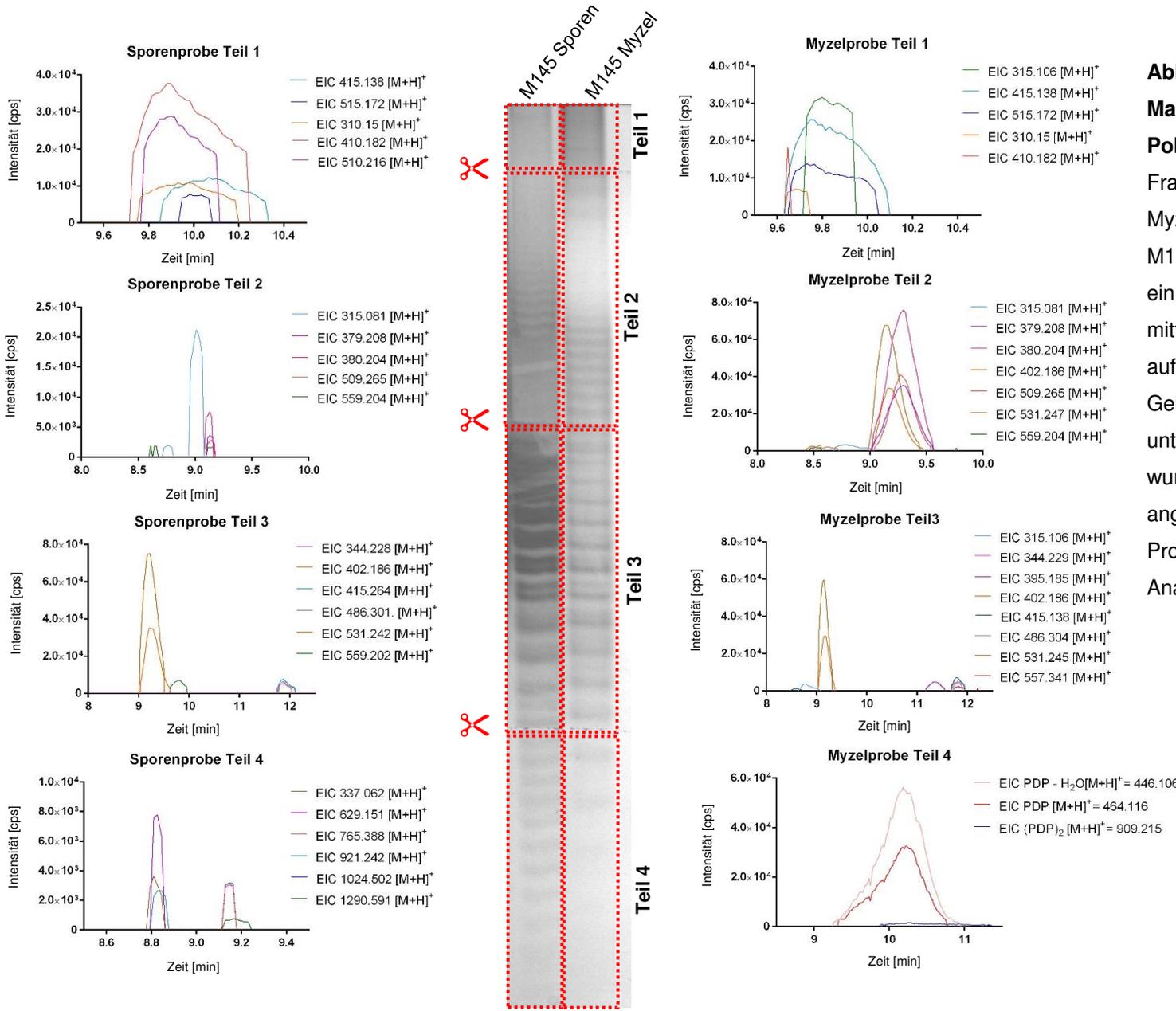
**Abbildung 36: Anteile an PDP-Monomer sowie PDP-Dimer über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 1]. (A)** ZWG-Fragmente von Zellwänden des vegetativen Myzels und von Sporen von *S. coelicolor* M145 wurden in zweifacher Ausführung auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Das gesamte Polyacrylamid-Gel wurde anschließend in vier waagrechte Teile unterteilt. Die erste Ausführung der Proben wurde mittels Alcianblau und Silbernitrat angefärbt. **(B)** Die zweite Ausführung der Proben blieb ungefärbt. Die sich in den Gel-Fragmenten befindlichen ZWG-Fragmente wurden extrahiert und mittels HPLC-MS analysiert. Das PDP-Monomer wurden im vierten Gel-Fragment der Probe der Myzelwände in hohen Mengen nachgewiesen.

In der Probe der Sporenwände ließen sich im vierten Gel-Fragment die Massen eines PDP-Monomers und des PDP-Dimers nur in Spuren detektieren, so dass man davon ausgehen muss, dass die Banden der Sporenwand nicht auf PDP, sondern auf ein phosphatfreies Polymer zurückzuführen sind.

### **4.1.6 Analyse weiterer sich im Polyacrylamid-Gel befindlicher Polymer-Massen mittels HPLC-MS**

Mit der beschriebenen Methode war es ebenfalls möglich, weitere Massen im Polyacrylamid-Gel mittels HPLC-MS zu detektieren (Abbildung 37). Diese Massen ließen sich aber keinen aus der Literatur bekannten Massen zuordnen, so dass sich über die entsprechenden Moleküle keine Aussagen machen lassen.

4. ERGEBNISSE



**Abbildung 37: Detektierte Polymer-Massen über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 1].** ZWG-Fragmente von Zellwänden des vegetativen Myzels und von Sporen von *S. coelicolor* M145 wurden in zweifacher Ausführung auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Das gesamte Polyacrylamid-Gel wurde in vier waagrechte Teile unterteilt. Die erste Ausführung der Proben wurde mittels Alcianblau und Silbernitrat angefärbt (Gel). Die zweite Ausführung der Proben wurde ungefärbt für HPLC-MS-Analysen verwendet (Chromatogramme).

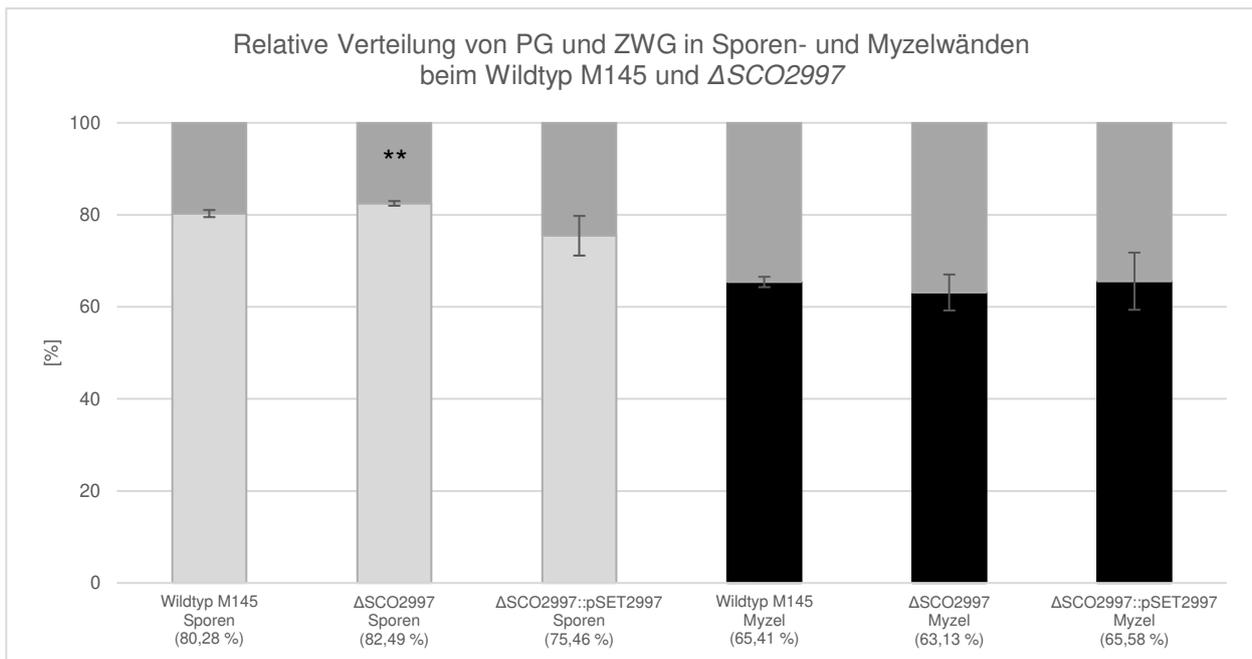
## 4.2 Rolle der mutmaßlichen CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase SCO2997 an der Zellwandglykopolymer-Synthese

SCO2997 liegt im Zellwandglykopolymer-Cluster II (Abbildung 13) und kodiert eine der sechs CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferasen von *S. coelicolor*. Auf Grund der genetischen Organisation wurde SCO2997 als *tagF*-Homolog bezeichnet (Kleinschnitz et al. 2011b). TagF ist bei *Bacillus subtilis* für die Polymerisation von Polyglycerolphosphat-Ketten während der Synthese von Wandteichonsäuren verantwortlich (Pooley et al. 1992; Schertzer und Brown 2003). 2011 beschrieben Kleinschnitz et al. eine knock out Mutante ( $\Delta$ SCO2997) und führten eine erste morphologische Charakterisierung durch (Kleinschnitz et al. 2011b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die ZWG-Zusammensetzung der Mutante näher charakterisiert werden.

### 4.2.1 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden bei $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::*pSET2997*

Die Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren der Mutante  $\Delta$ SCO2997 wurde bestimmt und mit der des Wildtyps M145 und der komplementierten Mutante  $\Delta$ SCO2997::*pSET2997* verglichen. Für die Untersuchungen wurden jeweils 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände für 90 min hydrolysiert. Das Peptidoglykan blieb als Pellet zurück und wurde nach der Hydrolyse lyophilisiert und anschließend gewogen. Das lyophilisierte Peptidoglykan wurde anschließend danach prozentual zu der ursprünglich eingesetzten Menge an Zellwänden berechnet.

Bei den Myzelwänden wurden beim Wildtyp M145 35 % Zellwandglykopolymeren abhydrolysiert. Die Mutante  $\Delta$ SCO2997 wies mit 37 % abhydrolysierten Zellwandglykopolymeren ein ähnliches Niveau auf wie der Wildtyp M145 (Abbildung 38). Bei den Sporenwänden wurden beim Wildtyp M145 20 % Zellwandglykopolymeren abhydrolysiert. Bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 war der Zellwandglykopolymer-Gehalt mit 18 % leicht reduziert und wurde durch die genetische Komplementation mit 25 % sogar über das Wildtyp Niveau erhöht.



**Abbildung 38:** Anteil an Peptidoglykan (unterer Anteil) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Anteil) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 5]. 10 mg (= 100 %) isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Anschließend wurde das Pellet (PG) gewogen und prozentual verrechnet. Es besteht zwischen dem Wildtyp und der Mutante  $\Delta$ SCO2997 kein auffälliger Unterschied den ZWG-Anteil betreffend (Mann-Whitney Test, \*, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel von $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::pSET2997

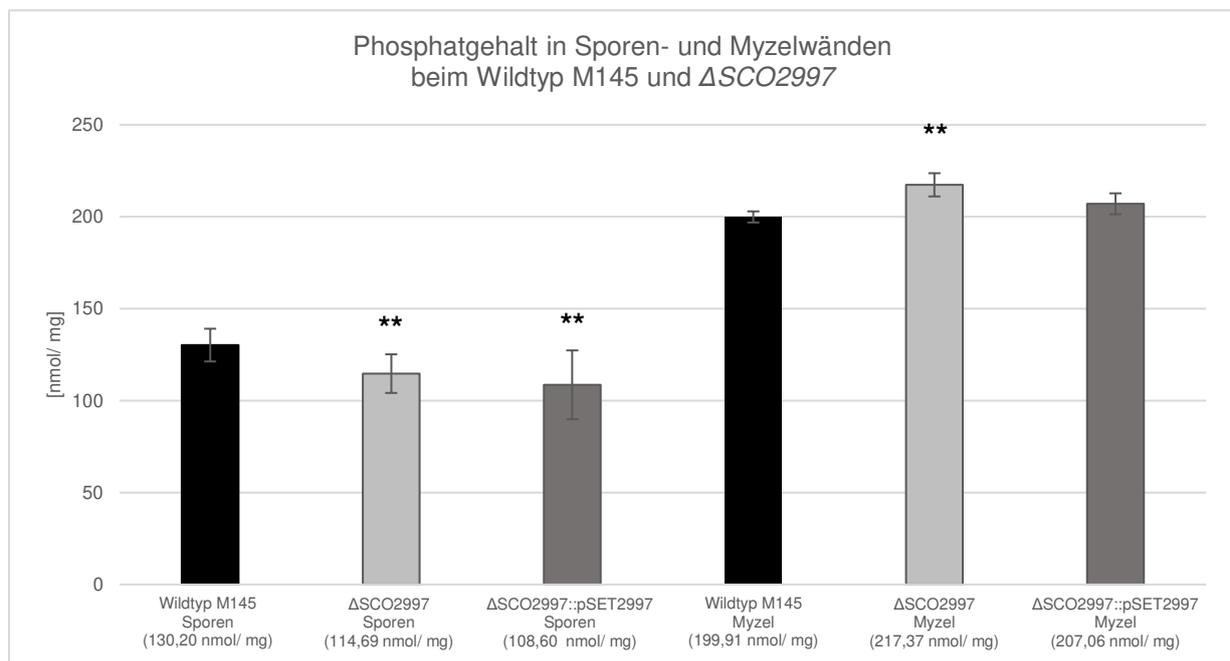
Um ein besseres Verständnis über die Zellwandzusammensetzung der Mutante  $\Delta$ SCO2997 zu erhalten, wurden Zellwandhydrolysate bezüglich Phosphat-, Hexosamin- und Kdn-Gehalt hin untersucht.

Für die Assays wurden Myzel- sowie Sporenwände des Wildtyps M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 verwendet. Die Zellwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die sich im Überstand befindlichen abgespaltenen Zellwandglykopolymere wurden anschließend für die entsprechenden Assays verwendet.

#### 4.2.2.1 Phosphat-Assay

In den Sporenwänden war der Phosphatgehalt in der Mutante  $\Delta$ SCO2997 gegenüber dem des Wildtyps M145 um 12 % kleiner (Abbildung 39). Die genetische Komplementation der Mutante  $\Delta$ SCO2997 konnte den reduzierten Phosphatgehalt nicht komplementieren.

In den Myzelwänden verfügte die Mutante  $\Delta$ SCO2997 dagegen über einen erhöhten Phosphatgehalt von 9 % im Vergleich zum Wildtyp M145. Durch die genetische Komplementation wurde dieser wieder gesenkt.

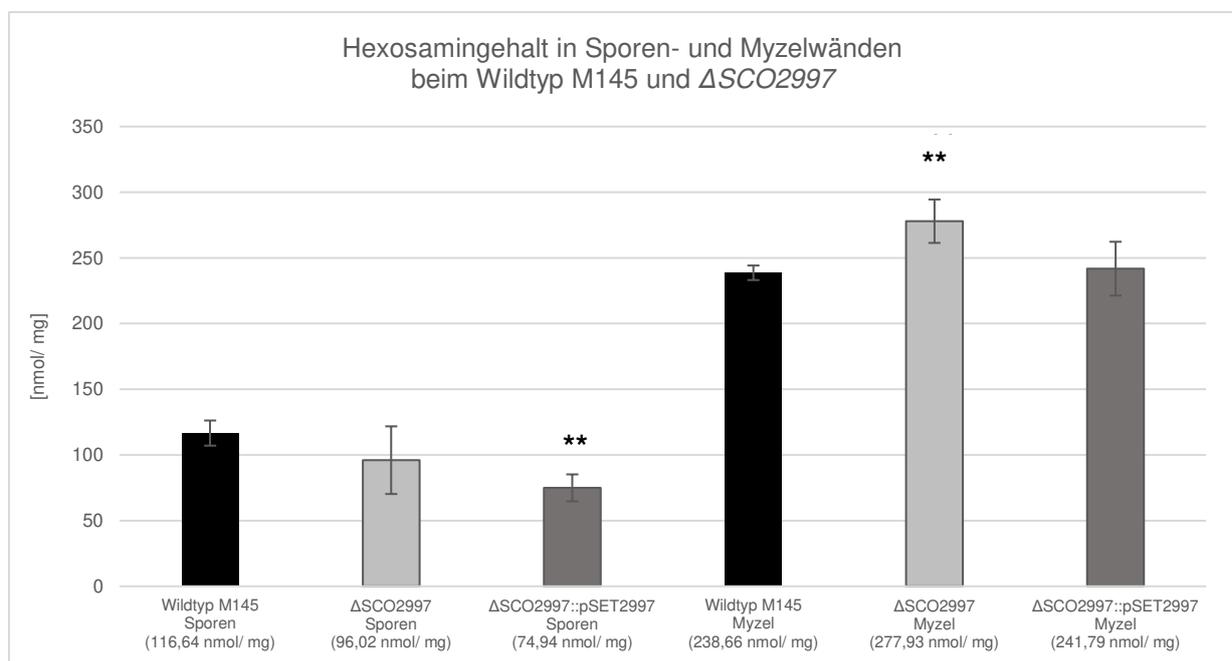


**Abbildung 39: Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Phosphat-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Phosphat wird in nmol/ mg angegeben. In der Mutante  $\Delta$ SCO2997 sowie in der Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ist der Anteil an ZWG in den Sporenwänden gegenüber dem Anteil im Wildtyp M145 reduziert. In Myzelwänden dagegen ist bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 der Anteil an ZWG erhöht (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2.2 Hexosamin-Assay

Der Hexosamingehalt in den Sporenwänden der Mutante  $\Delta$ SCO2997 ist um 18 % kleiner als der des Wildtyps M145 (Abbildung 40). Die genetische Komplementation von  $\Delta$ SCO2997 kann diesen unverständlicherweise nicht erhöhen. Der Phosphatgehalt ist sogar um 36 % kleiner als beim Wildtyp M145.

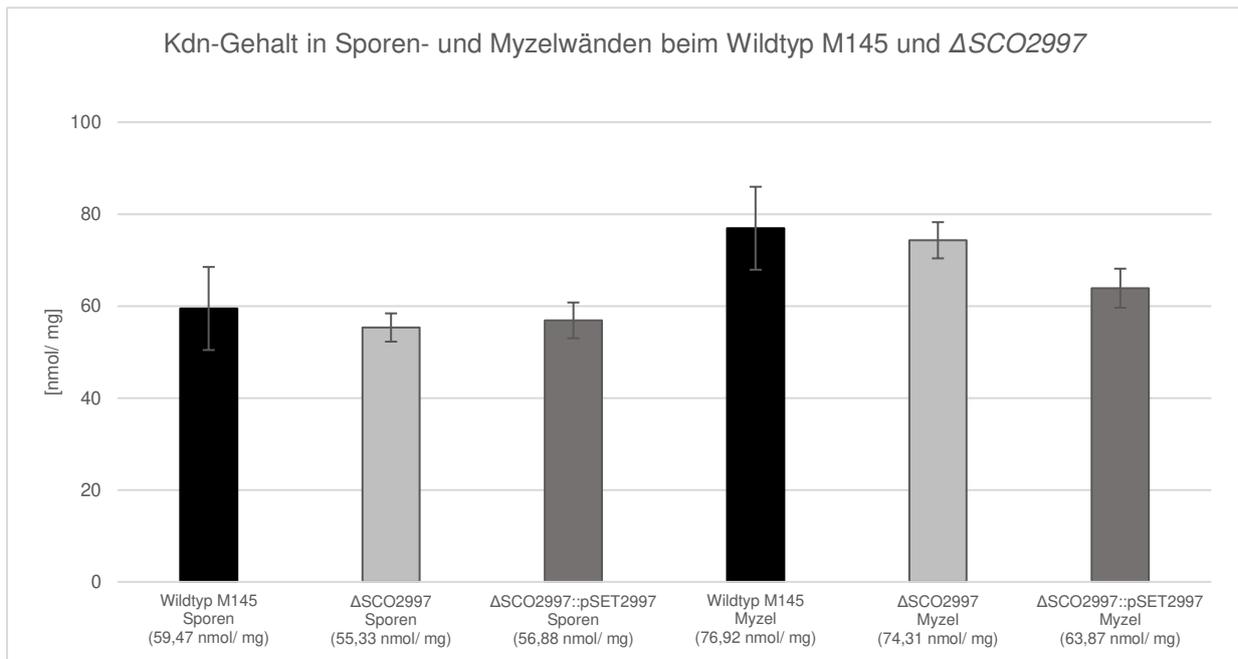
In den Myzelwänden weist die Mutante  $\Delta$ SCO2997 dagegen über einen höheren Hexosamingehalt von 17 % im Vergleich zum Wildtyp M145 auf. Die Komplementation der Mutante senkt den Hexosamingehalt wieder auf das Niveau des Wildtyps M145.



**Abbildung 40: Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Hexosamin-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Phosphat wird in nmol/ mg angegeben. In der Mutante  $\Delta$ SCO2997 sowie in der Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ist der Anteil an ZWG in den Sporenwänden gegenüber dem Anteil im Wildtyp M145 reduziert. In den Myzelwänden dagegen ist bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 der Anteil an ZWG erhöht (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

### 4.2.2.3 Kdn-Assay

Der Kdn-Gehalt ist in der Mutante  $\Delta$ SCO2997 nicht beeinträchtigt und liegt in den Sporen- sowie in den Myzelwänden auf ähnlichem Niveau wie beim Wildtyp M145 (Abbildung 41). Die genetische Komplementation von  $\Delta$ SCO2997 zeigte jedoch in den Myzelwänden unerklärlicherweise eine Reduktion von 17 % im Kdn-Gehalt gegenüber dem des Wildtyps M145.



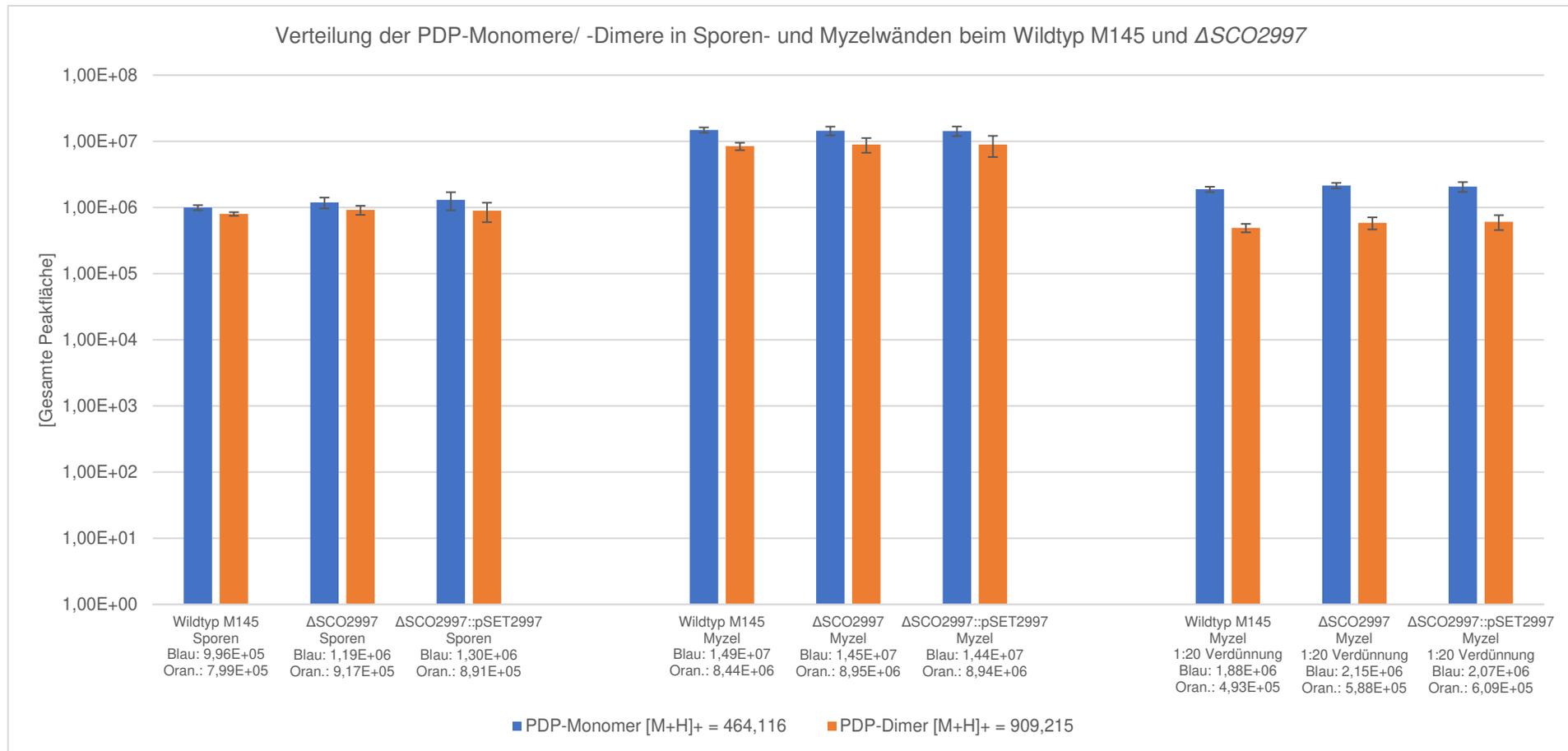
**Abbildung 41: Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 5].** 5 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Kdn-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Phosphat wird in nmol/ mg angegeben. In Sporen- sowie in Myzelwänden zeigen die Mutante  $\Delta$ SCO2997 und die Komplementation  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 eine geringe Reduktion im Kdn-Gehalt im Vergleich zum Kdn-Gehalt im Wildtyp M145 (Mann-Whitney Test, \*, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Mutation in dem Gen *SCO2997* keinen bedeutenden Einfluss hat auf den Phosphat-, Hexosamin- und Kdn-Gehalt in Myzel- sowie Sporenwänden.

