

**Die Rolle von Mre- Proteinen und Teichonsäuren 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

Eva- Maria Margarete Kleinschnitz

aus Bad Mergentheim

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation: 04. 05. 2012

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Hantke

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Die Zellgestalt von Bakterien.....	2
2.2	Das Wachstum und die Differenzierung von Streptomyceten.....	5
2.2.1	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).....	5
2.2.2	Der Lebenszyklus von Streptomyceten	6
2.3	Die Zellwandsynthese.....	9
2.3.1	Die Peptidoglykansynthese	9
2.3.2	Das Wachstum von Bakterien und die Stäbchenform	18
2.3.3	Die Zellteilung , FtsZ und das Divisom	20
2.3.4	Die Mre- Proteine und die Zellwandsynthese	23
2.3.5	Anionische Zellwandpolymere	30
2.3.6	Mutationen, die zum Verlust der Stäbchenform führen.....	38
2.4	Das bakterielle Zytoskelett.....	40
2.4.1	Aktin und seine prokaryontischen Homologe	41
2.4.2	Tubulin und seine prokaryontischen Homologe	42
2.4.3	Intermediärfilamente und ihre prokaryontischen Homologe.....	44
2.5	Die Ziele dieser Arbeit	46
3	Material und Methoden	47
3.1	Bakterienstämme	47
3.2	Nährmedien und Zusätze	48
3.2.1	Flüssigmedien und Agar	48
3.2.2	Indikatormedien	49
3.2.3	Antibiotika	50
3.3	Oligonukleotide	51
3.4	Plasmide, Vektoren, Cosmide.....	54
3.5	Puffer und Lösungen	55

3.6	Chemikalien und andere Materialien.....	62
3.7	Die Kultivierung von Bakterien.....	65
3.7.1	Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	65
3.7.2	Die Herstellung einer Glycerinkultur.....	65
3.7.3	Kulturbedingungen für Streptomyceten.....	65
3.7.4	Die Herstellung einer Sporensuspension von Streptomyceten.....	65
3.8	DNA- Aufnahme durch Bakterien.....	66
3.8.1	Die Transformation von <i>E. coli</i> - Stämmen.....	66
3.8.2	Die Protoplastentransformation bei Streptomyceten (Kieser <i>et al.</i> , 1982).....	67
3.8.3	Die Kolonie- PCR.....	68
3.9	Die Plasmidisolierung.....	69
3.9.1	Die alkalische Lyse (Minipräparation).....	69
3.9.2	Die Plasmidisolierung aus BTH101- Zellen (Alkalische Lyse mit Phenol- Chloroform-Extraktion).....	69
3.9.3	Die Qiagen- Lyse (Maxipräparation).....	70
3.9.4	Die Lyse nach Eckhard.....	70
3.9.5	Die Plasmidisolierung aus Streptomyceten.....	70
3.10	Vom PCR- Produkt zum Plasmid.....	72
3.10.1	Die PCR (polymerase chain reaction).....	72
3.10.2	Die Agarose- Gelelektrophorese.....	72
3.10.3	Die Aufreinigung von PCR- Produkten.....	73
3.10.4	Der Restriktionsverdau.....	73
3.10.5	Die Phenol- Chloroform- Extraktion vor der Ligation.....	74
3.10.6	Die Ligation.....	74
3.11	Das Bacterial Two Hybrid System (BTH) (Karimova <i>et al.</i> , 1998).....	75
3.11.1	Klonierungen für das BTH.....	76
3.11.2	Die Suche nach Interaktionspartnern mit dem BTH.....	76
3.11.3	β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen.....	77

3.12	Die Konstruktion und das Screening einer <i>S. coelicolor</i> - Genbank	79
3.12.1	Die Isolierung von genomischer DNA aus Streptomyceten	79
3.12.2	Die Konstruktion einer Genbank	79
3.12.3	Das Testen der Diversität und Insertrate einer Genbank.....	81
3.12.4	Das Screening einer Genbank.....	82
3.13	Die Erzeugung und der Nachweis von Deletionsmutanten.....	84
3.13.1	Die Erzeugung der Mutanten	84
3.13.2	Der Nachweis einer Deletionsmutanten mittels Southern Blot.....	84
3.13.3	Die Komplementation einer Deletionsmutante	86
3.14	Phänotypische Untersuchungen von Deletionsmutanten	87
3.14.1	Mikroskopie und Sporenmessungen.....	87
3.14.2	Die physiologische Charakterisierung der Mutanten.....	87
3.14.3	Die TEM- Mikroskopie	88
3.15	Die Aufreinigung von Peptidoglykan und WTA aus Streptomyceten.....	89
3.15.1	Aufschlussmethoden für Streptomyceten	89
3.15.2	Die Zellwandisolierung aus Streptomyceten.....	89
3.15.3	Die WTA- Isolierung aus Zellextrakten (Peschel et al., 1999).....	90
3.15.4	Die WTA- Isolierung nach (Meredith et al., 2008).....	90
3.15.5	Die WTA- Isolierung nach dem Protokoll von K. Schirner, Boston	91
3.15.6	Der Phosphatnachweis zur Quantifizierung von WTA (Chen et al., 1956).....	91
3.15.7	Die WTA- PAGE mit Tris/Tricin- Puffer (Meredith et al., 2008).....	91
3.15.8	Die WTA- PAGE mit TBE- Puffer (Brown et al., 2008).....	92
3.15.9	Die Alcianblue- und Silberfärbung von WTA- PAGE- Gelen.....	92
4	Ergebnisse.....	94
4.1	Die Interaktionspartner der Mre- Proteine und ihre Beteiligung an der Sporenwandsynthese von <i>S. coelicolor</i>	94
4.1.1	Proteins encoded by the <i>mre</i> gene cluster in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) cooperate in spore wall synthesis.....	94
4.1.2	Die Mre- Proteine von <i>S. coelicolor</i> interagieren mit bifunktionellen PBPs.....	107

4.1.3	Das morphogene Membranprotein, SCO2097, ist an der Sporenwandsynthese beteiligt	108
4.1.4	Die Überexpression von Mre- Proteinen hat bei <i>E. coli</i> Auswirkungen auf die Zellform und beeinträchtigt das Wachstum von Streptomyceten	111
4.1.5	The MreB- like protein Mbl of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis	114
4.2	Teichonsäuren und ihre Beteiligung an der morphologischen Differenzierung von <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).....	124
4.2.1	Genetic analysis of SCO2997 encoding a TagF homologue indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).....	124
4.2.2	Teichonsäuren synthetisierende Enzyme interagieren mit Komponenten des Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex.....	129
4.2.3	Die Zellwände der Δ mreB- Mutanten und der SCO2997(tagF)- Mutanten enthalten weniger Wandteichonsäuren als die des WT.....	130
5	Diskussion.....	133
5.1	Die Sporenwandsynthese bei <i>S. coelicolor</i> erfolgt durch einen Komplex, welcher dem Peptidoglykansynthesekomplex für die laterale Zellwandsynthese von stäbchenförmigen Bakterien entspricht	133
5.1.1	RodZ und MreC spielen zentrale Rollen im Sporenwandsynthesekomplex.....	134
5.1.2	MreB interagiert nicht mit sich selbst oder den anderen Mre- Proteinen im Peptidoglykansynthesekomplex.....	136
5.2	Der <i>Streptomyces</i> Spore wall Synthesizing Complex.....	139
5.2.1	SCO2097 ist ein morphogenes Protein des <i>Streptomyces</i> Spore wall Synthesizing Complex.....	140
5.2.2	Kann die konstruierte Genbank alle <i>S. coelicolor</i> Gene enthalten?	141
5.3	Die Verknüpfung von Sporenwand- und Wandteichonsäuresynthese.....	143
5.3.1	Das LCP- Protein SCO2578 interagiert mit den Mre- Proteinen	144
5.3.2	Mutationen in Genen, welche für Teichonsäuren synthetisierende Enzyme kodieren, führen zu einer gestörten Sporenwandsynthese.....	146
5.4	Wird die Sporenwandsynthese durch Serin / Threoninkinasen reguliert?	148
6	Eigenanteil.....	150

7	Anhang.....	151
7.1	Der <i>Streptomyces</i> Spore Wall Synthesizing Complex.....	151
7.1.1	Supplementary information: Proteins encoded by the <i>mre</i> gene cluster in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) co- operate in spore wall synthesis	151
7.1.2	Das BTH: Übersicht aller Interaktionen	161
7.1.3	Das BTH: Konstruierte Plasmide	168
7.1.4	Expressionsplasmide	178
7.1.5	Supplementary information: The MreB- like protein Mbl of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis	180
7.2	Wandteichonsäuren	184
7.2.1	Supplementary information: Genetic analysis of <i>SCO2997</i> encoding a TagF homologue indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	184
7.2.2	Zur Erzeugung und Komplementation der <i>tagF</i> - Mutanten (EMK2997) konstruierte Plasmide..	190
7.2.3	Die Phosphatgehalte der Wandteichonsäureaufreinigungen.....	190
7.2.4	Die DNA- Verunreinigungen der Wandteichonsäureaufreinigungen.....	191
7.3	Abkürzungsverzeichnis	193
7.4	Tabellenverzeichnis	195
7.5	Abbildungsverzeichnis.....	198
8	Literatur	201

1 Zusammenfassung

Das *mre*- Gencluster ist bei vielen stäbchenförmigen Bakterien für das laterale Längenwachstum und die Ausbildung der Zellgestalt verantwortlich. Obwohl die filamentös wachsenden Streptomycceten ein von DivIVA abhängiges apikales Spitzenwachstum zeigen, besitzen sie auch ein *mre*- Gencluster bestehend aus *mreB*, *mreC*, *mreD*, *PBP2* und *sfr* (*rodA*). Geninaktivierungsexperimente haben gezeigt, dass *Streptomyces coelicolor* A3(2) die *mre*- Gene während der morphologischen Differenzierung für die Ausbildung einer stressresistenten Sporenwand benötigt.

Um mehr über die Funktion der Mre- Proteine bei der Sporenwandsynthese herauszufinden, wurden Bacterial Two Hybrid (BTH) Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Interaktionsmuster, wie es für den lateralen Zellwandsynthesekomplex stäbchenförmiger Bakterien beschrieben ist. Es wurde eine *S. coelicolor*- Genbank angelegt und gescreent; dabei konnten bisher unbekannte Interaktionspartner der Mre- Proteine identifiziert werden. Darunter befanden sich ein vom *dcw*- Gencluster kodiertes, für Actinomyceten spezifisches Membranprotein unbekannter Funktion (SCO2097), eine Serin / Threoninkinase vom Eukaryontentyp (SCO4778) sowie zwei möglicherweise an der Teichonsäurebiosynthese beteiligte Proteine (SCO2578, SCO2584). Geninaktivierungsexperimente führten zu den Mutanten Δ 2097 und EMK2584; diese waren den *mre*- Mutanten sehr ähnlich und produzierten morphologisch auffällige Sporen. Dies bestätigte die Beteiligung der mit der Genbank identifizierten Interaktionspartner an der Sporulation.

Des Weiteren wurde die auf Grund der Proteininteraktionen vermutete Verknüpfung von Sporenwand- und Teichonsäuresynthese näher untersucht. Dafür wurde das *S. coelicolor* Genom nach möglichen Teichonsäurebiosynthesegenen durchsucht. Es wurden zwei Gencluster identifiziert, welche unter anderem für acht Glycosyl / Glycerophosphotransferasen kodieren. Eine Deletionsmutante der *tagF* homologen Glycerophosphotransferase SCO2997 wurde konstruiert. Die Mutante war in ihrem vegetativen Wachstum nicht beeinträchtigt. Ihre Sporen jedoch besaßen eine unregelmäßige Form mit einer signifikant vom Wildtyp M145 unterschiedlichen Längenverteilung. Außerdem waren die Sporen empfindlicher gegenüber Hitze, Lysozym und Vancomycin. Dies lässt auf eine defekte Sporenwand schließen.

Die Ergebnisse der BTH- Experimente ergaben ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen den Mre- Proteinen, Penicillinbindeproteinen, morphogenen Proteinen sowie an der Teichonsäuresynthese beteiligten Proteinen. Funktionelle Beziehungen wurden durch die Phänotypen der Deletionsmutanten unterstützt und führten zum Modell des *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex (SSSC). Der SSSC ist sowohl an der Peptidoglykan- als auch an der Teichonsäuresynthese der Sporenwand beteiligt.

2 Einleitung

2.1 Die Zellgestalt von Bakterien

Unterschiedliche Bakterienarten zeigen eine große Vielfalt an Formen (Abbildung 2-1). Es gibt neben Kokken und Stäbchen, auch Myzel bildende Bakterien, keulen- oder sternförmige, schraubig gewundene, kommaförmige und viele mehr (Young, 2006, Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007). Innerhalb derselben Art werden Gestalt und Größe von einer Generation zur nächsten weitergegeben (Schwarz & Leutgeb, 1971, Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007). Während der morphologischen Differenzierung oder als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen kann sich diese Gestalt jedoch wandeln (Siefert & Fox, 1998). Besonders bei grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt findet man oft komplexe Lebenszyklen und Morphologien; dafür gibt es ein genetisch festgelegtes Programm (Siefert & Fox, 1998). Die Ursprungsgestalt des Bakteriums ist wahrscheinlich das Stäbchen gewesen (Siefert & Fox, 1998). Kokken stammen von stäbchenförmigen Bakterien ab, entweder durch Verlust von oder Beeinträchtigung des durch PBP2 vermittelten Längenwachstums (Siefert & Fox, 1998, Tamames *et al.*, 2001).

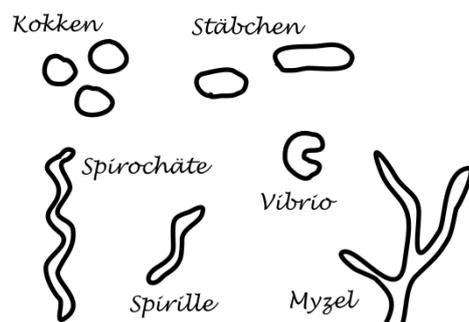


Abbildung 2-1. Bakterienmorphologien

Wichtige Kriterien für eine bestimmte Morphologie sind z. B. die limitierenden Faktoren der Nährstoffaufnahme und der Diffusion (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007). Die Diffusionseffizienz ist dabei abhängig vom Verhältnis Oberfläche zu Volumen (Schulz & Jørgensen, 2001). Auch die Fähigkeiten des Anheftens an Oberflächen und der Bildung von Biofilmen hängen von der Form ab, weil Scherkräfte unterschiedlich auf verschieden geformte Körper wirken

(van Loosdrecht *et al.*, 1990, Nicoletta *et al.*, 1996). Die Optimierung des Zell- Zell- oder des Zell-Oberflächen- Kontaktes ist ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Biofilmen, welche wiederum von der Form abhängt (Shapiro & Hsu, 1989, James *et al.*, 1995). Eine Stäbchenform ist hilfreich für zielgerichtete Bewegungen (Dusenbery, 1998, Young, 2006) und eine bilaterale Symmetrie erleichtert die gleichmäßige Verteilung von Chromosomen und zytoplasmatischen Proteine auf die Tochterzellen (Helmstetter & Leonard, 1990). Bestimmte Ernährungs- und Fortbewegungsformen oder ein bestimmter Lebensraum geben so die Rahmenbedingungen für Größe und Gestalt vor (Cooper & Denny, 1997, Takeuchi *et al.*, 2005, Young, 2006). Die Zellgestalt ist wichtig für das Überleben in einer definierten Umgebung; sie wurde und wird durch die Evolution geformt (Young, 2006).

Was gibt der Bakterienzelle ihre konkrete Gestalt?

Das Grundgerüst der Zellwand besteht aus komplexen Polysacchariden, die zu einem einzigen großen dreidimensionalen Molekül, dem Mureinsacculus, vernetzt sind (Schleifer & Kandler, 1972, Shockman et al., 1996, van Heijenoort, 2001). Der Mureinsacculus gibt die Zellgestalt des Bakteriums wieder (Weidel *et al.*, 1960, Höltje, 1998, Vollmer & Höltje, 2004), wenn er entfernt wird, bleibt die Gestalt der Zelle nicht erhalten (Henning *et al.*, 1972); der Verlust des Murein führt so zu runden Spheroplasten von eigentlich stäbchenförmigen *E. coli* oder *B. subtilis* Zellen (Weibull, 1953, Pitzurra & Szybalski, 1959).

Das Murein, auch Peptidoglykan genannt, kann bis zu 80% des Zellwandtrockengewichts bei grampositiven Bakterien ausmachen (Ward, 1984). Meist sind es aber nur 40- 50%. Weitere 30- 50% der Zellwand bestehen aus Teichonsäuren und anderen Polysacchariden und ca 10% aus Proteinen (Abbildung 2-2A) (Archibald *et al.*, 1961, Ward, 1984). Peptidoglykan ist das Zellwandpolymer, welches grampositiven und gramnegativen Bakterien gemein ist (Schleifer & Kandler, 1972). Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht aber nur zu etwa 10% aus Peptidoglykan zudem aus Lipopolysacchariden, Lipoproteinen, dem Periplasma und einer äußeren Membran (Abbildung 2-2B) (Schleifer & Kandler, 1972).

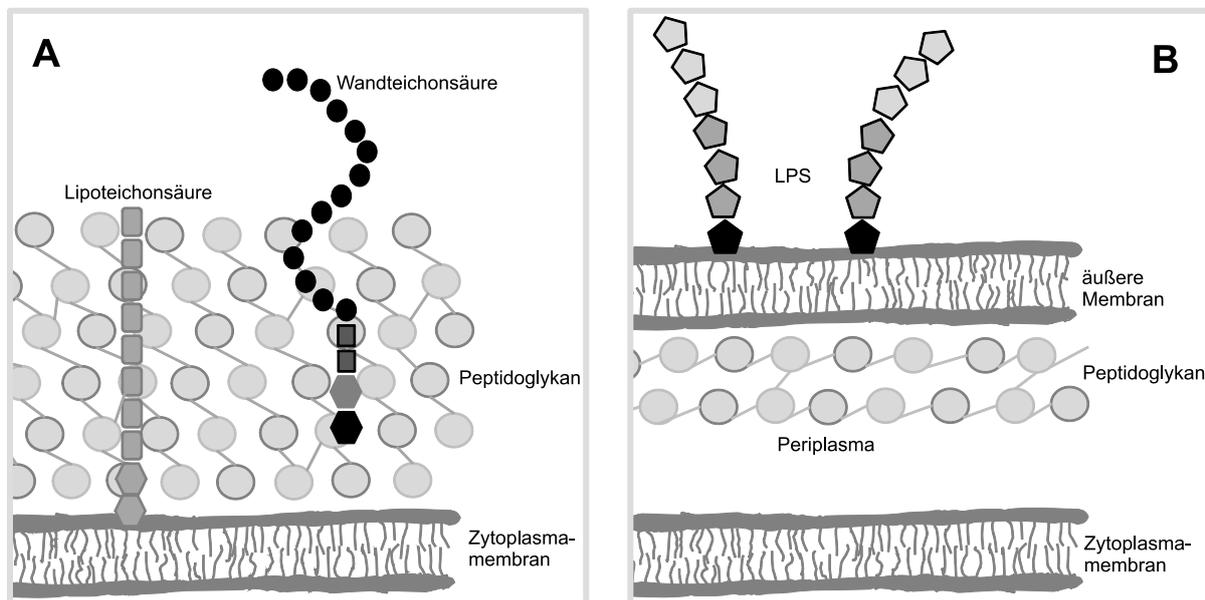


Abbildung 2-2. Modell der Zellwand. (A) Die Zellwand von grampositiven Bakterien. Grampositive Bakterien besitzen nur eine Membran. Ihre Peptidoglykanschicht besteht aus vielen Lagen. In der Zytoplasmamembran sind die Lipoteichonsäuren verankert, welche in die Peptidoglykanschicht hineinragen. Wandteichonsäuren sind direkt mit dem Peptidoglykan verknüpft und ragen über dieses heraus. Proteine und weitere Polysaccharide wurden zu Gunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. (B) Die Zellwand von gramnegativen Bakterien. Gramnegative Bakterien besitzen eine innere und eine äußere Membran. Dazwischen befinden sich das Periplasma und ein bis drei Lagen Peptidoglykan. In der äußeren Membran sind die Lipopolysaccharide verankert.

Das Peptidoglykangeflecht ist elastisch; es kann sich reversibel ausdehnen und zusammenziehen (Koch & Woeste, 1992). Dies ist auf die flexiblen Peptidbrücken zurückzuführen. Der Glykananteil ist wesentlich unnachgiebiger (Burge *et al.*, 1977a, Lapidot & Irving, 1979, Vollmer & Höltje, 2004). Das Peptidoglykannetzwerk wird zudem durch Teichon- und Teichuronsäuren stabilisiert (Burge *et al.*, 1977a, Burge *et al.*, 1977b, Matias & Beveridge, 2005). Isolierte Zellwände von *B. subtilis* behalten ihre Form bei; entfernt man jedoch die Teichonsäuren, verlieren sie diese. Es besteht die Annahme, dass die Interaktionen von protonierten D-Alaningruppen der Teichonsäuren mit den Carboxylgruppen des Peptidoglykans dessen Konformation bestimmen und so der Zellhülle Festigkeit und Stabilität geben (Neuhaus & Baddiley, 2003, Matias & Beveridge, 2005).

Das aktinähnliche Zytoskelett, welches vor einiger Zeit bei Bakterien entdeckt wurde, erhält alleine nicht deren Form. Andererseits nimmt ohne ein intaktes Zytoskelett das Peptidoglykan auch nicht die richtige Gestalt an. Es wurde gezeigt, dass das aktinähnliche Protein MreB die Zellformen von *B. subtilis* (Jones *et al.*, 2001, Formstone & Errington, 2005), *E. coli* (Kruse *et al.*, 2005), *C. crescentus* (Figge *et al.*, 2004), *R. sphaeroides* (Slovak *et al.*, 2005) und die Sporenform von *S. coelicolor* (Mazza *et al.*, 2006) beeinflusst. Die Steifheit einer *E. coli* Zelle wird durch eine Depolymerisierung von MreB-Filamenten, z. B. durch das Antibiotikum A22 (S-(3,4-Dichlorbenzyl) isothioharnstoff), erniedrigt. MreB trägt hier fast so viel zur Festigkeit der Zelle bei wie die Peptidoglykanzellwand (Wang *et al.*, 2010). Die Zellwand und das MreB-Zytoskelett sind folglich die Hauptdeterminanten der Zellform von stäbchenförmigen Bakterien (Domínguez-Escobar *et al.*, 2011).

Die Zellwand hält dem Turgor der Zelle stand, sie stabilisiert die Zellmembran und gibt der Zelle ihre Form (Tipper & Strominger, 1965, Shockman *et al.*, 1996, Bhavsar & Brown, 2006, Campbell *et al.*, 2011, Swoboda *et al.*, 2010). Zytoplasmatische Zytoskelettproteine, wie MreB oder FtsZ, kontrollieren die Zellgestalt und deren Veränderungen; aber die Form der Bakterienzelle wird letztlich durch die mechanische Stabilität der Peptidoglykanhülle erhalten (Popham & Young, 2003, Harold, 2007, Young, 2010).

2.2 Das Wachstum und die Differenzierung von Streptomyceten

2.2.1 *Streptomyces coelicolor* A3(2)

S. coelicolor A3(2) bzw. seine plasmidfreie Variante M145 (Abbildung 2-3) aus der Gattung der Actinomyceten ist ein Modellorganismus (Buchanan, 1917, Goodfellow & Williams, 1983). Aufgrund seines komplexen Lebenszyklus eignet er sich zum Studium von Differenzierungsvorgängen (Chater, 1993). Sein lineares Chromosom von 8 Mb wurde physikalisch und genetisch kartiert (Kieser *et al.*, 1992, Redenbach *et al.*, 1996) Er ist der erste Streptomycet dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Bentley *et al.*, 2002) und es gibt geeignete Vektoren, Transformationssysteme sowie etablierte Verfahren zur Mutagenese, um ihn zu manipulieren und zu untersuchen (Hopwood, 1959, Suarez & Chater, 1980, Thompson *et al.*, 1982a, Hopwood, 1999).



Abbildung 2-3. *Streptomyces coelicolor* M145. Auf Soja- Mannit- Agar ca vier Tage bei 29°C gewachsen. Es sind sowohl weiße (Luftmyzel) als auch graue (Sporen) Kolonien zu erkennen. Die Blaufärbung des Agars ist auf die Produktion von Actinorhodin zurückzuführen.

Streptomyceten sind grampositive, obligat aerobe unbewegliche Bodenbakterien mit myzelartigem verzweigtem Wachstum. Während ihres vegetativen Wachstums erschließen sie organische Materialien aus dem Boden wie z.B. Zellulose, Chitin, Lignin und Xylan. Dies geschieht mit Hilfe von sekretierten extrazellulären Enzymen wie Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Lipasen und Nucleasen. Sie erhalten so das ökologische Gleichgewicht im Boden (McCarthy & Williams, 1992). Der GC- Gehalt von Streptomyceten liegt bei über 70%. Sie sind überwiegend apathogen und besitzen einen ausgeprägten Sekundärmetabolismus (Lechevalier & Lechevalier, 1967, Goodfellow & Williams, 1983, Woese, 1987, Hood *et al.*, 1992, Wright & Bibb, 1992). So produzieren

Streptomyceten und verwandte Bakterien mehr als zwei Drittel der medizinisch angewandten Antibiotika sowie Antitumorsubstanzen, Immun-suppressiva, Fungizide und Herbizide (Demain, 1999, Bérdy, 2005). *S. coelicolor* A3(2) produziert mindestens vier verschiedene Antibiotika: Actinorhodin (Wright & Hopwood, 1976a), Undecylprodigiosin (Red) (Rudd & Hopwood, 1980), Methylenomycin (Wright & Hopwood, 1976b) und CDA, ein Antibiotikum, das Ca²⁺-abhängig Poren in Membranen macht (Lakey *et al.*, 1983). Streptomyceten sind nicht nur als Antibiotikaproduzenten, sondern auch als Ursprung von Resistenzen interessant (Benveniste & Davies, 1973).