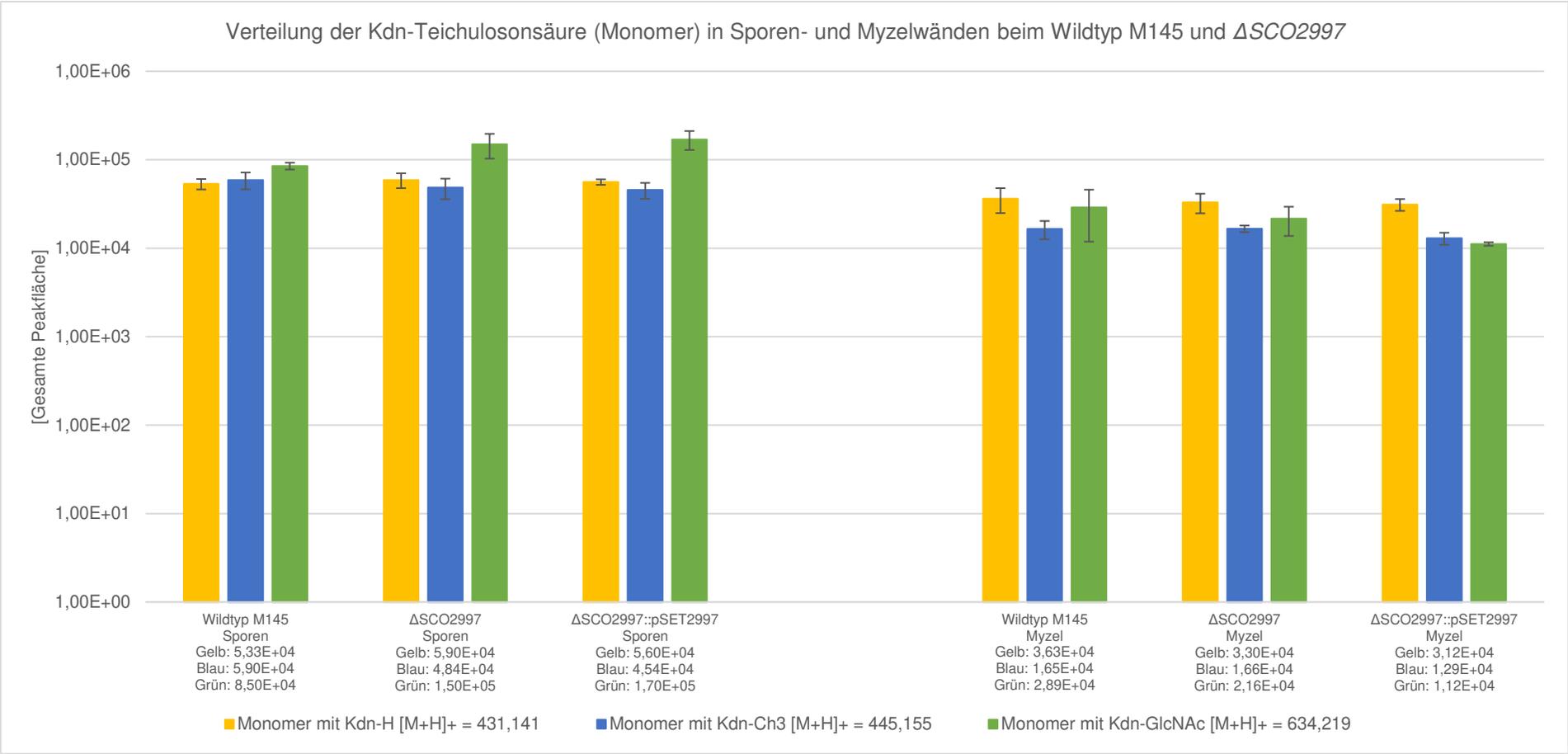
#### **4.2.3 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der relativen Verteilung der Zellwandglykopolymeren Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosonsäure in $\Delta$ SCO2997 und $\Delta$ SCO2997::*pSET2997***

Die Verteilung der beiden Polymere PDP und Kdn-Teichulosonsäure, welche an PG verankert sind, wurde mittels HPLC-MS analysiert. Hierfür wurden die Myzel- sowie Sporenwände des Wildtyps M145 und der Mutante  $\Delta$ SCO2997 einschließlich der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::*pSET2997* hydrolysiert und analysiert. Zwischen dem Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2997::*pSET2997* ließen sich keine nennenswerten Unterschiede bezüglich des PDP-Gehalts feststellen (Abbildung 42). Die Mutante  $\Delta$ SCO2997 sowie die Komplementation besaßen einen vergleichbaren Anteil an PDP-Monomer und -Dimer wie der Wildtyp M145.

In den Sporenwänden verfügte die Mutante  $\Delta$ SCO2997 1,8 x mehr an Kdn-Teichulosonsäure mit GlcNAc-Rest als der Wildtyp M145 (Abbildung 43). Die genetische Komplementation wies allerdings ebenfalls einen erhöhten Anteil auf. In den Zellwänden des vegetativen Myzels wies die Mutante keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Anteile an Kdn-Teichulosonsäure im Vergleich zum Wildtyp M145 auf.



**Abbildung 42: Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementationen  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 5 min hydrolysiert. Die Myzelproben wurden zusätzlich 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Blau: PDP-Monomer ([M+H]<sup>+</sup> = 464,116), Orange: PDP-Dimer ([M+H]<sup>+</sup> = 909,215). Im Vergleich zum Wildtyp M145 sind die Anteile an PDP-Monomer und -Dimer in der Mutante  $\Delta$ SCO2997, in den Sporen- sowie Myzelwänden, unverändert.



**Abbildung 43: Verteilung des Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante  $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementationen  $\Delta$ SCO2997::pSET2997 (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 5 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Gelb: Kdn-H ([M+H]<sup>+</sup> = 431,141), Blau: Kdn-Ch<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup> = 445,155), Grün: Kdn-GlcNAc ([M+H]<sup>+</sup> = 634,219). Die Anteile des Kdn-Teichulosonsäure-Monomers zeigen bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 in Sporen- sowie in Myzelwänden keine auffälligen Unterschiede gegenüber den Anteilen im Wildtyp M145.

#### 4.2.4 Einfluss der Mutation in dem Gen *SCO2997* auf die Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel

2016 postulierten Sigle et al., dass es sich bei dem Bandenmuster im Polyacrylamid-Gel um Fragmente des PDP-Polymers handelt (Sigle et al. 2016b). Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel 4.1.4 und 4.1.5, deuten darauf hin, dass es sich bei den Banden auch um ein oder mehrere andere Polymere handeln könnte.

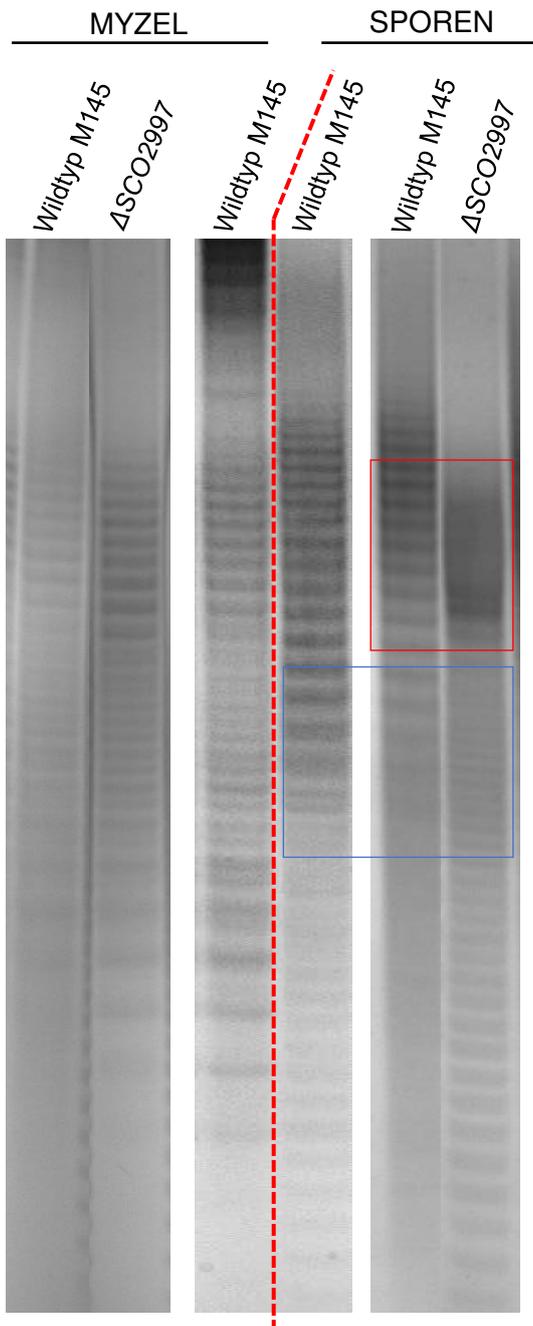
Um Unterschiede aufzudecken, welche die Kettenlänge von PDP oder anderer Polymere betreffen, wurden die ZWG aus den Zellwänden des Wildtyp M145 sowie der Mutante  $\Delta SCO2997$  mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten ZWG aus Myzel- und Sporenwänden waren im Polyacrylamid-Gel zu erkennen (Abbildung 44). Die ZWG der Mutante sind immer mit dem Wildtyp M145 aus demselben Polyacrylamid-Gel abgebildet.

Das Bandenmuster der ZWG aus dem vegetativen Myzel vom Wildtyp M145 und der Mutante  $\Delta SCO2997$  ist nahezu identisch.

Bei den ZWG aus den Sporenwänden lassen sich dagegen Unterschiede im Bandenmuster zwischen dem Wildtyp M145 und der Mutante  $\Delta SCO2997$  erkennen. Im oberen Bereich des Polyacrylamid-Gels lassen sich beim Wildtyp M145 mehrere klare Banden erkennen. Bei  $\Delta SCO2997$  sind diese eher als Schmier sichtbar (roter Rahmen). Dieser Bereich deutet auf eine unzureichende Auftrennung hin. Dies könnte auf Überladung des Gels durch einen erhöhten Anteil an Polymer-Fragmenten dieser Größe zurückzuführen sein. Alternativ könnte der Schmier auch durch ein unbekanntes Zellwandpolymer, welches sich mit den milden Hydrolysebedingungen nicht in seine Bestandteile zerlegen lässt, verursacht werden.

Der mittlere Bereich des Polyacrylamid-Gels bei den Proben der Sporenwände zeigt ein weiteres Detail (blauer Rahmen). Das Bandenmuster der Mutante  $\Delta SCO2997$  verfügt über mehrere Banden in kleineren Abständen. Vergleicht man die Mutante  $\Delta SCO2997$  mit der Probe des Wildtyps M145 aus der Mitte, so lässt sich auch hier keine vollständige Übereinstimmung des Bandenmusters erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mutante  $\Delta SCO2997$  über ein weiteres Zellwandglykopolymer verfügt.

Der untere Bereich des Polyacrylamid-Gels bei der Probe der Sporenwände ist beim Wildtyp M145 sowie bei der Mutante  $\Delta SCO2997$  nahezu identisch.



**Abbildung 44: Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten vom Wildtyp M145 und der Mutante  $\Delta$ SCO2997 (*S. coelicolor*).** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden 15 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach der anschließenden kombinierten Färbung aus Alcianblau und Silbernitrat wurden die ZWG-Fragmente als Bandenmuster im Polyacrylamid-Gel sichtbar.

### 4.3 Charakterisierung der Mutationen in den Genen *SCO2578*, *SCO2589-2590* und *SCO2594*, die vermutlich an der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren beteiligt sind

Die Gene *SCO2578*, *SCO2589-90* und *SCO2594* liegen gemeinsam im Zellwandglykopolymer-Cluster I (Abbildung 13). Das Gen *SCO2578* kodiert ein TagV-ähnliches LCP Protein, das ursprünglich beim Bacterial two-Hybrid Screening einer *S. coelicolor* Genbank auf Interaktionspartner von MreC identifiziert wurde (Kleinschnitz et al. 2011a). Da *SCO2578* Interaktionen mit anderen Proteinen des *Streptomyces* Spore Wall Synthesizing Complex (MreC, MreD, Sfr(RodA), PBP2, FtsI, RodZ, *SCO2584*) zeigte, wurde vermutet, dass es möglicherweise ebenfalls an der Synthese der Sporenhülle beteiligt ist. Die Inaktivierung von *SCO2578* führte zu einer aberranten Sporulation, reduziertem Phosphatgehalt in der Zellhülle und zur Beeinträchtigung der Integrität der Sporenhülle (Sigle et al. 2016b).

*SCO2589* und *SCO2590* kodieren CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferasen. Die genomische Organisation legt nahe, dass *SCO2589* und *SCO2590* ein Zellwandglykopolymer polymerisieren, welches dann durch *SCO2578* an das Peptidoglykan angeheftet wird. Bis jetzt wurden die beiden Gene *SCO2589* und *SCO2590* nicht charakterisiert.

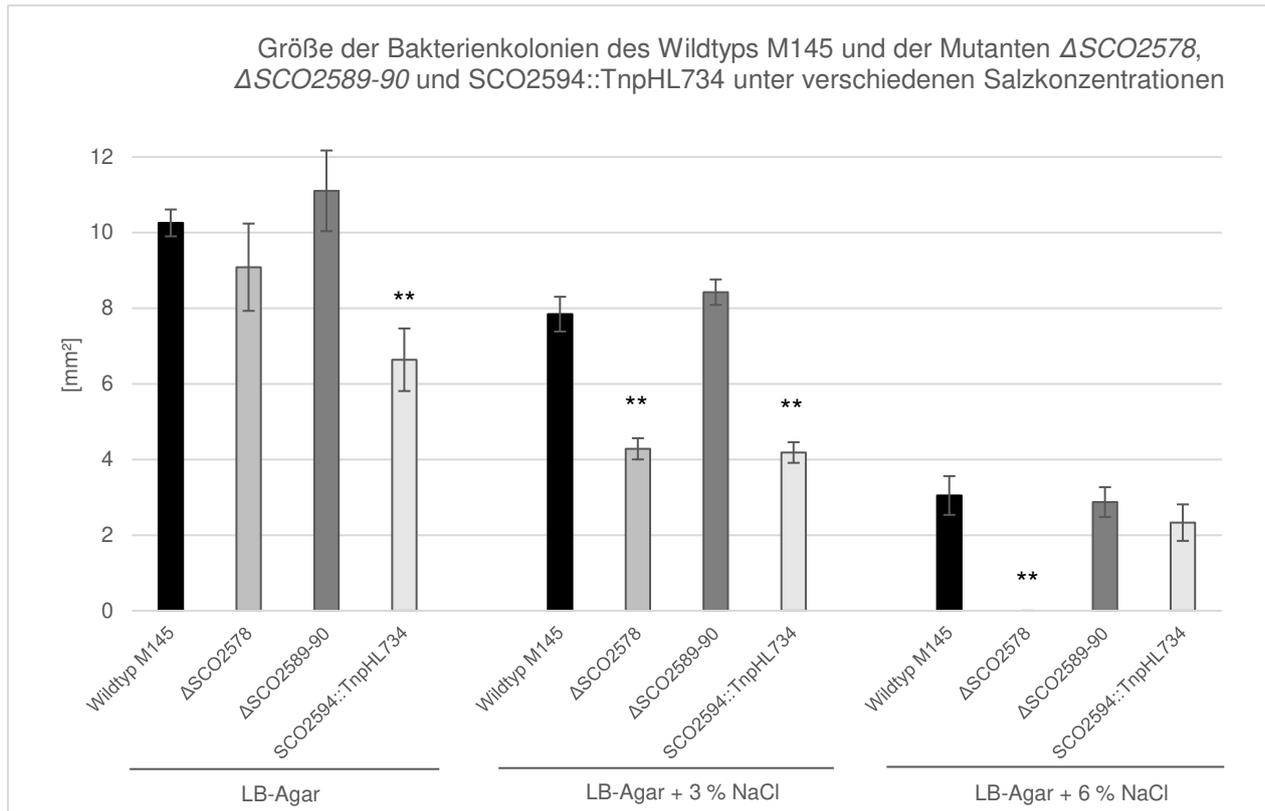
Bei *SCO2594* und *SCO2592* handelt es sich laut BLAST-Analysen um putative Exopolysaccharid-Phosphotransferasen von *Streptomyces coelicolor* M145. *SCO2594* bildet zusammen mit *SCO2593* und *SCO2592* ein Operon. Der Promotor befindet sich vor dem Gen *SCO2594*. Darüber hinaus besitzen die Gene *SCO2594* und *SCO2593* überlappende Start- und Stopcodons (...GAC TGATG AAA...) und weisen somit eine translationale Kopplung auf. Die Mutante *SCO2594::TnpHL734* von *SCO2594* wurde im Rahmen einer Transposon-Mutagenese von *S. coelicolor* M145 aufgrund einer veränderten Koloniemorphologie isoliert (Schmid 2019; Vollmer et al. 2019).

#### 4.3.1 Bestimmung der Größe der Bakterienkolonien in Abhängigkeit zu steigender Salzkonzentration

*S. coelicolor* Mutanten weisen häufig eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber hohen Osmolaritäten auf, wenn die Integrität der Zellwand beeinträchtigt ist (Sigle et al. 2015). Um ein erstes Indiz zu erhalten, ob die drei Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::*TnpHL734* an der Synthese der Zellhülle beteiligt sind, wurden sie auf LB-Agar mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen wachsen gelassen. Anschließend wurde die Größe der Einzelkolonien der Bakterien bestimmt.

Die Kolonien der Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und SCO2594::*TnpHL734* waren bereits auf LB-Agar ohne zusätzliche Salzkonzentration kleiner als die Kolonien des Wildtyps M145. Bei SCO2594::*TnpHL734* war die Größe der Kolonien um 35 % reduziert. Dagegen waren die Kolonien der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 um 8 % größer als die des Wildtyps M145.

Mit steigender Salzkonzentration nahm die Größe der Kolonien des Wildtyps M145 sowie der Mutanten ab (Abbildung 45). Besonders ausgeprägt war die Empfindlichkeit der Mutante  $\Delta$ SCO2578, die bei zusätzlichen 6 % NaCl nicht mehr wachsen konnte.



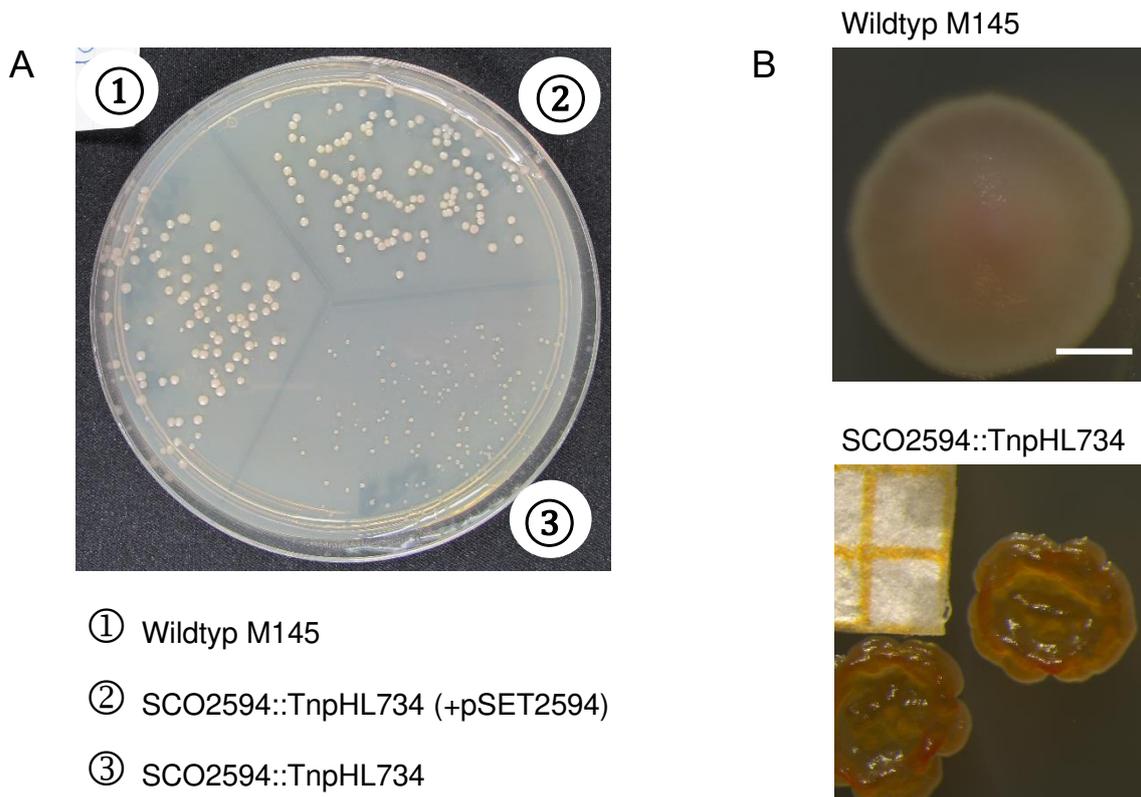
**Abbildung 45: Bestimmung der Größe der Bakterienkolonien in Abhängigkeit zu steigender Salzkonzentration beim Wildtyp M145 und bei den Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::*TnpHL734* (*S. coelicolor*) [n= 5].** Es wurden jeweils  $10^2$  Sporen auf LB-Agar sowie auf LB-Agar mit zusätzlichen 3 % und 6 % NaCl ausgestrichen und anschließend bei 29 °C für 6 Tage wachsen gelassen. Anschließend wurde die Fläche der Bakterienkolonien berechnet [mm<sup>2</sup>]. Auf LB-Agar ohne zusätzliche Salzkonzentration weist die Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 größere Bakterienkolonien auf als der Wildtyp M145. Die beiden Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und SCO2594::*TnpHL734* verfügen auf LB-Agar ohne zusätzliche Salzkonzentration und auf LB-Agar mit zusätzlichen 3 % NaCl über kleinere Bakterienkolonien als der Wildtyp M145. Die Mutante  $\Delta$ SCO2578 kann des Weiteren auf LB-Agar mit zusätzlichen 6 % NaCl überhaupt nicht wachsen (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

### 4.3.2 Morphologische Charakterisierung der Mutante SCO2594::*TnpHL734*

#### 4.3.2.1 Koloniemorphologie auf Agarplatten

Im Vergleich zum Wildtyp M145 und den Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und  $\Delta$ SCO2589-90, waren die Kolonien der Mutante SCO2594::*TnpHL734* deutlich kleiner (Abbildung 45, Abbildung 46). Aus diesem Grund wurden speziell bei der Mutante SCO2594::*TnpHL734* weitere Versuche zur morphologischen Charakterisierung durchgeführt.

Nach 3 Tagen auf LB-Agar war der Größenunterschied der Kolonien zwischen dem Wildtyp M145 und der Mutante SCO2594::TnpHL734 bereits zu erkennen (Abbildung 46 A). Die Kolonien der genetischen Komplementation waren in Hinblick auf die Größe mit denen des Wildtyps M145 vergleichbar, folglich wurde der Defekt vollständig komplementiert.



**Abbildung 46: Vergleich der Größe der Bakterienkolonien zwischen dem Wildtyp M145 und der Mutante SCO2594::TnpHL734 von *S. coelicolor*.** (A) Es wurden jeweils  $10^2$  Sporen auf 1/3 einer LB-Agar ausgestrichen und anschließend bei 29 °C für 3 Tage wachsen gelassen. Die Kolonien der Mutante SCO2594::TnpHL734 sind im Vergleich zu denen des Wildtyps M145 deutlich kleiner. (B) Es wurden jeweils  $10^2$  Sporen auf einer halben quadratischen Petrischale mit LB-Agar ausgestrichen und anschließend bei 29 °C für 6 Tage wachsen gelassen. Die Kolonien unterscheiden sich in ihrer Größe sowie in ihrem Aussehen von denen des Wildtyps M145 (Maßstab= 1 mm).

Nach 6 tägigen Wachstum zeigte sich mit Hilfe eines Stereomikroskops, dass das Aussehen der Kolonien sich von dem des Wildtyps M145 unterscheidet. Die Kolonien des Wildtyps M145 besaßen eine glatte und gleichförmig geformte Oberfläche. Die Kolonien der Mutante SCO2594::TnpHL734 bildeten dagegen einen äußeren leicht erhöhten Kranz (Abbildung 46 B)

#### 4.3.2.2 Wachstumsverhalten auf Ibidi-Dishs

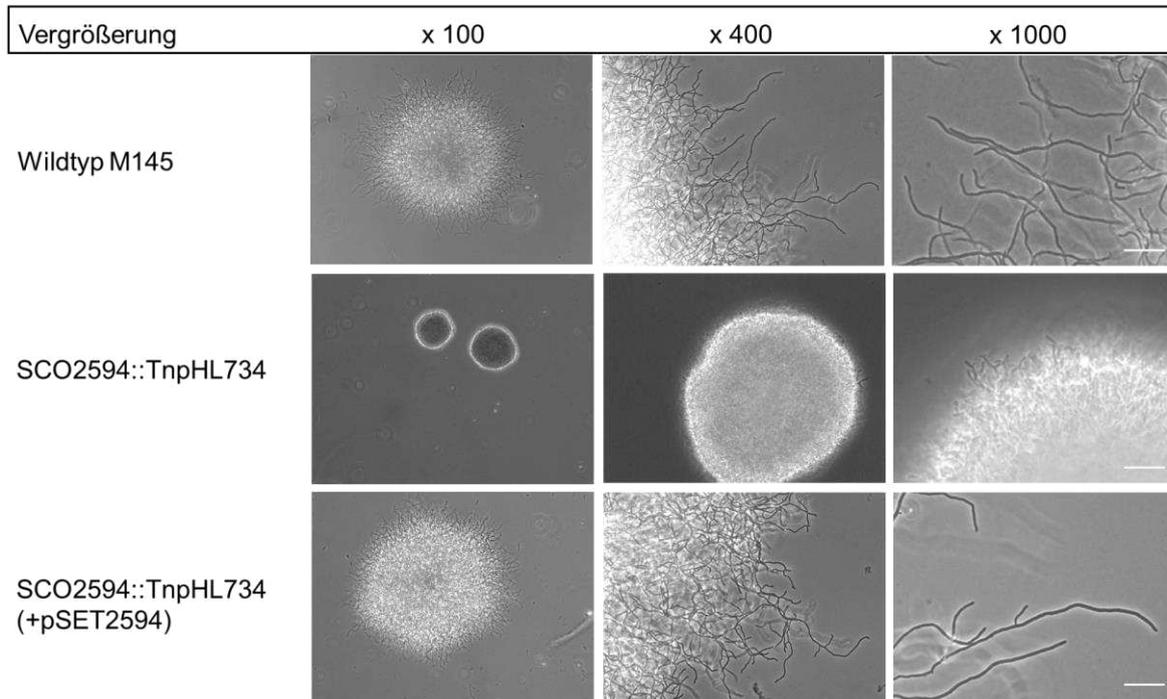
Um den morphologischen Defekt der SCO2594::TnpHL734 Mutante näher zu untersuchen, wurde SCO2594::TnpHL734 auf Ibidi-Dishs (Abbildung 47) kultiviert und unterm Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

Dabei zeigte sich, dass das vegetative Myzel der auf den Ibidi-Dishs gebildeten Mikrokolonien wesentlich dichter und kompakter strukturiert war, verglichen mit dem des Wildtyps M145 sowie der komplementierten Mutante SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) (Abbildung 47 A).