2.2.2 Der Lebenszyklus von Streptomyceten

Um die industrielle Produktion von Antibiotika erhöhen zu können, ist es wichtig, die Differenzierung zu verstehen (Chater, 1990). Am Lebenszyklus von Streptomyceten (Abbildung 2-4) besteht folglich auch ein wirtschaftliches Interesse. Auf Festmedium beginnt die Antibiotikaproduktion, wenn sich das Luftmyzel bildet, in Flüssigkultur beim Übergang zur stationären Phase. Die Antibiotikaproduktion und die Differenzierung werden, als Reaktionen auf Nahrungsmittelknappheit, gemeinsam kontrolliert (Martínez-Costa *et al.*, 1996, Chakraborty & Bibb, 1997). Hinweise auf eine gemeinsame Regulierung der Differenzierung und der Produktion von Sekundärmetaboliten sind die Phänotypen von Mutanten, welche unfähig sind zu sporulieren und auch kein Antibiotikum mehr produzieren. Es gibt nichtsporulierende Mutanten, die den *bld* (bald) und *whi* (white) Klassen zugeordnet werden (Chater, 1993). Die meisten der *bld*- und *whi*- Gene kodieren für regulatorische Proteine (Chater, 2001). *whi*- Mutanten bleiben weiß, sie können Luftmyzel, zum Teil auch Sporen, aber kein graues Sporenpigment synthetisieren (Chater, 1972). *bld*- Mutanten zeigen pleiotropische Defekte. Hierbei handelt es sich um Defekte bei der Kohlenstoff- Katabolitrepression und der Differenzierung (Kelemen & Buttner, 1998). So produzieren *bld*- Mutanten unter bestimmten Bedingungen weder Luftmyzel noch Sporen zudem sind sie in der Produktion von Antibiotika beeinträchtigt (Merrick, 1976). Die morphologischen Defekte der *bld*- Mutanten sind von der Kohlenstoffquelle abhängig. Je nach Kohlenstoffquelle können sie, mit Ausnahme der *bldB*- Mutante, ein Luftmyzel und Sporen bilden: Handelt es sich bei der Kohlenstoffquelle um Glukose, Mannose oder Cellobiose kommt es nicht zur Luftmyzelbildung; handelt es sich jedoch um Mannitol, Arabinose, Galactose, Maltose oder Glycerin wird das Luftmyzel gebildet (Merrick, 1976, Champness, 1988). *bldA*-, *baldB*-, *baldC*-, *baldD*-, *baldG*- und *baldH*- Mutanten verfügen über eine konstitutive (galaktoseunabhängige, glukoseunempfindliche) Expression des Galaktoseoperons. Es wird daher angenommen, dass diese *bld*- Mutanten unfähig sind, ein Hungersignal zu senden oder darauf zu reagieren, und deshalb keine morphologische und physiologische Differenzierung zeigen (Pope *et al.*, 1996).

Der Lebenszyklus von *S. coelicolor* (Abbildung 2-4) beginnt mit dem Auskeimen der Spore. Diese schwillt an und bildet einen oder zwei Keimschläuche, welche durch Verzweigungen zum Substratmyzel auswachsen (Ensign, 1978, Flärdh & Buttner, 2009). Das Substratmyzel besteht aus multigenomischen verzweigten Hyphen (Chater, 1993) und wächst durch apikales Spitzenwachstum (Gray *et al.*, 1990, Miguélez *et al.*, 1992). Das Spitzenwachstum sowie die Entstehung von Verzweigungen werden durch das coiled- coil Protein DivIVA positioniert (Abbildung 2-5A) (Hempel *et al.*, 2008). Die vegetativen Hyphen enthalten in unregelmäßigen Abständen Septen, welche das Filament in multigenomische Kompartimente unterteilen (Chater, 1993). In Flüssigkultur bildet *S. coelicolor* nur Substratmyzel. Es gibt jedoch auch Streptomycetenarten, welche in Flüssigkultur sporulieren (Kendrick & Ensign, 1983, Rueda *et al.*, 2001). Das Luftmyzel wird bei Nährstoffknappheit,

Stress und zu hoher Zelldichte unter Lyse und Verwertung des Substratmyzels gebildet (Wildermuth, 1970, Miguélez et al., 1992); es besteht aus unverzweigten, nichtseptierten Hyphen, ist dicker als das Substratmyzel und wird von einer hydrophoben Hülle umgeben (Williams et al., 1972, Ensign, 1978).

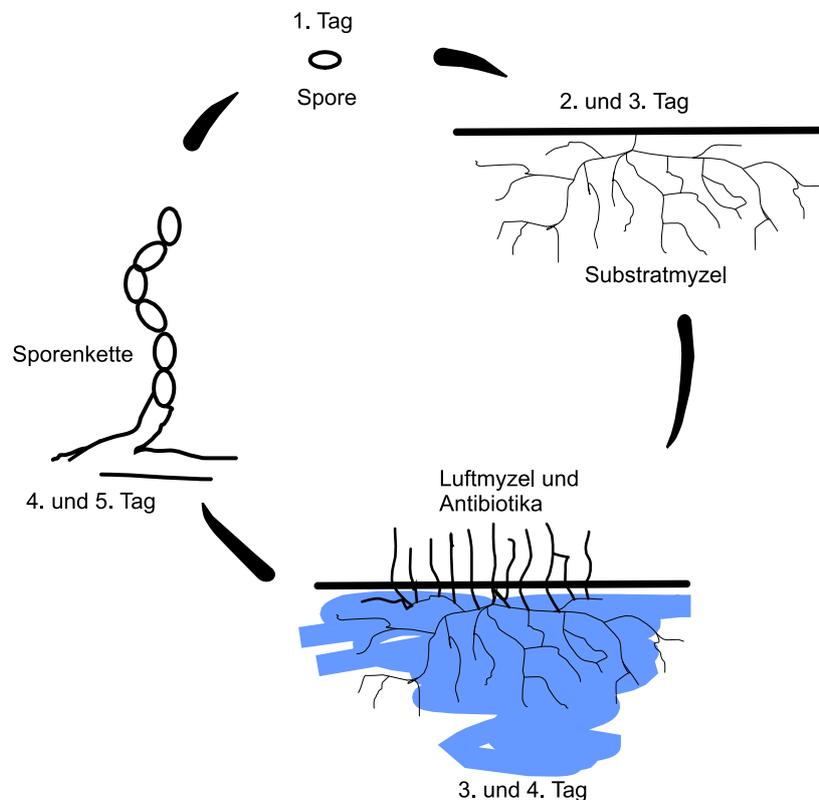


Abbildung 2-4. Der Lebenszyklus von *S. coelicolor* auf Festmedium. Unter geeigneten Bedingungen keimt die Spore aus und bildet ein Geflecht von vegetativem Myzel. Nach ca drei Tagen erhebt sich das unverzweigte weiße Luftmyzel aus dem Medium. Während dieser Zeit beginnt auch die Produktion von Antibiotika. Ein oder zwei Tage später werden Trennwände in das Luftmyzel eingezogen und es kommt zur Produktion des grauen Sporenpigments. Nach etwa fünf Tagen ist die Sporenbildung abgeschlossen und der Zyklus kann von neuem beginnen.

Das Luftmyzel und die Sporen sind von einer hydrophoben Proteinschicht aus Rodlins und Chaplins, welche die Oberflächenspannung reduzieren, umgeben (Claessen et al., 2002, Claessen et al., 2003, Elliot et al., 2003, Claessen et al., 2004). Zudem hilft das hydrophobe Peptid SapB dem Myzel, die Oberflächenspannung zu überwinden, damit es aus dem Medium in die Luft hinein wachsen kann (Willey et al., 1991, Tillotson et al., 1998). SapB ist ein den Lantibiotika ähnliches Peptid, welches vom *ramS*-Gen kodiert wird (Kodani, 2004). Die *bld*-Gene sind entweder direkt oder indirekt an der Generierung von extrazellulären Signalen beteiligt, welche für die Produktion von SapB benötigt werden (Willey et al., 1991, Willey et al., 1993). Die SapB-Produktion ist in *bld*-Mutanten (mit Ausnahme von *bldM* und *bldN*), die auf glukosehaltigem Medium wachsen, blockiert (Capstick et al., 2007). Auf Minimalmedium, welches Mannitol oder Arabinose als Kohlenstoffquelle enthält, wird SapB weder vom Wildtyp noch von den *bld*-Mutanten produziert (Willey et al., 1991).

Das Luftmyzel windet sich und bildet synchron Septen in regelmäßigen Abständen (Wildermuth, 1970, McCormick & Losick, 1996, Schwedock *et al.*, 1997, Flärdh *et al.*, 2000). FtsZ legt die Lokalisierung dieser Septen fest, indem es zu einem helikalen Filament innerhalb des Luftmyzels polymerisiert; dieses baut sich dann zu einzelnen Ringstrukturen um (Grantcharova *et al.*, 2005). Die Ringe sind in regelmäßigen Abständen leiterartig angeordnet (Abbildung 2-5B) (Schwedock *et al.*, 1997). Die Expression von FtsZ und die Ausbildung der FtsZ-Leitern wird durch die *whi*-Gene kontrolliert (Schwedock *et al.*, 1997, Flärdh *et al.*, 2000). FtsZ ist nicht essentiell für das vegetative Wachstum von *S. coelicolor*; ohne FtsZ gibt es jedoch keine Querwände, keine Septierung und keine Sporenbildung (McCormick *et al.*, 1994).

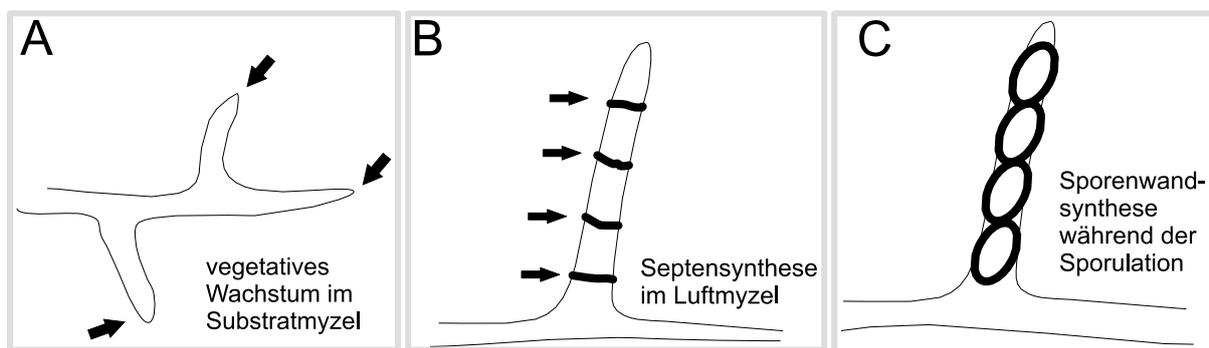


Abbildung 2-5. Das Zellwandwachstum und die Zellteilung bei Streptomycceten. (A) Das vegetative Zellwandwachstum findet an der Hyphenspitze statt (schwarze Pfeile). (B) Erst während der Zellteilung im Luftmyzel werden regelmäßige Septen eingezogen (schwarze Pfeile). (C) Anschließend erfolgt die Zellwandsynthese rund um das Innere der Spore (schwarze Umrandung).

Nach der Septierung des Luftmyzels erfolgt die Sporensynthese rund um das Innere der Spore herum (Abbildung 2-5C). Streptomyccetensporen sind relativ stressresistente Dauerstadien aber dennoch stoffwechselaktiv (Hirsch & Ensign, 1978). Sie besitzen eine hydrophobe Oberfläche und bauen Hopanoide, als Schutz vor Sauerstoff und Wasserverlust, in ihre Membran als ein (Poralla *et al.*, 2000). Ihre Zellwand ist verdickt und sie sind resistent gegenüber moderater Hitze, Ultraschall, enzymatischem Abbau (Lysozym), sowie Trockenheit (Glauert & Hopwood, 1961, McBride & Ensign, 1987). Die Einlagerung von Trehalose als Speicherstoff könnte eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Trockenheit und Hitze spielen (Crowe *et al.*, 1984, McBride & Ensign, 1987).

2.3 Die Zellwandsynthese

2.3.1 Die Peptidoglykansynthese

Das Peptidoglykan besteht aus zwei Aminozuckern, der N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und dem N-Acetylglucosamin (GlcNAc), welche linear über eine β 1,4-glykosidische Bindung verknüpft sind (Schleifer & Kandler, 1972). Die Carboxylgruppe eines jeden N-Acetylmuraminsäurerestes ist mit einer Peptidkette substituiert; diese besteht aus L- und D-Aminosäuren. Im neusynthetisierten Peptidoglykan sind dies meist L-Alanyl- γ -D-Glutamyl-Diaminopimelyl (oder L-Lysyl)-D-Alanyl-D-Alanin (Schleifer & Kandler, 1972, van Heijenoort, 2001). Im reifen Peptidoglykan verliert die Peptidkette einen oder beide Alanin-Rest(e) und ist oft quervernetzt. Dies geschieht über die ω -Aminogruppe der Diaminosäure zur Carboxylgruppe eines D-Ala einer anderen Peptiduntereinheit entweder direkt oder über kurze Peptidbrücken. Bei *S. coelicolor* erfolgt die Quervernetzung über einen Glycin-Rest (Abbildung 2-6) (Leyh-Bouille *et al.*, 1970, Hong *et al.*, 2004, Schäberle *et al.*, 2011).

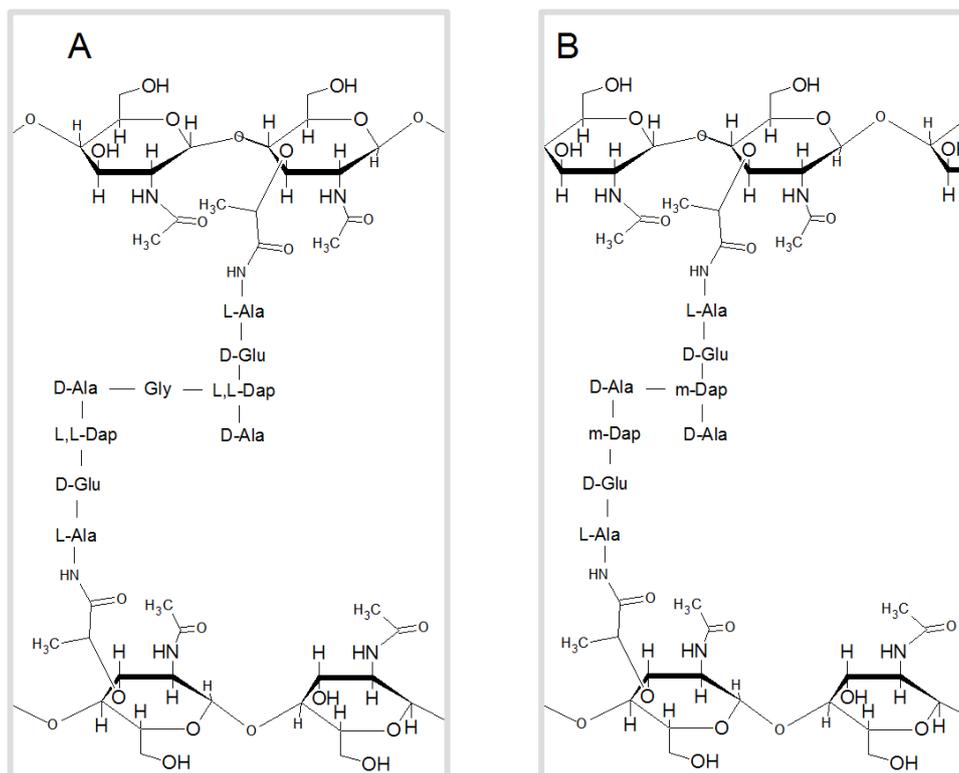


Abbildung 2-6. Das Peptidoglykan von *S. coelicolor* A3(2) (A) und *E. coli* (B). Das Peptidoglykan besteht aus alternierenden β 1,4- verknüpften MurNAc- und GlcNAc- Untereinheiten. Diese sind über Peptide vernetzt. (A) Bei *S. coelicolor* bestehen die Peptidketten aus L-Ala- D- Glu- L, L- Dap- D- Ala- D- Ala; die Quervernetzung erfolgt über eine Glycinbrücke. (B) Bei *E. coli* sind die Peptidketten aus L-Ala- D- Glu- m-Dap- D- Ala- D- Ala direkt miteinander verknüpft.

Die Glykanstränge sind nicht zufällig ausgerichtet, sondern umgeben die Zelle auf eine sehr regelmäßige Art und Weise (Burman & Park, 1984). Bei stäbchenförmigen Bakterien sind sie im rechten Winkel zur langen Achse der Zelle orientiert, d. h., sie winden sich um deren kurze Achse (Abbildung 2-7) (Verwer *et al.*, 1978, Yao *et al.*, 1999, Gan *et al.*, 2008, Domínguez-Escobar *et al.*, 2011, Garner *et al.*, 2011). Die Glykanstränge sind von variabler Länge (Koch, 2000). Bei *E. coli* bestehen sie aus durchschnittlich 30 Dimeren, oft werden aber auch kurze Fragmente von nur fünf bis zehn Dimeren gefunden (Höltje, 1998, Harz *et al.*, 1990, Schindler *et al.*, 1976, Glauner *et al.*, 1988). Bei *S. aureus* sind es überwiegend drei bis sechs Disaccharideinheiten (Boneca *et al.*, 2000). Sie sind viel zu kurz, um die Zelle vollständig zu umschließen (Yao *et al.*, 1999).

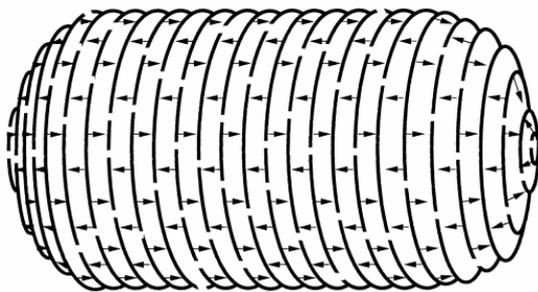


Abbildung 2-7. Schematische Zeichnung des Mureinsacculus (Höltje, 1998). Die parallelen Linien, welche sich um die kurze Achse des Zylinder umwinden, stellen die Glykanstränge und die Pfeile die Quervernetzungen durch Peptide dar.

2.3.1.1 Die Synthese der Peptidoglykanvorstufen

Die Synthese der Peptidoglykanvorstufen bei *E. coli* und *B. subtilis* erfolgt durch die von *murABCDEFG* und *mraY* kodierten Proteine (Daniel & Errington, 1993, Barreteau *et al.*, 2008). Die Vorstufen werden im Zytoplasma synthetisiert (Abbildung 2-8). MurA katalysiert den Transfer von Enolpyruvat auf UDP- GlcNAc (Gunetileke & Anwar, 1968, Marquardt *et al.*, 1992). Anschließend reduziert MurB das Pyruvat zu D- Lactat (Pucci *et al.*, 1992, Tayeh *et al.*, 1995). So entsteht UDP- N- Acetylmuramat, auf das durch vier ATP- abhängige Aminoligasen (MurCDEF) die Aminosäuren und das D- Ala- D- Ala- Dipeptid übertragen werden (Ito & Strominger, 1962a, Ito & Strominger, 1962b, Barreteau *et al.*, 2008, Mattei *et al.*, 2010). Das so entstandene UDP- N- Acetylmuramylpentapeptid (UDP- MurNAc- Pentapeptid) wird vom integralen Membranprotein MraY (Ikeda *et al.*, 1991) auf den Membrananker Bactoprenol (Undecaprenylphosphat) übertragen; es entsteht Lipid I (Higashi *et al.*, 1967). Anschließend fügt das Enzym MurG GlcNAc an, so entsteht Lipid II (Salmond *et al.*, 1980, Ward, 1984). Es wird vermutet, dass das Lipid II von den integralen Membranproteinen der SEDS- Familie (shape elongation division & sporulation) wie z. B. den Homologen RodA oder FtsW durch die Zytoplasmamembran transportiert wird (Ehlert & Höltje, 1996, Mattei *et al.*, 2010, Mohammadi *et al.*, 2011). SEDS- Proteine aktivieren, transportieren und / oder lokalisieren Penicillinbindeproteine (PBPs) bzw. PG- Vorstufen (Ishino *et al.*, 1986, Mercer & Weiss, 2002). Dieser Vorgang ist an die Transglykosylierung gekoppelt (van Dam *et al.*, 2007). Sowohl RodA als auch FtsW kommen bei vielen

stäbchenförmigen Eubakterien vor, wohingegen es in Kokken wahrscheinlich nur ein Homolog gibt (Scheffers & Pinho, 2005, Höltje, 1998, Henriques *et al.*, 1998).

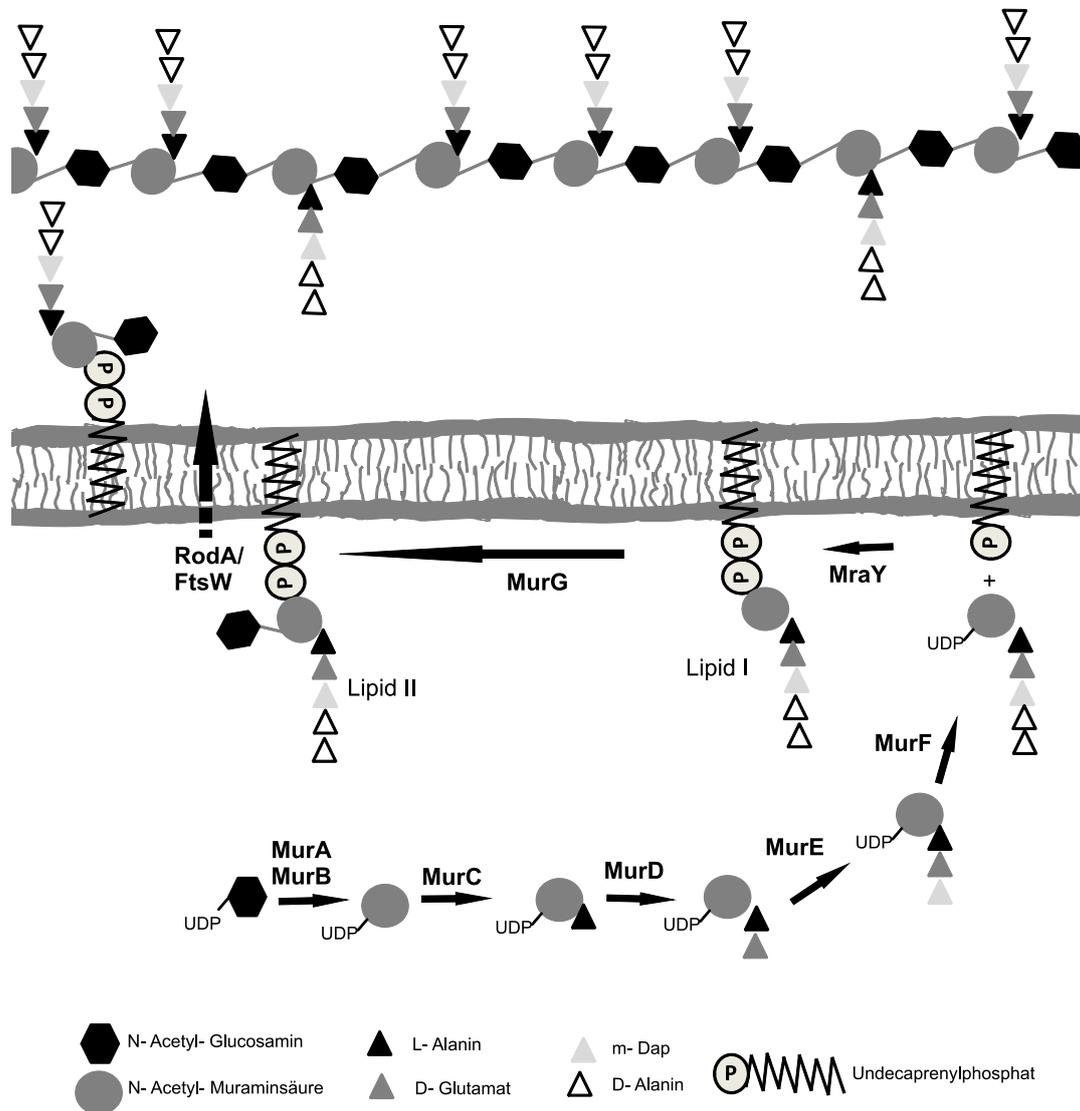


Abbildung 2-8. Schematische Darstellung der Peptidoglykanvorstufensynthese von *B. subtilis*. Die Peptidoglykanvorstufensynthese findet im Zytoplasma statt. MurA überträgt Enolpyruvat auf UDP- GlcNAc und MurB reduziert das Pyruvat. So entsteht UDP- N- Acetyl- Muraminsäure. MurC, D, E und F addieren die Aminosäuren. MraY überträgt das UDP- N- Acetylmuramylpentapeptid auf den Membrananker Undecaprenylpyrophosphat. Es entsteht Lipid I. MurG fügt GlcNAc an und bildet so Lipid II. Die integralen Membranproteine RodA bzw. FtsW transportieren die Vorstufen durch die Membran.

2.3.1.2 PBPs, der Einbau und die Modifikation von Peptidoglykan

Glykosyltransferasen verknüpfen die Disacchariduntereinheiten zu Glykansträngen, Transpeptidasen vernetzen die Glykanstränge über Peptidbindungen (Höltje, 1998). Dabei wird das terminale D- Ala freigesetzt, daraus stammt die Energie für die Reaktion (Goffin & Ghuysen, 1998, Vollmer & Höltje, 2004, Scheffers & Pinho, 2005). Anschließend wird der Undecaprenylphosphatlinker abgespalten,

dephosphoryliert und wieder verwendet (Scheffers & Pinho, 2005, El Ghachi *et al.*, 2005, Tatar *et al.*, 2007) (Abbildung 2-9).

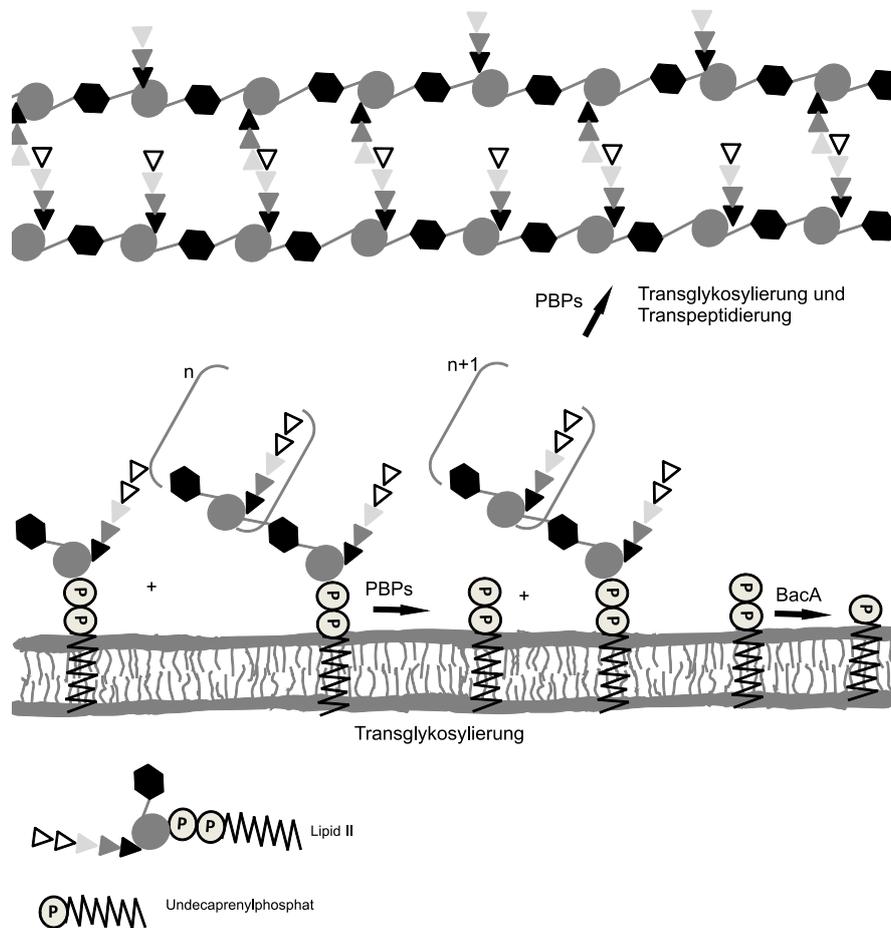


Abbildung 2-9. Die Peptidoglykansynthese. Die Synthese von Peptidoglykan findet im Periplasma, bzw. extrazellulär statt. Penicillinbindeproteine werden sowohl für die Transglykosylierung als auch die Transpeptidierung benötigt. Zunächst werden die Peptidoglykanvorstufen (Lipid II = Undecaprenylpyrophosphat-Disaccharid-Pentapeptid) durch die Membran transportiert. Anschließend werden die Disaccharidpentapeptid-Einheiten auf einen entstehenden Glykanstrang übertragen (Transglykosylierung), dabei wird das Undecaprenylpyrophosphat abgespalten und durch das Enzym BacA dephosphoryliert, damit der Linker erneut für die Peptidoglykanvorstufensynthese zur Verfügung stehen kann. Ein neusynthetisierter Glykanstrang wird in das bestehende Peptidoglykan mittels Transpeptidierung eingefügt. Nach dem „three-for-one“ Modell (Abbildung 2-10) geschieht dies, indem ein alter Strang durch drei neue Stränge ersetzt wird.

Penicillinbindeproteine polymerisieren und modifizieren das Peptidoglykan. Es gibt drei Klassen von PBPs. Penicillinbindeproteine der Klasse A sind hochmolekulare PBPs. Diese Enzyme sind bifunktionelle Peptidoglykansynthetasen (Popham & Young, 2003). Sie besitzen C-terminal eine Penicillinbindedomäne, welche für die Transpeptidierung (Crosslinking oder Quervernetzung) zuständig ist. N-terminal enthalten sie einen Membrananker und eine Domäne mit Glykosyltransferaseaktivität für die Verknüpfung der Disacchariduntereinheiten (Ghuysen, 1991, Goffin & Ghuysen, 1998, van Heijenoort, 2001, Sauvage *et al.*, 2008).

Die Klasse B der hochmolekularen PBPs besitzt ebenfalls C-terminal eine Transpeptidaseaktivität und eine N-terminale Domäne unbekannter Funktion. Diese könnte eine Chaperonfunktion bei der Faltung wahrnehmen (Goffin *et al.*, 1996) oder als Erkennungsstelle für die Interaktion mit Proteinen, welche eine Rolle im Zellzyklus und bei der Morphogenese spielen, dienen (Nguyen-Distèche *et al.*, 1998, Marrec-Fairley *et al.*, 2000, Sauvage *et al.*, 2008).

PBPs mit niedrigem Molekulargewicht (LMW PBPs) gehören zur Klasse C; sie synthetisieren kein Peptidoglykan, sondern modifizieren es (Popham & Young, 2003). D, D-Carboxypeptidasen wie z. B. PBP5 und PBP6 von *E. coli* spalten das letzte D-Alanin des Stammpeptides ab und verhindern so die Transpeptidierung (Spratt & Strominger, 1976, Sauvage *et al.*, 2008). PBP4 und PBP7 von *E. coli* sind Endopeptidasen, welche die Peptidbindungen zwischen zwei Glykansträngen spalten (Popham & Young, 2003, Sauvage *et al.*, 2008, Vollmer *et al.*, 2008). LMW PBPs regulieren das Ausmaß der Quervernetzung durch Verändern der Substrate der HMW PBPs. So verändern sie die PG-Syntheseraten bzw. das Turnover (Meberg *et al.*, 2004, Vollmer *et al.*, 2008). Dies führt zu erheblichen Einflüssen auf die Zellgestalt (Popham & Young, 2003). LMW PBPs werden für die Aufrechterhaltung des Zelldurchmessers und die korrekte Bildung des Septums benötigt (Ghuysen, 1991, Scheffers & Pinho, 2005, Sauvage *et al.*, 2008).

PBPs ergänzen sich in ihrer Aktivität – haben aber dennoch spezifische Funktionen bei der Determination der Zellgestalt (Scheffers & Pinho, 2005); Zellteilung und Längenwachstum erfordern unterschiedliche Penicillinbindepoteine der Klasse B (Popham & Young, 2003). Der Komplex für das Längenwachstum bei *E. coli* beinhaltet PBP2 (Spratt, 1975). Zudem gibt es septumspezifische PBPs für die Zellteilung. Der Zellwandsynthesekomplex während der Zellteilung von *E. coli* benötigt PBP3, bei *Bacillus subtilis* PBP2B (Spratt, 1975, Höltje, 1996, Daniel *et al.*, 2000). Inaktivierung von PBP2 bzw. PBP3 bei *E. coli* führt zu Wachstum als Kokken bzw. als Filament (Spratt, 1975). PBP4 ist bei *S. aureus* zuständig für die Quervernetzung von Peptidoglykan am Teilungsseptum. Teichonsäuren regulieren das Ausmaß dieser Quervernetzung, indem sie die PBP4-Lokalisierung regulieren (Atilano *et al.*, 2010). PBP5 von *E. coli*, eine D, D-Carboxypeptidase, hat eine regulatorische Funktion. Sie spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der gleichmäßigen Gestalt der *E. coli* Stäbchen (Nelson & Young, 2000). PBP5-Mutanten haben einen veränderten Zelldurchmesser und eine gekrümmte, verzweigte Form (Nelson & Young, 2000, Ghosh & Young, 2003). Fehlt PBP5 steht eine größere Anzahl von Pentapeptidseitenketten zur Verfügung. Dies könnte sich auf die Konkurrenz von Längenwachstum und Zellteilung auswirken, was wiederum zu den unförmigen Zellformen führen könnte (Begg *et al.*, 1990, Popham & Young, 2003).

Bei *S. aureus* sind vier bzw. fünf PBPs bekannt (Hartman & Tomasz, 1984, Pinho *et al.*, 2000). *B. subtilis* besitzt 16 PBPs (Sauvage *et al.*, 2007), *E. coli* zwölf (Denome *et al.*, 1999, Sauvage *et al.*,

2008) und *S. coelicolor* 19 (Tabelle 2-1) (Sauvage et al., 2008). Es gibt zwei Vermutungen, welche die hohe Anzahl an PBPs bei Streptomycceten, erklären könnten. Zum einen besitzen Streptomycceten einen komplexen Lebenszyklus und es könnte sein, dass sie in den verschiedenen Lebensphasen unterschiedliches Peptidoglykan produzieren. Zum anderen sind einige von ihnen Produzenten von β -Lactamantibiotika und könnten unterschiedliche PBPs benötigen um sich vor ihren eigenen Antibiotika zu schützen (Ward & Hodgson, 1993, Sauvage et al., 2008).

Tabelle 2-1. Die PBPs von *S. coelicolor* zusammengestellt nach (Sauvage et al., 2008).

Klasse A	Klasse B	Klasse C
SCO2897	SCO2090 (PBP3)	SCO0830
SCO3901	SCO2608 (PBP2)	SCO2283
SCO5039	SCO3156	SCO3408
	SCO3157	SCO3811
	SCO3771	SCO4439
	SCO3847	SCO4847
	SCO4013	SCO6131
		SCO7050
		SCO7561

Es gibt auch Peptidoglykansynthese ohne PBPs. *B. subtilis* ist auch ohne Klasse A PBPs lebensfähig und synthetisiert ein relativ normales PG – folglich muss es alternative Glykosyltransferasen geben (McPherson & Popham, 2003). Nichtpenicillinbindende monofunktionelle Glykosyltransferasen sind ähnlich der Glykosyltransferase- Domäne der Klasse A PBPs aufgebaut (van Heijenoort, 2001, Sauvage et al., 2008) und werden von den *mgt*- Genen kodiert (Spratt et al., 1996). Mgt von *E. coli* synthetisiert nicht quervernetzte Glykanstränge aus der Peptidoglykanvorstufe Lipid II (Undecaprenylpyrophosphat- Disaccharid-Pentapeptid) (Hara & Suzuki, 1984, Di Berardino et al., 1996). Bei *E. coli* gibt es drei Phasen der Peptidoglykansynthese: Die Elongation, die Zellteilung und einen kurzen Intervall der Peptidoglykansynthese von inertem Peptidoglykan, dieser findet nach der FtsZ Polymerisation am Ort der beginnenden Septumsynthese statt (de Pedro et al., 1997). Dort entstehen später die neuen Zellpole (de Pedro et al., 2001). β -Lactame inhibieren die von FtsZ gesteuerte Zellwandsynthese direkt vor der Bildung des Divisoms nicht, deshalb wird sie PIPs genannt (PBP3- independent oder penicillin- insensitive- PG- synthesis) (Wientjes & Nanninga, 1989, Nanninga, 1991).

2.3.1.3 Modelle für den Einbau von Peptidoglykan

Während des Zellwachstums muss das Peptidoglykangerüst für den Einbau von neuen Disaccharidpentapeptiden kurzzeitig durchbrochen werden; gleichzeitig darf es seine Stabilität nicht

verlieren. Deshalb ist es sinnvoll, den Einbau von neuem Material genau zu regulieren und zu lokalisieren (Scheffers & Pinho, 2005). Bei grampositiven Bakterien erfolgt die Mureinsynthese nach dem „inside- to- outside“ Mechanismus. Neues Peptidoglykan wird direkt an der Außenseite der Zytoplasmamembran stressfrei eingebaut und an den äußeren Schichten von Hydrolasen wieder abgebaut (Koch, 1988, Graham & Beveridge, 1994, Höltje, 1998). Bevor das bestehende PG hydrolysiert wird, muss das neue Material eingebaut werden („make- before- break“ Modell) (Koch, 1985, Koch & Doyle, 1985, Höltje, 1996, Höltje, 1998). Dies kann durch Multienzymkomplexe, welche sowohl lytische als auch Peptidoglykan synthetisierende Enzyme enthalten, erfolgen (Abbildung 2-10) (Romeis & Höltje, 1994, Höltje, 1996, Höltje, 1998, Vollmer *et al.*, 1999). Es gibt für jede Art von Bindung im Peptidoglykan eine Hydrolase. Muramidasen, Glucosamidasen, Amidasen, Endopeptidasen und Carboxypeptidasen spielen bei vielen Prozessen eine wichtige Rolle: Der Zellteilung, dem Zellwandwachstum, dem Zellwandumbau, dem Recycling der Muropeptide, der morphologischen Differenzierung, der Bildung von Sporen sowie deren Auskeimung (Shockman *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 2000, Park & Uehara, 2008). Lipo- und Wandteichonsäuren regulieren deren Aktivität und verhindern so die Autolyse der Zellwand (Shockman *et al.*, 1996, Schlag *et al.*, 2010).

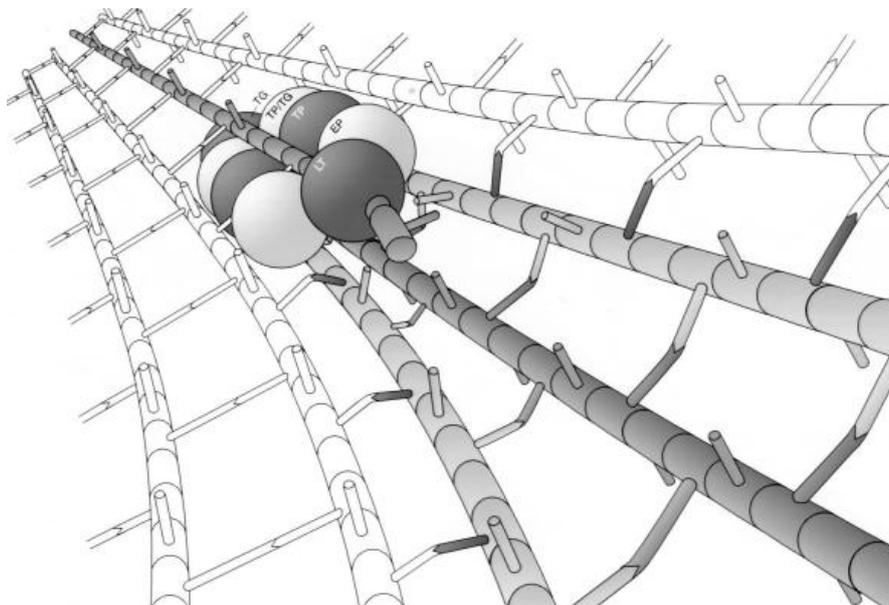


Abbildung 2-10. Das „three- for- one“ Modell und der Multienzymkomplex bei der Peptidoglykansynthese (Höltje, 1998). Ein Multienzymkomplex aus lytischen Transglykosylasen (LT), Endopeptidasen (EP), Transpeptidasen (TP), bifunktionellen Transpeptidasen / Transglykosylasen (TP / TG) und Transglykosylasen (TG) synthetisiert drei neue Stränge unterhalb eines alten, verknüpft diese rechts und links mit dem bestehenden Peptidoglykan und baut gleichzeitig den alten Strang ab.

Nach dem „three- for- one“ Modell werden drei miteinander verknüpfte Peptidoglykanstränge unter einem Strang im bestehenden Murein synthetisiert und rechts und links kovalent durch Transpeptidierung befestigt (Abbildung 2-10). Anschließend wird der sogenannte Akzeptorstrang entfernt (Koch, 1985, Höltje, 1996). Folglich wird ein alter durch drei neue Stränge ersetzt. Nur die

neuen Stränge können als Donor bei der Transpeptidierung dienen, weil sie noch das Pentapeptid besitzen (Burman & Park, 1984). Da die Glykanstränge im rechten Winkel zur langen Achse angeordnet sind, resultiert durch diese Art des Einbaus das Längenwachstum von stäbchenförmigen Bakterien (Verwer et al., 1978, Höltje, 1996). Das „three-for-one“ Modell erklärt auch das Murein-Turnover von 40- 50% bei *E. coli* und die Verdopplung der Zelllänge während einer Generation sowie das Auftreten von trimeren Quervernetzungen mit kurzer Halbwertszeit (Goodell, 1985, Höltje, 1996, Vollmer & Bertsche, 2008). Dieses Modell verlangt einen Multienzymkomplex aus Synthasen und Hydrolasen (Höltje, 1996, Höltje, 1998, Höltje & Heidrich, 2001). Proteininteraktionen zwischen bifunktionellen PBPs, monofunktionellen Transpeptidasen, lytischen Transglykosylasen, D,D-Endopeptidasen und Strukturproteinen wurden bereits beschrieben (Romeis & Höltje, 1994, von Rechenberg et al., 1996, Alaedini & Day, 1999, Schiffer & Höltje, 1999, Vollmer et al., 1999). Bei stäbchenförmigen Bakterien sollte es folglich mindestens zwei spezifische Multienzymkomplexe geben, einen für die Zellteilung und einen für das Elongations- oder das Verdickungswachstum der Zellwand (Höltje, 1998, van Heijenoort, 2001, Daniel & Errington, 2003, Scheffers & Pinho, 2005).

Bei gramnegativen Bakterien wird die Peptidoglykansynthese durch in der äußeren Membran verankerte Lipoproteine reguliert. Dies sind bei *E. coli* die Proteine LpoA und LpoB, welche durch Poren im Sacculus hindurchreichen, um auf der inneren Seite der Peptidoglykanschicht die Penicillinbindepoteine PBP1A bzw. PBP1B zu aktivieren (Paradis-Bleau et al., 2010, Typas et al., 2010). Der Porendurchmesser im Peptidoglykan bestimmt das Ausmaß der Aktivierung der PBPs durch die Lipoproteine.

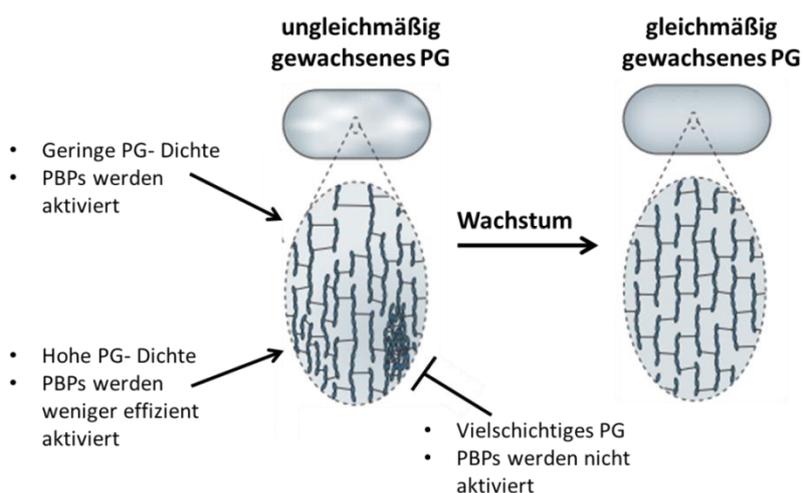


Abbildung 2-11. Modell des Einbaus von Peptidoglykanvorstufen bei gramnegativen Bakterien (Typas et al., 2012). Bei einer geringen Dichte des Peptidoglykannetzes können die Proteine der äußeren Membran die PBPs aktivieren und es kommt zu vermehrtem Einbau von PG- Vorstufen. Ist das Netzwerk dichter werden die PBPs weniger effizient aktiviert und es findet ein verminderter Einbau statt. Bei mehrschichtigem PG werden die PBPs gar nicht mehr aktiviert und es kommt zu keinem neuen Einbau von PG- Vorstufen. Auf diese Weise wird bei *E. coli* eine gleichmäßige Verteilung des Einbaus von Peptidoglykanvorstufen gewährleistet und eine konstante Schichtdicke erreicht.

Es kommt zu einem gleichmäßigen Einbau der Peptidoglykanvorstufen, da ein großer Porendurchmesser zu einer starken Aktivierung der PBPs und dem PG- Vorstufeneinbau führt, wohingegen ein kleiner Porendurchmesser oder eine zu dicke PG- Schicht kaum oder keine Aktivierung der PBPs zulässt (Abbildung 2-11). Durch einen hohen Turgor gedehntes Peptidoglykan besitzt größere Poren als weniger gedehntes. So wird die Peptidoglykansynthese über die Porengröße im PG auch an das Zellwachstum gekoppelt (Typas *et al.*, 2012).

Es gibt ferner die Vorstellung, dass neues Zellmaterial zufällig und diffus, kontinuierlich über die Länge der Zelle verteilt, eingebaut wird (Koch, 1982, Koch, 1990). Die „surface stress theory“ geht davon aus, dass die Zellwand aufgrund der Spannung, welche durch den osmotischen Druck erzeugt wird, wächst (Koch *et al.*, 1982). In der Zelle werden Nährstoffe angesammelt, dadurch steigt der osmotische Druckunterschied. Der Druck auf das Peptidoglykan steigt ebenfalls. Dies macht die Bindungen im Peptidoglykan anfälliger für hydrolytische Enzyme (Koch, 1985). Neues Material wird mit der Zellwand verknüpft, bevor an ausgewählten Stellen alte Verbindungen hydrolysiert werden. Die Spannung wird auf das neu eingefügte Material übertragen. Es wird dabei gedehnt und die Zelle kann sich vergrößern (Koch, 1985). Ein stabiles zylindrisches Wachstum erfolgt nur, wenn die Zellpole inert und fest sind. Das neue Material wird über die zylindrische Oberfläche verteilt eingebaut (Koch, 1985). Die Aufrechterhaltung eines konstanten Durchmessers in stäbchenförmigen gramnegativen Bakterien wird durch das Verhältnis von zwei Größen bestimmt, dem Turgor und der Energetik der Bildung der Bindungen in der Zellwand (Koch, 2000). Demzufolge ist kein Zytoskelett notwendig.

Es gibt viele Modelle, dennoch ist die Zellwandsynthese auf molekularer Ebene noch nicht wirklich verstanden. Der Turgor hat wahrscheinlich eine Auswirkung auf den Einbau von PG- Vorstufen und bestimmt mit das Zellwandwachstum und die Morphologie (Jiang & Sun, 2010, Koch, 2000). Ebenso spielen Multienzymkomplexe aus Peptidoglykansynthasen und –hydrolasen sowie das Zytoskelett eine Rolle (Höltje, 1998, Typas *et al.*, 2012). Neue hochauflösende bildgebende Verfahren könnten zu einem besseres Verständnis der Peptidoglykansynthese sowie deren Verknüpfung mit der Synthese anderer Zellwandpolymere führen.

2.3.1.4 Antibiotika und die Peptidoglykansynthese

Peptidoglykan kommt nur in prokaryontischen Zellwänden vor, sein Aufbau ist wenig variabel (Schleifer & Kandler, 1972) und die Verknüpfung der Disacchariduntereinheiten zum Mureinsacculus findet außerhalb der Zytoplasmamembran statt (Höltje, 2001). Deshalb ist die Peptidoglykansynthese ein guter Angriffsort für antibakteriell wirksame Substanzen und Medikamente (Höltje, 2001, van Dam *et al.*, 2009); sie ist z. B. das Ziel der β - Lactamantibiotika (z. B. Penicillin) (Park & Strominger,

1957), welche die hochmolekularen Penicillinbindeproteine (HMW PBPs) inhibieren. Ihr β -Lactamring bindet kovalent an einen Serin-Rest im aktiven Zentrum der Transpeptidase-Domäne, indem er den endständigen D-Ala / D-Ala-Rest der Pentapeptidkette imitiert (Tipper & Strominger, 1965, Ghuysen, 1991, Popham & Young, 2003). Eine Resistenz gegen β -Lactamantibiotika kann durch die Synthese von PBPs mit geringer Affinität oder von β -Lactamasen, welche den β -Lactamring der Penicilline hydrolysieren können, erreicht werden (Frère, 1995, Goffin & Ghuysen, 1998, Massova & Mobashery, 1998, Typas et al., 2012).

Die Zahl der Bakterien, die gegen Penicillin und verwandte Antibiotika resistent sind, steigt an. Inzwischen gibt es viele multiresistente Bakterien (Cegelski *et al.*, 2008). Sie entstehen durch den Selektionsdruck, welcher durch die weitverbreitete Anwendung von Antibiotika entsteht. Die empfindlichen Stämme werden gehemmt oder abgetötet und die resistenten können sich vermehren (Levy & Marshall, 2004). Deshalb ist es sinnvoll nach Antibiotikazielen zu suchen, die nicht überlebensnotwendig sind, sondern Virulenzfaktoren sind (Cegelski et al., 2008). Hier bietet sich z. B. die Teichonsäuresynthese an (Brown et al., 2008, Weidenmaier & Peschel, 2008).

2.3.2 Das Wachstum von Bakterien und die Stäbchenform

Peptidoglykan ist eine dynamische Struktur (Nanninga, 1991). Während die Bakterienzelle wächst und sich teilt, muss auch der Mureinsacculus wachsen und geteilt werden (Goodell, 1985). Gleichzeitig müssen die spezifische Form wie auch die mechanische Stabilität der Zellwand aufrechterhalten werden (Glauner & Höltje, 1990). Die Form des Bakteriums hängt davon ab, wo und wann der Einbau von neuem Peptidoglykan stattfindet (Koch et al., 1982). Bei kugelförmigen Zellen wie z. B. *S. aureus* kann nicht zwischen der Zellteilung und dem Zellwachstum unterschieden werden, beides erfolgt an der Zellteilungsebene (Abbildung 2-12) (Cole & Hahn, 1962, Pinho & Errington, 2003, Scheffers & Pinho, 2005).

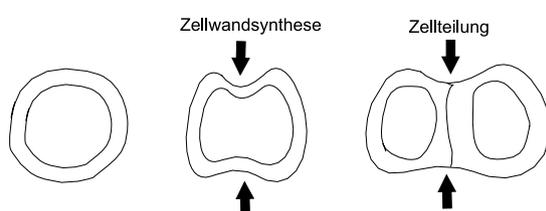


Abbildung 2-12 Die Zellwandsynthese bei kugelförmigen Bakterien. Neues Peptidoglykan wird an der Zellteilungsebene eingefügt. Es kann nicht zwischen der Zellteilung und dem Zellwachstum unterschieden werden.