Bei 400-facher Vergrößerung (Objektiv x40) ließen sich erste Details des abnormalen Wachstums erkennen. Der Wildtyp M145 bildete lockere Minikolonien, aus denen lange, kaum verzweigte Hyphen herauswuchsen. Im Gegensatz dazu waren die Kolonien der Mutante SCO2594::TnpHL734 sehr viel kompakter und dichter. Zudem wuchsen keine Hyphen heraus. Die genetische Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) unterschied sich nicht vom Wildtyp M145.

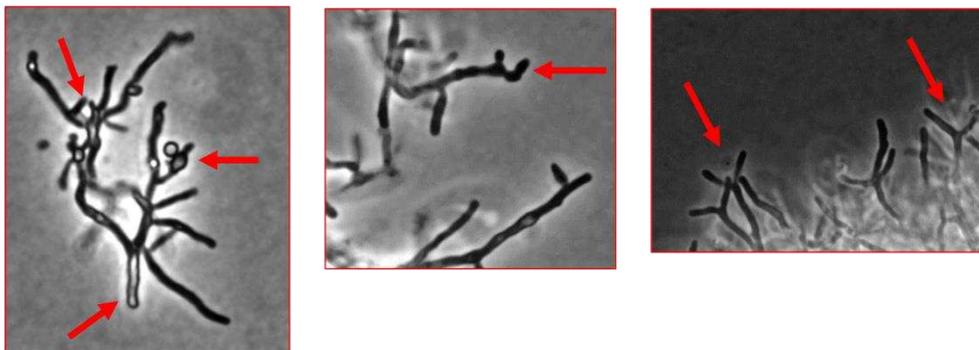
Bei 1000-fachen Vergrößerung (Objektiv x100) war der morphologische Defekt noch deutlicher zu erkennen. Das Längenwachstums der Mutante SCO2594::TnpHL734 war drastisch reduziert und die Hyphen verzweigten häufiger, oft schon direkt an der Hyphenspitze. Darüber hinaus waren die Hyphen verkürzt, teilweise geschwollen und zum Teil auch lysiert (Abbildung 47 B). Dies führte zum kompakten Erscheinungsbild der Pellets.

A



B

SCO2594::TnpHL734



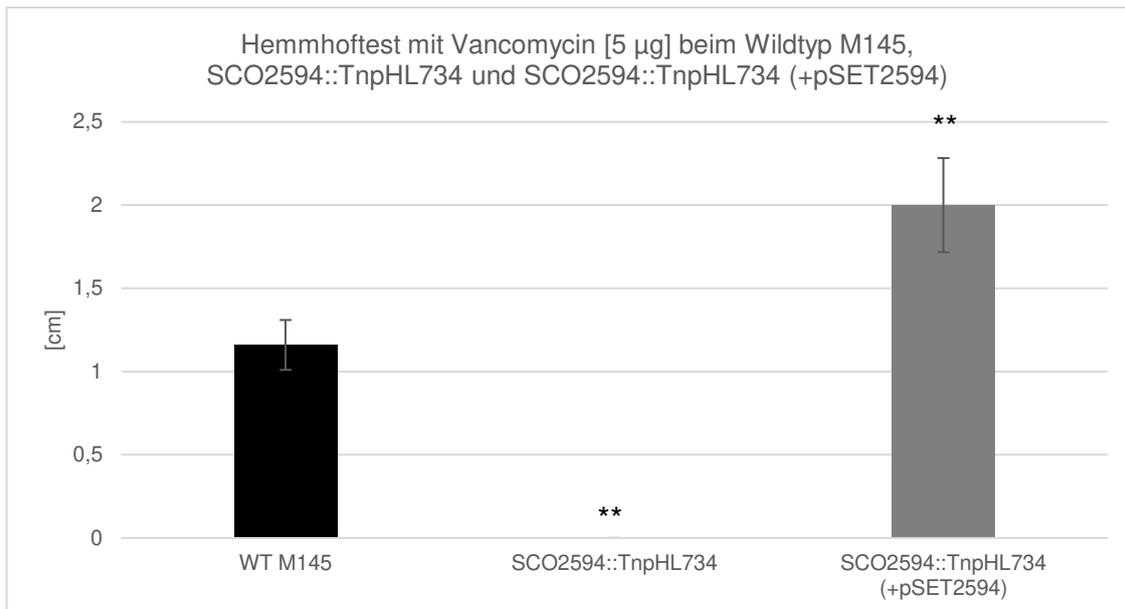
**Abbildung 47: Morphologie des Wildtyps M145, der Mutante SCO2594::TnpHL734 und der genetischen Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von *S. coelicolor* (Maßstab= 5 µm).** Die Bakterienkolonien wuchsen für 40 Stunden bei 29 °C (Ibidi Dish Methode) und wurden anschließend mit Hilfe eines Mikroskop untersucht. **(A)** Die Morphologie der Kolonien wurde unter verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Die Mutante SCO2594::TnpHL734 scheint über ein kompakteres Wachstum zu verfügen. **(B)** Des Weiteren weist die Mutante SCO2594::TnpHL734 bei näherer Betrachtung ein abnormales Wachstum auf bezüglich des Spitzenwachstums.

#### 4.3.2.3 Erhöhte Vancomycinresistenz bei der Mutante SCO2594::TnpHL734

*S. coelicolor* Mutanten, die einen Defekt in der Zellhülle aufweisen, sind häufig empfindlicher gegen das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin. Um dies bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 näher zu betrachten, wurden  $5 \times 10^5$  Sporen des Wildtyps M145, der Mutante SCO2594::TnpHL734 und der genetischen Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und mit einem Antibiotika-Testplättchen mit  $5 \mu\text{g}$  Vancomycin versehen. Nach 3 Tagen wurden die Hemmhöfe ausgemessen. Während der Wildtyp M145 einen Hemmhof ausbildete, erwies sich die Mutante SCO2594::TnpHL734 als resistent gegenüber  $5 \mu\text{g}$  Vancomycin (Abbildung 48). Die komplementierte Mutante SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) war sogar noch empfindlicher als der Wildtyp M145 und wies einen um 72 % größeren Hemmhof auf (Abbildung 49).



**Abbildung 48: Hemmhofstest beim Wildtyp M145, bei SCO2594::TnpHL734 und SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von *S. coelicolor*.** Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Sporen auf 1/3 einer LB-Platte ausgestrichen und anschließend mit einem Vancomycin-Testplättchen ( $5 \mu\text{g}$ ) versehen. Nach 3 Tagen bei  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Hemmhof ermittelt. Nur die Mutante SCO2594::TnpHL734 wies eine Resistenz gegenüber Vancomycin auf.



**Abbildung 49: Größe der Hemmhöfe beim Wildtyp M145, bei SCO2594::TnpHL734 und SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von *S. coelicolor* [n= 5].** Der Hemmhöfetest wurde mit Vancomycin-Testplättchen (5 µg) durchgeführt. Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Sporen auf 1/3 einer LB-Platte ausgestrichen und mit jeweils einem Testplättchen versehen. Nach 3 Tagen bei 29 °C wurde der Hemmhof ausgemessen. Die Mutante SCO2594::TnpHL734 bildete keinen Hemmhof aus und war Vancomycin gegenüber resistent (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.3 Relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren in isolierten Sporen- und Myzelwänden in $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734

Die Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 sowie deren genetische Komplementationen wurden auf ihre relative Verteilung von Peptidoglykan und Zellwandglykopolymeren untersucht.

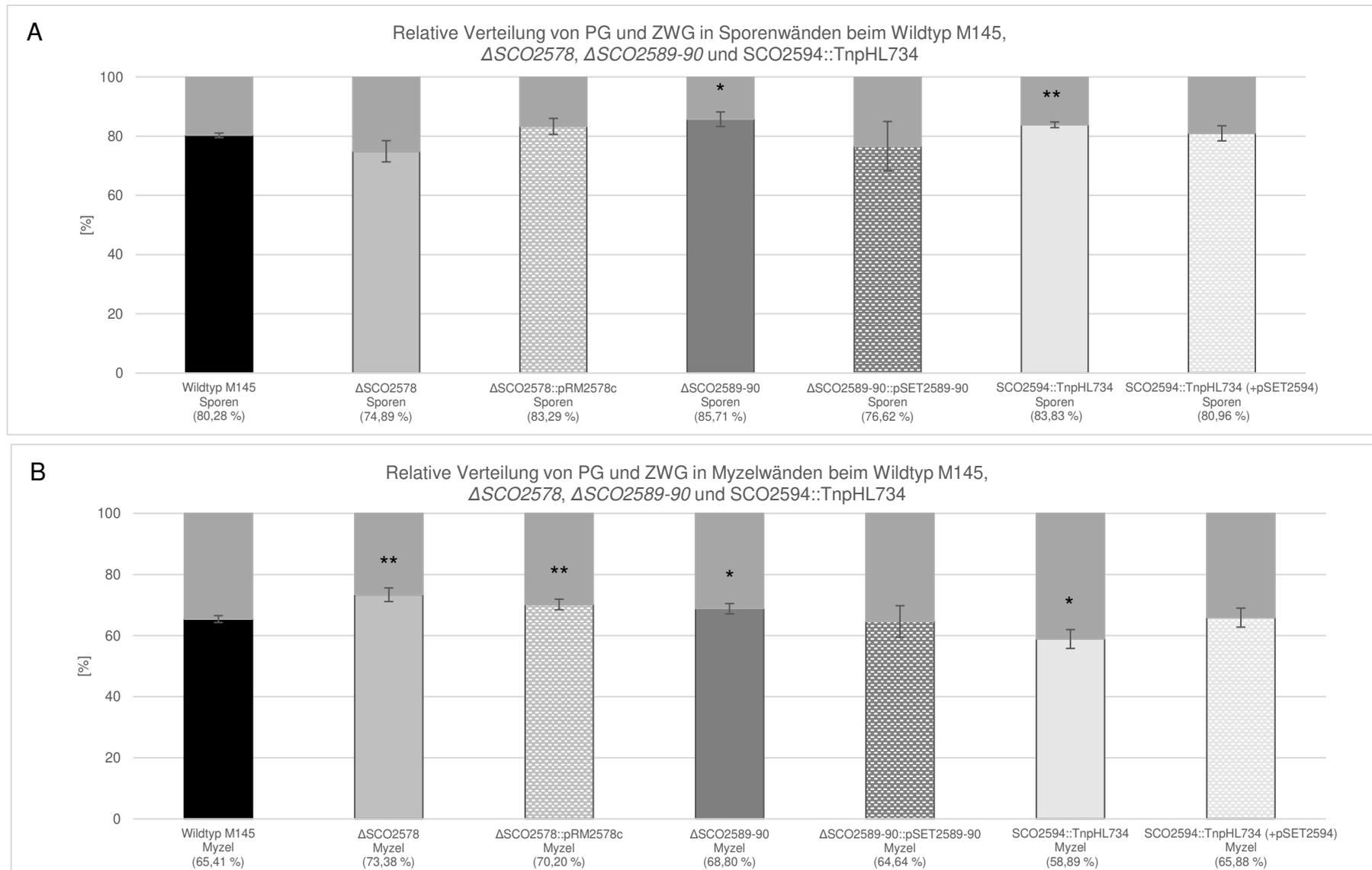
Bei den Sporenwänden des Wildtyps M145 wurden 20 % ZWG abhydrolysiert (Abbildung 50 A). In der Mutante  $\Delta$ SCO2578 waren es dagegen 25 % abgespaltene ZWG. Dies bedeutet, dass  $\Delta$ SCO2578 über einen höheren Anteil an ZWG verfügt. Durch die genetische Komplementation sank dieser Wert wieder auf 17 %.

Die Doppelmutante  $\Delta$ SCO2589-2590 wies hingegen mit 14 % abspaltbarer ZWG einen deutlich niedrigeren Wert als der Wildtyp M145 auf. Die genetische Komplementation erhöhte den Anteil an ZWG wieder auf Wildtyp Niveau.

Auch die Mutante SCO2594::TnpHL734 verfügte in den Sporenwänden über einen geringfügig reduzierten Anteil (16 %) an ZWG. Dieser Anteil wurde durch die genetische Komplementation mit 19 % wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben.

Bei den vegetativen Myzelwänden zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 50 B). Während die Myzelwände des Wildtyps M145 35 % abhydrolysierbare ZWG enthielten, konnten bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 nur 27 % ZWG abgespalten werden. Dies weist auf einen reduzierten ZWG-Gehalt im vegetativen Myzel hin. Durch die genetische Komplementation wurde der ZWG-Gehalt wieder auf 30 % erhöht. Auch die Doppelmutante  $\Delta$ SCO2589-2590 wies mit 31 % einen niedrigeren ZWG-Gehalt auf. Durch die genetische Komplementation wurde der ZWG-Gehalt mit 35 % wieder auf Wildtyp Niveau erhöht. In der Mutante SCO2594::*TnpHL734* war dagegen der Anteil an ZWG sogar höher als im Wildtyp M145. Es wurden in der Mutante 41 % ZWG abhydrolysiert. Die genetische Komplementation senkte den ZWG-Gehalt wieder auf 34 %, was beinahe dem Gehalt im Wildtyp M145 entsprach.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gene *SCO2578*, *SCO2589-90* und *SCO2594* einen zwar nachweisbaren, aber doch relativ geringen Einfluss auf die ZWG-Zusammensetzung in Sporen- und Myzelwänden haben.



**Abbildung 50: Anteil an Peptidoglykan (unterer Anteil) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Anteil) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145, den Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischen Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 5]. 10 mg (= 100 %) isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Anschließend wurde das Pellet (PG) gewogen und prozentual verrechnet. (A) In den Sporenwänden ist der Anteil an ZWG in der Mutante  $\Delta$ SCO2578 höher als es im Wildtyp M145 der Fall ist. In den beiden Mutanten  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 ist der ZWG-Gehalt reduziert. (B) In den Myzelwänden ist der Anteil an ZWG in der Mutante SCO2594::TnpHL734 dagegen erhöht und in der Mutante  $\Delta$ SCO2578 reduziert gegenüber dem Anteil im Wildtyp M145 (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).**

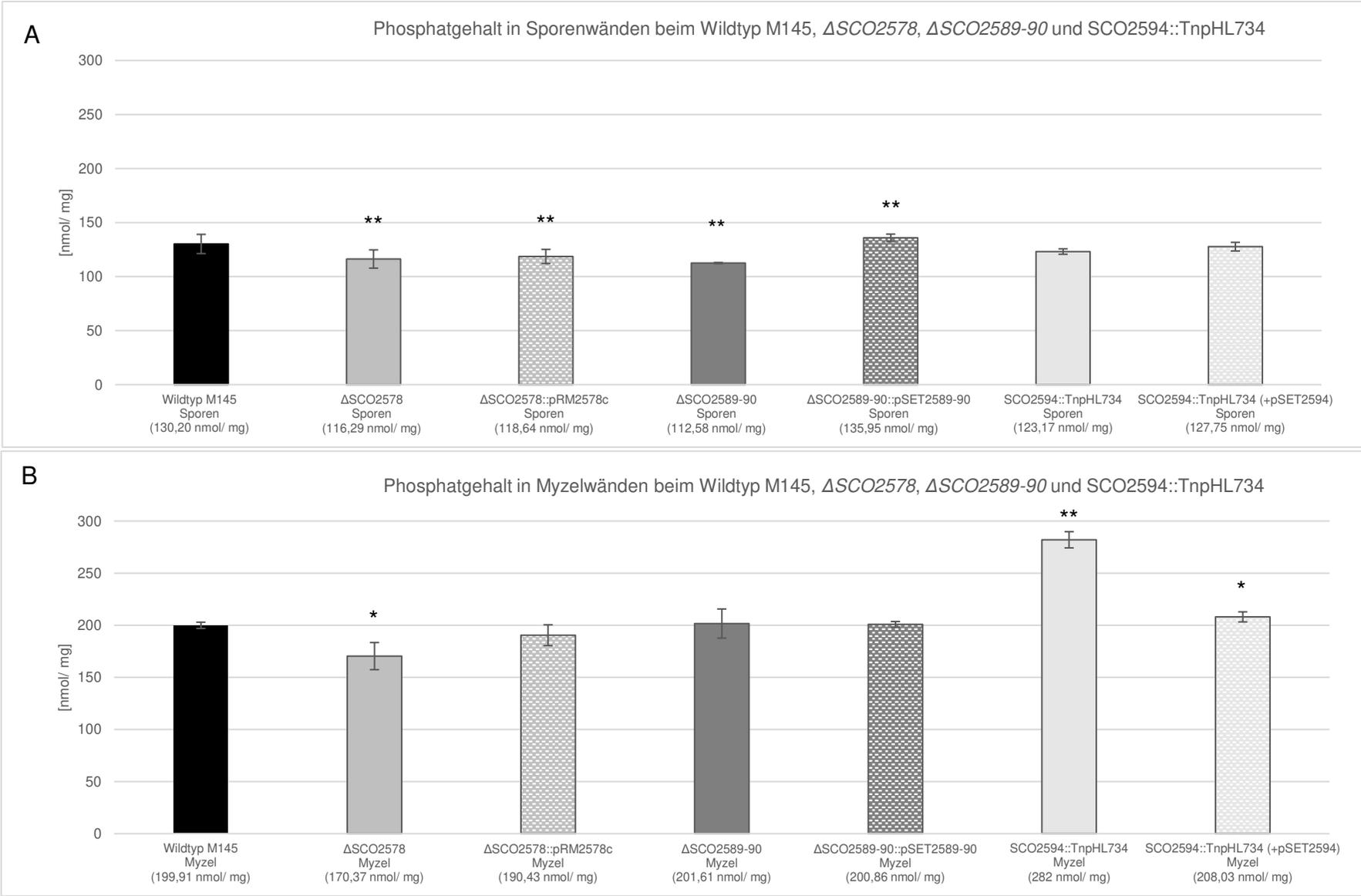
#### 4.3.4 Quantifizierung von Zellwandglykopolymeren bei isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel von $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734

Um zu prüfen, ob die beobachteten Unterschiede im Zellwandglykopolymer-Gehalt der Mutanten auf ein spezifisches Polymer zurückzuführen sind, wurden Zellwandhydrolysate bezüglich des Phosphat-, Hexosamin- und Kdn-Gehalts hin untersucht.

##### 4.3.4.1 Phosphat-Assay

In den Sporenwänden des Wildtyps M145 wurden 130,20 nmol/ mg Phosphat detektiert (Abbildung 51 A). Die beiden Mutanten  $\Delta$ SCO2578 (116,29 nmol/ mg) und  $\Delta$ SCO2589-90 (112,58 nmol/ mg) wiesen einen leicht verringerten Phosphatgehalt auf. Die genetische Komplementation  $\Delta$ SCO2578::pRM2578c (118,64 nmol/ mg) zeigte keinen Effekt. Bei der genetischen Komplementation  $\Delta$ SCO2589-90::pSET2589-90 (135,95 nmol/ mg) war der Phosphatgehalt unverständlicherweise sogar noch höher als beim Wildtyp M145. Die Mutante SCO2594::TnpHL734 verfügte mit 123,17 nmol/ mg über ein ähnliches Niveau wie der Wildtyp M145.

In den Myzelwänden des Wildtyps M145 wurden 199,91 nmol/ mg Phosphat detektiert (Abbildung 51 B). In der Mutante  $\Delta$ SCO2578 war der Gehalt um 15 % (170,37 nmol/ mg) geringer als beim Wildtyp M145 und wurde z.T. komplementiert (190,43 nmol/ mg). Der Phosphatgehalt der  $\Delta$ SCO2589-90 Mutante (201,61 nmol/ mg), bzw. der komplementierten Mutante  $\Delta$ SCO2589-90::pSET2589-90 (200,86 nmol/ mg) entsprach dem des Wildtyps M145. In der Mutante SCO2594::TnpHL734 war der Phosphatgehalt dagegen um 41 % (282 nmol/ mg) höher als beim Wildtyp M145. Die Komplementationen konnten dies nahezu komplementieren (208,03 nmol/ mg).

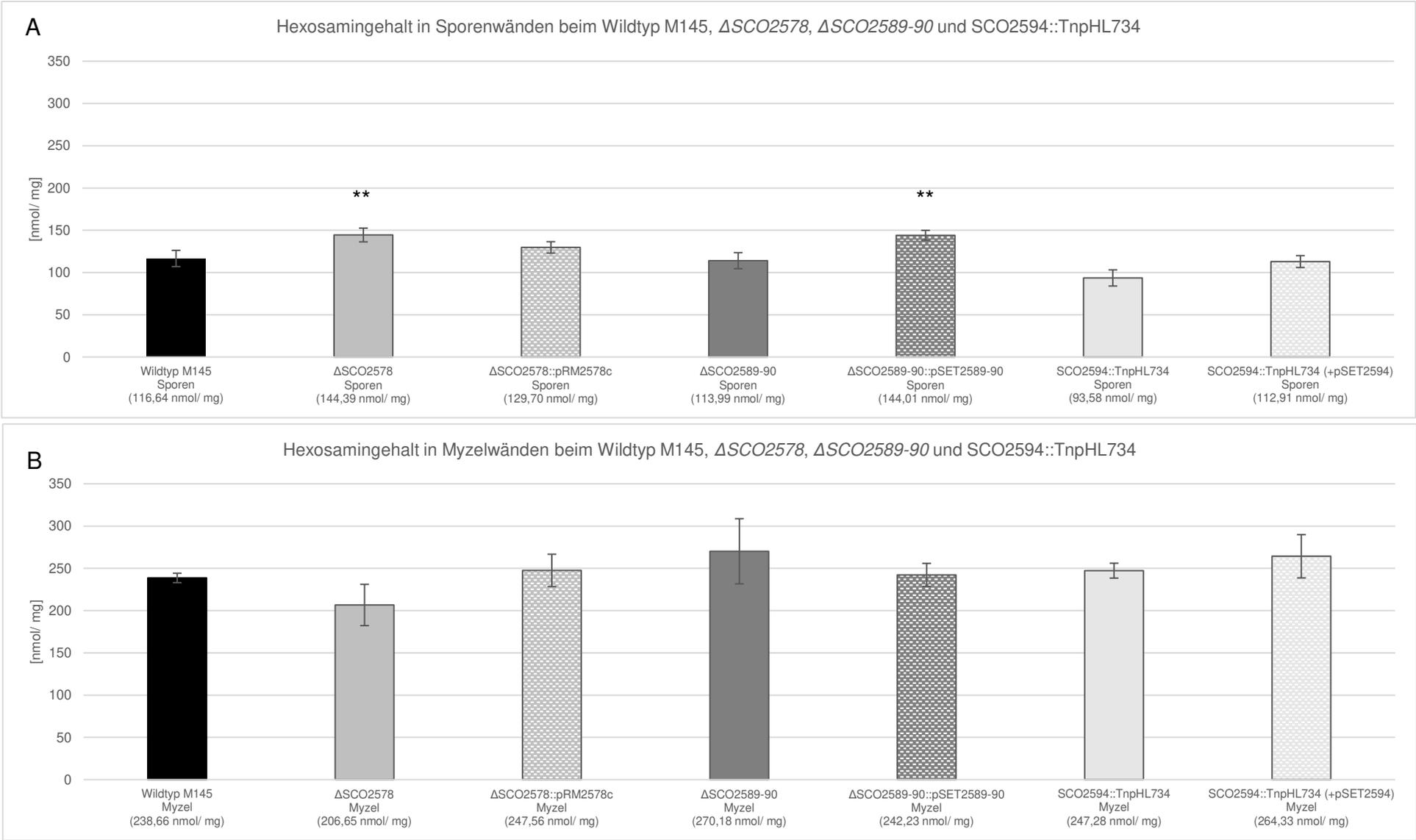


**Abbildung 51: Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Phosphat-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Phosphat wird in nmol/ mg angegeben. **(A)** In den Sporenwänden ist der Anteil an ZWG in den Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und  $\Delta$ SCO2589-90 gegenüber dem Anteil im Wildtyp M145 reduziert. **(B)** In Myzelwänden ist bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 der Anteil an ZWG reduziert. In der Mutante SCO2594::TnpHL734 ist der Anteil dagegen erhöht (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.4.2 Hexosamin-Assay

Während in den Sporenwänden des Wildtyps M145 116,64 nmol/ mg Hexosamin detektiert wurden (Abbildung 52 A), war der Hexosaminanteil in den Sporenwänden der Mutante  $\Delta$ SCO2578 (144,3 nmol/ mg) um 24 % höher. Durch die Komplementation wurde der Hexosamingehalt wieder auf 129,70 nmol/ mg gesenkt, sodass dieser nur 11 % höher war als der des Wildtyps M145. In den Mutanten  $\Delta$ SCO2589-90 (113,99 nmol/ mg) und SCO2594::TnpHL734 (93,58 nmol/ mg) wurde ein mit dem Wildtyp vergleichbarer, bzw. geringerer Hexosamingehalt detektiert. Wohingegen der Hexosamingehalt in der komplementierten Mutante SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) mit 112,91 nmol/ mg nahezu wieder auf Wildtyp Niveau angehoben wurde. Die genetische Komplementation von  $\Delta$ SCO2589-90 (144,01 nmol/mg) wies einen 24 % höheren Hexosamingehalt als der Wildtyp M145 auf.

In den Myzelwänden spiegelte sich, im Vergleich zu den Sporenwänden, ein anderes Bild bezüglich des Hexosamingehalts wieder. Beim Wildtyp M145 wurde 238,66 nmol/ mg Hexosamin detektiert (Abbildung 52 B). Bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 war der Hexosaminanteil (206,65 nmol/ mg) nicht höher, sondern um 13 % niedriger als beim Wildtyp M145. In der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 war der Hexosamingehalt dagegen um 13 % höher als beim Wildtyp M145. Die genetische Komplementation von  $\Delta$ SCO2589-90 konnte den Hexosamingehalt wieder auf das Niveau des Wildtyps M45 senken. Die Mutante SCO2594::TnpHL734 (247,28 nmol/ mg) zeigte einen dem Wildtyp vergleichbaren Hexosamingehalt.

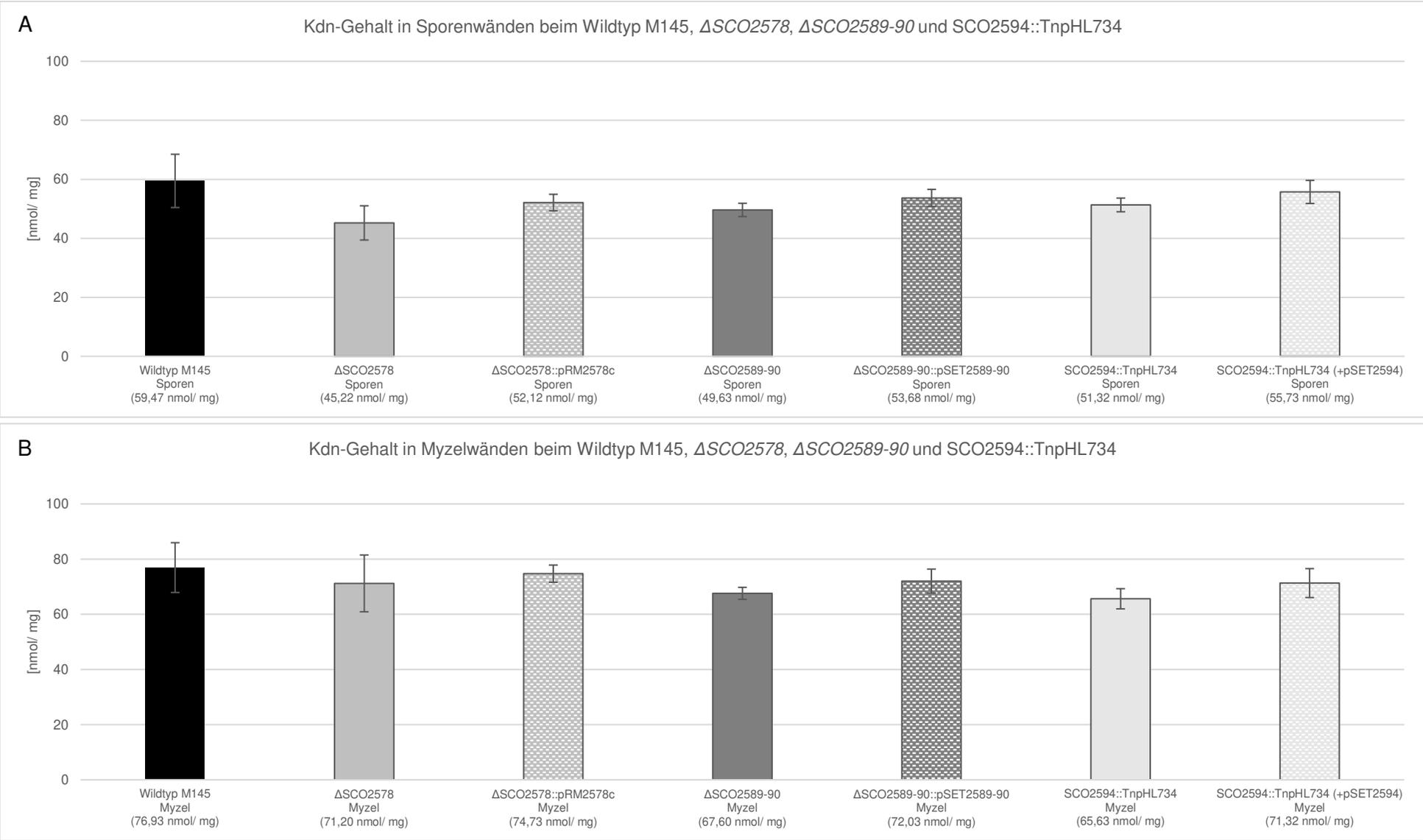


**Abbildung 52: Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 5].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Hexosamin-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Hexosamin wird in nmol/ mg angegeben. **(A)** In den Sporenwänden verfügt die Mutante  $\Delta$ SCO2578 über einen erhöhten und die Mutante SCO2594::TnpHL734 über einen reduzierten Hexosamingehalt gegenüber dem Wildtyp M145. **(B)** In Myzelwänden ist dagegen bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 der Hexosamingehalt reduziert und in der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 erhöht (Mann-Whitney Test, \*\* =  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.4.3 Kdn-Assay

In den Sporenwänden wurde im Wildtyp M145 59,47 nmol/ mg Kdn detektiert (Abbildung 53 A). In den Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 war der Kdn-Gehalt gegenüber dem Gehalt im Wildtyp M145 reduziert. In der Mutante  $\Delta$ SCO2578 (45,22 nmol/ mg) war der Kdn-Anteil um 24 % kleiner. In der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 (49,63 nmol/ mg) waren es 17 % und in der Mutante SCO2594::TnpHL734 (51,32 nmol/ mg) waren es 14 % weniger. Nur die genetische Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) (55,73 nmol/ mg) konnte den Kdn-Gehalt wieder auf ein ähnliches Niveau wie das des Wildtyps M145 heben.

In den Myzelwänden wurde beim Wildtyp M145 76,92 nmol/ mg Kdn detektiert (Abbildung 53 B). Der Kdn-Gehalt bei den Mutanten war nur in  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 geringer als beim Wildtyp M145. In der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 (67,60 nmol/ mg) war der Kdn-Anteil um 12 % und in SCO2594::TnpHL734 (65,63 nmol/ mg) um 15 % reduziert. Die genetischen Komplementationen konnten das Kdn-Niveau wieder auf das des Wildtyps M145 heben.



**Abbildung 53: Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 5].** 5 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 90 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden für den Kdn-Assay verwendet. Die Menge an detektiertem Kdn wird in nmol/ mg angegeben. (A) In Sporen- sowie (B) in Myzelwänden sind im Vergleich zum Kdn-Gehalt im Wildtyp bei allen Mutanten geringe, aber keine signifikanten Reduktionen erkennbar (Mann-Whitney Test, \*, \*\* = p ≤ 0,05).

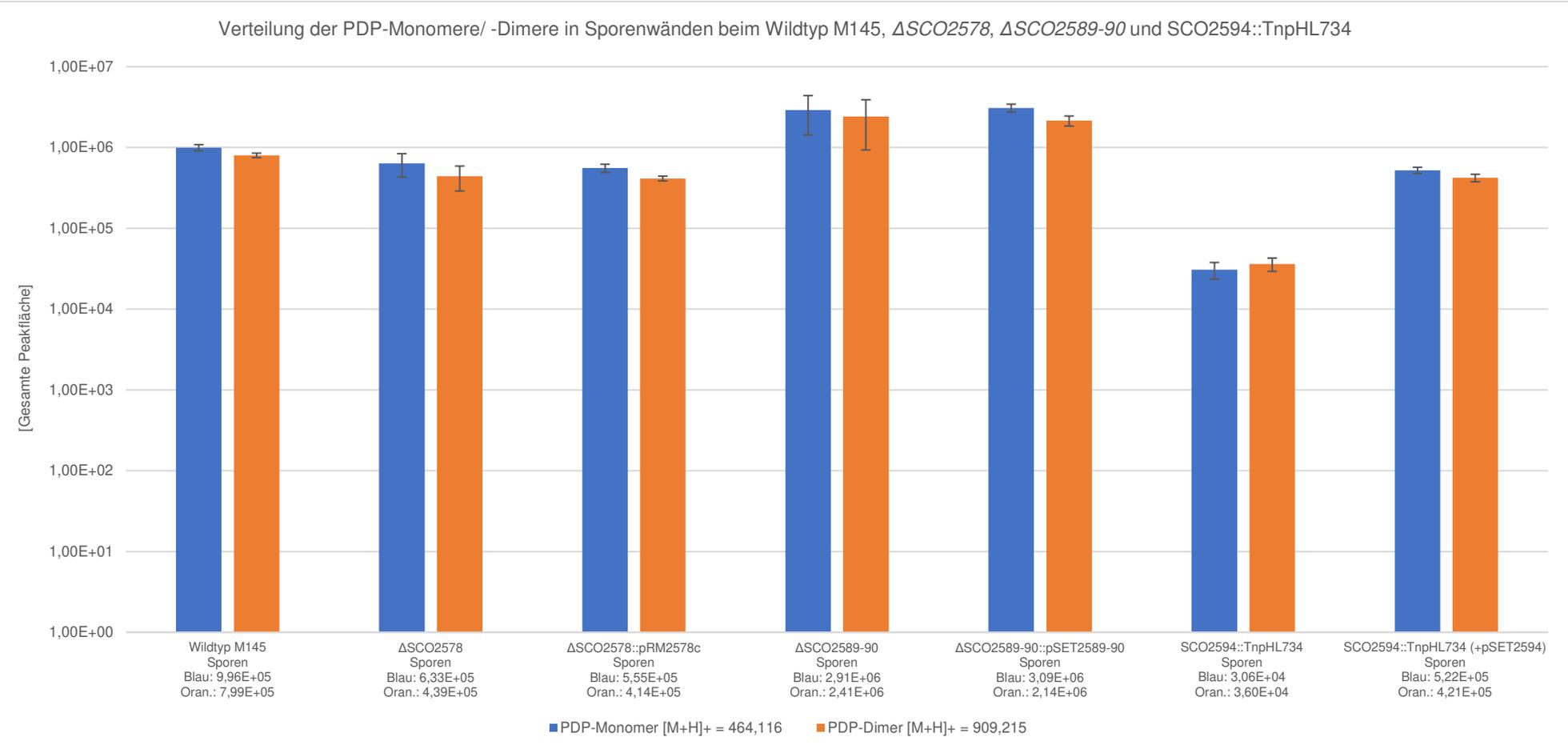
Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass in den Myzel- sowie in den Sporenwände es in Bezug auf den Phosphat-, Hexosamin- und Kdn-Gehalt bei den Mutanten nur relativ geringe Unterschiede zum Wildtyp M145 gab.

#### **4.3.5 HPLC-MS Analysen zur Bestimmung der relativen Verteilung der Zellwandglykopolymere Polydiglycosylphosphat und Kdn- Teichulosonsäure in $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734**

Die Verteilung der beiden Polymere Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosonsäure in den Hydrolysaten der Sporen- und Myzelwände der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 wurde mittels HPLC-MS analysiert (Abbildung 54, Abbildung 56).

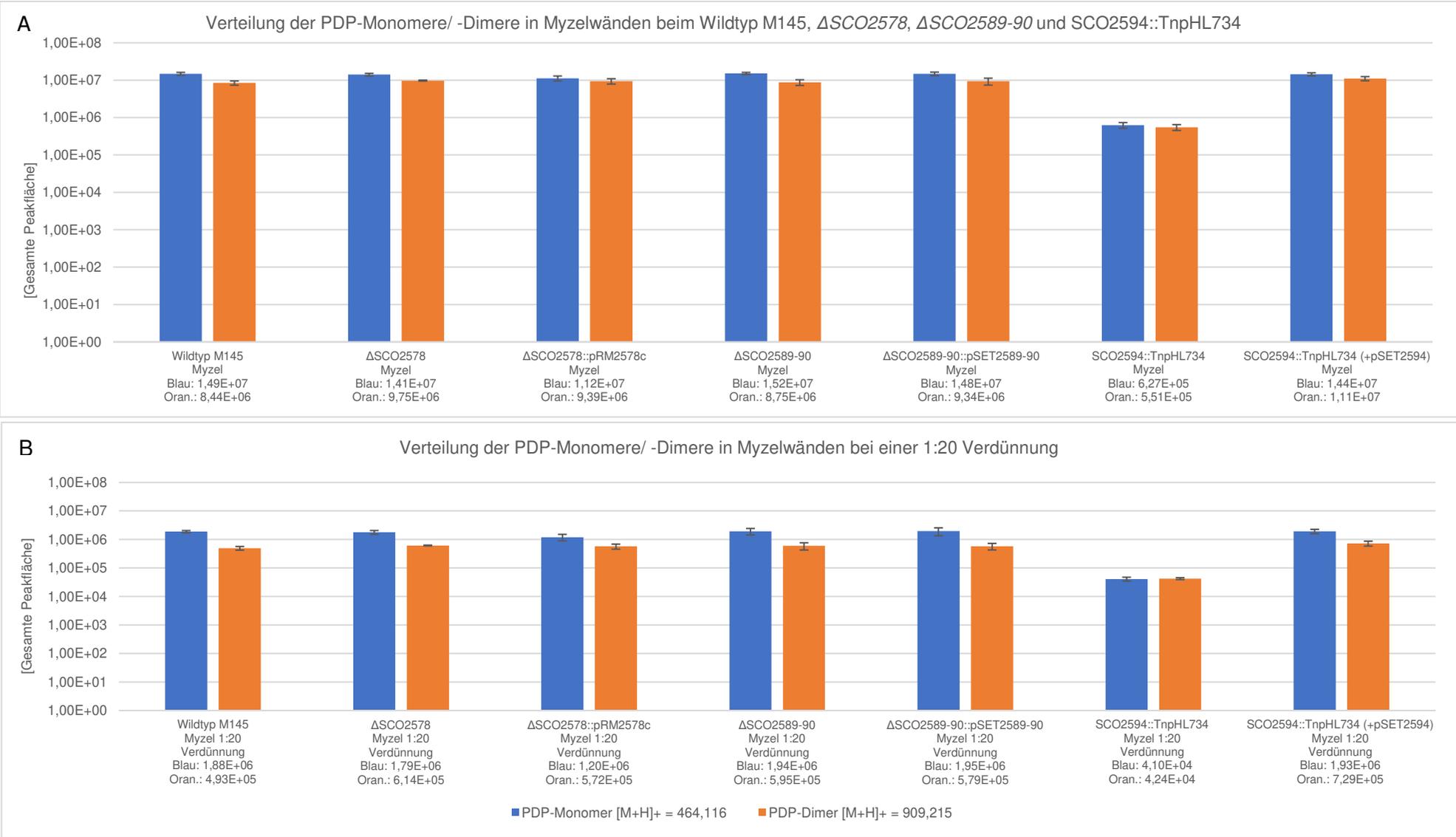
Bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 wurde das PDP-Monomer im Vergleich zum Wildtyp M145 in 1,5 fach geringeren Mengen und das PDP-Dimer 1,8 fach verringert detektiert (Abbildung 54). Die genetische Komplementation mit SCO2578 zeigte keinen Effekt und konnte die Reduktion im PDP-Monomer sowie im -Dimer Gehalt nicht ausgleichen. Dagegen war der Anteil an PDP-Monomer und PDP-Dimer in der Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 erhöht. Gegenüber dem Wildtyp M145 wies  $\Delta$ SCO2589-90 das 2,9 fache mehr an PDP-Monomer und das 3 fache mehr an PDP-Dimer auf. In der dazugehörigen Komplementation sind die Anteile an PDP-Monomer sowie PDP-Dimer ebenfalls erhöht im Vergleich zu den Anteilen des Wildtyps M145. Die hohen Standardabweichungen bei diesen Werten  $\Delta$ SCO2589-90 relativieren allerdings dieses Ergebnis.

Die Inaktivierung von SCO2594 führt zu einer deutlichen Verringerung des PDP-Gehalts in den Zellwänden von Sporen und Myzel (Abbildung 54, Abbildung 55). Die Menge des PDP-Monomers war in den Sporenwänden der Mutante um 97 % und in den Myzelwänden um 96 % niedriger im Vergleich zum Wildtyp M145. Die Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) kann diesen Phänotyp komplementieren. Dies deutet darauf hin, dass das Operon SCO2592-2594 an der PDP-Synthese beteiligt ist. In den vegetativen Zellwänden der beiden Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und  $\Delta$ SCO2589-90 einschließlich derer Komplementationen ließen sich bezüglich des PDP-Monomer und -Dimer Anteils keine nennenswerten Unterschiede zum Wildtyp feststellen (Abbildung 55).



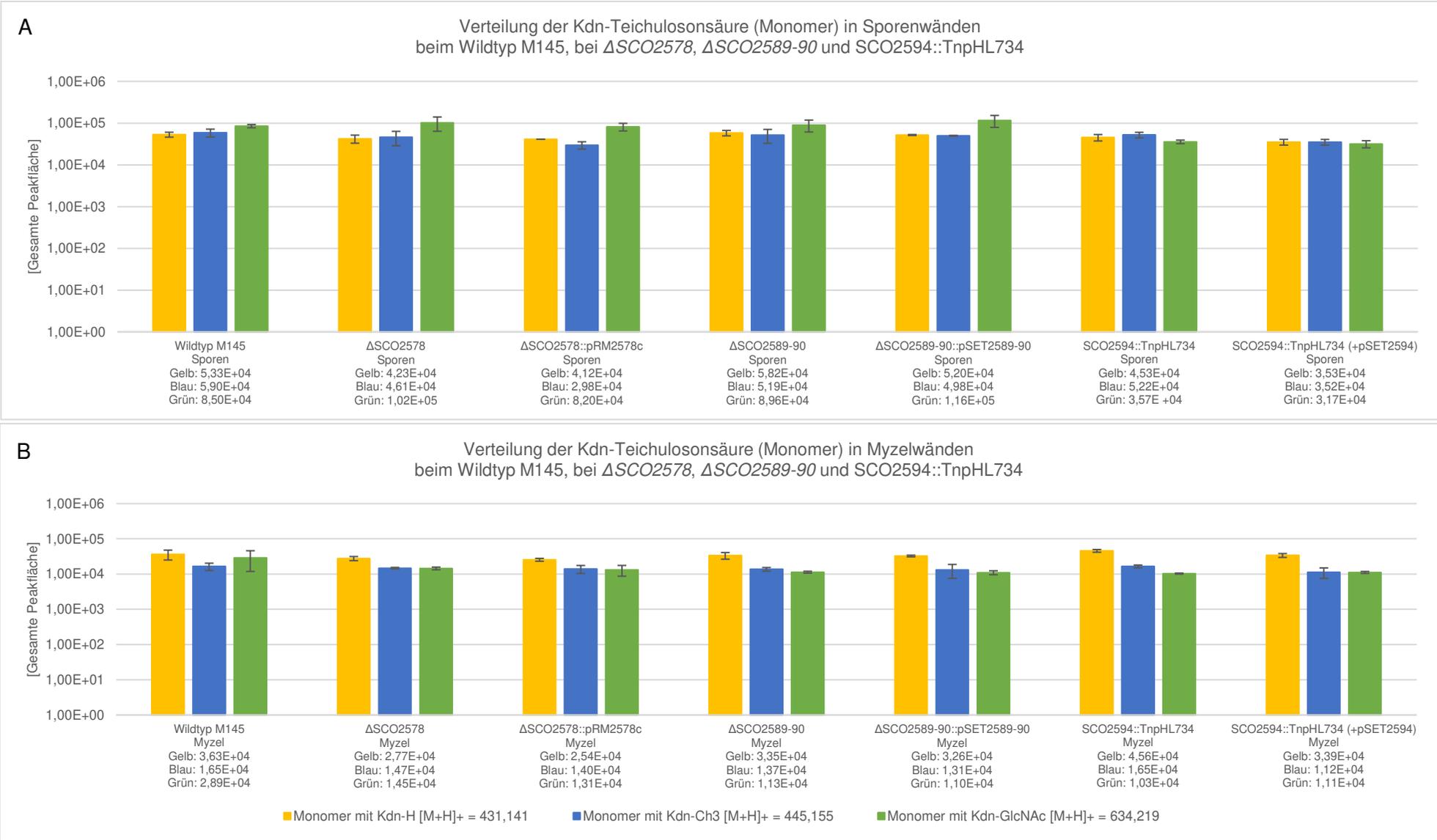
**Abbildung 54: Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Sporenwänden vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporenwände wurden für 5 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Blau: PDP-Monomer ([M+H]<sup>+</sup> = 464,116), Orange: PDP-Dimer ([M+H]<sup>+</sup> = 909,215). Die Mutante  $\Delta$ SCO2589-90 sowie die genetische Komplementation  $\Delta$ SCO2589-90::pSET2589-90 weisen einen höheren Anteil an PDP-Monomeren und -Dimeren auf als der Wildtyp M145. In der Mutante SCO2594::TnpHL734 ist dagegen der Anteil an PDP-Monomeren und -Dimeren reduziert.

4. ERGEBNISSE



**Abbildung 55: Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Myzelwänden vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Myzelwände wurden für 5 min hydrolysiert. Die Myzelproben wurden zusätzlich 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Blau: PDP-Monomer ([M+H]<sup>+</sup> = 464,116), Orange: PDP-Dimer ([M+H]<sup>+</sup> = 909,215). **(A)** **(B)** Bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 ist der Anteil an PDP-Monomeren und -Dimeren im Vergleich zu den Anteilen im Wildtyp M145 reduziert. Die Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und  $\Delta$ SCO2589-90 zeigen keine auffallenden Unterschiede.

Ebenfalls wurde die Menge an Kdn-Teichulosonsäure in den Zellwänden von Sporen (Abbildung 56 A) und vom vegetativen Myzel (Abbildung 56 B) betrachtet. Weder in den Sporen- noch in Myzelwänden unterschieden sich die Mutanten vom Wildtyp M145. Auch das Verhältnis der unterschiedlich substituierten Formen (-GlcNAc, -CH<sub>3</sub>, -H) wich in den Mutanten nicht von dem des Wildtyps M145 ab.

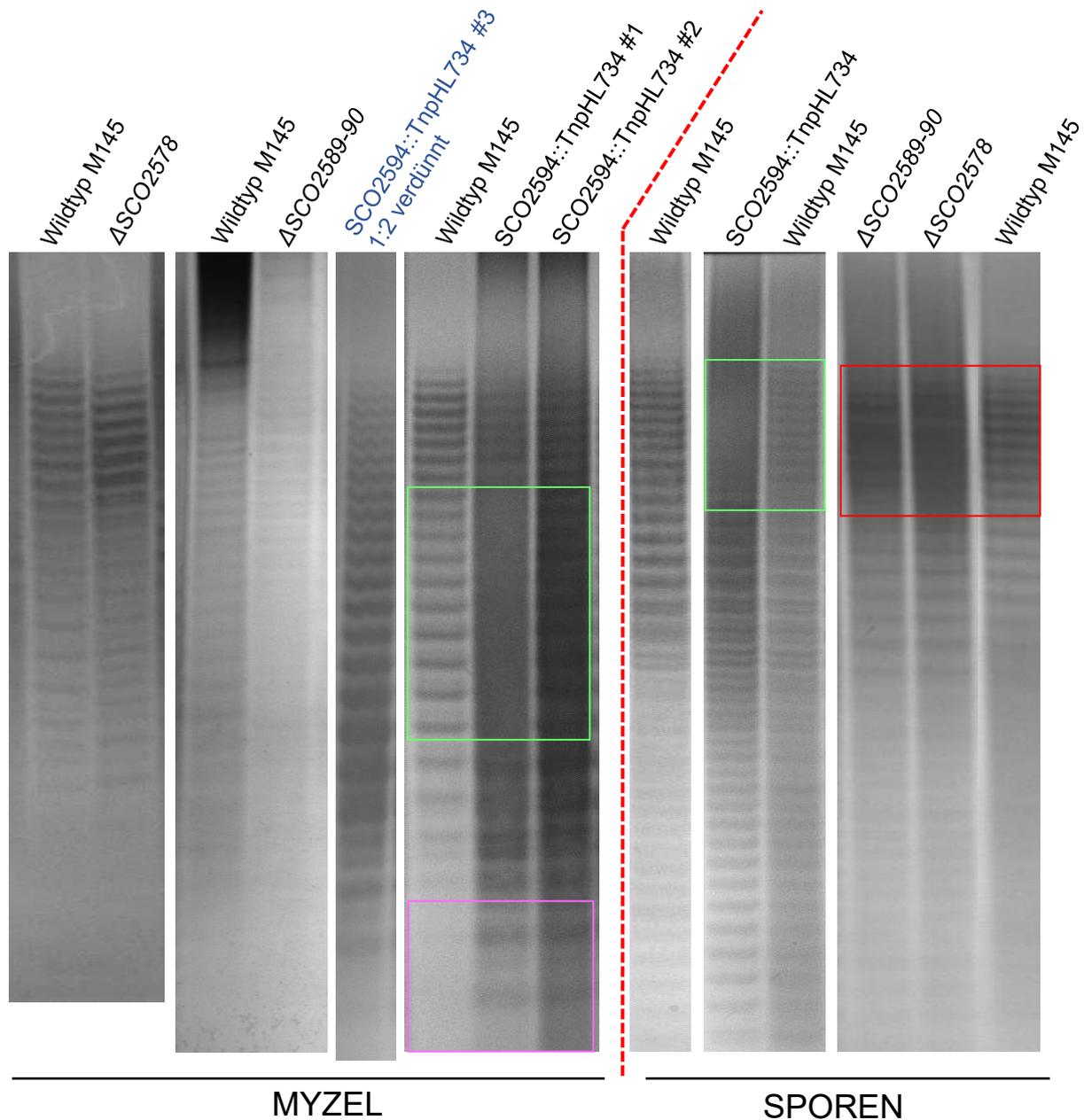


**Abbildung 56: Verteilung des Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen (*S. coelicolor*) [n= 3].** 10 mg isolierte Sporen- und Myzelwände wurden für 5 min hydrolysiert. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden mittels HPLC-MS analysiert. Gelb: Kdn-H ([M+H]<sup>+</sup> = 431,141), Blau: Kdn-Ch<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup> = 445,155), Grün: Kdn-GlcNAc ([M+H]<sup>+</sup> = 634,219). **(A)** In Sporen- sowie **(B)** in Myzelwänden gibt es zwischen dem Wildtyp M145 und den Mutanten keine auffallenden Unterschiede.

#### **4.3.6 Einfluss der Mutationen in den Genen *SCO2578*, *SCO2589-90* und *SCO2594* auf die Kettenlänge von Zellwandglykopolymeren in isolierten Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel**

Um zu untersuchen, ob durch die Mutationen die Kettenlängen der im Polyacrylamid-Gel sichtbaren Polymerfragmente beeinflusst werden, wurden Sporen- sowie Myzelwände vom Wildtyp M145 sowie von den Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 für 15 min hydrolysiert. Anschließend wurden die Kettenfragmente unterschiedlicher Länge mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum besseren Vergleich wurden die Hydrolysate der Mutanten immer direkt neben der Gelspur des Wildtyp-Hydrolysats aufgetragen. Auf dem Polyacrylamid-Gel sind die Hydrolysate der Myzelwände auf der linken Seite und die Hydrolysate der Sporenwände auf der rechten Seite der roten Linie angeordnet (Abbildung 57).

Das Bandenmuster der Zellwandglykopolymeren aus den Myzelwänden des Wildtyps M145 und der beiden Mutanten  $\Delta$ SCO2578 und  $\Delta$ SCO2589-90 ist nahezu identisch. Wohingegen sich bei den ZWG aus den Sporenwänden des Wildtyps M145 im oberen Bereich des Polyacrylamid-Gels klare Banden erkennen lassen, ist dieser Gelbereich bei allen Mutanten verschwommen bzw. durch einen Schmier überlagert (roter Rahmen). Diese unzureichende Auftrennung könnte auf einen zu hohen Anteil an Polymerfragmenten dieses Größenbereichs zurückzuführen sein. Da die Wildtyp M145 Probe in der Nebenspur zufriedenstellend aufgetrennt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Mutanten über längere Polymerketten oder über einen größeren Anteil an diesem Polymer verfügen. Alternativ könnte der Schmier auch durch ein weiteres ZWG, das sich unter den verwendeten milden Hydrolysebedingungen nicht in seine Untereinheiten zerlegen lässt, verursacht werden.