Wo genau neues Peptidoglykan in die Wand stäbchenförmiger Bakterien eingebaut wird, ist unklar. Es gibt dazu verschiedene Aussagen: Diffus über den ganzen Zellzylinder verteilt (de Chastellier *et al.*, 1975, Anderson *et al.*, 1978, de Pedro *et al.*, 1997), an einer begrenzten Anzahl beweglicher Punkte, welche mit dem MreB Zytoskelett assoziiert und helikal lokalisiert sind (Daniel & Errington, 2003, den

Blaauwen *et al.*, 2003, den Blaauwen *et al.*, 2008), oder in Patches, welche im rechten Winkel um die lange Achse der Zelle herum wandern (Garner *et al.*, 2011, Domínguez-Escobar *et al.*, 2011). Die Lokalisierung des PG- Einbaus scheint dabei abhängig von der gewählten Untersuchungsmethode und deren Auflösung zu sein.

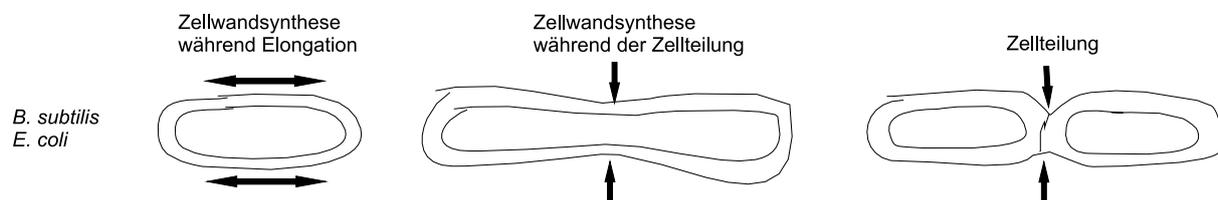


Abbildung 2-13. Die Zellwandsynthese und Zellteilung bei stäbchenförmigen Bakterien wie *B. subtilis* und *E. coli*. Die Pfeile geben den Ort der Zellwandsynthese an. Während des Längenwachstums erfolgt der Einbau von Peptidoglykan entlang des Zellzylinders. Während der Zellteilung verlagert er sich in die Zellmitte.

Das two-competing-sites Modell beschreibt, wie die stäbchenförmige Zellform von der Konkurrenz und Abwechslung zwischen dem Längenwachstum und der Septumsynthese abhängt (Satta *et al.*, 1980, Leo *et al.*, 1990). Neues Peptidoglykan wird erst am Septum, anschließend entlang der zylindrischen Zellwand eingebaut (Nanninga, 1991, de Pedro *et al.*, 1997, Scheffers & Pinho, 2005, Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007). Hat die Bakterienzelle eine bestimmte Länge erreicht, wird die Zellwandsynthese wieder in die Mitte verlagert, wo ein neues Septum entsteht (Abbildung 2-13) (Donachie *et al.*, 1976). Dies erfolgt in Koordination mit anderen vom Zellzyklus abhängigen Vorgängen wie z. B. der DNA-Synthese oder der Chromosomenverteilung (Figge *et al.*, 2004). An den Polen ist die Zellwand weitgehend inert, dort finden kaum Neusynthese oder Turnover statt (Anderson *et al.*, 1978, Burman *et al.*, 1983, Mobley *et al.*, 1984, Clarke-Sturman *et al.*, 1989, de Pedro *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass dies dazu beiträgt, den Zelldurchmesser konstant zu halten (Koch, 1988, Popham & Young, 2003). Der Zelldurchmesser könnte aber auch auf Grund der Tatsache, dass die neuen Stränge die gleiche Länge wie die alten, welche abgebaut werden, besitzen und dass das existierende Peptidoglykan entlang der Länge der Glykanstränge repliziert wird, beibehalten werden (Höltje, 1996).

Im Gegensatz zum lateralen Elongationswachstum von *E. coli* und *B. subtilis*, welches mit dem MreB-Zytoskelett in Verbindung gebracht wird, wachsen stäbchenförmige Coryne- und Mykobakterien, welche kein MreB besitzen, an den Zellpolen; die Zellteilung findet ebenfalls in der Zellmitte statt (Abbildung 2-14) (Daniel & Errington, 2003, Flärdh, 2003b). An dieser Art von Wachstum ist das auch bei Streptomyceten vorkommende coiled-coil Protein DivIVA beteiligt (Ramos *et al.*, 2003, Letek *et al.*, 2008).

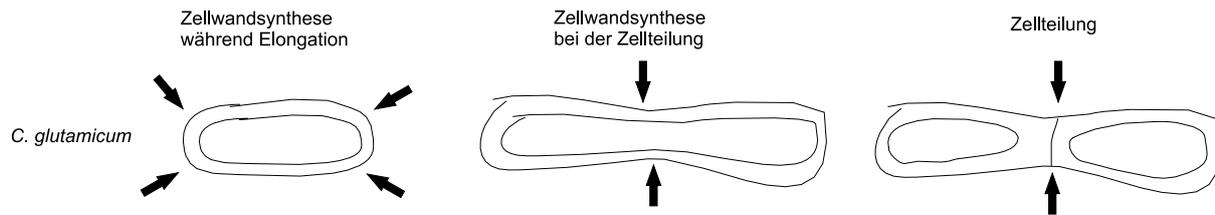


Abbildung 2-14. Die Zellwandsynthese bei den stäbchenförmigen Corynebakterien. Die Pfeile geben den Ort der Zellwandsynthese an. Die Zellwandsynthese findet zunächst an den Zellpolen statt. Zu Beginn der Zellteilung wird sie in die Zellmitte verlagert.

Bei *S. coelicolor* wird die neue Zellwand an der Hyphenspitze eingebaut (Schwedock et al., 1997, Daniel & Errington, 2003), daran ist DivIVA beteiligt (Flärdh, 2003a). DivIVA ist auch für die Zellform verantwortlich, eine Überexpression führt zu vermehrten Verzweigungen an der Hyphenspitze (Flärdh, 2003a). Computervoraussagen für DivIVA weisen auf alpha- helikale coiled- coils hin, welche an der Oligomerisierung beteiligt sind (Muchová et al., 2002, Flärdh, 2003b, Nguyen et al., 2007). Das *divIVA*- Gen ist bei vielen grampositiven Bakterien downstream des *dcw*- Genclusters zu finden (Ramos et al., 2003), wie auch bei *B. subtilis*, wo DivIVA an der Lokalisierung der Zellteilung beteiligt ist, indem es MinCD kontrolliert. Außerdem spielt DivIVA dort eine Rolle bei der Segregation der Chromosomen während der Sporenbildung (Cha & Stewart, 1997, Edwards & Errington, 1997, Marston et al., 1998, Thomaidis et al., 2001, Wu & Errington, 2003). *B. subtilis* DivIVA hat eine schwache strukturelle Ähnlichkeit zu Tropomyosin (Edwards et al., 2000). Tropomyosin ist bei Eukaryonten weit verbreitet. Es bindet und stabilisiert F- Aktin (Smillie, 1979). DivIVA könnte auch an Aktin oder aktinähnliche Proteine binden (Edwards et al., 2000); seine polare Lokalisation hängt jedoch nicht von MreB oder Mbl, einem MreB Homolog, ab (Hamoen & Errington, 2003). DivIVA von *S. coelicolor* könnte ein zytoskelettales Gerüst für die polare PG- Synthese bilden, eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität spielen oder die Form und Integrität der Hyphenspitze erhalten (Flärdh, 2003a).

2.3.3 Die Zellteilung, FtsZ und das Divisom

Die Analyse der bakteriellen Zellteilung führte zu den *fts*- Mutanten (filamentation temperature-sensitive). Sie wurden durch Screening nach temperatursensitiven Mutanten, welche bei hohen Temperaturen Filamente bilden, gefunden (Lutkenhaus et al., 1980, de Boer et al., 1990). *fts*- Mutanten replizieren und trennen ihre Chromosomen, eine Zellteilung findet jedoch nicht statt (Walker et al., 1975, Dai & Lutkenhaus, 1991, Goehring & Beckwith, 2005). Ihre Mutationen liegen in Genen des *dcw*- Cluster (Abbildung 2-15). Die Anordnung der *dcw*- Gene korreliert mit der Zellgestalt,

ist spezifisch für stäbchenförmige Bakterien und sehr konserviert (Tamames et al., 2001).

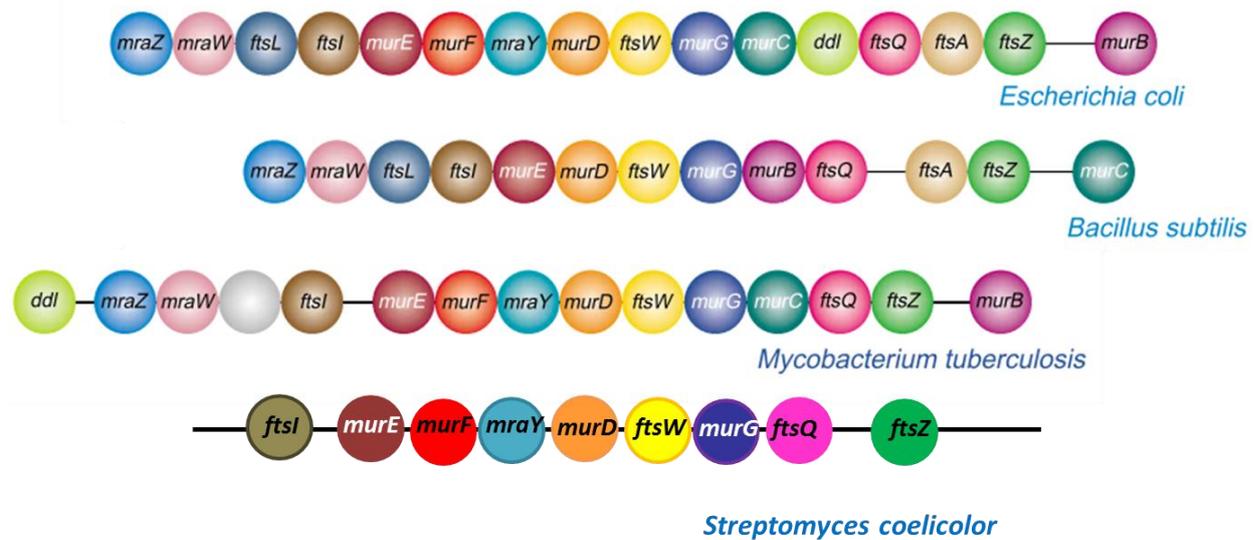


Abbildung 2-15. Das *dcw*-Gencluster von *E. coli*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* (Tamames et al., 2001) sowie *S. coelicolor*. Diese Anordnung der Gene ist konserviert und typisch für stäbchenförmige Bakterien.

FtsZ ist ein hochkonserviertes Zellteilungsprotein. Es kommt in Archaea, Chloroplasten, manchen Mitochondrien und Bakterien vor (Osteryoung & Vierling, 1995, Baumann & Jackson, 1996, Beech et al., 2000, Vitha et al., 2001, Vaughan et al., 2004). Sowohl Kokken als auch Stäbchen benötigen FtsZ (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007) ebenso wie zellwandlose Bakterien (Wang & Lutkenhaus, 1996). Der Z-Ring scheint einen universellen Zellteilungsapparat darzustellen (Wang & Lutkenhaus, 1996). Seine Bildung in der Zellmitte ist der erste Schritt der Zellteilung. Bei Hefen und Pflanzen gibt es am Beginn der Zellteilung einen ähnlichen aus Tubulin aufgebauten Ring (Smith, 2001). Die Konstriktion wird bei den Eukaryonten jedoch von Myosin und Aktinfilamenten durchgeführt (van den Ent et al., 2001a).

Stäbchenförmige Bakterien und Kokken vermehren sich meist durch Zweiteilung (Angert, 2005). Die Länge einer Bakterienzelle wird durch den Zeitpunkt und die Häufigkeit der Zellteilung festgelegt. Dieser ist abhängig von der Aktivität des FtsZ-Proteins (Young, 2010). Es ist wichtig, dass die Zellteilung erst dann stattfindet, wenn die Zelle ihre kritische Masse erreicht, alle notwendigen Komponenten vervielfältigt und auf die beiden Hälften aufgeteilt hat (Varley & Stewart, 1992). FtsZ legt die Zellteilungsebene fest und lokalisiert die anderen Proteine des Divisoms (Errington et al., 2003).

Wie findet FtsZ die Zellteilungsebene? Die „nucleoid occlusion“ verhindert, dass das Septum gebildet wird, bevor die Chromosomen getrennt sind (Mulder & Woldringh, 1989). Bei *B. subtilis* wird die Z-Ring-Bildung in der Nähe des Nucleoids durch das DNA-bindende Noc-Protein inhibiert. So wird verhindert, dass die DNA durch die Septumbildung geschnitten wird (Wu & Errington, 2004). Bei *E.*

coli hemmt SlmA, ein DNA- assoziiertes Protein, die Bildung des Z- Rings in der Nähe des Nucleoids (Bernhardt & de Boer, 2005), und das Min- System verhindert die Ausbildung des Z- Rings an den Zellpolen. Die inhibitorisch wirkenden Proteine MinC, MinD und MinE oszillieren von Pol zu Pol und unterbinden so die Entstehung des Z- Rings an falscher Position (Raskin & de Boer, 1999, Hu & Lutkenhaus, 1999, Fu *et al.*, 2001, Hale *et al.*, 2001). In den minicell- Mutanten (*minC* oder *minD* ist gestört) von *E. coli* und *B. subtilis* findet die Zellteilung sowohl an den Polen als auch an Stellen zwischen den Nukleotiden statt (de Boer *et al.*, 1989, Varley & Stewart, 1992). Bei *B. subtilis* wird MinE von DivIVA ersetzt (Marston *et al.*, 1998). DivIVA ist an den Zellpolen lokalisiert und rekrutiert MinCD permanent (Marston & Errington, 1999). Die gleichzeitige Inaktivierung des Min- Systems und der „nucleoid occlusion“ ist letal (Wu & Errington, 2004).

FtsZ bildet gekrümmte oder gerade kurze Filamente in der Nähe der Membran in der Mitte sich teilender Zellen (Li *et al.*, 2007, Swulius *et al.*, 2011). Sie sind Teil eines hochdynamischen Zytoskeletts (Addinall & Lutkenhaus, 1996). Bei *E. coli* gibt mindestens zwölf essentielle Zellteilungsproteine (FtsZ, FtsA, ZipA, FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, PBP3 und FtsN) (den Blaauwen *et al.*, 2008). FtsZ ist essentiell für die Septierung, weil es die die anderen Zellteilungsproteine rekrutiert (Beall & Lutkenhaus, 1991, Mukherjee & Lutkenhaus, 1998, Lutkenhaus, 2007), so z. B. FtsA, ein ATP- bindendes aktinähnliches Protein (Bork *et al.*, 1992), oder ZipA (Z interacting protein A), welches den Z- Ring stabilisiert und an der Membran verankert (Hale & de Boer, 1997). FtsE und FtsX sind die Untereinheiten eines ABC- Transporters (Schmidt *et al.*, 2004). Die DNA- Translokase FtsK sortiert die Tochterchromosomen (Liu *et al.*, 1998, Yu *et al.*, 1998). FtsQ ist ein Membranprotein, das wahrscheinlich während der gesamten Zellteilung benötigt wird (Carson *et al.*, 1991). Es bildet mit FtsL, einem Membranprotein mit Leucinzipper Motiv (Guzman *et al.*, 1992), und FtsB einen Proteinkomplex in der inneren Membran (Buddelmeijer & Beckwith, 2004). Das integrale Membranprotein der SEDS- Familie FtsW ist am Transport der Peptidoglykanvorstufen beteiligt (Mohammadi *et al.*, 2011). FtsI (PBP3) ist eine Transpeptidase für die Peptidoglykansynthese am Septum (Spratt, 1975, Goffin *et al.*, 1996). Das periplasmatische Protein FtsN hat eine schwache Sequenzähnlichkeit zu Zellwandamidasen von *B. subtilis* (Errington *et al.*, 2003) und interagiert mit Mureinsynthesen von *E. coli* (Müller *et al.*, 2007). Insgesamt umspannt das Divisom drei

Kompartimente: das Zytoplasma, die Zytoplasmamembran und das Periplasma (Abbildung 2-16) (Nanninga, 1991).



Abbildung 2-16. Schematische Abbildung des Divisoms erstellt aus der Lokalisierung von GFP- Fusionen und Immunfluoreszenzmikroskopie (den Blaauwen *et al.*, 2008).

Der zytokinetische Z- Ring zieht sich und die Membran während der Zellteilung zusammen (Bi & Lutkenhaus, 1991, Møller-Jensen & Löwe, 2005). Die Energie der Nukleotidhydrolyse wird als mechanische Kraft für die Konstriktion eingesetzt (Lu et al., 2000). Diese wird durch das Biegen der Protofilamente übertragen (Osawa *et al.*, 2009). Ein kompletter Z- Ring ist nicht für die Konstriktion erforderlich, auch Z- Spiralen schnüren sich zusammen (Addinall & Lutkenhaus, 1996). Für die Trennung des Septums bei der Zellteilung sind in erster Linie Amidasen, außerdem Endopeptidasen sowie lytische Transglykosylasen verantwortlich (Höltje & Heidrich, 2001). Ohne diese Enzyme bildet *E. coli* lange Ketten zusammenhängender Zellen (Höltje & Heidrich, 2001). Die Lokalisierung der Amidasen geschieht aufgrund einer Ausschlussstrategie. Wandteichonsäuren z. B. verhindern das Binden von Atl, einer bifunktionellen Amidase von *S. aureus*, an das Peptidoglykan. WTA kommen in großer Menge in älterem Peptidoglykan vor, aber nicht im neusynthetisierten PG der Zellteilungsebene. In einer *tagO*- Mutanten von *S. aureus* gibt es keine WTA, deshalb wird Atl nicht mehr an der Zellteilungsebene lokalisiert, sondern ist gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt, was zu Autolyse führt (Schlag et al., 2010).

Bei Streptomyceten kommen zwei Arten der Zellteilung vor: Die vegetative Zellteilung und die Zellteilung während der Sporulation (Flärdh, 2003b, Grantcharova *et al.*, 2003). FtsW, FtsL, FtsQ und FtsI werden für den Aufbau des Divisoms bei der Sporulation benötigt (Mistry *et al.*, 2008, Flärdh & Buttner, 2009). Es gibt jedoch keine Homologen zu ZipA oder FtsA (McCormick, 2009). Ebenso gibt es keine homologen Gene für Zellteilungsmechanismen wie das Min- System oder die „nucleoid occlusion“ (Grantcharova et al., 2003, Flärdh & Buttner, 2009).

2.3.4 Die Mre- Proteine und die Zellwandsynthese

Die Gene für die Mre- Proteine MreB, MreC, MreD kommen bei *S. coelicolor* in einem Operon mit den Genen für PBP2 und Sfr (RodA) vor (Burger *et al.*, 2000). Zur Vereinfachung wird der Begriff „Mre- Proteine“ für die fünf Proteine MreB, MreC, MreD, PBP2 und Sfr (RodA) verwendet. MreB ist bei Bakterien mit einer komplexen Morphologie weitverbreitet; es kommt z. B. bei stäbchenförmigen, gewundenen oder filamentös wachsenden Bakterien, jedoch für gewöhnlich nicht bei kugelförmigen Bakterien vor (Jones et al., 2001). Einige kugelförmige Cyanobakterien und Planctomycetenarten enthalten jedoch MreB- Orthologe (Graumann, 2007). Das könnte daran liegen, dass sie MreB für ihre morphologische Differenzierung benötigen (Daniel & Errington, 2003). Ebenso gibt es Stäbchen, die kein *mre*- Gencluster besitzen, z. B. *Mycobacterium* oder *Corynebacterium*. Dennoch scheint das MreB- Zytoskelett eine wichtige Funktion bei der nichtkugeligen Zellgestalt zu spielen (van den Ent *et al.*, 2001b). Viele grampositive Bakterien, darunter *B. subtilis*, enthalten drei MreB Homologe; gramnegative wie z. B. *E. coli* oder *C. crescentus* enthalten nur eines (Abbildung

2-17) (Jones et al., 2001, Defeu Soufo & Graumann, 2006, Carballido-López, 2006). MreC und MreD kommen auch in kugelförmigen Bakterien wie Streptokokken und Staphylokokken vor (Kruse et al., 2005).

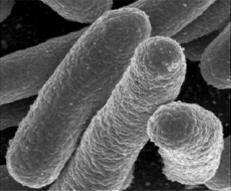
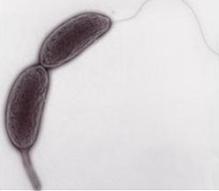
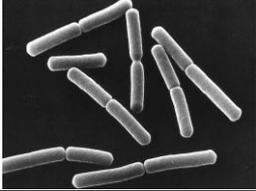
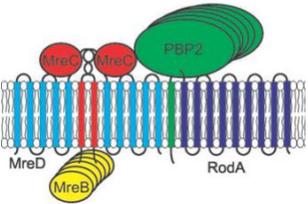
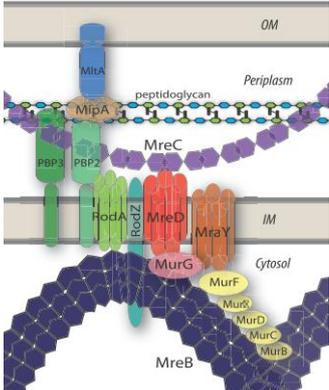
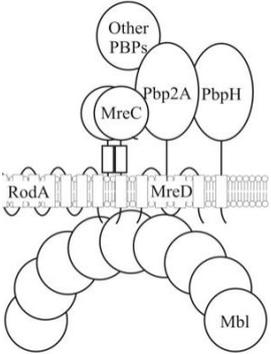
gramnegativ		grampositiv	
<i>E. coli</i>	<i>C. crescentus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. coelicolor</i>
			
MreB	MreB	MreB Mbl MreBH	MreB Mbl SCO6166
MreC MreD PBP2 RodA	MreC MreD PBP2 RodA	MreC MreD PBP2A RodA	MreC MreD PBP2 Sfr
			

Abbildung 2-17. Vorkommen und Interaktionen der Mre-Proteine bei *E. coli* (Kruse et al., 2005), *C. crescentus* (White et al., 2010), *B. subtilis* (Carballido-López et al., 2006, Leaver & Errington, 2005) und *S. coelicolor*

Bilder: <http://www.foundalis.com/soc/anarchy.htm>; <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/07/now-thats-using-your-head.html>; <http://www.astrobio.net/exclusive/3838/mutant-microbes-test-radiation-resistance>

Ein Zytoskelett könnte durch Interaktionen mit Peptidoglykan synthetisierenden Enzymen die Peptidoglykansynthese räumlich und zeitlich lokalisieren und so die Form des Mureinsacculus und des Organismus bestimmen (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007, Bagchi et al., 2008, Mattei et al., 2010). Dies setzt voraus, dass PBPs, Hydrolasen und Gerüstproteine miteinander assoziiert sind (Leaver & Errington, 2005, Mattei et al., 2010). Es wird davon ausgegangen, dass das Mre- Zytoskelett die Form der Zelle bestimmt, indem es transmembrane und periplasmatische Peptidoglykan synthetisierende Enzyme positioniert (Löwe et al., 2004). Zahlreiche Proteininteraktion zwischen Enzymen der Peptidoglykanvorstufensynthese (MurABCDEFG und MraY), dem Zytoskelett (MreB, FtsZ) sowie PBPs unterstützen diese Vorstellung (Tabelle 2-2, Tabelle 2-3 und Tabelle 2-4).

Tabelle 2-2. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von *C. crescentus* im Bacterial Two Hybrid System zusammengestellt nach (White *et al.*, 2010).

<i>C. crescentus</i>	MreB	MreC	MreD
MurG	✓	✗	✓
MurF	✓	✗	✗
Mray	✓	✗	✓
MreB	✓	✗	✓
MreC	✗	✓	✗
MreD	✓	✗	✓
HMW PBPs	✗	✓	n. u.
RodA	✓	✗	✗
RodZ	✓	✓	✓
FtsZ	✓	✗	✗

(✓ Interaktion; ✗ keine Interaktion; n. u.: nicht untersucht)

Tabelle 2-3. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von *E. coli* zusammengestellt nach (Kruse *et al.*, 2005, Mohammadi *et al.*, 2007, Bendezú *et al.*, 2009).

<i>E. coli</i>	MreB	MreC	MreD	RodZ
MurG	✓	n. u.	n. u.	n. u.
MurF	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
Mray	✓	n. u.	n. u.	n. u.
MreB	✓	✓	✗	✓
MreC	✓	✓	✓	✓
MreD	✗	✓	✗	✓
HMW PBPs	n. u.	n. u.	n. u.	✓
RodA	n. u.	n. u.	n. u.	✗
RodZ	✓	✓	✓	✓
FtsZ	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.

(✓ Interaktion; ✗ keine Interaktion; n. u.: nicht untersucht)

Tabelle 2-4. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von *B. subtilis* zusammengestellt nach (van den Ent *et al.*, 2006, Formstone *et al.*, 2008, Kawai *et al.*, 2009, Kawai *et al.*, 2011).

<i>B. subtilis</i>	MreB	MreC	MreD
TagA	n. u.	✓	✓
TagB	n. u.	✓	✓
TagF	✓	✓	✓
TagH	✓	✓	✓
MurF	✓	n. u.	n. u.
MreB	✓	✓	n. u.
MreC	✓	✓	✓
MreD	n. u.	✓	n. u.
HMW PBPs	✓	✓	n. u.
RodA	✓	n. u.	n. u.
FtsZ	n. u.	n. u.	n. u.

(✓ Interaktion; ✗ keine Interaktion; n. u.: nicht untersucht)

MreB interagiert mit Enzymen, welche Peptidoglykanvorstufen synthetisieren (MurG, MurF und MraY) (Mohammadi et al., 2007, White et al., 2010) sowie mit hochmolekularen PBPs (Kawai et al., 2009); zudem interagiert es mit den Membranproteinen MreC und MreD (Kruse et al., 2005, Kawai et al., 2009). Diese könnten als Verbindung zwischen MreB und den periplasmatischen bzw. extrazellulären Penicillinbindeproteinen dienen. So interagieren hochmolekulare Penicillinbindeproteine (HMW PBPs) der Klassen A und B mit MreC (van den Ent et al., 2006, Kawai et al., 2009). Außerdem interagiert MreC mit der lytischen Transglykosylase MltA (Divakaruni et al., 2007). MreC könnte somit ein Gerüstprotein für die Peptidoglykan synthetisierenden Enzyme sein (Divakaruni et al., 2005, van den Ent et al., 2006).

Die Modelle der Interaktionen der Mre-Proteine für *E. coli*, *C. crescentus* und *B. subtilis* sind sich sehr ähnlich. Ihnen ist ein helikales Filament von MreB gemein (Abbildung 2-17). Dieses steht über Membranproteine wie MreC, MreD und RodA mit den periplasmatischen bzw. extrazellulären PBPs in Kontakt (Kruse et al., 2005, Leaver & Errington, 2005, Carballido-López et al., 2006, White et al., 2010).

RodZ ist ein weiteres, die Zellgestalt bestimmendes, Protein, das mit MreB interagiert (Bendezú et al., 2009, van den Ent et al., 2010). Es hat eine periplasmatische, eine transmembrane und eine zytosolische Domäne (Bendezú et al., 2009, Alyahya et al., 2009). RodZ interagiert mit MreB im Zytosol (van den Ent et al., 2010) und mit HMW PBPs im Periplasma (Shiomi et al., 2009) (Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3) und bildet so ebenfalls eine Brücke zwischen den Kompartimenten (Mattei et al., 2010).

2.3.4.1 MreB und die Peptidoglykansynthese

MreB gehört zur Aktin Superfamilie (Bork et al., 1992) wie auch die Zuckerkinasen (Hurley et al., 1993), das Heat shock protein 70 (Flaherty et al., 1990), das Zellteilungsprotein FtsA (van den Ent & Löwe, 2000), sowie das plasmidkodierte ParM (Møller-Jensen et al., 2002). Es handelt sich hierbei um Proteine mit sehr unterschiedlichen Funktionen und Aminosäuresequenzen, aber mit einer sehr ähnlicher 3D-Struktur (Bork et al., 1992).

Bei *B. subtilis* interagieren MreB, Mbl und MreBH direkt unterhalb der Zellmembran miteinander und können sich teilweise in ihren Funktionen ersetzen (Jones et al., 2001, Carballido-López et al., 2006, Defeu Soufo & Graumann, 2006). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen legen nahe, dass MreB und Mbl helikale Filamente an der Innenseite der Zytoplasmamembran bilden (Jones et al., 2001, Shih et al., 2003, Figge et al., 2004). Es wird angenommen, dass diese Filamente die Zellwandsynthesemaschinerie so positionieren, dass stäbchenförmige Bakterien entstehen

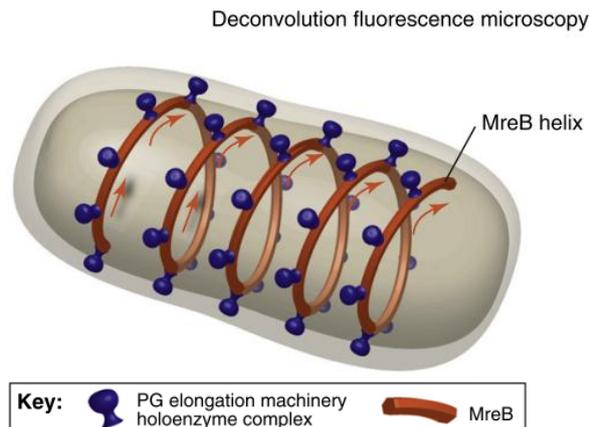


Abbildung 2-18. Modell der Lokalisierung von MreB und dem PG-Synthesekomplex basierend auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (White & Gober, 2011). Helikale Filamente von MreB winden sich durch die Zelle und lokalisieren die PG-Synthese.

(Carballido-López et al., 2006, Divakaruni et al., 2007, Kawai et al., 2009). Fluoreszenzmarkiertes Vancomycin oder Ramoplanin zeigt eine helikale Verteilung entlang des Zellzylinders von *B. subtilis*, was auf einen helikalen Einbau von Peptidoglykanvorstufen hinweist (Abbildung 2-18) (Daniel & Errington, 2003, Tiyanont et al., 2006). Vancomycin bindet an die D-Ala-D-Ala-Reste der lipidgebundenen Peptidoglykanvorstufen und markiert so den Ort des Peptidoglykaneinbaus sowie das gerade eingebaute Peptidoglykan (Sheldrick et al., 1978, Tiyanont et al., 2006). Ramoplanin bindet an das reduzierende Ende der Glykankette und an Lipid II, es markiert deshalb den Ort der Transglykosylierung genauer (Walker et al., 2005, Fang et al., 2006). MreB-Filamente werden als kontinuierliche Helix, welche sich von Pol zu Pol spannt (Jones et al., 2001, Shih et al., 2003), oder als Bündel vieler kurzer Filamente interpretiert (Kim et al., 2006, Salje et al., 2011). Es sind hochdynamische Strukturen, die ständig umgebaut werden (Carballido-López & Errington, 2003). Die dynamische Bewegung der MreB-Filamente wird vermutlich durch ihre Polymerisation ausgelöst (Defeu Soufo & Graumann, 2004). Zusätzlich zu den MreB-Helices werden weitere helikale Filamente oder Verteilungsmuster beschrieben. So sollen MreC, MreD, RodA, PBP2, RodZ, TagG, TagH und TagO ebenfalls ein helikales Lokalisierungsmuster besitzen (Figge et al., 2004, Divakaruni et al., 2005, Leaver & Errington, 2005, Formstone et al., 2008, Shiomi et al., 2008).

Die Elektronen-Kryotomographie von sechs verschiedenen stäbchenförmigen Bakterienarten, darunter *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus*, hat gezeigt, dass es keine langen helikalen Filamente von MreB oder anderen Proteinen in der Nähe von bzw. an der Innenseite der Membran gibt (Swulius et al., 2011). MreB wird zwar für die Aufrechterhaltung der Stäbchenform benötigt, aber es bildet kein zelldurchspannendes Zytoskelett (Garner et al., 2011). Die beobachteten Helices könnten Artefakte der Präparation sein. Vielleicht wird MreB unter den Mikroskopiebedingungen dazu angeregt, Filamente zu bilden (Swulius et al., 2011). Außerdem könnten Komplexe, die sich bewegen, zeitlich gesehen, als Striche wahrgenommen werden (Swulius et al., 2011, Domínguez-Escobar et al., 2011).

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)

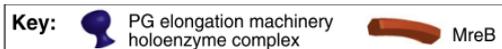
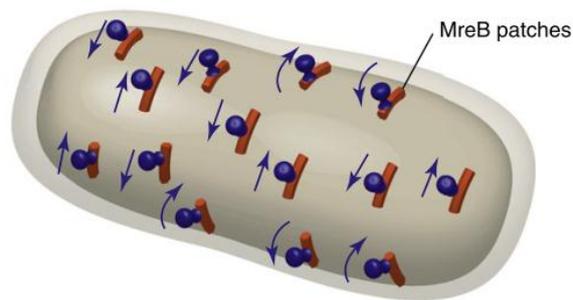


Abbildung 2-19. Modell der Lokalisation von MreB und dem PG-Synthesekomplex basierend auf Totalreflexionsmikroskopie (White & Gober, 2011). MreB und die PG-Synthesemaschinerie bewegen sich als klar getrennte Punkte in beide Richtungen um die lange Achse der Zelle herum.

(Domínguez-Escobar et al., 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass MreB, Mbl und MreBH mit MreC, MreD, RodA und PBPH / 2a einen Zellwandsynthesekomplex für das Längenwachstum bilden, welcher sich fortlaufend um die Zelle bewegt (Domínguez-Escobar et al., 2011). Die Bewegung der Zellwandsynthesekomplexe ist notwendig, damit die neusynthetisierten Peptidoglykanstränge sich nicht auf sich selbst zurückfalten; statt dessen werden sie auseinandergezogen, während sie mit dem bestehenden Peptidoglykan vernetzt werden (Swulius et al., 2011).

Diese unabhängigen MreB-Peptidoglykan-Synthese-Komplexe haben folgende Eigenschaften: sie können sich in beide Richtungen um den Zellumfang herum bewegen, sie sind nicht über die Zelllänge koordiniert und sie synthetisieren radiale PG-Stränge. Die alten Glykanstränge dienen zur Orientierung dieser Komplexe (Gan et al., 2008). Durch die Rotation wird eine gleichmäßige Verteilung des Peptidoglykanvorstufeneinbaus sichergestellt (van Teeffelen *et al.*, 2011, Garner et al., 2011). Die treibende Kraft für die Rotation ist die Peptidoglykansynthese selbst und nicht die Polymerisierung von MreB (Garner et al., 2011, Domínguez-Escobar et al., 2011, van Teeffelen et al., 2011). Ohne PG-Synthese bewegen sich die MreB-Spots nicht. So führt eine Inhibierung der Zellwandsynthese durch Antibiotika, wie z. B. dem Transglykosylierungsinhibitor Ramoplanin oder dem Transpeptidierungsinhibitor Vancomycin, zur Blockierung dieser Bewegung (van Teeffelen et al., 2011, Domínguez-Escobar et al., 2011). Die Beweglichkeit von MreB hängt auch von der Verfügbarkeit der PG-Vorstufen ab (van Teeffelen et al., 2011). Eukaryontische zytoskelettale Bewegungen werden oft von Motorproteinen angetrieben (van Teeffelen et al., 2011). Bisher wurden hierfür jedoch keine prokaryontischen Motorproteine gefunden (Li *et al.*, 2007). Entweder ist die Zellwandsynthesemaschinerie eine neue Art von extrazellulärem Motor, welcher eine Kraft auf das

Durch high-precision-particle-tracking wurde gezeigt, dass MreB und die Zellelongationsmaschinerie sich in *B. subtilis* als klar getrennte Punkte oder Flecken in einer Rotationsbewegung im rechten Winkel zur Längsachse um den Zellumfang herum bewegen (Abbildung 2-19) (Garner et al., 2011, White & Gober, 2011). Totalreflexions-fluoreszenzmikroskopie zeigt ebenfalls Flecken von GFP-MreB, GFP-Mbl und GFP-MreBH, welche sich entlang linearer Bahnen ungefähr rechtwinklig zur langen Achse der Zelle bewegen (Domínguez-Escobar et al., 2011). MreC, MreD, RodA und PBPH bilden ebenfalls Patches, die sich wie die MreB-Flecken verhalten

intrazelluläre MreB ausübt, oder sie ist indirekt für einen noch nicht identifizierten Motor notwendig (van Teeffelen et al., 2011). Thermodynamische Berechnungen zeigen, dass die Peptidoglykansynthese ausreichende Energie zur Verfügung stellen könnte, um die Bewegung von MreB zu generieren (van Teeffelen et al., 2011).

Nach dem „fluid mosaic model“ diffundieren Proteine in der Membran (Singer & Nicolson, 1972). Es muss also einen Mechanismus geben, der die Peptidoglykan synthetisierenden Enzyme an einer definierten Position hält. Sie könnten direkt am Peptidoglykan befestigt sein (Fan *et al.*, 1975) oder durch ein Zytoskelett lokalisiert werden. MreB von *T. maritima* oder *E. coli* bindet an Zellmembranen. Diese Membranbindung ist essentiell für die Funktion von MreB (Salje et al., 2011), denn nur wenn MreB direkt an der Zellmembran lokalisiert ist, kann es mit MreD, einem integralen Membranprotein, und MreC, einem Protein mit nur sehr kleiner zytosolischer Domäne, interagieren (Salje et al., 2011). MreB kompartimentalisiert die Membran, indem es die laterale Diffusion von integralen und peripheren Membranproteinen beschränkt (Salje et al., 2011, Domínguez-Escobar et al., 2011) und organisiert bzw. limitiert so die Beweglichkeit der PG- Synthesekomplexe (Domínguez-Escobar et al., 2011). MreB- Flecken oder Filamente könnten Gerüststrukturen für die Synthese und den Export von PG- Vorstufen bilden. Vielleicht regulieren sie aber auch Enzymaktivitäten oder befördern Vorstufen zu den Stellen des PG- Einbaus. C- terminale mCherry- Fusionen der Peptidoglykanvorstufen synthetisierenden Proteine von *C. crescentus* (MurB, C, D, E, F, und MraY) zeigen eine ähnliche Lokalisierung von Bändern oder Foci im rechten Winkel zur langen Achse der Zelle wie MreB und ihre Lokalisation ist von MreB abhängig (White et al., 2010). Die Frage, ob MreB eine wirkliche Zytoskelettfunktion besitzt oder die Synthese von Peptidoglykan koordiniert oder beides, bleibt offen.

2.3.4.2 Das *mre*- Gencluster bei Streptomyceten

Streptomyceten wachsen durch apikales Spitzenwachstum – sie zeigen kein laterales Elongationswachstum (Daniel & Errington, 2003, Hempel et al., 2008). Sporulierende Actinomyceten besitzen dennoch ein *mre*- Gencluster; viele nichtsporulierende Actinomyceten wie Mykobakterien und Corynebakterien besitzen keines (Mazza et al., 2006). Das *mre*- Gencluster von *S. coelicolor* hat die gleiche Operonstruktur wie das stäbchenförmiger Bakterien (Burger et al., 2000). Es gibt drei Promotoren, wovon zwei konstitutiv exprimiert sind. Einer davon wird während der Sporulation hoch reguliert (Burger et al., 2000). Die *mre*- Genprodukte sind Homologe zu MreB, MreC, MreD aus *E. coli* und *B. subtilis* (Burger et al., 2000). Außer MreB gibt es bei *S. coelicolor* noch zwei weitere MreB- ähnliche Proteine, nämlich Mbl (SCO2451) und SCO6166 (Abbildung 2-20) (Mazza et al., 2006, Heichlinger, 2011).

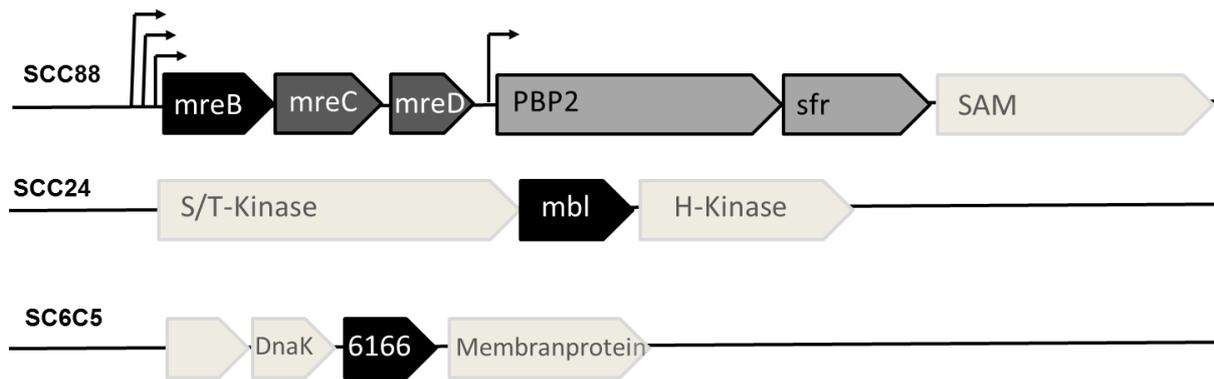


Abbildung 2-20. Das *mre*- Gencluster sowie *mbl* und *SCO6166* von *S. coelicolor* A3(2). *mreB* (SCO2611), *mreC* (SCO2610), *mreD* (SCO2609) bilden mit *PBP2* (SCO2608) und *sfr* (SCO2607) das *mre*- Gencluster; direkt anschließend befindet sich *SAM* (SCO2606), eine S-Adenosyl-Methylthiotransferase. *mbl* (SCO2451) befindet sich zwischen einer Serin / Threoninkinase (SCO2450) und einer Histidin- Kinase (SCO2452). *SCO6166* wird zusammen mit *SCO6165*, einem DnaK Supressor, exprimiert.

MreB lokalisiert vermutlich den Peptidoglykansynthesekomplex für die Sporenwandsynthese und wird für die korrekte Ausbildung der stressresistenten Sporenwand benötigt. Seine Deletion erzeugt keinen Phänotyp im Substratmyzel. Deletionsmutanten sind lebensfähig, bilden jedoch geschwollene, oft lysierte und teils vorzeitig auskeimende Sporen, welche eine verringerte Resistenz gegenüber osmotischem Stress, Lysozym, Vancomycin oder hohen Temperaturen zeigen (Mazza et al., 2006, Heichlinger, 2011).

2.3.5 Anionische Zellwandpolymere

Gramnegative Bakterien besitzen eine äußere Membran, grampositive nicht. Grampositive Bakterien sind deshalb weniger vor kleinen schädlichen Molekülen geschützt und bauen aus diesem Grund in ihre Peptidoglykanschichten anionische Glykopolymere ein (Xia & Peschel, 2008, Weidenmaier & Peschel, 2008). Diese Polymere scheinen einige Funktionen der äußeren Membran von gramnegativen zu erfüllen, wie z. B. die Regulation der Membranpermeabilität, die Vermittlung von zellulären Interaktionen, die Erhaltung der Stabilität der Plasmamembran und eine Art Gerüstfunktion für Enzyme (Neuhaus & Baddiley, 2003, Swoboda et al., 2010). Grampositive Bakterien, welche keine WTAs besitzen, auf Grund von Phosphatmangel oder weil sie keine Gene zur Synthese besitzen, produzieren andere polyanionische Polymere. Die negative Ladung kann auch von Carboxyl- oder Sulfat- Gruppen stammen (Sutcliffe & Shaw, 1991, Silhavy et al., 2010). Bei Organismen mit hohem GC-Gehalt findet man zudem Lipoglycane, die mit anionischen Succinylgruppen verestert sind (Powell et al., 1975, Delmas et al., 1997). Bei Actinomyceten wurden außerdem ungeladene Zellwandglykopolymere gefunden. Viele dieser Polymere sind verzweigt und enthalten Mannose, Arabinose oder Galactose (Garton et al., 2002, Tatituri et al., 2006).

Unter nicht-phosphatlimitierenden Bedingungen enthalten Wandteichonsäuren bis zu 15% des gesamten Phosphats der Zelle (Lahooti & Harwood, 1999). Sie können dies zumindest teilweise wieder freisetzen, indem sie durch Teichuronsäuren ersetzt werden. Das durch den Abbau von Teichonsäuren freigesetzte Phosphat wird für zelluläre Prozesse, wie z. B. die Nukleinsäuresynthese, verwendet (Grant, 1979). Teichuronsäuren bestehen aus glykosidisch verknüpften Zucker- und Uronsäureresten (Hughes & Thurman, 1970). Das Teichuronsäure-Operon *tuaABCDEFGH* von *B. subtilis* wird durch Phosphatlimitierung induziert. Es kodiert für Enzyme, welche für die Polymerisation und die Synthese der Vorstufe UDP-Glucuronat zuständig sind (Lahooti & Harwood, 1999, Soldo *et al.*, 1999). Doch selbst während der Teichuronsäuresynthese wird die Teichonsäuresynthese nicht vollkommen aufgegeben (Ellwood & Tempest, 1967, Grant, 1979, Ward, 1981, Bhavsar *et al.*, 2004). Ein Gleichgewicht zwischen Teichonsäuren und Teichuronsäuren stellt eine konstante negative Ladung der Zellwand sicher (Lang *et al.*, 1982, Soldo *et al.*, 1999).

Teichonsäuren sind anionische, wasserlösliche Glykopolymere; sie bestehen meist aus linearen Ketten von 1,3-Glycerol- oder 1,5-Ribitolphosphat und enthalten geladene Phosphomono- und Phosphodiestergruppen sowie freie Aminogruppen (Neuhaus & Baddiley, 2003). Die typische Wandteichonsäure eines grampositiven Bakteriums mit geringem GC-Gehalt besteht aus einem Linker und einer langen Kette von ca 40 bis 60 Glycerol- oder Ribitolphosphat-Untereinheiten. Bei Glycerol- wie Ribitol-WTA ist der Linker aus den gleichen Bestandteilen aufgebaut (Coley *et al.*, 1978); er setzt sich aus einem ManNAc-(β 1-4)-GlcNAc-Disaccharid und ein bis drei Glycerolphosphatresten, welche an das C4-Hydroxyl des ManNAc gebunden sind, zusammen (Schleifer & Kandler, 1972). Die WTA ist kovalent über Phosphodiesterbindungen mit dem C6-Hydroxyl der N-Acetylmuraminsäure des Peptidoglykan verknüpft und reicht darüber hinaus (Neuhaus & Baddiley, 2003, Swoboda *et al.*, 2010).

Die Hydroxylreste der Glycerol- oder Ribitoluntereinheiten können mit kationischen D-Alaninestern oder Monosacchariden wie Glucose oder N-Acetylglucosaminen modifiziert sein (Abbildung 2-21) (Mirelman *et al.*, 1970, Yokoyama *et al.*, 1989, Xia & Peschel, 2008, Swoboda *et al.*, 2010). Es gibt aber auch Teichonsäuren mit Untereinheiten aus Tetrosen, Hexosen oder komplexen Zuckern (Potekhina *et al.*, 1993, Fischer *et al.*, 1993).

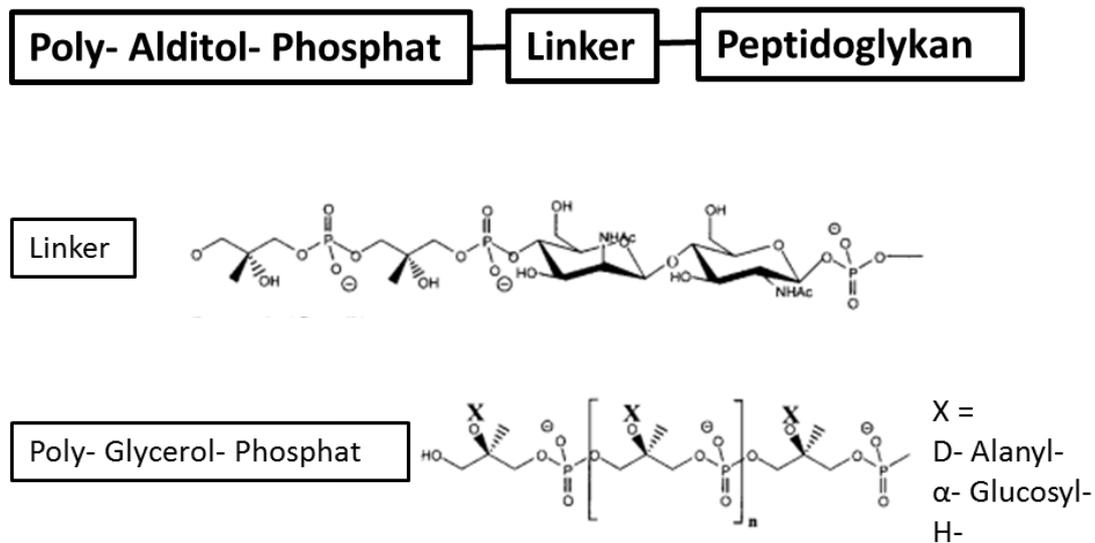


Abbildung 2-21. Glycerolphosphat-Wandteichonsäure mit Modifikationen (Neuhaus & Baddiley, 2003). Wandteichonsäuren bestehen häufig aus 1,3- Glycerolphosphat- Untereinheiten und sind über einen Linker bestehend aus Glycerolphosphat und einem Disaccharid direkt mit dem Peptidoglykan verknüpft. Oft sind die WTA mit Alanyl- oder Glucosylresten substituiert.

2.3.5.1 Die Teichonsäuresynthese

Bei *B. subtilis* oder *S. aureus* sind die Gene für die Synthese von Wandteichonsäuren in einem Cluster organisiert. *tagABDEFGH* kodieren die Enzyme für die Glycerolphosphat- WTA- Synthese von *B. subtilis* 168 (Mauël *et al.*, 1991) und *tarABIJKLDF* die Enzyme für die Ribitolphosphat- WTA- Synthese von *B. subtilis* W23 (Lazarevic *et al.*, 2002). *tagAB* und *tagDEF* sind zwei benachbarte, divergent transkribierte Operonstrukturen (Mauël *et al.*, 1991, Pooley *et al.*, 1991), *tarABIJKL* und *tarDF* ebenfalls (Lazarevic *et al.*, 2002). *tagO* hingegen kommt an anderer Stelle im Genom vor (Mauël *et al.*, 1991, Soldo *et al.*, 2002, Xia & Peschel, 2008). Die Transkription der *tag*- Gene könnte durch zellzyklusspezifische Signale wie die Chromosomenverdoppelung oder die Zellteilung gesteuert werden (Mauël *et al.*, 1995).

TagF und TagB sind die Phosphotransferasen der Glycerol- WTA- Synthese (Pooley *et al.*, 1992, Swoboda *et al.*, 2010). TarB, F, K, und L sind die Phosphotransferasen der Ribitol- WTA- Synthese (Xia & Peschel, 2008). TagO, ein Membranprotein, katalysiert den ersten Schritt der WTA- Synthese (Soldo *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die meisten WTA synthetisierenden Enzyme membranassoziiert sind (Brooks *et al.*, 1971, Ward, 1981, Pooley *et al.*, 1992, Bhavsar *et al.*, 2007, Formstone *et al.*, 2008). Sie könnten einen Multienzymkomplex bilden, welcher durch die hydrophobe Domäne von TagB mit der Membran verbunden ist (Mauël *et al.*, 1991, Bhavsar *et al.*, 2005). Die Enzyme für die Synthese der Nukleotidvorstufen (z. B. TagD) sind löslich (Ward, 1981).

Wandteichonsäuren werden nach einem ähnlichen Mechanismus wie das Peptidoglykan synthetisiert (Abbildung 2-22) (Anderson *et al.*, 1972, Bhavsar & Brown, 2006). Beide Synthesewege benötigen den Undecaprenolphosphatlinker (Bactoprenol) (Anderson *et al.*, 1972, Scheffers & Pinho, 2005, Bouhss *et al.*, 2008). Man geht davon aus, dass dies ein Ungleichgewicht bei der Zellwandzusammensetzung verhindert (Anderson *et al.*, 1972, Ward, 1984). Im Zytoplasma erfolgt die Vorstufensynthese der Teichonsäuren bzw. des Peptidoglykans. Der Einbau von Wandteichonsäuren findet an der Membran gleichzeitig mit der Peptidoglykansynthese statt (Mauck & Glaser, 1972, Tomasz *et al.*, 1975).