**Abbildung 57: Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten (Bandenmuster).** 10 mg isolierte Zellwände vom Wildtyp M145 und den Mutanten  $\Delta$ SCO2578,  $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 von *S. coelicolor* wurden 15 min hydrolysiert. Es wurden jeweils Myzel- sowie Sporenwände verwendet. Die wasserlöslichen sich im Überstand befindenden ZWG wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach der anschließenden kombinierten Färbung aus Alcianblau und Silbernitrat wurden die ZWG-Fragmente als Bandenmuster im Polyacrylamid-Gel sichtbar.

Dasselbe Phänomen trat verstärkt auch bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 im mittleren Bereich des Polyacrylamid-Gels bei der Probe mit Myzelwänden auf (grüner Rahmen). Für eine Überladung des Gels mit einer höheren Menge an Polymerfragmenten würden auch die stärker ausgeprägten Banden im unteren Bereich des Polyacrylamid-Gels bei der Mutante in der Probe der Sporenwände sowie der Myzelwände sprechen (pinker Rahmen). Um klarere Banden zu erhalten, wurde die Myzelprobe der Mutante SCO2594::TnpHL734 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Das Bandenmuster ähnelt stark dem des Wildtyps M145.

## 5. Diskussion

### 5.1 Gram-positive Bakterien besitzen unterschiedliche Zellwandglykopolymere

Zellwandglykopolymere sind über eine Phosphodiesterbindung an das Peptidoglykan gebunden und sind ein wichtiger Bestandteil der Gram-positiven Zellwand (Ward 1981; Silhavy et al. 2010). Zu den bekanntesten Zellwandglykopolymeren zählen die Teichonsäuren, welche sich in Lipo- sowie in Wandteichonsäuren einteilen lassen (Brown et al. 2013; Armstrong et al. 1958; Armstrong et al. 1959). Ihre Untereinheiten verfügen über Polyole und sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft (Naumova et al. 2001; Armstrong et al. 1958). Eine Vielzahl an Bakterien verfügen über Teichonsäuren. Einige Repräsentanten lassen sich in *Bacilli*, *Streptomyces*, *Staphylokokken* und *Nocardiosis* finden (Naumova et al. 2001).

Teichuronsäuren verfügen über eine Uronsäure als Komponente (Janczura et al. 1961). Sie wurden in diversen Bakteriengattungen (*Kribbella*, *Streptomyces*, *Staphylokokken*) gefunden (Shashkov et al. 2009; Allison et al. 2011; Shashkov et al. 2001; Wu und Park J. T. 1971). Einige Bakterien, so wie *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 oder *Micrococcus luteus*, verfügen über Teichon- sowie über Teichuronsäuren (Lifely et al. 1980; Tul'skaya et al. 2011a; Johnson et al. 1981). In *Bacillus megaterium* M46 wurden dagegen nur Teichuronsäuren gefunden (White 1977). Und wiederum andere Bakterien, wie *Bacillus subtilis* var. *niger*, sind in der Lage unter Phosphatmangel Teichuronsäuren statt phosphathaltige Teichonsäuren zu synthetisieren (Ellwood und Tempest 1967).

Eine weitere Klasse der Zellwandglykopolymere bilden die Teichulosonsäuren, welche eine Kdn- oder Pse-Gruppe tragen können (Knirel 2009). Diese wurden zum Beispiel in Repräsentanten der Gattungen *Streptomyces*, *Kribbella*, *Actinoplanes* und *Athrobacter* gefunden (Tul'skaya et al. 2011a).

2012 beschrieben Shashkov et al. das phosphathaltige Polymer Polydiglycosylphosphat sowie eine Kdn-beinhaltende Teichulosonsäure. Beide Polymere wurde aus den Zellwänden des vegetativen Myzels von *S. coelicolor* isoliert. Das Polydiglycosylphosphat wurde als das „minor“ und die Kdn-Teichulosonsäure als das „major“ Polymer identifiziert (Shashkov et al. 2012). Die Gene, welche für die

Synthese von Polydiglycosylphosphat verantwortlich sind, sind bisher noch unbekannt. Dagegen sind die Gene für die Synthese des Kdn-Zuckers (*sco4870-sco4882*) identifiziert worden (Ostash et al. 2014).

Die bisher in der Gattung *Streptomyces* beschriebenen Zellwandglykopolymere sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Neben den verschiedenen Funktionen, wie z.B. Resistenzvermittlung gegen Hitze und niedrige Osmolarität, Unterstützung der nasalen Kolonisierung von *S. aureus*, usw. (siehe Kapitel 2. Einleitung), können Zellwandglykopolymere auch eine Rolle bei der Zellteilung spielen (Xia et al. 2010) sowie ältere bereits bestehende Zellwände vor den eigenen autolytischen Enzymen schützen (Schlag et al. 2010; Yamamoto et al. 2008). Bei *S. aureus* dienen Zellwandglykopolymere als zeitliche und räumliche Regulatoren des Peptidoglykan-Stoffwechsels. Dabei kontrollieren sie das Level der Vernetzung, indem sie PBP4 am Teilungsseptum positionieren (Atilano et al. 2010).

Tabelle 16: Auflistung unterschiedlicher sich wiederholender Einheiten von Polymeren in *Streptomyces*

	Spezies (Quelle)	Wiederholende Einheit
Teichonsäuren	<i>S. sp.</i> VKM Ac-2534 (Tul'skaya et al. 2007)	-1,5-Poly(Ribitol-Phosphat)
	<i>S. thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus</i> VKM Ac-1857 (Kozlova et al. 2006)	-1,3-Poly(Glycerol-Phosphat)
Teichuronsäuren	<i>S. sp.</i> VKM Ac-2534 (Tul'skaya et al. 2007)	-4)- $\beta$ -D-ManpNAc3NAcyA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1-
	<i>S. sp.</i> VKM Ac-2124 (Shashkov et al. 2002a)	-6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA-(1-
	<i>S. lavendulocolor</i> VKM Ac-215 (Shashkov et al. 2001)	-4)- $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -d-GalpNAc-(1-
	<i>S. setonii-griseus</i> (Tul'skaya et al. 2011a)	-4)- $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1-
Teichulosonsäuren	<i>S. albus</i> ' J1074 (Shashkov et al. 2016)	- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 9)- $\alpha$ -Kdnp-(2[( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 9)- $\alpha$ -Kdnp-(2 $\rightarrow$ ] <sub>n</sub> 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 9)- $\beta$ -Kdnp-(2-OH-
	<i>S. albus subsp. albus</i> VKM Ac-35 (Shashkov et al. 2016)	- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdnp-(2[( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdnp-(2 $\rightarrow$ ] <sub>n</sub> 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\beta$ -Kdnp-(2-OH-
	<i>S. coelicolor</i> M145 (Shashkov et al. 2012)	-6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 9)- $\alpha$ -Kdn-(2-
Polydiglycosylphosphat	<i>S. coelicolor</i> M145 (Shashkov et al. 2012)	-6)- $\alpha$ -Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -GlcpNAc-1(1-P-
Polysaccharid	<i>S. thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus</i> VKM Ac-1857 (Kozlova et al. 2006)	-6)- $\alpha$ -GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalpNAc-(1-

## 5.2 Mögliche Rolle von Zellwandglykopolymeren bei der morphologischen Differenzierung von Streptomycceten

Streptomycceten verfügen über einen einzigartigen komplexen Lebenszyklus und sind in der Lage in festen sowie in flüssigen Medien durch apikales Spitzenwachstum ein filamentartiges Myzel auszubilden (McCormick und Flärdh 2012; Santos-Beneit und Martín 2013). Durch partielle Nährstofflimitation ausgelöst kommt es zur morphologischen Differenzierung (Chater 1998, 2001) und Sporenbildung (Elliot et al. 2003). Dabei verlassen die Hyphen das wässrige Substrat und wachsen in die Luft (Elliot et al. 2003; Flärdh und Buttner 2009). Die Änderung des Milieus erfordert auch eine Umstrukturierung der Zellhülle. Durch Anlagerung von Amyloid ähnlichen Proteinen wird ein Mosaik von 8 bis 10 nm großen „Rodlets“ gebildet, die als hydrophobe Schicht die Lufthyphen und Sporen umgeben und vor Austrocknung schützen (Wildermuth et al. 1971; Smucker und Pfister 1978). Damit verbunden erfolgt auch eine Umstrukturierung des Peptidoglykans und der Zellwandglykopolymeren (Sigle et al. 2016a; van der Aart et al. 2018).

Zellwandglykopolymeren können bei Streptomycceten für verschiedene zelluläre Prozesse notwendig sein. So wurde für die terminale Transferase PdtA (SCO2578) bereits eine Rolle beim apikalen Spitzenwachstum unter osmotischem Stress beschrieben (Sigle et al. 2016b). Eine spezifische Funktion ist somit bei der morphologischen Differenzierung (Koordination der Septierung) oder der Dormanz (Resistenz gegenüber Austrocknung) von Sporen denkbar. Auch wenn Sporen von Streptomycceten gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen über eine gewisse Resistenz verfügen (Chater und Chandra 2006), so besitzen sie allerdings nicht die extrem hohe Resistenz der Endosporen von Bacillen und Clostridien gegenüber Hitze, Austrocknung und UV-Strahlung (Setlow 2007).

### 5.3 Sporen- und vegetative Myzelwände von *S. coelicolor* A3(2) unterscheiden sich in den Zellwandglykopolymeren

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandglykopolymeren in den Zellwänden der beiden wesentlichen Wachstumsstadien von *S. coelicolor*, vegetatives Substratmyzel und reife Sporen, aufzudecken.

Bereits nach der Hydrolyse der Zellwände war ersichtlich, dass Sporenwände über einen geringeren ZWG-Gehalt verfügen als vegetative Myzelwände. Die relative Reduktion des ZWG-Gehalts in Sporenwänden könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die Zellwand durch die Synthese von zusätzlichen Peptidoglykanschichten verdickt wird, ohne dass es Änderungen in der eigentlichen ZWG-Menge gibt (Wildermuth und Hopwood 1970; Sigle et al. 2015). Andererseits kann aber auch durch eine reduzierte Expression der ZWG-Biosynthesegene während der Sporulation der Anteil an ZWG verringert werden (Kleinschnitz et al. 2011b; Sigle 2016).

Des Weiteren ließen sich die ZWG von den Myzelwänden leichter abspalten als von Sporenwänden. So wurden nach 5 min Hydrolyse bereits 71 % (bezogen auf 90 min Hydrolyse) der ZWG von den Myzelwänden abgespalten, während bei Sporenwänden nach 5 min Hydrolyse nur 27 % abgespalten wurden. Möglicherweise sind ZWG an Sporenwände fester gebunden, z.B. aufgrund eines anderen (säureresistenteren) Linkerrests oder anderer Sporenbestandteile, wie z.B. Rodlets, welche mit der hydrolytischen Abspaltung interferieren.

In der Literatur wird die Verknüpfung von Teichon- sowie Teichuronsäuren ans Peptidoglykan als Phosphodiesterbindung zwischen einem *N*-Acetylglycosamin des Polymers und einem Muraminsäure-Rest des Peptidoglykans beschrieben (Araki und Ito 1989; Gassner et al. 1990; Unsleber 2017). Darüber hinaus postulierten Larson und Yother 2017, dass kapsuläre Polysaccharide von *Streptococcus pneumoniae* über eine glykosidische Bindung direkt an das *N*-Acetylglycosamin des Peptidoglykans geknüpft sind (Larson und Yother 2017). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Verknüpfungen zwischen Zellwandglykopolymeren und dem Peptidoglykan vorherrschen.

Um eine genauere Aussage über die Zusammensetzung der ZWG zu machen, wurden verschiedene photometrische Assays (Sigle et al. 2016a) durchgeführt, die spezifische Bestandteile der verschiedenen ZWG von *S. coelicolor* quantifizieren konnten. Diese Analysemethoden wurden in dieser Arbeit durch die zusätzliche Anwendung von HPLC-MS ergänzt. Dadurch war es zum ersten Mal möglich die Bausteine der von Shashkov et al. (2012) beschriebenen Polymere, Polydiglycosylphosphat und Kdn-Teichulosonsäure, direkt nachzuweisen (Shashkov et al. 2012). Anhand der gewonnenen Ergebnisse lassen sich drei Kernaussagen bezüglich der ZWG-Zusammensetzung von Myzel- und Sporenwänden treffen:

- (i) Myzelwände verfügen über mehr Polydiglycosylphosphat als Sporenwände.
- (ii) Sporenwände verfügen über einen höheren Anteil an Kdn-Teichulosonsäure als Myzelwände.
- (iii) Die elektrophoretisch aufgetrennten ZWG-Fragmente der Sporenwände unterscheiden sich deutlich von denen aus Myzelwänden.

(i) In den Myzelwänden war der Phosphatgehalt um 54 % höher. Ähnliche Ergebnisse stellten auch Sigle et al. (2016) fest. Hier betrug der Unterschied 49 % (Sigle et al. 2016a). Zudem wiesen Myzelwände nach 5 min das 13,8 fache und nach 90 min das 11,7 fache an PDP-Monomeren auf als Sporenwände. Somit verfügen Myzelwände über mehr PDP. Des Weiteren wird in Myzelwänden mehr Hexosamin detektiert. Vergleichbar ist dieses Ergebnis mit den Daten von Sigle et al. 2016.

(ii) Die zweite Aussage stützt sich darauf, dass in den Sporenwänden ein höherer Anteil an Kdn-Monomeren mittels HPLC-MS detektiert wurde als in Myzelwänden. Vor allem die Menge mit GlcNAc substituierten Kdn war erhöht. Dies steht allerdings im Widerspruch zu dem photometrischen Kdn-Assay, mit dem in Myzelwänden ca. 1,3 mal mehr Kdn gefunden wurde als in Sporenwänden (Abbildung 28) (Sigle et al. 2016a). Der Kdn-Assay basiert auf der Generierung eines fluoreszierenden Moleküls, welches ein freies Formaldehyd-Molekül als Basis benötigt. Dieses wird am C-9 Atom des Kdn-Moleküls freigesetzt (Matsuno und Suzuki 2008). Bei der Kdn-Teichulosonsäure muss jedoch zunächst die Bindung zum Galaktose-Molekül mit Hilfe einer Hydrolyse gelöst werden. Anhand der durchgeführten Zeitreihe (Abbildung 27) ist erkennbar, dass mit längerer Hydrolysedauer die detektierte Menge an Kdn in Sporen- und Myzelwänden steigt. Ein gewisser Verlustanteil kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da Sialinsäure, wozu auch Kdn zählt, labil gegenüber Säure

ist (Matsuno und Suzuki 2008). Diese Diskrepanz könnte jedoch daher rühren, dass Myzelwände eventuell über ein weiteres noch unbekanntes ZWG mit Sialinsäureresten verfügen. Ein derartiges ZWG wurde allerdings von Shashkov et al. nicht gefunden (Shashkov et al. 2012). Für ihre NMR-Analysen verwendeten Shashkov et al. (2012) zunächst TCA, um die ZWG von der Zellwand abzuspalten. Anschließend wurden die ZWG mit 2 M HCL bei 100 °C für 3 Stunden hydrolysiert (Shashkov et al. 2012). Dagegen wurde in dieser Arbeit eine mildere saure Hydrolyse (50 mM HCL, 90 °C, 90 min) angewendet, die aber vergleichbare Ergebnisse wie die klassische Hydrolyse mit Flusssäure ergibt (Sigle et al. 2016a).

(iii) Um eine Aussage darüber zu treffen, ob in Myzel- und Sporenwänden Polymere unterschiedlicher Kettenlänge vorliegen, wurde eine hochauflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei zeigten sich unterschiedliche Bandenmuster, die möglicherweise durch die Überlagerung verschiedener Polymere zustande kamen. Anschließend wurden die Polymerfragmente aus verschiedenen Gelbereichen eluiert und mittels Phosphat-Assay und HPLC-MS analysiert. Sigle et. al (2016) postulierten, dass es sich bei dem Bandenmustern der Zellwandhydrolysate aus Sporen- und Myzelwänden um PDP unterschiedlicher Kettenlänge handelt (Sigle et al. 2016a). Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen nur begrenzt mit dieser These überein.

Die bessere Auftrennung der Proben in den 40 cm Gelen, zeigte vor allem im unteren Gelbereich ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster (Abbildung 33). Die Banden der Myzelproben verfügten über größere Abstände als die Banden der Sporenproben. Dies bedeutet, dass es sich um unterschiedliche Polymere handeln muss. Weiterhin scheinen mindestens zwei unterschiedliche Polymere in der Myzel- und Sporenwand vorzuliegen, von denen sich die Banden überlappten. Eine weitere Hypothese wäre, dass die unterschiedlichen Abstände dadurch hervorgerufen werden, dass die jeweiligen Fragmente unterschiedlich substituiert sind (z.B. + GlcNAc), sodass das Laufverhalten nicht gleichmäßig ist.

Im gesamten Polyacrylamid-Gel wurden überall nur geringe Spuren von Phosphat in der Sporen- sowie in der Myzelprobe detektiert. Lediglich die aus dem unteren Gelbereich der Myzelprobe eluierten Fragmente wiesen einen signifikant erhöhten Phosphatgehalt auf. Dieser korrelierte mit dem HPLC-MS Nachweis von PDP (Abbildung 36). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den unteren Banden in der Myzelprobe um PDP handelt.

PDP wurde in den Sporenproben nur in Spuren gefunden, was auf eine geringe Verunreinigung der Sporenproben mit Myzelresten zurückzuführen sein könnte. Da die Polymerfragmente aus dem unteren Gelbereich der Sporenproben nur einen äußerst geringen Phosphatgehalt zeigten, kann es sich bei dem Polymer nur um ein phosphatfreies Polymer handeln. Da glykosidische Bindungen unter den verwendeten Hydrolysebedingungen nicht angegriffen werden, die Bindungen in Teichuronsäuren aber säurelabil sind (Hildebrandt und Anderson 1990; Wolters et al. 1990), ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem ZWG aus Sporenwänden um eine noch unbekannte Teichuronsäure handelt. Im HPLC-MS-Chromatogramm des vierten Gel-Fragments der Sporenprobe war jedoch kein dominanter Peak einer anderen Masse vorhanden (Abbildung 37). Möglicherweise lässt sich das Polymer schlecht ionisieren. In den oberen Gel-Fragmenten der Sporenproben wurde zwar Phosphat gefunden, aber kein PDP detektiert. Folglich handelt es sich dabei um ein anderes phosphathaltiges Polymer. Es besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit, dass sich lange Polymerfragmente schlechter aus dem Gel eluieren und somit mittels HPLC-MS detektieren lassen. Im mittleren und oberen Bereich des Gels war das Bandenmuster der Sporen- sowie Myzelprobe weitgehend identisch. Mittels HPLC-MS wurden auch dieselben Massen in Sporen- und Myzelproben detektiert. Diesen Massen konnten jedoch keinen bekannten Molekülen zugeordnet werden, so dass die Identität dieser Moleküle noch unklar ist.

#### **5.4 Versuch der Identifizierung von Biosynthesegenen der unterschiedlichen Zellwandglykopolymeren**

Eine Inaktivierung von Zellwandsynthesegenen bei Streptomyceten beeinflusst oft die Integrität der Zellhülle, wodurch Zellen auf diverse Stressfaktoren wie Austrocknung, Hitze oder Salzstress empfindlicher reagieren. Dies wurde bei den Genen des *Streptomyces* Spore Wall Synthesizing Complex (SSSC), der neben klassischen Zellteilungsgenen (*mreBCD*) und Genen der Peptidoglykansynthese (*pbp2*, *ftsI*, *SCO3580*, *SCO3901*) auch mutmaßliche ZWG-Gene (*SCO2578*, *SCO2584*) beinhaltet (Mazza et al. 2006; Kleinschnitz et al. 2011a).

Die Bedeutung der ZWG für die Biologie der Aktinomyceten ist bisher noch ungeklärt. Da die Schlüsselgene für die ZWG-Synthese in *S. coelicolor* vermutlich redundant vorliegen (sechs TagF homologe CDP-Glycerol:Glycerophosphat

Glycerophosphotransferasen, elf TagTUV-homologe terminale Transferasen der LytR-CpsA-Psr (LCP) Familie), sind die Gene zur Synthese der unterschiedlichen Polymere bisher noch nicht identifiziert.

### **5.5 SCO2997 hat keinen Einfluss auf die PDP- oder Kdn-Teichulosonsäure Synthese**

Das Gen *SCO2997* wurde das erste Mal 2011 von Kleinschnitz et al. beschrieben. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und der Nähe zu *tagG/tagH*-ähnlichen ABC Transportergenen (*SCO2995/SCO2996*) wurde *SCO2997* als *tagF*-Homolog bezeichnet (Kleinschnitz et al. 2011b). Des Weiteren befindet sich *SCO2997* in einem der vier Gencluster, deren Gene eine putative Rolle bei der Synthese von ZWG spielen (Sigle et al. 2015). Im Bacterial two-Hybrid System konnte jedoch keine Interaktion zwischen *SCO2997* und den SSSC-Proteinen, wie MreBCD, PBPs, FtsZ oder RodZ festgestellt werden (Kleinschnitz 2012).

Die Mutante  $\Delta$ *SCO2997* verfügte jedoch über einen ähnlichen Phänotyp wie die *mre*-Mutanten (Kleinschnitz et al. 2011a). Das vegetative Myzel schien von der Insertion in das Gen *SCO2997* nicht beeinflusst zu sein. Die Sporen wiesen dagegen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Vancomycin und Lysozym auf. Des Weiteren waren die Sporen kürzer als die des Wildtyps M145 und keimten früher aus (Kleinschnitz et al. 2011b; Kleinschnitz 2012).

In den Myzelwänden war der ZWG-, Phosphat- sowie Hexosamingehalt leicht erhöht. Der Anteil an PDP und Kdn-Teichulosonsäure lag hingegen auf dem Niveau des Wildtyps M145. In den Sporenwänden dagegen war der Anteil an Phosphat, Hexosamin und Kdn leicht reduziert. Das PDP-Monomer sowie die Monomere der Kdn-Teichulosonsäure waren dagegen erhöht. Allerdings konnten die Veränderungen in den Sporenwänden durch die genetische Komplementation nicht komplementiert werden, was die Aussagekraft dieser Befunde einschränkt.

Eine Untersuchung der Polymer-Kettenlänge in der  $\Delta$ *SCO2997* Mutante wurde durch das Auftreten eines Schmiere im oberen Bereich des Polyacrylamid-Gels, der die Polymerbanden überlagerte, erschwert. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein höherer Anteil an längeren Polymerfragmenten vorliegt und die Auftrennung beeinträchtigt ist. Auch eine Verunreinigung mit einer anderen Substanz oder einem anderen Polymer ist ebenfalls nicht auszuschließen. Des Weiteren wich im mittleren

Gelbereich das Bandenmuster der Mutante  $\Delta$ SCO2997 von dem des Wildtyps M145 ab. Die Banden lagen bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 enger beieinander als beim Wildtyp M145. Somit handelt es sich hierbei vermutlich um ein anderes überlappendes Polymer oder um eine andere Konfiguration des vorhandenen Polymers.

Es kann festgehalten werden, dass die TagF homologe CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase SCO2997 eine Rolle bei der Synthese von Zellwandglykopolymeren spielen könnte, jedoch keinen Einfluss auf die PDP- sowie Kdn-Teichulosonsäure Synthese hat. Es muss dabei allerdings berücksichtigt werden, dass das Komplementationskonstrukt nicht in der Lage war, die Mutation vollständig zu komplementieren. Daher ist es nicht sicher, ob sich der beobachtete Phänotyp der Mutante tatsächlich auf die Inaktivierung von *SCO2997* zurückführen lässt, oder ob eine zusätzliche Mutation an einer anderen Stelle vorliegt. Interessanterweise stellte Sigle (2016) eine Beeinträchtigung der Myzelhülle bei der Mutante  $\Delta$ SCO2997 fest (Sigle 2016). Mit Hilfe von Cryo-SEM (Kryoelektronenmikroskopie) und ATM (Rasterkraftmikroskopie) konnte die Rodletschicht auf den Sporen des Wildtyp M145 und der Mutante sichtbar gemacht werden. Des Weiteren wurde um die Mutante herum eine dichte Matrix, welche der Struktur der Rodletschicht glich, festgestellt. Anhand TEM Bilder (Transmissionselektronenmikroskopie) wurde zudem erkennbar, dass die Mutante über eine teils abgelöste Zellhülle verfügte. Sigle (2016) schlussfolgerte, dass eine ordnungsgemäße Ausbildung der Rodletschicht in dieser Mutante nicht möglich ist (Sigle 2016). Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass SCO2997 nicht für die Synthese von PDP verantwortlich ist, so kann dennoch eine putative Rolle von SCO2997 bei der Zellwandsynthese und die Synthese eines anderen ZWG nicht ausgeschlossen werden. Eine ähnliche Beeinträchtigung der Zellwand stellten 2019 auch Ultee et al. mittels Kryoelektronenmikroskopie fest, als sie mittels dCas9 eine knockdown Mutante des mutmaßlich essenziellen *tagO* Gens von *S. coelicolor* herstellten. TagO vermittelt den ersten Schritt der ZWG-Synthese. Die reduzierte *tagO* Expression hatte eine ungleichmäßige Zellwand zur Folge. Diese äußerte sich in Form von zwei teilweise voneinander gelösten Schichten. Daraus schlussfolgerten Ultee et al., dass Teichonsäuren (oder andere ZWG) eine Rolle bei der strukturellen Integrität von Exopolysacchariden spielen (Ultee et al. 2019).

Abschließend kann jedoch festgehalten werden, dass *SCO2997* nicht essenziell für die Lebensfähigkeit von *S. coelicolor* ist. Möglicherweise wird die Funktion durch eine andere der sechs Glycosyl/Glycerophosphotransferasen ersetzt (Kleinschnitz et al. 2011b). In *B. subtilis* ist TagF dagegen essenziell für die Viabilität (Bhavsar et al. 2004), kann jedoch bei gleichzeitiger Deletion von *tagO* inaktiviert werden (D'Elia et al. 2006).

### **5.6 SCO2578 (PdtA) spielt eine Rolle beim Hyphenwachstum, aber hat keinen Einfluss auf die PDP- und Kdn-Teichulosonsäure Synthese**

*SCO2578* wurde auf der Suche nach möglichen Komponenten des SSSC beim Screening einer genomischen *S. coelicolor* Bank (Fusionsproteine mit der T25 Domäne der *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase) entdeckt (Karimova et al. 1998). *SCO2578* zeigte Interaktionen mit den SSSC-Proteinen MreC, MreD, Sfr (RodA), PBP2 (Penicillin-bindendes Protein), Rod Z und FtsI (Kleinschnitz et al. 2011a). Dies deutet auf eine Rolle von *SCO2578* bei der Synthese der Sporenwand hin. Sequenzähnlichkeiten zu dem TagV Protein von *B. subtilis* annotieren *SCO2578* als mögliches Mitglied der LCP-Protein Familie, die terminale Zellwandglykopolymer Transferasen umfassen (Kleinschnitz et al. 2011b; Sigle et al. 2016b). Während *B. subtilis* drei LCP Transferasen aufweist (Kawai et al. 2011), kodiert *S. coelicolor* M145 über 11 Homologe (Sigle et al. 2016b). *SCO2578* liegt in einem Gencluster (Abbildung 13, Cluster I), das Schlüsselenzyme der ZWG-Synthese kodiert. Dies legt nahe, dass die von Cluster I synthetisierten ZWG über eine spezifische Funktion bei der Differenzierung von *S. coelicolor* verfügen (Sigle et al. 2015).