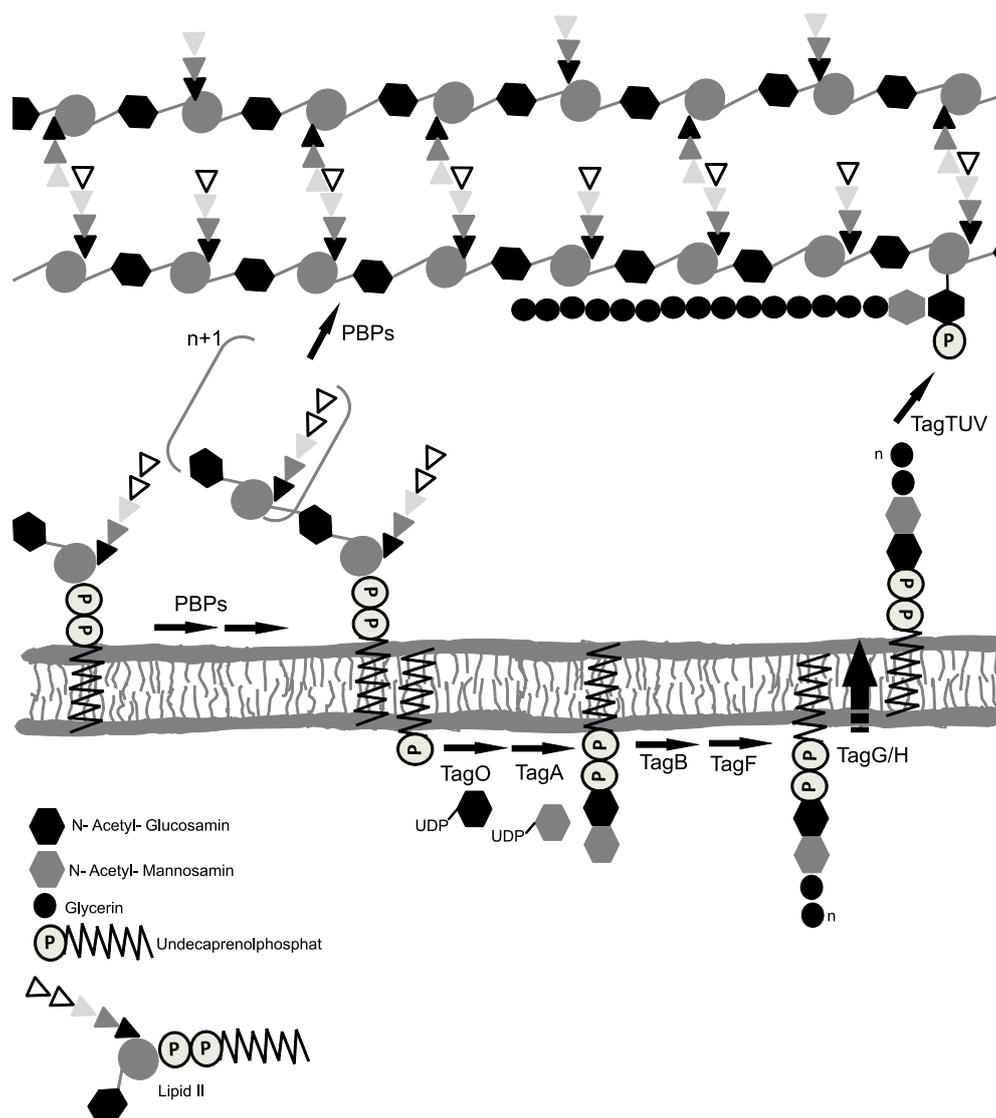


Abbildung 2-22. Die Verknüpfung von Peptidoglykan- und Wandteichonsäuresynthese. Sowohl die Peptidoglykanvorstufen als auch die Teichonsäureuntereinheiten werden am Undecaprenylphosphatlinker polymerisiert. Bei den Teichonsäuren geschieht dies bereits im Zytoplasma durch die Phosphotransferase TagF, wohingegen die Disaccharid-Untereinheiten des Peptidoglykans erst außerhalb der Zelle verknüpft werden. PBPs sind sowohl für die Polymerisation als auch den Einbau der Glykanstränge in die Zellwand verantwortlich, bei den Wandteichonsäuren sind wahrscheinlich die Phosphotransferasen TagTUV am Einbau beteiligt. Details der Wandteichonsäuresynthese werden im Text und in Abbildung 2-23 erläutert.

Die Synthese der Poly- Glycerolphosphat WTA von *B. subtilis* 168 ist am besten charakterisiert (Abbildung 2-23). An der Synthese des Linkers sind TagA, TagB, TagD und TagO beteiligt. TagO überträgt GlcNAc- P von UDP- GlcNAc auf den Lipidträger Undecaprenylphosphat (Soldo et al., 2002). Dann katalysiert TagA den „first committed step“ und überträgt ManNAc auf das UDP- GlcNAc am Undecaprenylphosphat Linker (D'Elia et al., 2009a). TagB, eine CDP- Glycerol: N- Acetyl- β - D- Mannosaminyl- 1,4- N- Acetyl- D- Glucosaminyl- Diphospho- Undecaprenylglycero- Phospho- transferase, fügt das erste Glycerolphosphat aus CDP- Glycerol und bis zu zwei weitere hinzu (Bhavsar et al., 2005).

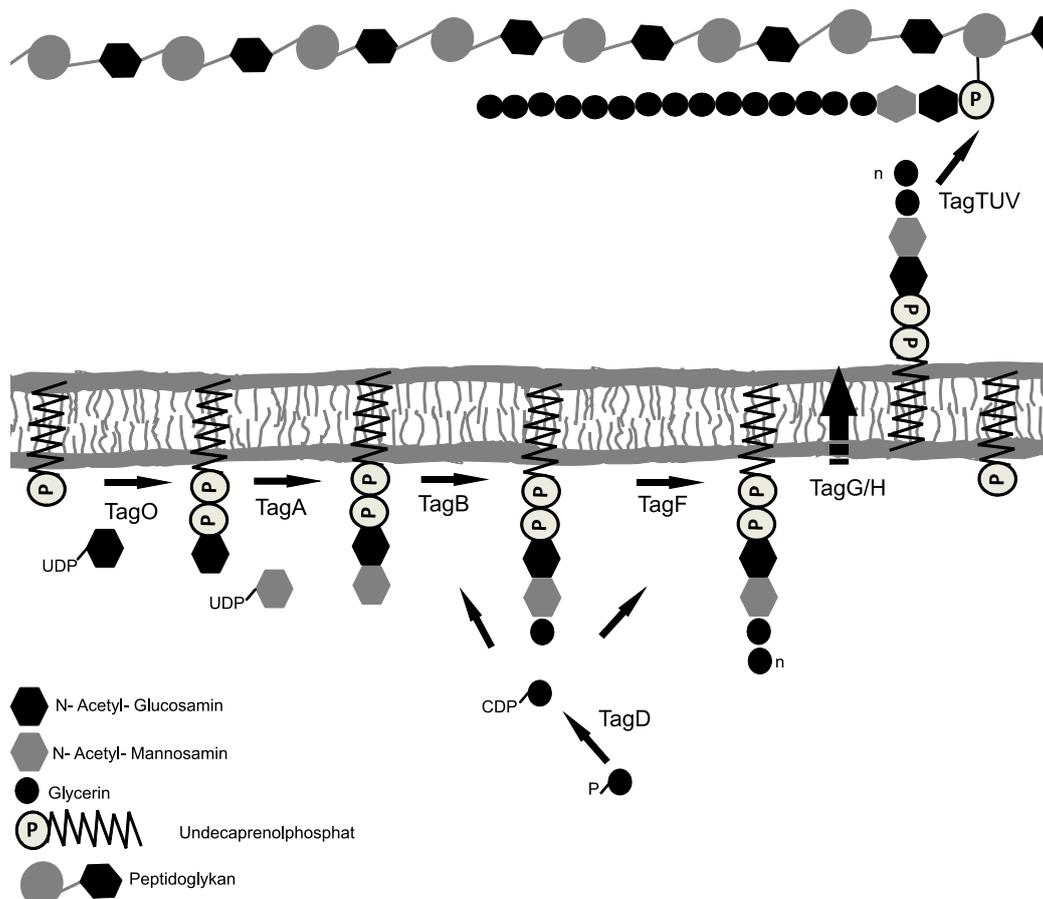


Abbildung 2-23. Die Glycerolphosphat-Wandteichonsäuresynthese bei *B. subtilis* 168. TagO überträgt GlcNAc- P auf den Lipidträger Undecaprenylphosphat; TagA heftet ein ManNAc daran; TagD stellt die Vorstufe CDP- Glycerol her; TagB fügt die erste und bis zu zwei weitere Glycerolphosphat- Untereinheiten an. Damit ist die Synthese des Linkers abgeschlossen. TagF überträgt 40 bis 60 weitere Glycerolphosphat-Untereinheiten auf die wachsende Kette. TagE ist für die Glucosylierung verantwortlich. TagGH sind die Untereinheiten des ABC- Transporters, welcher für den Transport der WTA über die Membran benötigt wird. TagTUV spielen eine Rolle bei der Verknüpfung der WTA mit dem Mureinsacculus.

Die Glycerol- 3- Phosphat- Cytidyltransferase TagD stellt die Vorstufe CDP- Glycerol her (Pooley et al., 1991, Park et al., 1993). Diese wird von der Poly- Glycerolphosphat- Polymerase TagF auf die wachsende Kette der WTA übertragen (insgesamt 40- 60 Untereinheiten) (Sasaki et al., 1983, Pollack & Neuhaus, 1994, Schertzer & Brown, 2003). TagE, eine UDP- Glucose: Poly- Glycerolphosphat-

Glucosyltransferase (Brooks et al., 1971), modifiziert die noch am Lipidanker befestigten Teichonsäuren durch Glucosylierung (Neuhaus & Baddiley, 2003, Swoboda et al., 2010). TagG und TagH sind die beiden Komponenten des ABC-Transporters, welcher für den Transport der WTA-Vorstufen durch die Zytoplasmamembran verantwortlich ist (Lazarevic & Karamata, 1995, Schirner et al., 2011). Die Befestigung über eine Phosphodiesterbindung an das MurNAc des Peptidoglykan erfolgt vermutlich durch die Phosphotransferasen der LCP- (LytR- Cps2A- Psr) Familie (TagTUV). Dabei wird Undecaprenylmonophosphat wieder abgespalten (Kawai et al., 2011). Anschließend werden die freien Hydroxylgruppen der Teichonsäuren teilweise mit D- Alanin verestert (Neuhaus & Baddiley, 2003, Swoboda et al., 2010).

Neben den Wandteichonsäuren (WTA) gibt es die Lipoteichonsäuren (LTA), auch Membranteichonsäuren genannt. LTA sind über einen Gentibiosyldiacylglycerol- Rest in der Membran verankert und ragen in die Peptidoglykanschichten hinein. Sie bestehen meist aus 1,3-Polyglycerolphosphat und sind ebenfalls mit D- Alanin substituiert (Duckworth et al., 1975, Iwasaki et al., 1986). LTA synthetisierende Enzyme interagieren mit der Zellteilungsmechanik und ihre Lokalisierung erfolgt an der Zellteilungsebene (Formstone et al., 2008, Schirner et al., 2009). WTA synthetisierenden Enzyme hingegen sind entlang des Zellzylinders in helikaler Anordnung lokalisiert (Formstone et al., 2008). Auch werden WTA und LTA aus unterschiedlichen Vorstufen hergestellt. Die LTA- Vorstufe ist Phosphatidylglycerol (Ganfield & Pieringer, 1980), die WTA- Vorstufe ist CDP-Glycerol (Bhavsar & Brown, 2006). Deshalb ist die Stereochemie der Untereinheiten von LTA und WTA verschieden. LTA bestehen aus L- Glycerol- 1- Phosphat (S- Konfiguration), wohingegen WTA aus L- Glycerol- 3- Phosphat (R- Konfiguration) aufgebaut sind (Bhavsar & Brown, 2006).

Im Gegensatz zur WTA-Synthese findet die Synthese von LTA an der Außenseite der zytoplasmatischen Membran statt. LtaS ist das Enzym, welches die Phosphatidylglycerinuntereinheiten auf den Lipidanker überträgt (Gründling & Schneewind, 2007). Eine Verarmung an LtaS führt zu vergrößerten Zellen, teilweise verdickten Zellwänden und fehlplatzierten Septen (Gründling & Schneewind, 2007). Mutanten ohne funktionsfähige LTAs zeigen geringere Autolyseraten, weil sie weniger Peptidoglykanhydrolasen besitzen, sie sind hitzeempfindlich, haben Probleme bei der Zellteilung und die Biofilmbildung auf hydrophoben Oberflächen ist gestört (Weidenmaier et al., 2004, Fedtke et al., 2007, Oku et al., 2009, Swoboda et al., 2010). *S. coelicolor* besitzt eine Phosphoglycerol- LTA (Rahman et al., 2009). Die meisten untersuchten Streptomycceten enthalten zudem mit Glucose substituierte Glycerol- Wandteichonsäuren (Naumova et al., 1980).

2.3.5.2 Funktionen von anionischen Zellwandpolymeren

WTA und LTA bilden ein polyanionisches Netz, welches für Elastizität, Durchlässigkeit, Elektrostatik und Integrität der Zellhülle von Bedeutung ist (Neuhaus & Baddiley, 2003, Fabretti *et al.*, 2006, Fedtke *et al.*, 2007). Das dichte Netzwerk von negativen Ladungen bindet Kationen wie Mg^{2+} , was einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat (Heptinstall *et al.*, 1970). D-Alaninester regulieren durch ihre positive Ladung, wie viele Kationen von den negativ geladenen Phosphatgruppen gebunden werden können (Lambert *et al.*, 1977). *B. subtilis* reguliert dies überdies, indem er bei Mg^{2+} -Mangel mehr Teichonsäuren produziert (Ellwood, 1970). Teichonsäuren sind zudem beteiligt an der Sekretion von Proteinen, dem Transport von Nährstoffen, Proteinen, Ionen und Antibiotika (Neuhaus & Baddiley, 2003, Nouaille *et al.*, 2004). Sie sind Phagenrezeptoren (Chatterjee, 1969, Swoboda *et al.*, 2010), wichtige Virulenzfaktoren (Xia & Peschel, 2008) und notwendig für die Infektion, Biofilmbildung und Adhäsion an Gewebe bzw. glatte Oberflächen (Gross *et al.*, 2001, Weidenmaier *et al.*, 2004, Oku *et al.*, 2009). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Antibiotika- und Lysozymresistenz (Collins *et al.*, 2002, Kristian *et al.*, 2003, Kovács *et al.*, 2006, Bera *et al.*, 2007) und schützen vor antimikrobiellen Fettsäuren (Kohler *et al.*, 2009). Die Enzyme der WTA-Biosynthese sind daher geeignete Antibiotikaziele (Weidenmaier & Peschel, 2008).

Teichonsäuren haben eine Gerüst- oder Aktivierungsfunktion für hydrolytische Enzyme, welche eine Rolle bei der Synthese und dem Abbau der Zellwand spielen (Lambert *et al.*, 1977, Navarre & Schneewind, 1999, Silhavy *et al.*, 2010). Sie haben Einfluss auf das Zellwachstum, die Zellteilung und die Morphogenese (Pollack & Neuhaus, 1994, Gründling & Schneewind, 2007, Vergara-Irigaray *et al.*, 2008, Oku *et al.*, 2009). In *S. aureus* regulieren Teichonsäuren die Quervernetzung von Peptidoglykan, indem sie die Lokalisierung von PBP4, welches für die Quervernetzung der Glykanstränge zuständig ist, am Teilungsseptum regulieren. In einer *tagO*-Mutanten lokalisiert PBP4 nicht mehr, es ist dispers verteilt. Die Mutante hat daher ein geringeres Maß an quervernetztem Peptidoglykan (Schlag *et al.*, 2010). Dies ist jedoch nicht auf mangelndes TagO, sondern auf die fehlende Synthese von Teichonsäuren zurückzuführen (Atilano *et al.*, 2010). Eine *S. aureus tagO*-Mutante hat einen größeren Zelldurchmesser, neigt zu Zellaggregation, ist hitzeempfindlich und resistent gegenüber Phageninfektionen; ihre Zelloberfläche ist rau und uneben und sie hat Probleme, Biofilme zu bilden (Atilano *et al.*, 2010, Schlag *et al.*, 2010).

Weder LTA noch WTA sind essentiell. Deletiert man jedoch einen der Biosynthesewege, kommt es zu Zellteilungsproblemen und morphologischen Defekten (Silhavy *et al.*, 2010). Es ist nicht möglich, beide Synthesewege gleichzeitig auszuschalten (Oku *et al.*, 2009).

2.3.5.3 Modifikationen von Teichonsäuren durch D- Alaninester

Die Funktionen der Teichonsäuren stehen im Zusammenhang mit ihrer elektrischen Ladung (Archibald et al., 1961). Ihre Nettoladung wird durch Modifikationen angepasst, um die Interaktionen zwischen der Zellhülle und der Umgebung zu modulieren (Neuhaus & Baddiley, 2003). Die Art der Modifikation ist abhängig vom Stamm und der Umgebung (Swoboda et al., 2010). Protonierte D-Alanyl-ester sind die Hauptsubstituenten von Teichonsäuren vieler grampositiver Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Sie sind mittels Esterbindungen kovalent an die Hydroxylgruppen der Teichonsäuren geheftet (Lambert et al., 1977, Peschel, 2002, Neuhaus & Baddiley, 2003). WTA grampositiver Bakterien mit hohem GC-Gehalt sind nicht mit D-Alanin, sondern mit Acetyl-, Glutamyl- oder Lysylresten modifiziert (Shashkov et al., 2006, Weidenmaier & Peschel, 2008).

Die D-Alanierung erfolgt durch die Proteine des *dlt*-Operon (Perego et al., 1995). Sie ist abhängig vom Medium, dem pH-Wert und der Temperatur. Das Fehlen von D-Alaninestern führt zu einer besseren Angreifbarkeit durch kationische antimikrobielle Peptide, einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptidantibiotika und lytischen Enzymen sowie einer Herabsetzung der Aktivität von Autolysinen. Ohne D-Alanierung ist *S. aureus* weniger infektiös im Tiermodell, da seine Bindung an Oberflächen und Gewebe abgeschwächt ist (Peschel et al., 1999, Peschel et al., 2000, Collins et al., 2002, Silhavy et al., 2010). Es ist nur ein Mechanismus, wie das D-Alanin in Lipoteichonsäuren eingebaut wird, bekannt. Die D-Alaninester der LTA werden vermutlich durch nichtenzymatische Transacylierung auf andere LTA und auf WTA übertragen (Haas et al., 1984, Childs et al., 1985, Perego et al., 1995). Es findet ein dynamisches Turnover statt, was zur Feinabstimmung der negativen Ladungen führt. Die Transacylierung könnte ein Mechanismus der Signalübermittlung sein; sie könnte die Aktivität von Proteinen, z. B. von Autolysinen, bestimmen (Neuhaus & Baddiley, 2003). D-Alanyl-LTA ist eine energiereiche Verbindung. Ihr Energiegehalt ist vergleichbar mit dem von Aminoacyl-tRNAs. D-Alanyl-LTAs können somit freie Energie für Reaktionen außerhalb des Zytoplasmas bereitstellen (Neuhaus & Baddiley, 2003).

D-Alanyl-ester bestimmen die Dichte der Zellwand, indem sie die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen der Phosphatgruppen verhindern (Neuhaus & Baddiley, 2003) und sie spielen eine Hauptrolle bei der Immunantwort auf LTA. Die klinischen Symptome einer Sepsis sind bei grampositiven und gramnegativen Bakterien mehr oder weniger identisch; bei gramnegativen werden sie durch LPS und bei grampositiven durch LTA erzeugt (Morath et al., 2005).

2.3.6 Mutationen, die zum Verlust der Stäbchenform führen

Mutationen, die eine Veränderung der Zellform bei stäbchenförmigen Bakterien zur Folge haben, liegen in Genen, deren Produkte am Peptidoglykanstoffwechsel (z. B. PBPs, RodA) oder Teichonsäurestoffwechsel (z. B. TagF, TagA, TagO) beteiligt sind (Spratt & Pardee, 1975, Tamaki *et al.*, 1980, Honeyman & Stewart, 1989, Wagner & Stewart, 1991, Varley & Stewart, 1992, Henriques *et al.*, 1998, Nelson & Young, 2000, Popham & Young, 2003, D'Elia *et al.*, 2009a). Außerdem haben Mutationen der *mre*-Gene und *mreB* Homologen Auswirkungen auf die Zellgestalt (Wachi *et al.*, 1987, Doi *et al.*, 1988, Abhayawardhane & Stewart, 1995, Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005). Bei *E. coli* sind drei Regionen für die Ausbildung der korrekten Zellform verantwortlich. Das *dcw*-Gencluster (division and cell wall), die *mrd* (murein D) region und das *mre*-Gencluster (murein formation gene cluster E), welches nicht direkt an der Peptidoglykansynthese beteiligt ist (Wachi *et al.*, 1987, Doi *et al.*, 1988, Levin *et al.*, 1992, Donachie, 1993). Stäbchenförmige Bakterien können, bei Blockade der PBPs durch β -Lactamasen, vorübergehend als Kokken oder Filamente wachsen (den Blaauwen *et al.*, 2008).

E. coli und *B. subtilis* werden durch die Inaktivierung bestimmter Gene vom Stäbchen zur Kugel. Sind MreB, MreC, MreD, RodA oder PBP2 in *E. coli* defekt, ist die Zellteilung ständig aktiv und das Längenwachstum inaktiv. Dies führt zur Bildung von Kokken (Spratt & Pardee, 1975, Tamaki *et al.*, 1980, Matsuzawa *et al.*, 1989, de Pedro *et al.*, 2001). Eine Inaktivierung von RodA bzw. FtsW zeigt dabei denselben Phänotyp wie eine Inaktivierung von PBP2 bzw. PBP3. Dies weist auf ein Zusammenspiel von RodA und PBP2 bzw. FtsW und PBP3 hin (Boyle *et al.*, 1997, Hara *et al.*, 1997, de Pedro *et al.*, 2001). Eine *rodZ*-Mutante von *E. coli* verliert ebenfalls ihre Stäbchenform. Sie bildet runde Zellen mit einer verringerten Wachstumsrate und hat einen Defekt bei der Zellteilung (Bendezú *et al.*, 2009, Shiomi *et al.*, 2009). Sind MreB, MreC, MreD oder RodA gestört oder die Zellen daran verarmt, so bildet *B. subtilis* kugelige, abnormal geformte Zellen, welche nur bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen mittels Zellteilungsapparat wachsen und sich teilen (Levin *et al.*, 1992, Henriques *et al.*, 1998, Divakaruni *et al.*, 2005, Leaver & Errington, 2005). Eine *tagO*- oder eine *tagA*-Mutante von *B. subtilis* verliert ihre Form und kann sich nicht mehr gleichmäßig teilen; außerdem ist ihr Zellwandaufbau gestört (D'Elia *et al.*, 2006, D'Elia *et al.*, 2009a). Es ist nicht möglich, Deletionsmutanten von späten Teichonsäuren synthetisierenden Enzymen zu erzeugen; *tagO* muss zuerst deletiert werden. Depletionsmutanten von späten WTA-synthetisierenden Enzymen zeigen eine gestörte Morphologie (Bhavsar *et al.*, 2004). Das Längenwachstum ist gehemmt, was zu runden, geschwollenen Zellen führt. Außerdem kommt es zu ungleichmäßigen Verdickungen des Peptidoglykans, einer falschen Platzierung des Septums sowie einer verringerten Wachstumsrate (Pollack & Neuhaus, 1994, Soldo *et al.*, 2002, D'Elia *et al.*, 2006, Yamamoto *et al.*, 2008, Swoboda *et al.*, 2010).

Nach dem „two competing sites“ Modell gibt es Mutanten stäbchenförmiger Bakterien, die als Kugel wachsen, weil sie in ihrem Längenwachstum beeinträchtigt sind oder weil ihre Zellteilung überaktiv ist (Lleo et al., 1990). Manche dieser Mutanten können folglich durch eine Inhibition der Septumsynthese wieder zum Stäbchen werden. Eine *PBP2*- Mutante von *E. coli* z. B. behält ihre runde Form bei, auch wenn man die Septumsynthese inhibiert, da ihr Längenwachstum gestört ist. Kugelige *rodA*- oder *mreB*- Mutanten von *E. coli* hingegen können wieder als Stäbchen wachsen (Lleo et al., 1990). MreB hat eine negative Auswirkung auf die Zellteilung, die Überexpression von MreB führt daher zu einem Verlust der Zellteilung und einem Wachstum als Filament. In einer *mreB*- Mutanten hingegen ist FtsI erhöht und die Zellteilung aktiver, weshalb es zu kugeligen Zellen kommt (Wachi & Matsuhashi, 1989).

Außerdem gibt es Kokken, die, wenn man ihre Zellteilung inhibiert, ein laterales Längenwachstum zeigen. Die Hemmung der Zellteilung kann durch spezifische Antibiotika oder Mutationen geschehen (Lleo et al., 1990). Solche Kokken besitzen im Vergleich zu Kokken, die unter den gleichen Umständen kein Längenwachstum zeigen, eine größere Anzahl unterschiedlicher PBPs, weil sie sowohl einen PG-Synthesekomplex für das Längenwachstum als auch einen für die Septumsynthese enthalten. Die Aktivität dieser Komplexe ist jedoch unter normalen Bedingungen zu Gunsten der Zellteilung verschoben (Lleo et al., 1990). Die Existenz eines Elongationskomplexes bei Kokken steht im Einklang mit der Vorstellung, dass sie von Stäbchen abstammen (Siefert & Fox, 1998, Tamames et al., 2001).

2.4 Das bakterielle Zytoskelett

Fast alle Eubakterien besitzen eine Zellwand aus Peptidoglykan, welche für die Zellform verantwortlich ist (Schleifer & Kandler, 1972). Ausnahmen sind die Mollicutes wie z. B. Mycoplasmen und Spiroplasma. Sie besitzen keine Zellwand und haben dennoch definierte Formen (Trachtenberg & Gilad, 2001). Spiroplasma haben eine spiralförmige Gestalt, Mycoplasmen sind rundlich, stäbchenförmig oder wachsen als Filamente (Trachtenberg, 1998, Miyata & Ogaki, 2006). Dies beruht auf zytoskelettartigen Strukturen (Williamson *et al.*, 1991, Hegermann *et al.*, 2002, Trachtenberg, 2004). Das Zytoskelett von Mollicutes ist jedoch nicht dem anderer Bakterien oder dem eukaryontischen ähnlich (Townsend *et al.*, 1980, Trachtenberg, 2004, Miyata & Ogaki, 2006). Ein Zytoskelett aus helikalen Bändern ist verantwortlich für die Fortbewegung und Zellgestalt von Spiroplasma (Trachtenberg & Gilad, 2001). Es besteht aus äußerst stabilen Zytoskelettbändern (Trachtenberg, 2004). Die zytoskelettalen Bänder aus parallelen Fibrillen sind an die Zellwand angeheftet und folgen der kürzesten Helix auf der Zellinnenseite (Trachtenberg *et al.*, 2003). Kürzlich wurde auch ein MreB Homolog bei Spiroplasma gefunden; es wird vermutet, dass MreB ein elastisches Band bildet, welches die Stäbchenform erzeugt. Zwei weitere Bänder bestehend aus dem Fibril Protein vermitteln die helikale Form bzw. Bewegungen, indem sie mit dem MreB Band interagieren (Kürner *et al.*, 2005).

Bakterienzellen sind sehr klein und können deshalb durch Diffusion versorgt werden (Elowitz *et al.*, 1999); daher wurde lange Zeit angenommen, dass Bakterien weder ein Zytoskelett, noch Kompartimente besitzen (Trachtenberg, 2004). Trotzdem haben viele Proteine, das Chromosom sowie Plasmide eine definierte zelluläre Lokalisation (Shapiro & Losick, 2000, Pogliano, 2002). Inzwischen sind homologe Proteine zu allen drei Hauptkomponenten des eukaryontischen Zytoskeletts bei Bakterien bekannt (Ausmees *et al.*, 2003, Graumann, 2004), und es wird davon ausgegangen, dass sich das Zytoskelett in Prokaryonten gebildet hat, bevor es Eukaryonten gab (Erickson, 2001, van den Ent *et al.*, 2001a).

Das eukaryontische Zytoskelett ist ein dynamisches Netzwerk aus Filamenten und regulatorischen Proteinen. Seine drei Hauptkomponenten sind Aktin, Tubulin und Intermediärfilamente (IF) (Fletcher & Mullins, 2010). Das Zytoskelett bestimmt die Zellgestalt, ist es notwendig für die Zellteilung, die Segregation der Chromosomen und die Strukturierung des Zytosols. Es spielt eine Rolle bei der Anordnung der Zellorganellen, beim intrazellulären Transport und bewirkt Zellbewegungen sowie Phagozytose (van den Ent *et al.*, 2001a, Fletcher & Mullins, 2010). Sehr wichtig für das eukaryontische Zytoskelett sind Motor- und Hilfsproteine (Vale *et al.*, 1985, Allan, 1995, Wickstead & Gull, 2011). Es wurden bisher noch keine homologen Hilfsproteine für das prokaryontische Zytoskelett gefunden (Møller-Jensen & Löwe, 2005). Dem bakteriellen Zytoskelett werden ähnliche

Funktionen wie dem eukaryontischen zugeschrieben. Mutanten der bakteriellen Zytoskelettproteine zeigen Auffälligkeiten bei der Zellteilung, Zellgestalt und Zellpolarität sowie eine Beeinträchtigung der Sporenbildung (Young, 2003, Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005, Mazza et al., 2006).

Es wird angenommen, dass EF- Tu ebenfalls eine zytoskelettartige Struktur bilden könnte (Beck *et al.*, 1978). EF- Tu ist der Elongationsfaktor für die bakterielle Proteinsynthese (Lucas-Lenard & Lipmann, 1971, Weijland & Parmeggiani, 1993). Es liegen jedoch vier bis fünf Mal mehr Kopien des Proteins in der Zelle vor, als zur Proteinsynthese benötigt werden (Furano, 1975, Mayer, 2006). Isoliertes monomeres EF- Tu von *E. coli* formt *in vitro* Protofilamente (Helms & Jameson, 1995). In *B. subtilis* soll EF- Tu in einer helikalen Anordnung unter der Zellmembran lokalisieren (Defeu Soufo *et al.*, 2010). Für *E. coli* wurde jedoch eine gleichmäßige Verteilung von EF- Tu im Zytoplasma gezeigt (Schilstra *et al.*, 1984). In *B. subtilis* co- lokalisiert und interagiert EF- Tu mit MreB. In Zellen mit verringertem EF- Tu- Gehalt kommt es zu morphologischen Veränderungen, weil die helikale Lokalisation von MreB gestört ist (Defeu Soufo et al., 2010); wohingegen eine Überexpression von EF- Tu in *E. coli* zu Formverlust und Lyse führt (Mayer & Gottschalk, 2003).

2.4.1 Aktin und seine prokaryontischen Homologe

Aktin ist in vielen eukaryontischen Zellen das häufigste Protein und hochkonserviert (Kron *et al.*, 1992, Dominguez & Holmes, 2011). Aktinmonomere (G- Aktin) polymerisieren ATP- abhängig zu Filamenten, dem F- Aktin (Korn *et al.*, 1987, Kabsch & Holmes, 1995, Schmidt & Hall, 1998). Aktinfilamente sind dynamisch und polar. An ihrem Plusende überwiegt die Polymerisierung und am Minusende die Depolymerisierung (treadmilling) (Schmidt & Hall, 1998). Jeweils zwei Aktin- Protofilamente winden sich so umeinander, dass eine rechtsgängige Helix entsteht (Abbildung 2-24) (Holmes *et al.*, 1990).

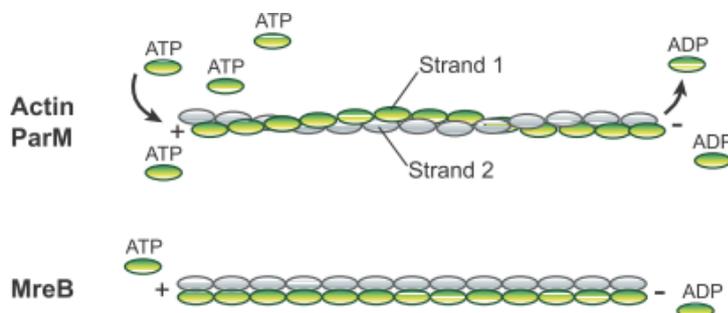


Abbildung 2-24. Aktin- und ParM- Filamente winden sich umeinander, wohingegen MreB parallele Filamente bildet (Graumann, 2007). Beide Stränge bestehen aus identischen Untereinheiten. Am Pluspol des Aktinfilaments wird ATP- gebundenes Aktin bevorzugt addiert, das ATP wird durch die ATPase- Aktivität des Aktin zu ADP hydrolysiert, und am Minuspol wird an ADP gebundenes Aktin wieder abgespalten. Diesen Vorgang nennt man „treadmilling“. MreB polymerisiert ATP- oder GTP- abhängig zu filamentösen Strukturen.

Es sind mehr Protein- Protein- Interaktionen von Aktin bekannt als von anderen Proteinen (Dominguez & Holmes, 2011). Aktinfilamente können untereinander und mit anderen Proteinen verknüpft sein und so hochorganisierte Netzwerke ausbilden (Schmidt & Hall, 1998, van den Ent et al., 2001a, Fletcher & Mullins, 2010). Dies wird durch eine Reihe von aktinbindenden Proteinen (ABPs) vermittelt und reguliert. ABPs verknüpfen, stabilisieren und destabilisieren die Aktinfilamente (Sun *et al.*, 1995, Winsor & Schiebel, 1997). In Bakterien wurden mehr als 35 sehr divergente Familien von aktinähnlichen Proteinen gefunden. Ihre Gene liegen hauptsächlich in Phagengenomen, auf Plasmiden und integrierenden konjugativen Elementen (Derman *et al.*, 2009). MreB und Aktin können trotz relativ geringer Aminosäuresequenzähnlichkeit aufgrund ihrer hochkonservierten Tertiärstruktur als Homologe betrachtet werden; Größe, Aufbau und konservierte Domänen entsprechen einander (van den Ent *et al.*, 2001). MreB polymerisiert in Anwesenheit von ATP oder GTP *in vitro* auf ähnliche Art wie Aktin zu Protofilamenten (van den Ent et al., 2001a, Esue *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2006). Während sich zwei Protofilamente des F- Aktin um einander winden, sind die Paare von MreB Protofilamenten jedoch parallel (Abbildung 2-24) und lagern sich oft zu Bündeln zusammen (van den Ent et al., 2001a, Graumann, 2007). MreB bildet in *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus* helikale Strukturen unterhalb der Zellmembran aus (Jones et al., 2001, Kruse *et al.*, 2003, Shih *et al.*, 2003, Figge et al., 2004) und soll eine Rolle bei der Chromosomensegregation von *B. subtilis* und *E. coli* spielen (Kruse et al., 2003, Soufo & Graumann, 2003). Wang und Sherratt fanden jedoch, dass die Chromosomensegregation nicht durch eine fehlende MreB Polymerisation gestört wird (Wang & Sherratt, 2010).

FtsA, ein weiteres aktinähnliches Protein, interagiert mit FtsZ und rekrutiert andere Zellteilungsproteine zum Z- Ring (Lutkenhaus & Addinall, 1997, Rothfield *et al.*, 1999, van den Ent & Löwe, 2000). Es bildet *in vitro* helikale Polymere, welche aus zwei mal zwei Protofilamenten bestehen (Lara *et al.*, 2005). Das plasmidkodierte ParM ist ein weiteres Aktin Homolog. ParM polymerisiert zu doppelt zusammengelagerten helikalen Filamenten, ähnlich dem F- Aktin (Abbildung 2-24). Es verteilt das R1- Plasmid bei der Zellteilung auf beide Tochterzellen (van den Ent *et al.*, 2002, Garner *et al.*, 2004, Löwe et al., 2004). AlfA von *B. subtilis* ist ein weiteres aktinähnliches Protein. Es ist bildet ähnliche Filamente wie ParM und ist ebenfalls an der Plasmidverteilung während des Wachstums und der Sporulation beteiligt (Becker *et al.*, 2006).

2.4.2 Tubulin und seine prokaryontischen Homologe

Eukaryontisches Tubulin bildet Mikrotubuli. Das sind hohle Röhren mit einem Durchmesser von 25 nm und einer Länge von mehreren μm . Mikrotubuli bestehen aus jeweils 13 Protofilamenten. Diese wiederum sind aus α - und β - Tubulin Heterodimeren aufgebaut, welche GTP- abhängig am

Plusende polymerisieren und am Minusende depolymerisieren (Abbildung 2-25) (van den Ent et al., 2001a, Jordan & Wilson, 2004, Graumann, 2007, Fletcher & Mullins, 2010). Mikrotubuli bilden die Bahnen für den mitotischen Spindelapparat, welcher die Chromosomen während der Mitose und Meiose teilt. Außerdem sind sie am Transport von intrazellulären Vesikeln, Mitochondrien und anderen Komponenten beteiligt (Jordan & Wilson, 2004). Tubulin gibt dabei die Richtung des Transportes vor, wohingegen Motorproteine die Kraft für die Bewegung liefern (van den Ent et al., 2001a).

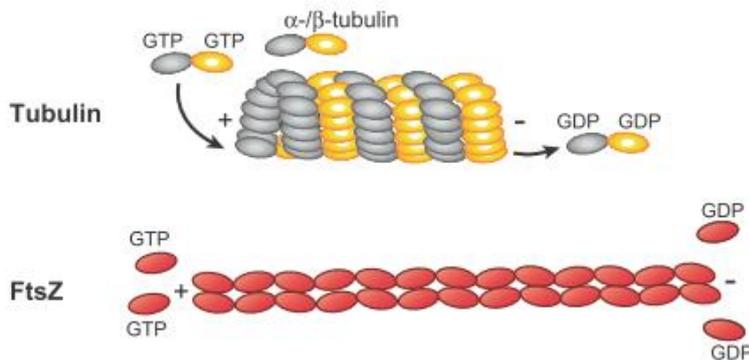


Abbildung 2-25. Tubulin und FtsZ (Graumann, 2007). Mikrotubuli bestehen aus α - und β -Heterodimeren; diese lagern sich GTP-abhängig am Plusende zu Röhren zusammen und werden nach der GTP-Hydrolyse am Minusende wieder abgebaut. FtsZ bildet ebenfalls GTP-abhängig parallele oder antiparallele Filamente.

Das Zellteilungsprotein FtsZ ist ein Tubulin Homolog (Erickson, 1998). Die Aminosäuresequenzähnlichkeit zwischen FtsZ und dem eukaryontischen α/β -Tubulin ist sehr gering, aber ihre 3D-Strukturen sind sehr ähnlich (Löwe & Amos, 1998, van den Ent et al., 2001a). Die Polymerisation von FtsZ erfolgt GTP-abhängig, (Abbildung 2-25) (Mukherjee & Lutkenhaus, 1994, Bramhill & Thompson, 1994). Die Hydrolyse von GTP reguliert das dynamische Verhalten von FtsZ-Filamenten und Mikrotubuli (Desai & Mitchison, 1997, Lu *et al.*, 1998, Lu *et al.*, 2000). *in vitro* bilden Tubulin und FtsZ Röhren und Blätter, welche aus parallelen oder antiparallelen Filamenten bestehen (Löwe & Amos, 1999). FtsZ-Regulatoren erfüllen ähnliche Funktionen wie die Mikrotubuli assoziierten Proteine MAPs, sie sind ihnen strukturell aber nicht ähnlich (Romberg & Levin, 2003, Gitai, 2005). MAPs sind Proteine, welche an Mikrotubuli binden, diese stabilisieren und deren Polymerisation vorantreiben. Außerdem gibt es Mikrotubuli destabilisierende Proteine (Desai & Mitchison, 1997, Winsor & Schiebel, 1997, Kinoshita *et al.*, 2001). Bei Prokaryonten gibt es Z-Ring stabilisierende (FtsA, ZipA, ZapA und SpoIIE) sowie Z-Ring destabilisierende Proteine (MinCD, EzrA und Sula) (Levin *et al.*, 1999, Gueiros-Filho & Losick, 2002, Romberg & Levin, 2003, Kawai & Ogasawara, 2006).

TubZ ist ein weiteres Tubulin Homolog. Es wird von *Bacillus* Plasmiden kodiert und hat eine Sequenzähnlichkeit zu FtsZ und Tubulin von 15- 20% (Ni *et al.*, 2010). TubZ gehört zur Superfamilie

der Tubulin/ FtsZ GTPasen, bildet ebenfalls dynamische lineare Polymere und ist für die Plasmidstabilität verantwortlich (Larsen *et al.*, 2007, Aylett *et al.*, 2010).

2.4.3 Intermediärfilamente und ihre prokaryontischen Homologe

Intermediärfilamente sind faserförmige Proteine, welche zu festen Platten zusammenlagern oder mit sich selbst, mit Aktin oder mit Tubulin zu einem Netzwerk verknüpft sein können (Herrmann & Aebi, 2004, Fletcher & Mullins, 2010). Sie verleihen der Zelle Elastizität und Stabilität, fangen mechanische Belastungen ab, gliedern das Zytoplasma, sind erforderlich für Muskelbewegungen und außerdem ein Bestandteil der Kernlamina (Herrmann & Aebi, 2004, Graumann, 2007, Herrmann *et al.*, 2009). Obwohl ihre Sequenzen kaum konserviert sind, teilen alle eukaryontischen IF- Proteine einen gemeinsamen Aufbau (Herrmann & Aebi, 2004). Dieser besteht aus einer zentralen α - helikalen Rod-Domäne aus einer bestimmten Anzahl von abwechselnden gleich großen coiled- coil Segmenten und Linkern. N- terminal werden sie von einer globulären Kopf- und C- terminal von einer globulären Schwanzdomäne eingerahmt (Abbildung 2-26) (Steinert *et al.*, 1985, Fuchs & Weber, 1994). Die Rod-Domäne ist essentiell für die Bildung von Filamenten. Eine charakteristische Eigenschaft von Intermediärfilamenten ist die Bildung elastischer Filamente *in vitro* ohne die Hilfe von Cofaktoren oder Energiezufuhr (Fuchs & Weber, 1994, Ausmees *et al.*, 2003).

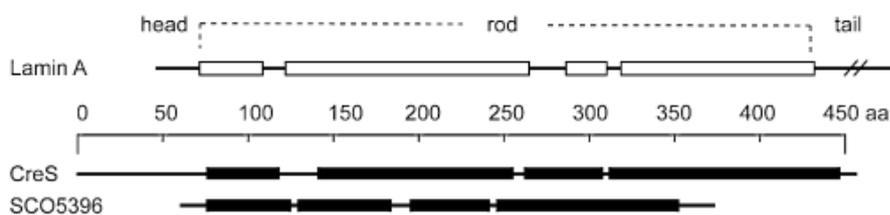


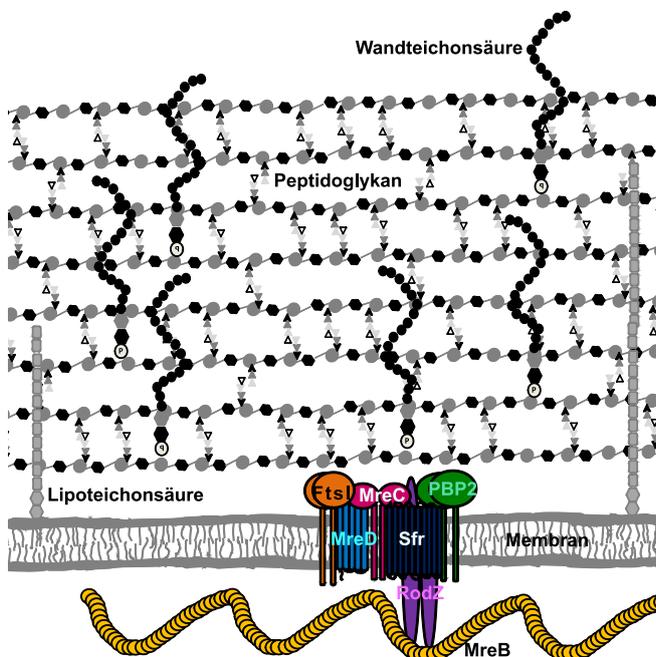
Abbildung 2-26. Schematische Abbildung von LaminA, einem humanen Intermediärfilament, sowie von Crescentin aus *C. crescentus* und SCO5396 aus *S. coelicolor* (Bagchi *et al.*, 2008). Der typische Aufbau eines Intermediärfilaments ist dreigeteilt. Es besteht aus einer Kopf- und einer Schwanzdomäne, welche eine in der Mitte befindliche Rod- Domäne umschließen. Die Rod- Domäne besteht aus coiled- coil Segmenten mit Linkern.

Das Crescentin von *C. crescentus* ist homolog zu den Intermediärfilamenten (Ausmees *et al.*, 2003). Crescentin ist notwendig für die vibroide (gekrümmte) Form von *C. crescentus*. *in vivo* bildet es eine helikale Struktur, welche an der gekrümmten Innenseite unter der Zytoplasmamembran lokalisiert (Ausmees *et al.*, 2003). Bei Datenbanksuchen wurden drei Proteine (SCO5396, SCO5397 und SCO3114) bei *S. coelicolor* mit putativen, den eukaryontischen Intermediärfilamenten ähnlichen, Rod- Domänen und unbekannter Funktion gefunden (Bagchi *et al.*, 2008). Eines davon – SCO5396 – bildet verzweigte gestreifte Filamente, welche optisch den Kernlamina ähneln. Eine Deletion von SCO5396 führt zu morphologischen Defekten sowie einer geringeren Auskeimungseffizienz der

Sporen, einer geringeren Wachstumsrate und einer veränderten Verzweigungshäufigkeit der Hyphen (Bagchi et al., 2008). Zudem sind die Hyphen der Mutante verformbarer als die WT Hyphen, was zum einen an einer weicheren Zelloberfläche oder zum anderen an einem geringeren Turgor liegen könnte (Bagchi et al., 2008).

2.5 Die Ziele dieser Arbeit

Bei den stäbchenförmigen Bakterien *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus* wurden untereinander sehr ähnliche Proteinkomplexe gefunden, (Abbildung 2-17) welche für das laterale Elongationswachstum benötigt werden. Das Modell in Abbildung 2-27 zeigt diesen Komplex für grampositive Bakterien.



Filamente von MreB und den Homologen lokalisieren einen Peptidoglykan synthetisierenden Komplex aus den Membranproteinen MreC, MreD und RodA, sowie der Transpeptidase PBP2. Das die Zellform bestimmende Protein RodZ ist ebenfalls Teil dieses Komplexes.

Überraschenderweise besitzt *S. coelicolor* ebenfalls ein *mre*-Gencluster, obwohl er es nicht für sein apikales Spitzenwachstum benötigt.

Abbildung 2-27. Ein Modell des Peptidoglykansynthesekomplexes von stäbchenförmigen Bakterien. Filamente von MreB sowie eventuellen MreB Homologen (bei *S. coelicolor* Mbl und SCO6166) lokalisieren einen Komplex aus MreC, MreD, PBP2 und RodA (Sfr). RodZ ist ebenfalls an dieser Komplexbildung beteiligt. Durch die Lokalisierung des Peptidoglykansynthesekomplexes wird der Ort des Einbaus von neuem Peptidoglykan festgelegt und somit die Form des Bakteriums bestimmt. Bei gramnegativen Bakterien gibt es nur ein MreB.

Um die Rolle der Mre- Proteine von *S. coelicolor* aufzuklären, sollten in dieser Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie interagieren die Mre- Proteine untereinander?
- 2) Formen sie einen ähnlichen Komplex, wie er für die laterale Zellwandsynthese bei stäbchenförmigen Bakterien postuliert wird – oder haben die Mre- Proteine für Streptomycceten spezifische Interaktionspartner?
- 3) Sind die Mre- Proteine auch an der Positionierung der Wandteichonsäuresynthese beteiligt?

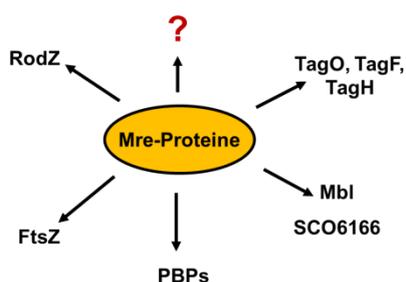


Abbildung 2-28. Mögliche Interaktionspartner der Mre- Proteine. Die MreB Homologen Mbl und SCO6166, das Zellteilungsprotein FtsZ, das morphogene Protein RodZ, Teichonsäuren synthetisierende Proteine, sowie diverse PBP's könnten mit den Mre- Proteinen interagieren. Außerdem könnte es für Streptomycceten spezifische Interaktionspartner geben.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Tabelle 3-1. Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> Xl1 blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ lacZM15, F':: proA⁺B⁺, lacI^q, tet^R</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁻ , <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^R), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> DHM1	F ⁻ , <i>cya-854, recA1, endA1, gyrA96 (Nal^R), thi1, hsdR17, spoT1, rfbD1, glnV44(AS)</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> NovaXG (Zapper Zellen)	F ⁻ , <i>mcrA, Δ(mcrC-mrr), endA1, recA1, Φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, araΔ139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, nupG, λ tonA</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	F ⁻ , <i>ompT, hsdFB (rb⁻mb⁻), gal dcm (DE3), pLysS (cam^R)</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> ET12567	F ⁻ , <i>dam, 13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, lacY1</i>	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. lividans</i> TK64	<i>pro, str-6</i>	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. coelicolor</i> M145	prototroph, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)
Δ <i>mreB</i>	<i>mreB</i> - Deletionsmutante von M145	(Mazza <i>et al.</i> , 2006)
Δ2097	SCO2097- Deletionsmutante von M145	(Kleinschnitz <i>et al.</i> , 2011a)
Δ2097 (pGM2097)	Δ2097 komplementiert mit Plasmid pGM2097	diese Arbeit
EMK2997	SCO2997 (<i>tagF</i>)- Deletionsmutante von M145	(Kleinschnitz <i>et al.</i> , 2011b)
EMK2997comp	EMK2997::pSET2997	(Kleinschnitz <i>et al.</i> , 2011b)
EMK2584	SCO2584- Deletionsmutante von M145	(Kleinschnitz <i>et al.</i> , 2011b)
EMK2584(pGM2584)	EMK2584 komplementiert mit Plasmid pGM2584	(Kleinschnitz <i>et al.</i> , 2011b)

3.2 Nährmedien und Zusätze

3.2.1 Flüssigmedien und Agar

Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf 1 l Flüssigmedium, d.h., ad 1000 ml H₂O soweit nichts anderes angegeben ist, für Festmedien werden pro Liter 16 g Agar zugegeben. Weichagar enthält 3 g Agar pro Liter. Agar und Flüssigmedien werden vor der Benutzung autoklaviert.

Beachte: S-, R5- und TB- Medium: Die Lösungen werden einzeln autoklaviert und anschließend unter sterilen Bedingungen zusammengemischt.

Tabelle 3-2. Nährmedien.