Mit Hilfe einer Deletionsmutante wurde das Gen *SCO2578* (*pdtA*) von *S. coelicolor* M145 das erste Mal 2016 von Sigle et al. charakterisiert (Sigle et al. 2015; Sigle et al. 2016b). Dabei wurde festgestellt, dass die Mutante  $\Delta$ *SCO2578* nicht in der Lage war auf LB-Agar mit zusätzlichen 6 % NaCl zu wachsen (Sigle et al. 2016b). Diese erhöhte Sensitivität gegenüber hoher Osmolarität ist ein Hinweis, dass die Integrität der Sporenhülle beeinträchtigt war. Dies stimmt ebenfalls mit den Beobachtungen aus dieser Arbeit überein.

Weiterhin scheint *SCO2578* eine Rolle beim vegetativen Hyphenwachstum in *S. coelicolor* zu spielen. So lokalisierte ein PdtA-mCherry Fusionsprotein hauptsächlich an den Spitzen der vegetativen Hyphen und an potentiellen neuen

Verzweigungspunkten (Sigle et al. 2016b). Während der Wildtyp M145 lange Hyphen bildete und sich anschließend verzweigte, zeigte die Mutante unregelmäßige Verzweigungen und teilweise geschwollene Hyphen. Aufgrund eines aberranten Spitzenwachstums, bildeten sich neue Verzweigungen, in denen das apikale Spitzenwachstum jedoch erneut blockiert wurde (Sigle et al. 2016b). Ein ähnlicher Phänotyp wurde für die *S. coelicolor scy*-Mutante beschrieben (Holmes et al. 2013). Scy soll durch das Sequestrieren von DivIVA die Anzahl der das Spitzenwachstum bewirkenden Polarisome (TIPOC = Tip organizing center) limitieren und somit Verzweigungen kontrollieren (Holmes et al. 2013; Mukherjee et al. 2009; Hempel et al. 2008).

Des Weiteren beschrieben Sigle et al. (2016) eine Reduktion des ZWG-Gehalts (48 %) sowie einen reduzierten Phosphat- (32 %) und Hexosamingehalt (48 %) in den Sporenwänden der Mutante und schlussfolgerten, dass es sich bei SCO2578 um eine sporenwandspezifische PDP-Transferase (PdtA) handelt (Sigle et al. 2016b).

Durch die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse kann diese Schlussfolgerung jedoch nicht unterstützt werden. Die TagV-ähnliche terminale Transferase SCO2578 (PdtA) verfügt zwar über eine Rolle beim Hyphenwachstum unter Stressbedingungen, jedoch ist sie nicht an der PDP- sowie Kdn-Teichulosonsäure Synthese beteiligt. Im Gegensatz zu Sigle et al. (2016b) lag in dieser Arbeit der ZWG-Gehalt der Sporenwände auf dem Niveau des Wildtyps M145. Die Mutante  $\Delta$ SCO2578 wies einen erhöhten Hexosamingehalt auf, wobei der Phosphatgehalt leicht reduziert (11 %) war. Allerdings war der mittels HPLC-MS ermittelte PDP-Monomer-Anteil in den Sporenwänden nur geringfügig reduziert, so dass es sich bei SCO2578 nicht um eine sporenwandspezifische PDP-Transferase handeln kann.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des  $\Delta$ SCO2578 Phänotyps in dieser Arbeit könnte in der Verwendung eines anderen Sojamehls (Hensel, Bio-Sojamehl fettreduziert) zur Herstellung der Sporulationsplatten liegen, da das von Sigle et al. (2016b) verwendete Sojamehl (Hensel, Bio-Sojamehl fettarm) nicht mehr lieferbar war.

Wie schon von Sigle et al. beschrieben hat die Deletion von SCO2578 keinen Einfluss auf die Kettenlänge der im Gel sichtbaren Polymerfragmente (Sigle et al. 2016b). Auch in dieser Arbeit wurden keine auffallenden Unterschiede im Bandenmuster zwischen

der Mutante  $\Delta$ SCO2578 und dem Wildtyp M145 festgestellt. Lediglich im oberen Bereich des Polyacrylamid-Gels der Sporenproben ließen sich die Polymerfragmente der Mutante  $\Delta$ SCO2578 schlechter auftrennen, was auf eine höhere Anzahl an Polymerfragmenten dieses Größenbereichs hinweist.

### **5.7 Die Deletion der beiden CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase Gene SCO2589/SCO2590 hat keinen Einfluss auf die PDP- und Kdn-Teichulosonsäure Synthese**

In der Literatur waren die beiden CDP-Glycerol:Glycerophosphat Glycerophosphotransferase Gene *SCO2589/SCO2590* noch nicht charakterisiert. Die beiden Gene *SCO2589* und *SCO2590* befinden sich wie *SCO2578* und *SCO2584* im gleichen putativen Zellwandglykopolymer-Biosynthesecluster (Abbildung 13). *SCO2589* sowie *SCO2590* verfügen jeweils über eine Glycosyltransferase- und über eine Glycerophosphotransferase-Domäne. *SCO2589* weist mit 743 As eine für TagF-Homologe typische Größe auf, wohingegen *SCO2590* mit einer Größe von 1197 As ungewöhnlich lang ist. Allerdings lassen sich für *SCO2590* keine zusätzlichen Pfam Domänen vorhersagen, so dass die Bedeutung des zusätzlichen Proteinbereichs unklar ist (Abbildung 58).

Die Inaktivierung von *SCO2589* und *SCO2590* beeinträchtigte weder die Größe der Bakterienkolonien noch das Wachstum bei Salzstress. Die Größe der Kolonien der Doppelmutante  $\Delta$ SCO2589/SCO2590 war sogar um 8 % größer als die des Wildtyps M145 (Abbildung 45).

Aufgrund der vorhergesagten Funktion als TagF-ähnliche Zellwandglykopolymer-Polymerase würde man in der Mutante  $\Delta$ SCO2589/SCO2590 mit kürzeren Polymerketten einhergehend eine Reduktion des ZWG-, Phosphat- und Hexosamingehalts erwarten. Beim ZWG-Gehalt in Myzel- (69 %) und Sporenwänden (86 %) war aber verglichen mit dem Wildtyp M145 (65 % bzw. 80 %) kein drastischer Unterschied zu erkennen. Ebenso lag der Phosphat- und Hexosamingehalt sowohl in Myzel- als auch in Sporenwänden auf Wildtyp Niveau. Lediglich der Kdn-Gehalt war in den Myzelwänden um 12 % und in Sporenwänden um 17 % reduziert. Ebenso ließen sich auch durch HPLC-MS Analysen nur relativ geringe Unterschiede im PDP- oder

Kdn-Gehalt detektieren, die aber auch in der komplementierten Mutante zu beobachten waren.

Wie bereits bei der Mutante  $\Delta$ SCO2578 beobachtet, scheint auch die Deletion der Gene *SCO2589-2590* keinen Einfluss auf das Bandenmuster der ZWG der Myzel- oder Sporenwände zu haben.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Deletion von *SCO2589* und *SCO2590* keinen signifikanten Einfluss auf die Synthese von PDP, Kdn-Teichulosonsäure oder anderer im Gel detektierbarer ZWG hat.

```

SCO2590 -----MAPRLSIVFIYVVERVYLPACLDSLAAQTFGDLEVLMDVSDGSDSASIAADYAARDPRFKLIR-KENAGLGAARNTGMTRLAPSESEYVAFVSDDDMIPDAYRLMVESLDE--SGSDFVTGNVQHI-NSTKIWQSFMRHILAGGA--VRRTHISRNNKLLT-DRIACNKVF
SCO2981 -----MEVVPVRFVSIVFAYQVQAYLHACLESVLAQSYFDFEVIIVDDGSDPADAGTIADEFALDPRVVRVIGLPRNEGLGPARNAGMER--AGGDYLVFLDGDSDTLTPHALRGIADRIKE-TGEPDVLVYDYARTYWTGETVNRNQAHAHLEQGG--PAFPRLADRFGLKLLMVMNRAV
SCO2983 -----VFRFSVIVFCFKVQGLFRQCLDSVLDQSPRDIEVIAVDDCSPDGSGAILDEYAAARDRVRVHLLEENAGLGRARNAGLEL--ATGDYVFLDSDDDTLTPGALRAMADRLAE-TDGDVVLVFDYARTYWWGTRARNVLAARVLAQAG--DGTFTAAGHFEILDLLMVMVWKNVY
SCO2589 -----MPRFSLIVFVHKVQGLPECLDSVLGQDYYVDFELIANDCSPDGSGAILDEYARHDARIHVHMLTENVGLGRARNAGMER--AQGDYVFLDSDDDTLTEGALTAIADRLDA-TDDEPEVLVYDYARTYWNNGVSRNQADLLRDTG--PDVPSLADRFQLDLDLQIVWKNAY
SCO2982 -----MPRFSLIVFVSHGVAGRLSQALDSVLGQSPDGFELIPVCDGPDCAADAVAGEHAERDSRVTPVHSPSAGLAGARNAGMRA--ATGAYLLFLDGDSDTLTPGALRAMADRLAE-TGGDVVLVYFHEHERVFWWEGETTNAFAPLLAKTP--DGAFAFDRAFHILTGVDFPMSAVH
SCO2997 MSVTAMSETAFDLSVIVHGRNVQDHLPALDLSLDAHFLTGVFVIVAAGV--DWAREVAERHA--PAFTVLFLPDGAGDAARSAGAAR--ARGRWLHFVHAKDGLFVGPAPVAERAGALPDAVEVLLLDHVRSSWRAAGLPSFDGPRLARAGRAGESLALDDRAGLLRLTPLLGNRAV

SCO2590 RRSFWEKHDLSPFEGVLVYEDVFI-LPAQLAEAVDIIIEPTYWRLRE-GEAAPSITQRTEPKAVDRRAAAVESVSRFFASRPGESGAELKHAYDHTALTGDRLIFLNLVDPGDAAEFRAEFLRVINKYLDQVDPVVMELFATARIKWLLVRKHALLDDVLKIAERGGDAVKISGLV
SCO2981 RREFAVREGFAPFPG-YIEDTPWT-YVPLMTAGSVATLDRVCVHYRQL-RGSILGTFGER-----HLDVFTFYQDRVFA-----FLDARMETHPESRKELAR-WRPLLYRRMADHLITVYTRPGR-----
SCO2983 RRDVFEREGFTFPG-YIEDTPWT-FVPMFSAERIAALDRICLNRYRQR-QGNILSTTSRK-----HFDVHAQYERVFA-----FLDA-----RPELAARWRPFLHAKMGHECLDILSKPDR-----
SCO2589 RRDFIARTGLTFPG-YVEDAPWT-FGSLITAERIAALDRVCVYRQRREGSNILKTVSRK-----HEDIFDQYRVFD-----YVDA-----HEELAE-WRGLPFRKMVDHYLVLESFGR-----
SCO2982 RRTFLTERRLDFFPG-HFTDVGFG-ARVAAAERMAVLEVVVVRHVR-RQNRNLNPGEH-----HADLLDQAEALIT-----HAVE-----RGLPERRGFLFEQLFAAVLKTATHPRR-----
SCO2997 RAGFWRHAHERLL--TTEDEFFAAYALLLADRVAFLPHFAYEDRRLR-PESLFPPTAAQ-----RYALVDRYEALLG-----LTAD-----RPAV-----HGVLYDLMIROCLHTFARAG-----

SCO2590 RXYVSYPTVEAAAAGLPKARRIDPDLRLHAPLQDIRWDGGRLLRSGHANWDQIQDQSGRRSAAKVLVLKKGDSRRATVUFLRNTHVPEATSLSGRKHNNYDWSGWAADDLPLKLRGSSQWEEGTWRVVGIGIATAGLLRKRRAVQVKGPTRANHPFYQWLLDDDFRLLFTPVNGALRLTVERV
SCO2981 -----LPRSLRA-----LRF-----LRRR-----
SCO2983 -----LPPSDRA-----LRF-----LRRR-----
SCO2589 -----LPRDARA-----LRF-----LRRR-----
SCO2982 -----LTRRGRR-----LRF-----LRRR-----
SCO2997 -----MPDDVAR-----LRF-----LRRR-----

SCO2590 RALITGHRAVGADIEIDGEIRVFLGAGESVSLRVTKKSGERLHPVTLTSAADGAHTFTVVRVPMRDVALLPEHQDVVKEENAAGGADPAAASRRNWSQTLVAVAPDGGERRFTVVRREGLADGEMRLPASLAENADRNEIALVSGHNGYKFSGRPLQAKITSVRWTGDRYVVGVSAA
SCO2981 RVHCRRYRVEGA-----PAPLF-----VR-LRHALL-----RLGLRRTY-----GALRLASALRRGTAGV-----
SCO2983 TEMFRAHRPEGA-----AVPAG-----LR-----VL-----E-GSYAAY-----RVRRQSGRAARELER-----
SCO2589 SADYRARVPEGF-----TRPGG-----GRGHKYTML-----ERDAYTTL-----MSALAARVARRRUKG-----
SCO2982 SRLYRHRPAGF-----RPPGG-----RLGVQHRLL-----ASGSYTA-----RALRAANRTATGV-----
SCO2997 SVTARRHRPEGL-----RFPAG-----LEGVRRSLL-----EGAGYRV-----RALRTASHARRGVRAA-----

SCO2590 DIDGADVVKARDRDEKTVLRTSPDGSFAAEFTFASMSGPDGTLPLKSGRNWFLRTPDGHDIPLVDRLAVDGFVPLGAAKDREYEFESRWYFQHLHCPDLSVLRGAYRQERL-KDVEYAGTQPLR-DAVLFISYNGKQYSDSFRAMHEELLARGADLEVLMVLDGQV---
SCO2981 -----AAGLLRA-----ARTGAL-RLHYRVRQCLPLRADRAVFAVEGDRGYGRDPALEEAFFRLAPHVRTAWTADRHH---
SCO2983 -----TRPALAA-----AAGRLR-RTASTVHVRRPDLPLVVSAPSHRGLVGDPAIAHRAARELAPHLRQVWVVRDEESAAD
SCO2589 -----IRGALNR-----SKRGAM-GAFYQSQLRPLDDNLALFSAYWSRGVSCNPAADAEALARLAPGMRRVAVHADHA---
SCO2982 -----LRRLFWP-----RGLRTRLRVRRHLRRLPDLNLUVYCAVWGRGYACNPAIAHAKARELAPHLRQVWVVRDEESAAD
SCO2997 -----ARTGRRR-----AGTRLR-TLQYRAALARPLDEHLAVFSAYWNRGVACNPAIAHAKARELAPHLRQVWVVRDEESAAD

SCO2590 -DL-PDTAQKRVFSTEWYEAALARCRIYVTNAHLPHMMERRPGQVIVQTHGTMKKIGLDIE----APKFDQYHERLIQEARNWMLVSSNRFTSPILKRAMGFDGKIETGYPRNDYLYAPDLAERAREIKERLGVSDRRVILYAPTRDRLSHRGGQFKFDLRIDVEDARARLG
SCO2981 -HTVFPQTRRLTPGTAARHTALARSRYLVREGAFPGGLVRRRQGVLVQTAQGTFLKHMGLDLQERP---AAAGQTDV-ARLLREADSDYVVSANRHSITLWVRVHFGDWTALEYQGPRTDVLQRAT-AADVARLRETLPVPEGTVAIYAPTRD---YRR-TQ-RS-ALDLERVVRLG
SCO2983 PALLPFGTEHVVLGSAAYRUTERAAFFVNNVNWPGTVAKRPGTWHLHTHQGTFLKHMVGLLDRP---GARHGLDV-PQMLRRAADRWDHSLVASRYAERVWERAYPCHFTSARTGSPRNDALVNAQ-PEDGRRVRERLGVPAHTVVLYAPTRD---YRRGGL-VE-RLDVARLAADLG
SCO2589 -DRVFKGVVVVRVSGREYVATLARAARVYLVNNVNFADSVVVRGQIHIQTHGTLPLKTMGLDQKYP---ASTDMDF-EKLLERCDRWDYSISSNRFTSTVWERVYPCSYATLETGYPRNDVUNAT-AEDVRAARAALGLADGTRAFLYMPTRE---YQP-GF-TS-ALDFARFARELG
SCO2982 -HTLPEGVDHAVVSGHRYWEVLARATYLVNNAFAGVVRKPGSVHLQTHGTFKTMGVQDQSTYVVAATG-SF-TKLLARVDRWDVFNLSANRHSITQWERAFPGSYEHLEYGYPNDVYCTAT-AGDVARVRELVGPEGTAVLYAPTRD---WET-GFGAG-GLDEAFCEAAG
SCO2997 -ALLPFGTDHVVPGRTRRWEVLARARVYLVNNVNFPDAVVRKPGTWHLQTHGTFKRMGVQDQKYP---AAHGLDF-QALLERVWDKDFVSVSANRHSITRMWQRAYPSRHLSDHGYPNDVYTAG-PAEVRAARERLGIAPGRRAVLYAPTRD---YEA-GW-TP-RDLAALADLDG

SCO2590 DDHVLLIRRHNSVVDSPFG-----AGNGFVHDVSEYFDIADLYLAADVLTDYSSVMFVYHAKRFLMFTFYDLEHYRDLKRGFYDFENDAPGFLIRTSEELVSLGDLDKVRSREYADRYRRFQELFCDLDDGRAAARVVDLML-----EQAREV-----
SCO2981 PRFVVLARAHFRMG-GPLA-----ASAGRVLDVSDHPSVESLCLASDALVTDYSSLMFVYAGLDRPIVIAHAAREAYEA-ARGTYVDLRSFPPGAIARDEDELIGVFAAGDWHGTRSAARLAAFRERFCFYDDGAAERVVRRVVLGET---DPPPAVPLSGRRPAPSATAALARTPLTTVPPFAGPRTVDSL
SCO2983 EGHILLVRLHPSLATGPARGLGLTELHRRGVVVDATDEPHVEDLMLASDLITDYSSALMFDYALLDRPILIHAEWDGFPYSA-TRGTYFDITEAPGHVSRSYRELAWLLASGAWDEEAARLRSFRARYCEYEDGAAERVVRTLLGEPMPAPEPS-GVPGARAVPSGRDLLPST
SCO2589 EDVILLVRGHYFYGDSPT---AALRRTGRIVDVSGHRSVEDLYLAADALITDYSSAMFDYAVLDRPIVSVVPPDWVYSA-VRGTYFDLLQEPFGAVATQTELLGLLTSYTDYDTPETTKRRDGFRRRCFFDDGAAERVVRRVFLGEE-SLLFVVFPDDRSHAPTPAQALEPVVERA
SCO2982 EDVVLLRAHYFYDRGSSR-----ERTGRVIDVIGHRSSEVCLAADALVTDYSSIMFDYANLDRPIVYVADDDWVYRE-TRGVYFDLMAEPGFPVARTPEELARVADGSAWGPSTALRAAFRERFCEFFDDGAAERVVRRVLLGEPPEALPVPLAERVPAAPAAATLVRS
SCO2997 EETVLLMRAHYFYDAAAPSLAGLRRTGRVLDVSSYEFVEELCLAADALVTDYSSIMFDYANLDRPIVYHADDWETVYRT-TRGVYFDLMAEPGFPVARTQAELEITLSDAWHDERAAKARTAFRRRCFFDYDDGAAERVVRRVFLGEDERTLPPVLPVEDRTPAPSPEEATSS

```

Abbildung 58: CLUSTAL Multiples Sequenzalignment mit MUSCLE (3.8). SCO2590 wurde mit folgenden anderen *S. coelicolor* TagF-Homologen verglichen: SCO2981, SCO2983, SCO2589, SCO2982 und SCO2997. Die erwähnten Enzyme sind in StrepDB als putative Glycosyltransferasen annotiert.

## 5.8 SCO2594::TnpH734 zeigt ein aberrantes Längenwachstum und einen reduzierten PDP-Gehalt

Durch ungerichtete Transposon-Mutagenese von *S. coelicolor* wurde eine Mutante isoliert, die eine veränderte Koloniemorphologie aufwies (Vollmer et al. 2019; Schmid 2019). In der Mutante (SCO2594::TnpH734) war das Gen *SCO2954*, das sich im gleichen Gencluster wie *SCO2578*, *SCO2584*, *SCO2589* und *SCO2590* befindet und für eine putative Exopolysaccharid-Phosphotransferase kodiert, durch die Insertion eines Mini-Transposons unterbrochen. Die Insertion hatte einen drastischen Effekt auf das Wachstumsverhalten und die Größe der Bakterienkolonien. Die Kolonien waren kleiner und kompakter als die des Wildtyps M145. Dieser Phänotyp war das Ergebnis eines gestörten Hyphenwachstums. Während beim Wildtyp M145 an den Kolonierändern bis über 50 µm lange unverzweigte Hyphen wuchsen, verzweigten die Hyphen der Mutante bereits kurz hinter der Hyphenspitze. Darüber hinaus waren die Hyphen verkürzt, teilweise geschwollen und zum Teil auch lysiert (Abbildung 47). Der morphologische Defekt von SCO2594::TnpH734 konnte durch die Komplementation vollständig wieder hergestellt werden.

Interessanterweise wurde eine *SCO2594* Mutante schon in einer früheren Publikation beschrieben (Santos-Beneit et al. 2014). Hier wurde *SCO2594* beim Screening von Transkriptionsdaten auf phosphatregulierte *S. coelicolor* Gene identifiziert. Die Mutante SCO2594::Tn5062, bei der *SCO2594* durch die Insertion des Transposons Tn5062 unterbrochen war, war im Wachstum beeinträchtigt und zeigte überraschenderweise eine hohe Vancomycinresistenz. Transkriptionsanalysen der Mutante SCO2594::Tn5062 ergaben, dass die Gene *SCO2776-2779* runterreguliert waren. Die Gene *SCO2776-2779* kodieren für zwei Acetyl-CoA Carboxylasen, eine 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase und eine Acyl-CoA Dehydrogenase, die am Lipid- und Acetat-Metabolismus beteiligt sind. Ihre runterregulierte Expression könnte der Grund für das reduzierte Wachstum der Mutante sein (Santos-Beneit et al. 2014; Demirev et al. 2009; Zhang et al. 1999).

Darüber hinaus wies die Mutante SCO2594::Tn5062 einen reduzierten Phosphatgehalt in der Zellwand auf. Daher postulierten Santos-Beneit et al. (2014) sowie Read et al. (2019), dass die Gene *SCO2592*, *SCO2593* und *SCO2594* an der Synthese eines phosphathaltigen Polymers beteiligt sind (Santos-Beneit et al. 2014; Read et al. 2019).

Die in dieser Arbeit detaillierter durchgeführten Analysen ergaben bezüglich des Phosphatgehalts ein anderes Bild. 2014 beschrieben Santos-Beneit et al., dass der Phosphatgehalt in der Mutante SCO2594::Tn5062 stark reduziert war (Santos-Beneit et al. 2014). Die Mutante SCO2594::TnpH734, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, verfügte jedoch in den Sporenwänden über einen geringfügig reduzierten Phosphatgehalt (23 %). In Myzelwänden hingegen war der Phosphatgehalt verglichen zum Wildtyp M145 erhöht (29 %). Durch die Komplementation wurden die Abweichung wieder auf Wildtyp Niveau angeglichen (Abbildung 51).

Die Diskrepanz bezüglich des Phosphatgehalts könnte zum einen auf die verschiedenen Mutanten (Insertion von unterschiedlichen Transposons an unterschiedlichen Positionen innerhalb des *SCO2594* Gens) oder auf die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien zurückzuführen sein. Während Santos-Beneit et al. (2014) das phosphatreiche MG-18.5 Flüssigmedium verwendete, wurden die Myzelwände in dieser Arbeit nach Kultivierung in HA-Medium isoliert.

In der Mutante SCO2594::TnpH734 war der Kdn-Gehalt kaum beeinträchtigt, die Mengen an PDP hingegen waren in Sporenwänden um 97 % und in vegetativen Myzelwänden um 96 % reduziert. Der reduzierte Anteil an PDP in der Mutante spiegelt sich aber weder im Verhältnis zwischen Peptidoglykan und ZWG noch im Phosphatgehalt wider. Folglich wird möglicherweise in der Mutante ein anderes phosphathaltiges Polymer mit einer bisher unbekannt Masse anstelle von PDP synthetisiert. Hinweise darauf lassen sich auch aus den Polyacrylamid-Gelen ersehen. Bei der Mutante SCO2594::TnpHL734 enthalten einige Gelbereiche keine klar definierten Banden, obwohl die anderen Bereiche ein klares Bandenmuster aufweisen. Bei der Sporenprobe betrifft dies den oberen Bereich des Bandenmusters. Bei der Myzelprobe ist der mittlere Bereich betroffen. Diese Bereiche könnten auf die Überlagerung mit einem Polymer, welches sich mit Silbernitrat/Alcianblau schlechter anfärben lässt, zurückzuführen sein.

Interessant ist der Link zwischen phosphathaltigen ZWG und Vancomycinresistenz. Obwohl *S. coelicolor* *vanHAX* Gene zur Synthese Vancomycin-resistenter Zellwand-Vorstufen besitzt, wird *S. coelicolor* von Vancomycin gehemmt (Hong et al. 2004). Dies beruht darauf, dass die *van* Promotoren zur Expression der *vanHAX* Gene durch hohe Phosphatkonzentration inhibiert werden (Santos-Beneit et al. 2014).

Darüber hinaus besteht die Theorie, dass die erhöhte Vancomycinresistenz der Mutanten SCO2594::Tn5062 und SCO2594::TnpH734 durch ein putatives Polymer zustande kommt, welches durch die vom *SCO2592-SCO2594* Operon kodierten Enzyme synthetisiert wird. Dieses negativ-geladene Polymer ist in der Zellhülle lokalisiert. Durch nicht-spezifische Bindung von Vancomycin über dessen positiv geladene Aminogruppe könnte sich die Antibiotikakonzentration an der Zellhülle anreichern und damit zur gesteigerten Sensibilität führen wie es beim Wildtyp M145 von *S. coelicolor* der Fall ist (Read et al. 2019).

Der Promotor von *SCO2594* steht unter Kontrolle des Zwei-Komponentensystems PhoR-PhoP. Unter Phosphatmangel bindet die phosphorylierte aktive Form von PhoP an eine spezifische Sequenz (pho box) und reguliert die Expression von PhoP-abhängigen Genen. Dies bedeutet, dass die Expression von *SCO2594* und somit auch die Synthese des putativen Polymers bei einer geringen Phosphatkonzentration im Medium unterdrückt wird. Aufgrund der Mutation in der Mutante SCO2594::Tn5062 wäre die Phosphatkontrolle unbedeutend, was auch bei hohem Phosphatgehalt im Medium in einer Vancomycinresistenz resultieren würde (Read et al. 2019; Santos-Beneit et al. 2014).

Eine weitere Möglichkeit für die erhöhte Vancomycinresistenz in der Mutante, könnte auch auf das Zusammenspiel zwischen ZWG und der Quervernetzung des PG zurückzuführen sein. Atilano et al. postulierten 2010, dass Wandteichonsäuren in *Staphylococcus aureus* als zeitliche sowie räumliche Regulatoren beim PG-Stoffwechsel dienen. Bei ihren Experimenten stellten sie eine Korrelation zwischen der Menge an synthetisierten Wandteichonsäuren und PBP4-Rekrutierung am Septum fest. Daher vermuteten sie, dass Wandteichonsäuren PBP4 zum Teilungsseptum dirigieren und somit auch eine Rolle bei der Quervernetzung spielen. Dafür spricht zudem, dass PBP4 später am Septum erscheint als TagO, nachdem das frühe Stadium der PG-Biosynthese abgeschlossen ist und dieses bereit ist für eine stärkere Quervernetzung (Atilano et al. 2010). Wenn eine hohe Quervernetzung der Muropeptide nicht möglich ist, sammeln sich Muropeptid-Monomere in der Zellwand an. Muropeptid-Monomere könnten laut Sieradzki et al. (1999), Vancomycin-Moleküle in den oberen Zellwandschichten abfangen. Dadurch würden sich die angesammelten Vancomycin-Moleküle selbst sterisch daran hindern an die Zellwandsynthesemaschinerie an der Plasmamembran zu gelangen und diese zu hemmen (Sieradzki et al. 1999).

## 5.9 Schlusswort

Zellwandglykopymere sind essenzielle Bestandteile der Gram-positiven Zellwand und beeinflussen verschiedenste zelluläre Prozesse. Die Gene der Zellwandpolymersynthese sind redundant ausgelegt und die Zellwandpolymere können Medien-abhängig synthetisiert werden. Besonders komplex ist die Situation in *Streptomyces coelicolor*. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Myzel- und Sporenwänden unterschiedliche Polymere vorliegen, und dass, neben den bereits charakterisierten Zellwandglykopolymeren Polydiglycosylphosphat und der Kdn-beinhaltenen Teichulosonsäure noch andere phosphatfreie und phosphathaltige Zellwandglykopymere vorhanden sind, die in vorangegangenen Arbeiten übersehen wurden.

## 6. Eigenanteil

1. **Sigle, S.; Steb lau, N.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2016a):** A toolbox to measure changes in the cell wall glycopolymer composition during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *Journal of microbiological methods* 128, S. 52–57.
  
1. **Sigle, S.; Steb lau, N.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2016b):** Polydiglycosylphosphate transferase PdtA (SCO2578) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is crucial for proper sporulation and apical tip extension under stress conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 82 (18), S. 5661–5672.
  
2. **Vollmer, B.; Steb lau, N.; Ladwig, N.; Mayer, C.; Macek, B.; Mitousis, L.; Sigle, S.; Walter, A.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2019):** Role of the *Streptomyces* spore wall synthesizing complex SSSC in differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *International journal of medical microbiology* 309 (6), S. 151327.

Eigenanteil an den oben aufgelisteten Publikationen:

1. Bei der Publikation “A toolbox to measure changes in the cell wall glycopolymer composition during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)” habe ich Dr. Steffen Sigle bei der Ermittlung der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Assays unterstützt. Ein kleiner Teil der benötigten Zellwände wurde von mir isoliert. Zudem führte ich die hochauflösende PAGE sowie den Nachweis, dass die aufgetrennten Fragmente Phosphat beinhalten, durch.
  
2. Bei der Publikation „Polydiglycosylphosphate transferase PdtA (SCO2578) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is crucial for proper sporulation and apical tip extension under stress conditions” habe ich Dr. Steffen Sigle bei den Messungen der ZWG-Bestandteile unterstützt und die PAGE durchgeführt.

3. Bei der Publikation "Role of the *Streptomyces* spore wall synthesizing complex SSSC in differentiation of *S. coelicolor* A3(2)" führte ich die Identifikation von PDP und Kdn-beinhaltenender Teichulosonsäure in Sporen- und Myzelwänden von *S. coelicolor* durch. Hierfür stellte ich die Zellwandisolate für die HPLC-MS-Messungen zur Verfügung und führte die Auswertung durch. Des Weiteren führte ich eine hochauflösende PAGE durch und analysierte die daraus entstandenen Gel-Fragmente in Bezug auf die darin enthaltenen ZWG mit Hilfe von photometrischen Assays und HPLC-MS.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
cps	Counts per second
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GC-Gehalt	Guanin- und Cytosin-Gehalt
GlcNAC	<i>N</i> -Acetylglycosamin
GroP	Glycerolphosphat
HPLC-MS	High Pressure Liquid Chromatography – Massenspektrometrie
Kdn	2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-D-Galacto-Nononic Acid
LCP	LytR-CpsA-Psr
nm	Nanometer
nmol/ g	Nanomol pro Gramm
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
Mg	Magnesium
min	Minute
mm <sup>2</sup>	Quadratmilimeter
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCD	Programmed cell death
PDP	Polydiglycosylphosphat
PG	Peptidoglykan
PolyP	Polyphosphat
RboP	Ribitolphosphat
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SEDS	Shape Elongation Division and Sporulation
sek	Sekunde
SSSC	<i>Streptomyces</i> Spore Wall Synthesizing Complex

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
TA	Teichonsäuren
TIPOC	Tip organizing center
TUA	Teichuronsäure
WTA	Wandteichonsäuren
ZWG	Zellwandglykopolymere

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Streptomyceten (Barka et al. 2016, modifiziert).....	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Ausbildung einer Rodletschicht (Claessen et al. 2003, modifiziert).....	4
<b>Abbildung 3:</b> Oberflächenstruktur der Sporen von Streptomyceten (unveröffentlicht; S. Sigle, F. Oesterhelt und G. Muth; Mikrobiologie/ Biotechnologie, Universität Tübingen).....	5
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Brown et al. 2015, modifiziert).....	6
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der Peptidoglykansynthese (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014, modifiziert).....	8
<b>Abbildung 6:</b> RodA-bPBP Komplex (Elongasom) und FtsW-bPBP Komplex (Divisom) (Welsh et al. 2019, modifiziert; Li et al. 2021) .....	10
<b>Abbildung 7:</b> Mögliche Strukturen von Wandteichonsäuren (Armstrong et al. 1959).....	12
<b>Abbildung 8:</b> Klassifizierung von Wandteichonsäuren nach Naumova et al. (2001) (van der Es et al. 2017) .....	13
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der Biosynthese von Wandteichonsäuren (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014, modifiziert) .....	15
<b>Abbildung 10:</b> Mögliche Strukturen von Teichuronsäuren (Ward 1981) .....	17
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung eines Monomers der Kdn-beinhaltenden Teichulosonsäure (angelehnt an: Shashkov et al. 2012) .....	20
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung eines Polydiglycosylphosphat-Monomers (angelehnt an: Shashkov et al. 2012) .....	20
<b>Abbildung 13:</b> Schematische Darstellung der vier Gencluster, welche eine putative Rolle bei der Biosynthese von Zellwandglykopolymeren spielen (Sigle et al. 2015, modifiziert) .....	26
<b>Abbildung 14:</b> Genetische Umgebung von <i>SCO2997</i> und schematische Darstellung der vorhergesagten PFAM-Domänen (SMART-embl).....	28
<b>Abbildung 15:</b> Sporengröße beim Wildtyp M145 und bei der Mutante $\Delta$ <i>SCO2997</i> von <i>Streptomyces coelicolor</i> (Kleinschnitz et al. 2011b).....	29
<b>Abbildung 16:</b> Genetische Umgebung von <i>SCO2578</i> ( <i>pdtA</i> ) und schematische Darstellung der vorhergesagten Protein-Domänen (SMART-embl) .....	30
<b>Abbildung 17:</b> Phänotyp von Myzel und Sporen im Wildtyp M145 und in der Mutante $\Delta$ <i>SCO2578</i> von <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	31
<b>Abbildung 18:</b> Genetische Umgebung von <i>SCO2589</i> und <i>SCO2590</i> und schematische Darstellung der vorhergesagten PFAM-Domänen (SMART-embl).....	32

<b>Abbildung 19:</b> Schematische Darstellung des Operons der Gene <i>SCO2592</i> , <i>SCO2593</i> und <i>SCO2594</i> .....	33
<b>Abbildung 20:</b> Genetische Komplementation von <i>SCO2594::TnpHL734</i> mit <i>SCO2594</i> in pSET190e .....	34
<b>Abbildung 21:</b> Gelkammer (BaseAce Jr Sequencer) von STRATAGENE für die vertikale Gel-Elektrophorese mit größeren Polyacrylamid-Gelen.....	50
<b>Abbildung 22:</b> Schematische Darstellung des Zusammenbaus eines Ibidi-Dishs.....	54
<b>Abbildung 23:</b> Schematische Darstellung eines an das Peptidoglykan gebundenen Polydiglycosylphosphats (angelehnt an: Weidenmaier und Peschel 2008).....	57
<b>Abbildung 24:</b> Anteil an Peptidoglykan (unterer Bereich) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Bereich) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5]. .....	58
<b>Abbildung 25:</b> Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] .....	60
<b>Abbildung 26:</b> Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5]......	61
<b>Abbildung 27:</b> Zeitreihe des Kdn-Gehalts von Zellwandglykopolymeren aus Sporen- und Myzelwänden vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 1].....	62
<b>Abbildung 28:</b> Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] .....	63
<b>Abbildung 29:</b> Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] .....	65
<b>Abbildung 30:</b> Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3]. .....	66
<b>Abbildung 31:</b> Verteilung der Kdn-Teichulosonsäure (Monomer mit drei unterschiedlichen Resten) in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] .....	68
<b>Abbildung 32:</b> Verteilung Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] .....	69
<b>Abbildung 33:</b> Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten (Bandenmuster).....	71
<b>Abbildung 34:</b> Polyacrylamid-Gele mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten ....	73
<b>Abbildung 35:</b> Phosphatgehalt über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 3].....	74
<b>Abbildung 36:</b> Anteile an PDP-Monomer sowie PDP-Dimer über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 1].....	75
<b>Abbildung 37:</b> Detektierte Polymer-Massen über die Länge eines Polyacrylamid-Gels [n= 1] .....	77

<b>Abbildung 38:</b> Anteil an Peptidoglykan (unterer Anteil) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Anteil) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5].....	79
<b>Abbildung 39:</b> Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5].....	80
<b>Abbildung 40:</b> Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5].....	81
<b>Abbildung 41:</b> Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementation $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5].....	82
<b>Abbildung 42:</b> Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementationen $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3].....	84
<b>Abbildung 43:</b> Verteilung des Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutante $\Delta$ SCO2997 und der genetischen Komplementationen $\Delta$ SCO2997::pSET2997 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3].....	85
<b>Abbildung 44:</b> Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten vom Wildtyp M145 und der Mutante $\Delta$ SCO2997 ( <i>S. coelicolor</i> ). .....	87
<b>Abbildung 45:</b> Bestimmung der Größe der Bakterienkolonien in Abhängigkeit zu steigender Salzkonzentration beim Wildtyp M145 und bei den Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] .....	90
<b>Abbildung 46:</b> Vergleich der Größe der Bakterienkolonien zwischen dem Wildtyp M145 und der Mutante SCO2594::TnpHL734 von <i>S. coelicolor</i> .....	91
<b>Abbildung 47:</b> Morphologie des Wildtyps M145, der Mutante SCO2594::TnpHL734 und der genetischen Komplementation SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von <i>S. coelicolor</i> (Maßstab= 5 $\mu$ m).....	93
<b>Abbildung 48:</b> Hemmhoftest beim Wildtyp M145, bei SCO2594::TnpHL734 und SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von <i>S. coelicolor</i> .....	94
<b>Abbildung 49:</b> Größe der Hemmhöfe beim Wildtyp M145, bei SCO2594::TnpHL734 und SCO2594::TnpHL734 (+pSET2594) von <i>S. coelicolor</i> [n= 5] .....	95
<b>Abbildung 50:</b> Anteil an Peptidoglykan (unterer Anteil) und abgespaltenen Zellwandglykopolymeren (oberer Anteil) in Sporen- und Myzelwänden beim Wildtyp M145, den Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischen Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5].....	97

<b>Abbildung 51:</b> Phosphatgehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] .....	99
<b>Abbildung 52:</b> Hexosamingehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] .....	101
<b>Abbildung 53:</b> Kdn-Gehalt von Zellwandglykopolymeren aus den Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 5] ...	103
<b>Abbildung 54:</b> Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Sporenwänden vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] ...	105
<b>Abbildung 55:</b> Verteilung von Polydiglycosylphosphat (Monomer und Dimer) in Myzelwänden vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] .....	106
<b>Abbildung 56:</b> Verteilung des Kdn-Teichulosonsäure-Monomers in Zellwänden von Sporen und vegetativem Myzel vom Wildtyp M145, der Mutanten $\Delta$ SCO2578, $\Delta$ SCO2589-90 und SCO2594::TnpHL734 und deren genetischer Komplementationen ( <i>S. coelicolor</i> ) [n= 3] ....	108
<b>Abbildung 57:</b> Polyacrylamid-Gel mit angefärbten Zellwandglykopolymer-Fragmenten (Bandenmuster) .....	110
<b>Abbildung 58:</b> CLUSTAL Multiples Sequenzalignment mit MUSCLE (3.8) .....	126

### 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verteilung von Ribitol- und Glycerolresten in verschiedenen Bakterien (Armstrong et al. 1958) .....	12
<b>Tabelle 2:</b> TagF-ähnliche Proteine in <i>S. coelicolor</i> A3(2) M145.....	28
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Bakterienstämme .....	35
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Flüssigmedien und Agar.....	35
<b>Tabelle 5:</b> Zellwandisolation (Schäberle et al. 2011) .....	36
<b>Tabelle 6:</b> Hayashi-Assay (Hayashi 1975) .....	36
<b>Tabelle 7:</b> Hydrolyse (Sigle et al. 2016a) .....	36
<b>Tabelle 8:</b> Phosphat-Assay (Chen et al. 1956).....	37
<b>Tabelle 9:</b> Hexosamin-Assay (Smith und Gilkerson 1979) .....	37
<b>Tabelle 10:</b> Kdn-Assay (Matsuno und Suzuki 2008) .....	37
<b>Tabelle 11:</b> Lösungen zum Ansetzen eines Fix- und Lauf-Polyacrylamid-Gels (20 % Gel)...	38
<b>Tabelle 12:</b> Lösungen für die Silbernitratfärbung (Blum et al. 1987; Heckels et al. 1977) .....	38
<b>Tabelle 13:</b> Buffer für die HPLC-Analysen .....	39
<b>Tabelle 14:</b> Chemikalien und Materialien .....	39
<b>Tabelle 15:</b> Enzyme .....	40
<b>Tabelle 16:</b> Auflistung unterschiedlicher sich wiederholender Einheiten von Polymeren in <i>Streptomyces</i> .....	114

## 8. Literaturverzeichnis

Allison, S. E.; D'Elia, M. A.; Arar, S.; Monteiro, M. A.; Brown, E. D. (2011): Studies of the genetics, function, and kinetic mechanism of TagE, the wall teichoic acid glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* 168. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (27), S. 23708–23716. DOI: 10.1074/jbc.M111.241265.

Andayani, Desak Gede Sri; Agustine, S.; Mulyati, I. Yetti; Dewi, L. Puspa; Hakiki, M. (2015): Identification of LL and Meso-diaminopimelic acid (DAP) of Actinomycete strains and Its Secondary Metabolite Production. In: *Procedia Chemistry* 16, S. 451–456. DOI: 10.1016/j.proche.2015.12.078.

Angata, T.; Varki, A. (2002): Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. In: *Chemical reviews* 102 (2), S. 439–469. DOI: 10.1021/cr000407m.

Araki, Y.; Ito, E. (1989): Linkage units in cell walls of gram-positive bacteria. In: *Critical reviews in microbiology* 17 (2), S. 121–135. DOI: 10.3109/10408418909105745.

Archibald, A. R.; Coapes, H. E. (1971): The influence of growth conditions on the presence of bacteriophage-receptor sites in walls of *Bacillus subtilis* W23. In: *The Biochemical journal* 125 (2), S. 667–669. DOI: 10.1042/bj1250667.

Archibald, A. R.; Coapes, H. E. (1976): Bacteriophage SP50 as a marker for cell wall growth in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 125 (3), S. 1195–1206.

Archibald, A. R.; Hancock I. C.; Harwood C. R. (1993): Cell Wall Structure, Synthesis, and Turnover. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und R. Losick (Hg.): *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*: American Society of Microbiology, S. 381–410.

Armstrong, J. J.; Baddiley, J.; Buchanan, J. G.; Carss, B.; Greenberg, G. R. (1958): 882. Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. In: *J. Chem. Soc.* (0), S. 4344–4354. DOI: 10.1039/JR9580004344.

Armstrong, J. J.; Baddiley, J.; Buchanan, J. G.; Davision, A. L.; Kelemen, M. V.; Neuhaus, F. C. (1959): Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. In: *Nature* 184, S. 247–248. DOI: 10.1038/184247a0.

Atilano, M. L.; Pereira, P. M.; Yates, J.; Reed, P.; Veiga, H.; Pinho, M. G.; Filipe, S. R. (2010): Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (44), S. 18991–18996. DOI: 10.1073/pnas.1004304107.

- Baddiley, J.; Buchanan, J. G.; Rajbhandary, U. L.; Sanderson, A. R. (1962): Teichoic acid from the walls of *Staphylococcus aureus* H. Structure of the N-acetylglucosaminyl-ribitol residues. In: *The Biochemical journal* 82, S. 439–448. DOI: 10.1042/bj0820439.
- Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Meier-Kolthoff, J. P. et al. (2016): Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 80 (1), S. 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.
- Barreteau, H.; Kovac, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. (2008): Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (2), S. 168–207. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
- Bauer, H.; Farr, D. R.; Horisberger, M. (1974): Ultrastructural localization of cell wall teichoic acids in *Streptococcus faecalis* by means of concanavalin A. In: *Archiv fur Mikrobiologie* 97 (1), S. 17–26. DOI: 10.1007/BF00403041.
- Bera, A.; Biswas, R.; Herbert, S.; Kulauzovic, E.; Weidenmaier, C.; Peschel, A.; Götz, F. (2007): Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of bacteriology* 189 (1), S. 280–283. DOI: 10.1128/JB.01221-06.
- Bertram, K. C.; Hancock, I. C.; Baddiley J. (1981): Synthesis of teichoic acid by *Bacillus subtilis* protoplasts. In: *Journal of bacteriology* 148 (2), S. 406–412.
- Bhavsar, A. P.; Erdman, L. K.; Schertzer, J. W.; Brown, E. D. (2004): Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid. In: *Journal of bacteriology* 186 (23), S. 7865–7873. DOI: 10.1128/JB.186.23.7865-7873.2004.
- Bhavsar, A. P.; Truant, R.; Brown, E. D. (2005): The TagB protein in *Bacillus subtilis* 168 is an intracellular peripheral membrane protein that can incorporate glycerol phosphate onto a membrane-bound acceptor in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (44), S. 36691–36700. DOI: 10.1074/jbc.M507154200.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis* 8 (2), S. 93–99. DOI: 10.1002/elps.1150080203.
- Bouhss, A.; Trunkfield, A. E.; Bugg, T. D. H.; Mengin-Lecreulx, D. (2008): The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (2), S. 208–233. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00089.x.
- Brooks, D.; Baddiley J. (1969): The mechanism of biosynthesis and direction of chain extension of a poly-(N-acetylglucosamine 1-phosphate) from the walls of *Staphylococcus lactis* N.C.T.C. 2102. In: *The Biochemical journal* 113 (4), S. 635–642. DOI: 10.1042/bj1130635.

- Brown, E. D.; Vivas, E. I.; Walsh, C. T.; Kolter, R. (1995): MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 177 (14), S. 4194–4197. DOI: 10.1128/jb.177.14.4194-4197.1995.
- Brown, L.; Wolf, J. M.; Prados-Rosales, R.; Casadevall, A. (2015): Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (10), S. 620–630. DOI: 10.1038/nrmicro3480.
- Brown, S.; Santa Maria, J. P.; Walker, S. (2013): Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. In: *Annual review of microbiology* 67, S. 313–336. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155620.
- Brumfitt, W.; Wardlaw, A. C.; Park, J. T. (1958): Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodieticus* and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall. In: *Nature* 181 (4626), S. 1783–1784. DOI: 10.1038/1811783a0.
- Chambert, R.; Petit-Glatron, M. F. (1999): Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins. In: *FEMS microbiology letters* 179 (1), S. 43–47. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08705.x.
- Chapot-Chartier, M. P.; Kulakauskas, S. (2014): Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. In: *Microbial cell factories* 13 Suppl 1, S9. DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Chater, K. F. (1998): Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. In: *Microbiology* 144 (6), S. 1465–1478. DOI: 10.1099/00221287-144-6-1465.
- Chater, K. F. (2001): Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? In: *Current opinion in microbiology* 4 (6), S. 667–673. DOI: 10.1016/s1369-5274(01)00267-3.
- Chater, K. F.; Chandra, G. (2006): The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. In: *FEMS microbiology reviews* 30 (5), S. 651–672. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x.
- Chen, P. S.; Toribara, T. Y.; Warner, H. (1956): Microdetermination of Phosphorus. In: *Anal. Chem.* 28 (11), S. 1756–1758. DOI: 10.1021/ac60119a033.
- Chin, T.; Burger, M. M.; Glaser, L. (1966): Synthesis of teichoic acids. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 116, S. 358–367. DOI: 10.1016/0003-9861(66)90042-7.
- Claessen, D.; Rink, R.; Jong, W.; Siebring, J.; Vreugd, P.; Boersma, F. G. H. et al. (2003): A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in

*Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. In: *Genes & development* 17 (14), S. 1714–1726. DOI: 10.1101/gad.264303.

Claessen, D.; Stokroos, I.; Deelstra, H. J.; Penninga, N. A.; Bormann, C.; SALAS, J. A. et al. (2004): The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. In: *Molecular microbiology* 53 (2), S. 433–443. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04143.x.

Claessen, D.; Wösten, H. A. B.; van Keulen, G.; Faber, O. G.; Alves, A. M. R.; Meijer, W. G.; Dijkhuizen, L. (2002): Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. In: *Molecular microbiology* 44 (6), S. 1483–1492.

Coleman, G. (1969): Effect of potassium ions on the attachment of polyribosomes to the membranes in lysates of exponential-phase cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. In: *The Biochemical journal* 112 (4), S. 533–539. DOI: 10.1042/bj1120533.

Del Sol, R.; Armstrong, I.; Wright, C.; Dyson, P. (2007): Characterization of changes to the cell surface during the life cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. In: *Journal of bacteriology* 189 (6), S. 2219–2225. DOI: 10.1128/JB.01470-06.

D'Elia, M. A.; Millar, K. E.; Beveridge, T. J.; Brown, E. D. (2006): Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 188 (23), S. 8313–8316. DOI: 10.1128/JB.01336-06.

Demirev, A. V.; Lee, J. S.; Sedai, B. R.; Ivanov, I. G.; Nam, D. H. (2009): Identification and characterization of acetyl-CoA carboxylase gene cluster in *Streptomyces toxytricini*. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 47 (4), S. 473–478. DOI: 10.1007/s12275-009-0135-5.

Diaz-Mauriño, T.; Perkins, H. (1974): The presence of acidic polysaccharides and muramic acid phosphate in the walls of *Corynebacterium poinsettiae* and *Corynebacterium betae*. In: *Journal of general microbiology* 80 (2), S. 533–539. DOI: 10.1099/00221287-80-2-533.

Elliot, M. A.; Karoonuthaisiri, N.; Huang, J.; Bibb, M. J.; Cohen, S. N.; Kao, C. M.; Buttner, M. J. (2003): The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. In: *Genes & development* 17 (14), S. 1727–1740. DOI: 10.1101/gad.264403.

Ellwood, D. C. (1970): The wall content and composition of *Bacillus subtilis* var. *niger* grown in a chemostat. In: *The Biochemical journal* 118 (3), S. 367–373. DOI: 10.1042/bj1180367.

Ellwood, D. C.; Tempest, D. W. (1967): Teichoic acid or teichuronic acid in the walls of *Bacillus subtilis* var. *niger*, grown in a chemostat. In: *The Biochemical journal* 104 (3), 69-69P.

- Ellwood, D. C.; Tempest, D. W. (1969): Control of teichoic acid and teichuronic acid biosyntheses in chemostat cultures of *Bacillus subtilis* var. niger. In: *The Biochemical journal* 111 (1), S. 1–5. DOI: 10.1042/bj1110001.
- Faria, M.; Hajek, A. E.; Wraight, S. P. (2009): Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. In: *Biological Control* 51 (3), S. 346–354. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.06.012.
- Fisher, D. J.; Richmond, D. V. (1970): The electrophoretic properties and some surface components of penicillium conidia. In: *Journal of general microbiology* 64 (2), S. 205–214. DOI: 10.1099/00221287-64-2-205.
- Flårdh, K.; Buttner, M. J. (2009): *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (1), S. 36–49. DOI: 10.1038/nrmicro1968.
- Gassner, G. T.; Dickie, J. P.; Hamerski, D. A.; Magnuson, J. K.; Anderson, J. S. (1990): Teichuronic acid reducing terminal N-acetylglucosamine residue linked by phosphodiester to peptidoglycan of *Micrococcus luteus*. In: *Journal of bacteriology* 172 (5), S. 2273–2279. DOI: 10.1128/jb.172.5.2273-2279.1990.
- Gebbink, M. F. B. G.; Claessen, D.; Bouma, B.; Dijkhuizen, L.; Wösten, H. A. B. (2005): Amyloids - a functional coat for microorganisms. In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (4), S. 333–341. DOI: 10.1038/nrmicro1127.
- Ginsberg, C.; Zhang, Y. H.; Yuan, Y.; Walker, S. (2006): In vitro reconstitution of two essential steps in wall teichoic acid biosynthesis. In: *ACS chemical biology* 1 (1), S. 25–28. DOI: 10.1021/cb0500041.
- Glaser, L.; Loewy, A. (1979): Control of teichoic acid synthesis during phosphate limitation. In: *Journal of bacteriology* 137 (1), S. 327–331.
- Grant, W. D. (1979): Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 137 (1), S. 35–43.
- Hancock, I. C. (1997): Bacterial cell surface carbohydrates: structure and assembly. In: *Biochemical Society transactions* 25 (1), S. 183–187. DOI: 10.1042/bst0250183.
- Hayashi, K. (1975): A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. In: *Analytical Biochemistry* 67 (2), S. 503–506. DOI: 10.1016/0003-2697(75)90324-3.
- Heckels, J. E.; Lambert, P. A.; Baddiley, J. (1977): Binding of magnesium ions to cell walls of *Bacillus subtilis* W23 containing teichoic acid or teichuronic acid. In: *The Biochemical journal* 162 (2), S. 359–365. DOI: 10.1042/bj1620359.

- Hempel, A. M.; Wang, S.; Letek, M.; Gil, J. A.; Flärdh, K. (2008): Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. In: *Journal of bacteriology* 190 (22), S. 7579–7583. DOI: 10.1128/JB.00839-08.
- Heptinstall, S.; Archibald, A. R.; Baddiley, J. (1970): Teichoic acids and membrane function in bacteria. In: *Nature* 225 (5232), S. 519–521. DOI: 10.1038/225519a0.
- Hildebrandt, K. M.; Anderson, J. S. (1990): Biosynthetic elongation of isolated teichuronic acid polymers via glucosyl- and N-acetylmannosaminuronosyltransferases from solubilized cytoplasmic membrane fragments of *Micrococcus luteus*. In: *Journal of bacteriology* 172 (9), S. 5160–5164. DOI: 10.1128/jb.172.9.5160-5164.1990.
- Holmes, N. A.; Walshaw, J.; Leggett, R. M.; Thibessard, A.; Dalton, K. A.; Gillespie, M. D. et al. (2013): Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (5), E397-406. DOI: 10.1073/pnas.1210657110.
- Hong, H. J.; Hutchings, M. I.; Neu, J. M.; Wright, G. D.; Paget, M. S. B.; Buttner, M. J. (2004): Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. In: *Molecular microbiology* 52 (4), S. 1107–1121. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04032.x.
- Inoue, S.; Kitajima, K. (2006): KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family. In: *Glycoconjugate journal* 23 (5-6), S. 277–290. DOI: 10.1007/s10719-006-6484-y.
- Inoue, Y.; Inoue, S. (1999): Diversity in sialic and polysialic acid residues and related enzymes. In: *Pure and Applied Chemistry* 71 (5), S. 789–800. DOI: 10.1351/pac199971050789.
- Janczura, E.; Perkins, H.; Rogers, H. (1961): Teichuronic acid: a mucopolysaccharide present in wall preparations from vegetative cells of *Bacillus subtilis*. In: *The Biochemical journal* 80, S. 82–93. DOI: 10.1042/bj0800082.
- Johnson, S. D.; Lacher, K. P.; Anderson, J. S. (1981): Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopic study of teichuronic acid from *Micrococcus luteus* cell walls. Comparison of the polysaccharide isolated from cells with that synthesized in vitro. In: *Biochemistry* 20 (16), S. 4781–4785. DOI: 10.1021/bi00519a039.
- Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A.; Ladant, D. (1998): A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (10), S. 5752–5756. DOI: 10.1073/pnas.95.10.5752.

- Kawai, Y.; Marles-Wright, J.; Cleverley, R. M.; Emmins, R.; Ishikawa, S.; Kuwano, M. et al. (2011): A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. In: *The EMBO journal* 30 (24), S. 4931–4941. DOI: 10.1038/emboj.2011.358.
- Kieser, T.; Hopwood, D. A.; Wright, H. M.; Thompson, C. J. (1982): pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. In: *Molecular & general genetics : MGG* 185 (2), S. 223–228. DOI: 10.1007/BF00330791.
- Kleinschnitz, E. M. (2012): Die Rolle von Mre- Proteinen und Teichonsäuren bei der morphologischen Differenzierung von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Tübingen: Universitätsbibliothek Tübingen.
- Kleinschnitz, E. M.; Heichlinger, A.; Schirner, K.; Winkler, J.; Latus, A.; Maldener, I. et al. (2011a): Proteins encoded by the mre gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. In: *Molecular microbiology* 79 (5), S. 1367–1379. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07529.x.
- Kleinschnitz, E. M.; Latus, A.; Sigle, S.; Maldener, I.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2011b): Genetic analysis of SCO2997, encoding a TagF homologue, indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *Journal of bacteriology* 193 (21), S. 6080–6085. DOI: 10.1128/JB.05782-11.
- Knirel, Y. A. (2009): Structures of bacterial polysaccharides, 181-198. In Progress in the synthesis of complex carbohydrate chains of plant and microbial polysaccharides. Unter Mitarbeit von E. N. Nifantiev. Trivandrum (India): Transworld research network. ISBN 8178954249.
- Kohler, T.; Weidenmaier, C.; Peschel, A. (2009): Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin. In: *Journal of bacteriology* 191 (13), S. 4482–4484. DOI: 10.1128/JB.00221-09.
- Kojima, N.; Kojima, S.; Hosokawa, S.; Oda, Y.; Zenke, D.; Toura, Y. et al. (2022): Wall teichoic acid-dependent phagocytosis of intact cell walls of *Lactiplantibacillus plantarum* elicits IL-12 secretion from macrophages. In: *Frontiers in microbiology* 13, S. 986396. DOI: 10.3389/fmicb.2022.986396.
- Kozlova, Y. I.; Streshinskaya, G. M.; Shashkov, A. S.; Senchenkova, S. N.; Evtushenko, L. I. (2006): Carbohydrate-containing polymers of the cell wall of the thermophilic streptomycete *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* VKM Ac-1857T. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 71 (7), S. 775–780. DOI: 10.1134/s0006297906070108.

- Kumar, S.; Mollo, A.; Kahne, D.; Ruiz, N. (2022): The Bacterial Cell Wall: From Lipid II Flipping to Polymerization. In: *Chemical reviews* 122 (9), S. 8884–8910. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00773.
- Larson, Thomas R.; Yother, Janet (2017): Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide is linked to peptidoglycan via a direct glycosidic bond to  $\beta$ -D-N-acetylglucosamine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (22), S. 5695–5700. DOI: 10.1073/pnas.1620431114.
- Lazarevic, V.; Karamata, D. (1995): The tagGH operon of Bacillus subtilis 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. In: *Molecular microbiology* 16 (2), S. 345–355. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02306.x.
- Li, Y.; Gong, H.; Zhan, R.; Ouyang, S.; Park, K. T.; Lutkenhaus, J.; Du, S. (2021): Genetic analysis of the septal peptidoglycan synthase FtsWI complex supports a conserved activation mechanism for SEDS-bPBP complexes. In: *PLoS genetics* 17 (4), e1009366. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009366.
- Lifely, M. R.; Tarelli, E.; Baddiley J. (1980): The teichuronic acid from the walls of Bacillus licheniformis A.T.C.C. 9945. In: *The Biochemical journal* 191 (2), S. 305–318. DOI: 10.1042/bj1910305.
- Matsuno, K.; Suzuki, S. (2008): Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. In: *Analytical Biochemistry* 375 (1), S. 53–59. DOI: 10.1016/j.ab.2008.01.002.
- Mauck, J.; Glaser, L. (1972): On the mode of in vivo assembly of the cell wall of Bacillus subtilis. In: *The Journal of biological chemistry* 247 (4), S. 1180–1187.
- Mazza, P.; Noens, E. E.; Schirner, K.; Grantcharova, N.; Mommaas, A. M.; Koerten, H. K. et al. (2006): MreB of Streptomyces coelicolor is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. In: *Molecular microbiology* 60 (4), S. 838–852. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05134.x.
- McCormick, J. R.; Flärdh, K. (2012): Signals and regulators that govern Streptomyces development. In: *FEMS microbiology reviews* 36 (1), S. 206–231. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x.
- Meeske, A. J.; Sham, L. T.; Kimsey, H.; Koo, B. M.; Gross, C. A.; Bernhardt, T. G.; Rudner, D. Z. (2015): MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in Bacillus subtilis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20), S. 6437–6442. DOI: 10.1073/pnas.1504967112.

- Mengin-Lecreulx, D.; Texier, L.; Rousseau, M.; van Heijenoort, J. (1991): The murG gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. In: *Journal of bacteriology* 173 (15), S. 4625–4636. DOI: 10.1128/jb.173.15.4625-4636.1991.
- Miguélez, E. M.; Hardisson, C.; Manzanal, M. B. (1999): Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. In: *The Journal of cell biology* 145 (3), S. 515–525. DOI: 10.1083/jcb.145.3.515.
- Mukherjee, P.; Sureka, K.; Datta, P.; Hossain, T.; Barik, S.; Das, K. P. et al. (2009): Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress. In: *Molecular microbiology* 73 (1), S. 103–119. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06750.x.
- Nadano, D.; Iwasaki, M.; Endo, S.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Inoue, Y. (1986): A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (25), S. 11550–11557.
- Nanninga, N. (1998): Morphogenesis of *Escherichia coli*. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 62 (1), S. 110–129.
- Naumova, I. B.; Shashkov, A. S.; Tul'skaya, E. M.; Streshinskaya, G. M.; Kozlova, Y. I.; Potekhina, N. V. et al. (2001): Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardiopsis*, and chemotaxonomic perspective. In: *FEMS microbiology reviews* 25 (3), S. 269–284. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00578.x.
- Noens, E. E. E.; Mersinias, V.; Traag, B. A.; Smith, C. P.; Koerten, H. K.; van Wezel, G. P. (2005): SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. In: *Molecular microbiology* 58 (4), S. 929–944. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04883.x.
- Ostash, B.; Shashkov, A. S.; Streshinskaya, G. M.; Tul'skaya, E. M.; Baryshnikova, L. M.; Dmitrenok, A. S. et al. (2014): Identification of *Streptomyces coelicolor* M145 genomic region involved in biosynthesis of teichulosonic acid-cell wall glycopolymer. In: *Folia microbiologica* 59 (4), S. 355–360. DOI: 10.1007/s12223-014-0306-6.
- Pal, M. K.; Ghosh, T. C.; Ghosh, J. K. (1990): Studies on the conformation of and metal ion binding by teichoic acid of *Staphylococcus aureus*. In: *Biopolymers* 30 (3-4), S. 273–277. DOI: 10.1002/bip.360300305.

- Pooley, H. M.; Abellan, F. X.; Karamata, D. (1991): A conditional-lethal mutant of *Bacillus subtilis* 168 with a thermosensitive glycerol-3-phosphate cytidyltransferase, an enzyme specific for the synthesis of the major wall teichoic acid. In: *Journal of general microbiology* 137 (4), S. 921–928. DOI: 10.1099/00221287-137-4-921.
- Pooley, H. M.; Abellan, F. X.; Karamata, D. (1992): CDP-glycerol:poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase, which is involved in the synthesis of the major wall teichoic acid in *Bacillus subtilis* 168, is encoded by *tagF* (*rodC*). In: *Journal of bacteriology* 174 (2), S. 646–649.
- Poralla, K.; Muth, G.; Härtner, T. (2000): Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *FEMS microbiology letters* 189 (1), S. 93–95. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09212.x.
- Qian, Z.; Yin, Y.; Zhang, Y.; Lu, L.; Li, Y.; Jiang, Y. (2006): Genomic characterization of ribitol teichoic acid synthesis in *Staphylococcus aureus*: genes, genomic organization and gene duplication. In: *BMC genomics* 7, S. 74. DOI: 10.1186/1471-2164-7-74.
- Read, N.; Howlett, R.; Smith, M. C. M. (2019): An operon encoding enzymes for synthesis of a putative extracellular carbohydrate attenuates acquired vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. In: *Microbiology (Reading, England)* 165 (2), S. 208–223. DOI: 10.1099/mic.0.000763.
- Rosenberger, R. F. (1976): Control of teichoic and teichuronic acid biosynthesis in *Bacillus subtilis* 168 $\text{trp}^-$ . In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 428 (2), S. 516–524. DOI: 10.1016/0304-4165(76)90060-X.
- Ruiz, N. (2009): *Streptococcus pyogenes* YtgP (Spy\_0390) complements *Escherichia coli* strains depleted of the putative peptidoglycan flippase MurJ. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (8), S. 3604–3605. DOI: 10.1128/AAC.00578-09.
- Santos-Beneit, F.; Fernández-Martínez, L. T.; Rodríguez-García, A.; Rodríguez García, A.; Martín-Martín, S.; Ordóñez-Robles, M. et al. (2014): Transcriptional response to vancomycin in a highly vancomycin-resistant *Streptomyces coelicolor* mutant. In: *Future microbiology* 9 (5), S. 603–622. DOI: 10.2217/fmb.14.21.
- Santos-Beneit, F.; Martín, J. F. (2013): Vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor* is phosphate-dependent but is not mediated by the PhoP regulator. In: *Journal of global antimicrobial resistance* 1 (2), S. 109–113. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.003.

Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P. (2008): The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (2), S. 234–258. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.

Schäberle, T. F.; Vollmer, W.; Fräsch, H. J.; Hüttel, S.; Kulik, A.; Röttgen, M. et al. (2011): Self-resistance and cell wall composition in the glycopeptide producer *Amycolatopsis balhimycina*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (9), S. 4283–4289. DOI: 10.1128/AAC.01372-10.

Schäffer, C.; Messner, P. (2005): The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 3), S. 643–651. DOI: 10.1099/mic.0.27749-0.

Schertzer, J. W.; Brown, E. D. (2003): Purified, recombinant TagF protein from *Bacillus subtilis* 168 catalyzes the polymerization of glycerol phosphate onto a membrane acceptor in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (20), S. 18002–18007. DOI: 10.1074/jbc.M300706200.

Schlag, M.; Biswas, R.; Krismer, B.; Kohler, T.; Zoll, S.; Yu, W. et al. (2010): Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. In: *Molecular microbiology* 75 (4), S. 864–873. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.07007.x.

Schleifer, K. H.; Kandler, O. (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. In: *Bacteriological Reviews* 36 (4), S. 407–477.

Schmid, R. F. (2019): Screening einer Transposon-Insertionsmutantenbank auf die Beteiligung chromosomal-codierter Gene am Plasmid-Transfer von *Streptomyces coelicolor*. Tübingen: Universitätsbibliothek Tübingen.

Setlow, P. (2007): I will survive: DNA protection in bacterial spores. In: *Trends in Microbiology* 15 (4), S. 172–180. DOI: 10.1016/j.tim.2007.02.004.

Sham, L. T.; Butler, E. K.; Lebar, M. D.; Kahne, D.; Bernhardt, T. G.; Ruiz, N. (2014): Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6193), S. 220–222. DOI: 10.1126/science.1254522.

Shashkov, A. S.; Kosmachevskaya, L. N.; Streshinskaya, G. M.; Evtushenko, L. I.; Bueva, O. V.; Denisenko, V. A. et al. (2002a): A polymer with a backbone of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a beta-glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124. In: *European journal of biochemistry* 269 (24), S. 6020–6025. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03274.x.

Shashkov, A. S.; Kozlova, I. I.; Streshinskaia, G. M.; Kosmachevskaia, L. N.; Bueva, O. V.; Evtushenko, L. I.; Naumova, I. B. (2001): The carbohydrate-containing cell wall polymers of

some species from the cluster "Streptomyces lavendulae". In: *Mikrobiologija* 70 (4), S. 477–486.

Shashkov, A. S.; Ostash, B. E.; Fedorenko, V. A.; Streshinskaya, G. M.; Tul'skaya, E. M.; Senchenkova, S. N. et al. (2012): Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145. In: *Carbohydrate research* 359, S. 70–75. DOI: 10.1016/j.carres.2012.05.018.

Shashkov, A. S.; Streshinskaya, G. M.; Tul'skaya, E. M.; Senchenkova, S. N.; Baryshnikova, L. M.; Dmitrenok, A. S. et al. (2016): Cell wall glycopolymers of *Streptomyces albus*, *Streptomyces albidoflavus* and *Streptomyces pathocidini*. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 109 (7), S. 923–936. DOI: 10.1007/s10482-016-0691-8.

Shashkov, A. S.; Tul'skaya, E. M.; Evtushenko, L. I.; Denisenko, V. A.; Ivanyuk, V. G.; Stomakhin, A. A. et al. (2002b): Cell wall anionic polymers of *Streptomyces* sp. MB-8, the causative agent of potato scab. In: *Carbohydrate research* 337 (21-23), S. 2255–2261. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00188-X.

Shashkov, A. S.; Tul'skaya, E. M.; Streshinskaya, G. M.; Senchenkova, S. N.; Avtukh, A. N.; Evtushenko, L. I. (2009): New cell wall glycopolymers of the representatives of the genus *Kribbella*. In: *Carbohydrate research* 344 (16), S. 2255–2262. DOI: 10.1016/j.carres.2009.08.010.

Sieradzki, K.; Pinho, M. G.; Tomasz, A. (1999): Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (27), S. 18942–18946. DOI: 10.1074/jbc.274.27.18942.

Sigle, S.; Ladwig, N.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2015): Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 305 (2), S. 183–189. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.014.

Sigle, S.; Steblau, N.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2016a): A toolbox to measure changes in the cell wall glycopolymer composition during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *Journal of microbiological methods* 128, S. 52–57. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.07.002.

Sigle, S.; Steblau, N.; Wohlleben, W.; Muth, G. (2016b): Polydiglycosylphosphate Transferase PdtA (SCO2578) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Is Crucial for Proper Sporulation and Apical Tip Extension under Stress Conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 82 (18), S. 5661–5672. DOI: 10.1128/AEM.01425-16.

Sigle, S. A. (2016): Dynamik der Zellwandzusammensetzung während der morphologischen Differenzierung von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Tübingen: Universitätsbibliothek Tübingen.

Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. (2010): The bacterial cell envelope. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (5), a000414. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414.

Smith, R. L.; Gilkerson, E. (1979): Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. In: *Analytical Biochemistry* 98 (2), S. 478–480. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90170-2.

Smucker, R. A.; Pfister, R. M. (1978): Characteristics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) aerial spore rodlet mosaic. In: *Canadian journal of microbiology* 24 (4), S. 397–408. DOI: 10.1139/m78-066.

Soldo, B.; Lazarevic, V.; Karamata, D. (2002): tagO is involved in the synthesis of all anionic cell-wall polymers in *Bacillus subtilis* 168. In: *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 7), S. 2079–2087. DOI: 10.1099/00221287-148-7-2079.

Sperisen, P.; Schmid, C. D.; Bucher, P.; Zilian, O. (2005): Stealth proteins: in silico identification of a novel protein family rendering bacterial pathogens invisible to host immune defense. In: *PLoS computational biology* 1 (6), e63. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0010063.

Tul'skaya, E. M.; Shashkov, A. S.; Senchenkova, S. N.; Akimov, V. N.; Bueva, O. V.; Stupar, O. S.; Evtushenko, L. I. (2007): Anionic polymers of the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM Ac-2534. In: *Russ J Bioorg Chem* 33 (2), S. 251–257. DOI: 10.1134/S1068162007020070.

Tul'skaya, E. M.; Shashkov, A. S.; Streshinskaya, G. M.; Senchenkova, S. N.; Potekhina, N. V.; Kozlova, Yu I.; Evtushenko, L. I. (2011a): Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 76 (7), S. 736–744. DOI: 10.1134/S0006297911070030.

Tul'skaya, E. M.; Streshinskaya, G. M.; Shashkov, A. S.; Senchenkova, S. N.; Avtukh, A. N.; Baryshnikova, L. M.; Evtushenko, L. I. (2011b): Novel teichulosonic acid from cell walls of some representatives of the genus *Kribbella*. In: *Carbohydrate research* 346 (13), S. 2045–2051. DOI: 10.1016/j.carres.2011.06.003.

Ultee, E.; van der Aart, L. T.; van Dissel, D.; Diebolder, C. A.; van Wezel, G. P.; Claessen, D.; Briegel, A. (2019): Teichoic acids anchor distinct cell wall lamellae in an apically growing bacterium (106).

Unsleber, S. (2017): Degradation and recovery of the peptidoglycan - wall teichoic acid - complex in *Bacillus subtilis*. Tübingen: Universitätsbibliothek Tübingen.

van der Aart, L. T.; Spijksma, G. K.; Harms, A.; Vollmer, W.; Hankemeier, T.; van Wezel, G. P. (2018): High-Resolution Analysis of the Peptidoglycan Composition in *Streptomyces coelicolor*. In: *Journal of bacteriology*.

- van der Es, D.; Hogendorf, W. F. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. (2017): Teichoic acids: synthesis and applications. In: *Chemical Society reviews* 46 (5), S. 1464–1482. DOI: 10.1039/c6cs00270f.
- Vimr, E. R.; Kalivoda, K. A.; Deszo, E. L.; Steenbergen, S. M. (2004): Diversity of microbial sialic acid metabolism. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68 (1), S. 132–153. DOI: 10.1128/membr.68.1.132-153.2004.
- Vollmer, B.; Steblau, N.; Ladwig, N.; Mayer, C.; Macek, B.; Mitousis, L. et al. (2019): Role of the Streptomyces spore wall synthesizing complex SSSC in differentiation of Streptomyces coelicolor A3(2). In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 309 (6), S. 151327. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.07.001.
- Vollmer, W.; Bertsche, U. (2008): Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (9), S. 1714–1734. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007.
- Vollmer, W.; Blanot, D.; Pedro, M. A. de (2008): Peptidoglycan structure and architecture. In: *FEMS microbiology reviews* 32 (2), S. 149–167. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
- Ward, J. B. (1981): Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. In: *Microbiological Reviews* 45 (2), S. 211–243.
- Weidenmaier, C.; Kokai-Kun, J. F.; Kristian, S. A.; Chanturiya, T.; Kalbacher, H.; Gross, M. et al. (2004): Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. In: *Nature medicine* 10 (3), S. 243–245. DOI: 10.1038/nm991.
- Weidenmaier, C.; Peschel, A. (2008): Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. In: *Nature reviews. Microbiology* 6 (4), S. 276–287. DOI: 10.1038/nrmicro1861.
- Welsh, M. A.; Schaefer, K.; Taguchi, A.; Kahne, D.; Walker, S. (2019): Direction of Chain Growth and Substrate Preferences of Shape, Elongation, Division, and Sporulation-Family Peptidoglycan Glycosyltransferases. In: *Journal of the American Chemical Society* 141 (33), S. 12994–12997. DOI: 10.1021/jacs.9b06358.
- White, P. J. (1977): A survey for the presence of teichuronic acid in walls of Bacillus megaterium and Bacillus cereus. In: *Journal of general microbiology* 102 (2), S. 435–439. DOI: 10.1099/00221287-102-2-435.
- Wildermuth, H.; Hopwood, D. A. (1970): Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor. In: *Journal of general microbiology* 60 (1), S. 51–59. DOI: 10.1099/00221287-60-1-51.

- Wildermuth, H.; Wehrli, E.; Horne, R. W. (1971): The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. In: *Journal of Ultrastructure Research* 35 (1), S. 168–180. DOI: 10.1016/S0022-5320(71)80149-1.
- Wolters, P. J.; Hildebrandt, K. M.; Dickie, J. P.; Anderson, J. S. (1990): Polymer length of teichuronic acid released from cell walls of *Micrococcus luteus*. In: *Journal of bacteriology* 172 (9), S. 5154–5159. DOI: 10.1128/jb.172.9.5154-5159.1990.
- Wosten, H. A. B.; Vries, O. M. H. de; Wessels, J. G. H. (1993): Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. In: *The Plant Cell* 5 (11), S. 1567–1574. DOI: 10.1105/tpc.5.11.1567.
- Wu, T. C.; Park J. T. (1971): Chemical characterization of a new surface antigenic polysaccharide from a mutant of *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of bacteriology* 108 (2), S. 874–884. DOI: 10.1128/jb.108.2.874-884.1971.
- Xia, G.; Kohler, T.; Peschel, A. (2010): The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 300 (2-3), S. 148–154. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.10.001.
- Yamamoto, H.; Miyake, Y.; Hisaoka, M.; Kurosawa, S. I.; Sekiguchi, J. (2008): The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative DL-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*. In: *Molecular microbiology* 70 (2), S. 297–310. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06397.x.
- Yoneyama, T.; Araki, Y.; Ito, E. (1984): The primary structure of teichuronic acid in *Bacillus subtilis* AHU 1031. In: *European journal of biochemistry* 141 (1), S. 83–89. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08160.x.
- Zhang, Y. X.; Denoya, C. D.; Skinner, D. D.; Fedechko, R. W.; McArthur, H. A. I.; Morgenstern, M. R. et al. (1999): Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. In: *Microbiology* 145 (Pt 9), S. 2323–2334. DOI: 10.1099/00221287-145-9-2323.

*Mein besonderer Dank gilt...*

... Prof. Dr. Wohlleben für die Möglichkeit meine Forschungsarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie durchzuführen.

... Dr. Günther Muth, für die exzellente Betreuung, die Prüfung meiner Arbeit und das große Engagement. Vielen Dank für die konstruktive Kritik, das fachliche Wissen und die lösungsorientierte Art, von denen ich im Rahmen dieser Arbeit profitieren durfte.

... Prof. Dr. Karl Forchhammer für die Begutachtung meiner Arbeit und Erstellung des Zweitgutachtens.

... Prof. Dr. Andreas Peschel für das entgegengebrachte Interesse für meine Arbeit und die Teilnahme als Prüfer bei der mündlichen Prüfung.

... Annette Latus, für die Zuarbeit, die Erzeugung der Komplementationen und einzelner Mutanten.

... Regina Prägitzer (geborene Schmid), für die Entdeckung sowie erste Charakterisierung der SCO2594::TnpHL734 Mutante.

... Prof. Dr. Christopher Mayer und Dr. Axel Walter für die Messung meiner Proben mittels HPLC-MS und die fachmännische Unterstützung bei der Auswertung der HPLC-MS Daten.

... Dr. Lina Thoma, Dr. Steffen Sigle und Bernd Vollmer für die anregenden Diskussionen und das wegweisende Feedback.

... Andreas Kulik, Thomas Härtner, Aysun Engelhard, Janina Lemaire und Pierre Lemaire. Eure Unterstützung erleichtert uns die Arbeit ungemein.

... allen Mitarbeitern des Lehrstuhls! Vielen Dank für die spannenden Gespräche während des Mittagessen, die interessanten Lehrstuhlseminare sowie für das großartige Arbeitsklima. Ich nehme viele schöne Erinnerungen aus meiner Doktoranden-Zeit dank euch mit.

...meinem Partner Joachim Kienzler für die unentwegte Motivation und das Verständnis, besonders an grauen Tagen. Vielen Dank für den Rückhalt und die Unterstützung.

...meinen Eltern Olga und Johann Steblau, die mir das ermöglicht haben und denen ich diese Arbeit widmen möchte. Vielen Dank für die grenzenlose Unterstützung, Liebe und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.