	Bestandteil	Menge	
LB- Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Trypton	10 g	
	Hefeextrakt	5 g	
	NaCl	5 g	
LB ⁺ - Medium	LB- Medium	1 l	
	Glucose	1 g	
S- Medium Lösung I (Okanishi <i>et al.</i> , 1974)	Pepton	4 g	
	Hefeextrakt	4 g	
	K ₂ HPO ₄	4 g	
	KH ₂ PO ₄	2 g	
	Glycin	10 g	
	H ₂ O	ad 800 ml	
S- Medium Lösung II (Okanishi <i>et al.</i> , 1974)	Glucose	10 g	
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g	
	H ₂ O	ad 200 ml	
R5- Medium	Saccharose	103 g	
	Glucose	10 g	
	K ₂ SO ₄	0,25 g	
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	10,12 g	
	Casaminosäuren	0,1 g	
	Hefeextrakt	5 g	
	TES	5,73 g	
	Spurenelement- Lösung	2 ml	
	H ₂ O	ad 960 ml	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	1 M CaCl ₂ * H ₂ O	20 ml	
40 mM KH ₂ PO ₄	10 ml		
20% L- Prolin	10 ml		
Spurenelement- Lösung für R5- Medium	ZnCl ₂	40 mg	
	FeCl ₃ * 6H ₂ O	200 mg	
	CuCl ₂ * 2H ₂ O	10 mg	
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	10 mg	
	Na ₂ B ₄ O ₇ * 10H ₂ O	10 mg	
	(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	10 mg	

	Bestandteil	Menge	
R2YE- Medium (Thompson <i>et al.</i> , 1982b)	Saccharose	103 g	
	K ₂ SO ₄	0,25 g	
	MgCl ₂ * 6H ₂ O	10,12 g	
	Glucose	10 g	
	Casaminosäuren	0,1 g	
	H ₂ O	ad 800 ml	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	0,5% KH ₂ PO ₄	10 ml	
	3,68% CaCl ₂ * 2H ₂ O	80 ml	
	20% L- Prolin	15 ml	
	5,73% TES- Puffer pH 7,2	100 ml	
Spurenelement- Lösung	2 ml		
NaOH	5 ml		
10% Hefeextrakt	50 ml		
TB- Medium	Trypton	12 g	
	Hefeextrakt	24 g	
	Glycerin	4 ml	
	H ₂ O	ad 900 ml	
TB- Medium Zusatz	KH ₂ PO ₄	2,31 g	
	K ₂ HPO ₄	12,54 g	
	H ₂ O	ad 100 ml	
Soja- Mannit- Medium (Cullum)	Mannitol	20 g	
	Sojamehl	20 g	
Soja- Mannit- Medium mit MgCl ₂	+ MgCl ₂ * 6H ₂ O	2 g	
Soja- Mannit- Medium 10,3% (w/v)			
Saccharose	+ Saccharose	103 g	

3.2.2 Indikatormedien

M63- Agar- Platten: 800 ml H₂O mit 16 g Agar werden autoklaviert und 200 ml autoklaviertes 5x M63- Medium sowie 10 ml einer 20%igen steril filtrierten Laktose- Lösung werden zugegeben. (Alternativ können auch 10 ml einer 20%igen Maltose- Lösung sowie 5 ml einer 100 mM IPTG- Lösung beigefügt werden.)

Tabelle 3-3. Indikatormedien.

	Bestandteil	Menge
5x M63- Medium (Karimova <i>et al.</i> , 1998)	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
	KH ₂ PO ₄	68 g
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 mg
	Vitamin B1	5 mg
	mit KOH- Plättchen	pH 7,0 einstellen
LB / X- Gal- Medium	LB- Medium	1 l
	X- Gal 20 mg/ml	2 ml
	IPTG 100 mM	5 ml
X- Gal- Lösung	X- Gal	200 mg
	Dimethylformamid	10 ml

	Bestandteil	Menge
Lactose- Lösung 20% (w/v)	Lactose H ₂ O	20 g ad 100 ml
Maltose- Lösung 20% (w/v)	Maltose H ₂ O	20 g ad 100 ml
IPTG- Lösung 100 mM	IPTG H ₂ O	0,24 g ad 10 ml
McConkey- Medium	Fertigmischung H ₂ O	50 g ad 1 l

3.2.3 Antibiotika

Die Stammlösungen werden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Verhältnis von 1:1000 dem Nährmedium zugegeben.

Tabelle 3-4. Antibiotika.

Antibiotikum	gelöst in	Konzentration [mg/ml]
Ampicillin	H ₂ O	150
Apramycin	H ₂ O	50/100
Chloramphenicol	EtOH 95%	50
Kanamycin	H ₂ O	50
Nalidixinsäure	0,2 N NaOH	30
Streptomycin	H ₂ O	100
Tetracyclin	EtOH 50%	100
Thiostrepton	DMSO	25

3.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt.

Tabelle 3-5. Oligonukleotide für das BTH System.

Bezeichnung	Sequenz	Zielkonstrukte
2upmreBXb 2lomreBK	ACTCTAGAGGGGAACTCAATGTCG TCGGTACCATCTACGGGGCGAGGC	pUT18c- mreB; pKT25- mreB
2upmreBXb mreBlo18K	ACTCTAGAGGGGAACTCAATGTCG TCGGTACCGATCTACGGGGCGAGGC	pUT18- mreB
2upmreCXb 2lomreCK	ACTCTAGAGGGACACGAAAGAG AAGGTACCACGGCTCGGGCTGCTC	pUT18c- mreC; pKT25- mreC
2upmreCXb mreClo18K	ACTCTAGAGGGACACGAAAGAG TCGGTACCGCTCGGGCTGCTCGTT	pUT18- mreC
2upmreDXb 2lomreDK	ACTCTAGAGCGCGTCAACCGGATC AAGGTACCACAGCCGCTTGACCC	pUT18c- mreD; pKT25- mreD
2uprodAXb 2lorodAK	ACTCTAGAGACCGGCAACAGCTTC AAGGTACCACGCCGACATCGGTCT	pUT18c- sfr; pKT25- sfr
2upSAMXb 2lowSAMK	ACTCTAGAGGTCCTTGTTCAGC AAGGTACCAGTCGGACTTCTTAC	pUT18c- SAM; pKT25- SAM
2upmbIXb 2lombIK	ACTCTAGAGACCGCCAGTCGGCGTC AAGGTACCAGTCGGAGTCGGCGTC	pUT18c- mbl; pKT25- mbl
2upmbIXb Mbllo18K	ACTCTAGAGACCGCCAGTCGGCGTC CTGGTACCCAGTCGGAGTCGGCGTG	pUT18- mbl
2upmreBHXb 2lomreBHK	ACTCTAGAGCTCCGGCGGCCCGGAC AAGGTACCAGTGGGGTGGGTGTC	pUT18c- SCO6166; pKT25- SCO6166
mreBHup18Xb mreBHlo18K	ACTCTAGAGACCGTGCTCCGGCGG AAGGTACCCAGTGGGGTGGGTGTC	pUT18- SCO6166
FtsIupXba FtsIlostopMun	ACTCTAGAGACGGAAGTGTCCGAC CCCAATTGTCAGGGTTTGAAGGTG	pUT18c- ftsI; pKT25- ftsI
FtsIupXba FtsIlo18Mun	ACTCTAGAGACGGAAGTGTCCGAC CCCAATTGTCAGGGTTTGAAGGTG	pUT18- ftsI
2897dSupXb 2897loK	ACTCTAGACACCAAGCAGTCCAAC AAGGTACCCACTGACGCCTGGGTGTG	pUT18- SCO2897; pUT18c- SCO2897; pKT25- SCO2897
3580upXb 3580lo1Mun	ACTCTAGAGCCAAAGAAGCGCTCG CTCAATTGCAGCGTCGTCGGCCGGG	pUT18- SCO3580; pUT18c- SCO3580; pKT25- SCO3580
3901dSupXb 3901lo18Mun	ACTCTAGAGTTCTTCGGCTGCCTG CTCAATTGTAGCCGTTCTGCCCCAG	pUT18- SCO3901; pUT18c- SCO3901; pKT25- SCO3901
5039upXb 5039loK	ACTCTAGAGGGCGCCTTCATCGTG AAGGTACCCACTGCCCCAGTCCAC	pUT18- SCO5039; pUT18c- SCO5039; pKT25- SCO5039
4132dSupXb 4132loK	ACTCTAGATGTCTACCTCGTCGCC AAGGTACCCACACCGTGGTGGGCAG	pUT18- SCO4132; pUT18c- SCO4132; pKT25- SCO4132
ftsZup18Xba ftsZloK	ACTCTAGAGGCAGCACCGCAGAAC AAGGTACCCACTTCAGGAAGTCCG	pUT18- ftsZ; pUT18c- ftsZ; pKT25- ftsZ
tagHupXb tagHloK	ACTCTAGAGCCCACCGTCGTCGTC AAGGTACCACACGGCTGTCGGAGC	pUT18- SCO2996; pUT18c- SCO2996; pKT25- SCO2996

Bezeichnung	Sequenz	Zielkonstrukte
tagFupXb tagGloM	ACTCTAGAGTCCGTCACCGCGATG GGCAATTGCATGACGAGGTCGCTC	pUT18- SCO2997; pUT18c- SCO2997; pKT25- SCO2997
tagOupXb tagOrev	ACTCTAGAGCGTGAATACCTGCTG AAGGTACCCACCGGGTCCCCGTACG	pUT18- SCO5365; pUT18c- SCO5365; pKT25- SCO5365
2980upXb 2980revK	ACTCTAGAGACCGCGGACGCGGGT AAGGTACCCACTTGACGGCGCCCCG	pUT18- SCO2980; pUT18c- SCO2980; pKT25- SCO2980
rodZupXbal rodZloKpnl	ACTCTAGAGTCCAACGGCAAATCC TTGGTACCCATCCGACCTGCGGGT	pUT18- rodZ; pUT18c- rodZ; pKT25- rodZ
2uPBPXb 2loPBPk	ACTCTAGAGACCAACATCCCCGAG AAGGTACCATACGCGTGCCCTCC	pUT18c- PBP2; pKT25- PBP2
Sequ-pUT18cfw Sequ-pUT18crev	ACGTTTCGAAGTTCTCG GGCTGGCTTAACTATG	Sequenzierprimer
Sequ-pKT25fw Sequ-pKT25rev	ATCGACATGTTCCGCA CTTCGCTATTACGCCA	

Tabelle 3-6. Oligonukleotide für die Herstellung, Komplementierung und den Nachweis von Mutanten.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
UptagFfwE UptagFrevB lotagFfwB lotagFrevH	AAGAATTCACGCAGAGCTCGA TTGGATCCCATCGCGGGGACTCCT AAGGATCCTCATGAGGACAGCCAC GGAAGCTTTGCCAGGTGATCTGGAG	Primer für die Deletion von <i>SCO2997</i>
TagF1fw TagF1rev TagF2fw TagF2rev	AGCCACAGCAACAAGT GATCATCAGGTCGTAC GAAACGGTCTGCTGA TACATCTTGCTGGTGG	Kontrollprimer für die Deletion von <i>SCO2997</i>
TagF2rev lotagFfwB	TACATCTTGCTGGTGG AAGGATCCTCATGAGGACAGCCAC	Primer für die Southern Blot Sonde
TagFkomeco TagFkombam	CCGAATTCTGTGAGCACACCGTC AAGGATCCGTGGCTGTCCTCATG	Primer für die Komplementation von <i>EMK2997</i>
TagFseqmitte	CTGTACGACCTGATGA	Sequenzierprimer
up2584fE up2584rB lo2584fB lo2584rH	CCGAATTCGCGCTGCGCCTGTG TTGGATCCACCCGCGTCAGCGC TTGGATCCTGAGCTGCCCCCGGG GGAAGCTTGACGCCACTACCCG	Primer für die Deletion von <i>SCO2584</i>
2584upNde 2584loB	GGCATATGCGGCCGCGGGTGGC AAGGATCCGGGGCTGCGCGGGATC	Primer für die Komplementation von <i>EMK2584</i>
nKdel2584fw nKdel2584r	CGAAGTACATCGTCAC TACGCCCATGTAGATC	Kontrollprimer für die Deletion von <i>SCO2584</i>
kd-sco2097up kd-sco2097r	GTAAGGCGCTGATCAG TGGACGGCCCTGAAA	Kontrollprimer für die Deletion von <i>SCO2097</i>
K5365rev K5365up	CCGGACGTCATT CAACCATCGTCGATA	Kontrollprimer für die Deletion von <i>SCO5365</i>

Tabelle 3-7. Oligonukleotide für die Herstellung von Expressionsvektoren.

Bezeichnung	Sequenz	Zielkonstrukt
MreCupB MreCloH	AAGGATCCAGGGACACGAAAGAG GGAAGCTTGGGGTGATGGCTC	MreC mit N- terminalem Streptag
MreDupNde MreDloBg-His	GGCATATGCGCGTCAACCGG AAAGATCTCAGCCGCTTGACCCC	MreD mit C- terminalem Histag
pJW7D2837fw pJW7D4378rev	TGTGGAATTGTGAGCG TTTTCGAACTGCGGGT	Sequenzierprimer
rodZupNde rodZloB	CCCATATGTCCAACGGCAAATCC AAGGATCCTCCGACCTGCGGGTC	RodZ mit C- terminalem Histag

Tabelle 3-8. Oligonukleotide für das Testen der Diversität der Genbank.

Bezeichnung	Sequenz	Nachweis für
RTmreBf RTmreBr	GGGGAACCTCAATGTCGTTCA CCGATCATCTTCTTCGCTTC	<i>mreB</i>
RTmreCf RTmreCr	GCTGAAGCAGTTCGACAAGA ATGGTGATGGTCCAGGAGAA	<i>mreC</i>
RTmreDf RTmreDr	CCCTGTACGACCTGCTGCT GAGGAGATGTCGGGGCTCT	<i>mreD</i>
RTpbpf RTpbpr	CACCAGGAGTGAAGAAGGA TTGTTGGCCTCCAGTAGTC	<i>PBP2</i>
RTrodAf RTrodAr	CGTTCTCGAAGGTCTGGAAG AGACCGACTTCGTCTTACC	<i>sfr</i>
RTmbLf RTmbLr	ACTGCCAATACCGCCAGTCT GTCATCTTCTCCGCGAAGTC	<i>mbl</i>
RTmreBHf RTmreBhr	ATCTCACGGAGGTGGTGCT AGCATCGAGGTCGTCATGT	<i>SCO6166</i>

Zum Testen der Diversität der konstruierten Genbank wurden Oligonukleotide (Heichlinger, 2011) für Realtime- PCR, welche kleine Fragmente der jeweiligen Gene amplifizieren, verwendet.

3.4 Plasmide, Vektoren, Cosmide

Tabelle 3-9. *E. coli* Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pKT25	pSU40-Derivat, <i>aph</i> , <i>cya</i> -T25	(Karimova et al., 1998)
pUT18	pUC19-Derivat, <i>bla</i> , <i>cya</i> -T18	(Karimova et al., 1998)
pUT18c	pUC19-Derivat, <i>bla</i> , <i>cya</i> -T18	(Karimova et al., 1998)
pKT25-zip	pKT25-Derivat, <i>aph</i> , leucine zipper of GCN4	(Karimova et al., 1998)
pUT18c-zip	pUT18c-Derivat, <i>bla</i> , leucine zipper of GCN4	(Karimova et al., 1998)
pYT1	Expressionsvektor mit P _{rha} , strep-tag	(Tiffert, 2005)
pYTMreC	Expressionsplasmid mit P _{rha} , MreC strep- Fusion	diese Arbeit
pJoe2775	Expressionsvektor mit P _{rha} , His-tag	(Volf et al., 1996)
pJoeMreC	Expressionsplasmid MreC mit P _{rha} , MreC His- Fusion	diese Arbeit
pJoeRodZ	Expressionsplasmid RodZ mit P _{rha} , RodZ His- Fusion	diese Arbeit
pRARE2	<i>cam</i> ^R , <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>argX</i> , <i>glyT</i> , <i>ileX</i> , <i>leuW</i> , <i>metT</i> , <i>proL</i> , <i>thrT</i> , <i>thrU</i> , <i>tyrU</i>	Novagen
pDrive	Klonierungsvektor P _{T7} , <i>kan</i> ^R , <i>amp</i> ^R , <i>Plac</i> , <i>lacZ</i> ⁺	QIAGEN

Eine Übersicht über die für das BTH konstruierten Plasmide befindet sich im Anhang.

Tabelle 3-10. Streptomyceten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pK18	pUC-Derivat, <i>aphIII</i> , <i>lacZ</i> ⁺ α	(Pridmore, 1987)
pKO2584	pK18 enthält 1521 bp upstream und 1539 bp downstream Fragmente inclusive Start- und Stopp-Codons von <i>SCO2584</i>	(Kleinschnitz et al., 2011b)
pKO2997	pK18 enthält 1610 bp upstream und 1620 bp downstream Fragmente inclusive Start- und Stopp-Codons von <i>SCO2997</i>	(Kleinschnitz et al., 2011b)
pSET152	Integrationsvektor, <i>lacZ</i> ⁺ α , <i>ΦC31int</i> , <i>oriT</i> , <i>apra</i> ^R	(Bierman et al., 1992)
pSET2997	pSET152 + <i>SCO2997</i> mit nativem Promotor	(Kleinschnitz et al., 2011b)
pGM1202	pGM190- Derivat, <i>oriT</i> , <i>aac</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA}	(Kleinschnitz et al., 2011b)
pGM2584	pGM1202 + <i>SCO2584</i> -His ₆	(Kleinschnitz et al., 2011b)
pGM190	pSG5-Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , <i>lacZ</i> ⁺ α His-tag	(Mazza et al., 2006)
pGM202	pSG5-Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , His-tag	G. Muth unpublished
p2097	pGM190- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} <i>SCO2097</i> - His ₆ - Fusion	(Kleinschnitz et al., 2011a)
pMreB	pGM190- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , MreB- His ₆ - Fusion	(Kleinschnitz et al., 2011a)
pMreC	pGM190- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , MreC- His ₆ - Fusion	(Kleinschnitz et al., 2011a)
pMreD	pGM202- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , MreD- His ₆ - Fusion	(Kleinschnitz et al., 2011a)
pSfr	pGM190- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , Sfr- His ₆ - Fusion	(Kleinschnitz et al., 2011a)
pSfrMreD	pGM190- Derivat, <i>aphIII</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , Sfr- His ₆ - MreD- His ₆ - Fusion	diese Arbeit
Cosmid	Eigenschaften	Referenz
c88	Derivat von Supercos-1	(Redenbach et al., 1996)

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 3-11. 50x TAE- Puffer für die DNA- Gelektrophorese.

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

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

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

Tabelle 3-12. E- 1- F- Puffer für Eckardgele.

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

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

Tabelle 3-13. Puffer für die Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen nach der CaCl₂- Methode.

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

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

Tabelle 3-14. P- Puffer zur Herstellung und T- Puffer zur Transformation von Protoplasten.

	Bestandteil	Menge für 200 ml	Menge für 1 l
P- Puffer	Saccharose	20,6 g in 172 ml H ₂ O	103 g in 860 ml H ₂ O
	Spurenelementlösung (siehe R5- Medium)	400 µl	2 ml
	250 mM TES pH 7,2	20 ml	100 ml
	140 mM K ₂ SO ₄	2 ml	10 ml
	40 mM KH ₂ PO ₄	2 ml	10 ml
	250 mM MgCl ₂	2 ml	10 ml
	250 mM CaCl ₂	2 ml	10 ml
	Bestandteil	Menge	
T- Puffer	PEG- 2000	1 g	
	P- Puffer	3 ml	

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

Tabelle 3-15. Puffer für die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse.

	Bestandteile	Menge/Konzentration
Puffer 1, bei 4°C lagern	Glucose	50 mM
	Tris/HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA	10 mM
	nach dem Autoklavieren RNase zugeben	100 µg/ml
Puffer 2, vor Gebrauch frisch ansetzen	NaOH	0,2 N
	SDS (w/v)	1%
Puffer 3, autoklavieren	5 M Kaliumacetat	60 ml
	Eisessig	11,5 ml
	H ₂ O	28,5 ml

Tabelle 3-16. Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Streptomyceten.

	Bestandteil	Menge/ Konzentration
Puffer 1	Puffer 1 (alkalische Lyse) + Lysozym	5 ml Spatelspitze
5% SDS (w/v)	SDS H ₂ O	5 g ad 100 ml
Natrium- Acetat 3 M pH 5,2	Natrium- Acetat Essigsäure	3 M bis pH 5,2
TE- Puffer pH 8,0	Tris EDTA HCl	10 mM 1 mM bis pH 8,0

Tabelle 3-17. Lösungen für den Southern Blot.

	Bestandteil	Konzentration
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris/HCl pH 8	0,5 M
	NaCl	1,5 M
20X SSC	NaCl	3 M
	Natrium- Citrat	0,3 M
	NaOH	bis pH 7

Tabelle 3-18. Hybridisierungslösungen für den Southern Blot.

	Bestandteil	Menge	Konzentration
Vorhybridisierungslösung	20X SSC	25 ml	5X
	35% N- Lauroylsarkosin Na- Salzlösung	0,3 ml	0,10%
	10% SDS- Lösung	0,2 ml	0,02%
	H ₂ O	74,5 ml	
	Blocking Reagenz (Milchpulver)	1 g	1%

Um das Milchpulver zu lösen, wird die Vorhybridisierungslösung aufgeköcht. Die Hybridisierungslösung besteht aus 5 ml Vorhybridisierungslösung mit der hitzedenaturierten Sonde (10 min bei 95°C inkubieren und anschließend rasch im Eis- Ethanol- Bad abkühlen).

Tabelle 3-19. Lösungen für die Nachweisreaktion des Southern Blots.

Puffer	Bestandteil	Menge/Konzentration
2X SSC 0,1% SDS	20X SSC	100 ml
	10% SDS	10 ml
	H ₂ O	890 ml
0,1X SSC 0,1% SDS	20X SSC	5 ml
	10% SDS	10 ml
	H ₂ O	985 ml
Puffer A	Tris/HCl pH 7,5	100 mM
	NaCl	150 mM
Puffer B	Puffer A	
	Blocking Reagenz (Milchpulver)	1%
Puffer C	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
Antikörper- Lösung	Puffer A	20 ml
	Antikörper Anti- Dig- FAB	4 µl
Detektionspuffer	Tris pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
CSPD- Arbeitslösung	Detektionspuffer	1 ml
	CSPD- Lösung	10 µl

Tabelle 3-20. Lösungen für β -Galactosidaseaktivitätsbestimmungen.

	Bestandteil	Konzentration
PM2- Medium pH7,0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	70 mM
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	30 mM
	MgSO_4	1 mM
	MnSO_4	0,2 mM
	β - Mercaptoethanol frisch zugeben	100 mM
Substrat- Lösung	ONPG in PM2- Medium ohne β - Mercaptoethanol Lagerung bei -20°C	4 mg/ml
Stopp- Lösung	Na_2CO_3	1 M
SDS- Lösung	SDS	0,1%

Tabelle 3-21. Lösungen für die Elektronenmikroskopie.

	Bestandteil	Konzentration/Menge
0,2 M PB- Puffer pH 7,4	Na_2HPO_4	21,8 g
	NaH_2PO_4	6,4 g
	H_2O	ad 1 l
Glutaraldehyd 2%	Glutaraldehyd	2%
Agarose 2% in PBS	Agarose	2%
OsO_4 in Phosphatpuffer	OsO_4	1%
	Phosphat	0,1 M
Uranylacetat	Uranylacetat	1%
Bleicitrat	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	1,33 g
	$\text{Na}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	1,76 g
	H_2O	42 ml
	1N NaOH	8 ml

Tabelle 3-22. Lösungen für die Peptidoglykanisolierung aus Streptomyceten.

Lösung	Konzentration
Tris/HCl pH 7	50 mM
SDS	5%
NaCl	1 M
NaH_2PO_4 pH 7,2	0,7 M
Methylenblau	0,5%
Tris/HCl pH 7,5	100 mM
+ MgSO_4	20 mM
+ DNase	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
+ RNase	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
+ CaCl_2	10 mM
+ Trypsin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SDS	8%
LiCl	8 M
EDTA pH 7	100 mM

Zunächst werden nur MgSO_4 , DNase und RNase zum 100 mM Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Erst nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden kommen CaCl_2 und Trypsin dazu.

Tabelle 3-23. Lösungen für die WTA- Isolierung aus Zellextrakten.

Bestandteil	Konzentration
Na- Acetat pH 4,6	20 mM
SDS	2%

Tabelle 3-24. Puffer für die WTA- Isolierung nach (Meredith *et al.*, 2008).

	Bestandteil	Konzentration
Puffer1	MES	50 mM
	NaOH	bis pH 6,5
Puffer2	MES	50 mM
	SDS	4% (w/v)
	NaOH	bis pH 6,5
Puffer3	MES	50 mM
	NaCl	2% (w/v)
	NaOH	bis pH 6,5
Puffer4	Tris	20 mM
	SDS	0,5% (w/v)
	HCl	bis pH 8

Dem Puffer4 wird frisch 20 $\mu\text{l/ml}$ ProteinaseK zugegeben. Außerdem werden 0,1 M NaOH oder 10%ige TCA für die Hydrolyse der WTA benötigt.

Tabelle 3-25. Puffer für die WTA- Isolierung (Protokoll Kathrin).

	Bestandteil	Menge/Konzentration
2 M NaCl	NaCl	2 M
PBS	KCl	0,2 g
	KH_2PO_4	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,15 g
	NaCl	8 g
	H_2O	ad 1000 ml
4% SDS	SDS	4%
50 mM Tris/HCl pH 7 mit MgCl_2	Tris	50 mM
	HCl	bis pH 7
	MgCl_2	5 mM
1 M Tris/HCl pH 7	Tris	1 M
	HCl	bis pH 7
1 M Tris/HCl pH 7 mit NaCl	Tris	1 M
	NaCl	1 M
	HCl	bis pH 7
TCA	TCA	10%

Zur 50 mM Tris/HCl Lösung pH 7 mit MgCl_2 werden vor der Benutzung 0,2 mg/ml Trypsin, 0,1 mg/ml RNase und 0,1 mg/ml DNase zugegeben.

Tabelle 3-26. Lösungen für die Phosphatbestimmung zur Quantifizierung von Teichonsäuren.

	Bestandteil	Menge/Konzentration
Phosphat- Standard	KH ₂ PO ₄	0,1 g
	H ₂ O	100 ml
Ammoniummolybdat- Lösung	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	1,25%
L- Ascorbinsäure- Natriumsalz- Lösung	L- Ascorbat- Na ⁺	5%

Die Lösungen für die Phosphat- Bestimmung nach (Chen *et al.*, 1956) werden mit H₂O aus der Millipore- Anlage angesetzt, da der Nachweis sehr sensitiv ist. Aus demselben Grund werden nur neue, ungespülte Reagenzgläser verwendet. Die 5%ige L- Ascorbinsäure- Natriumsalzlösung wird jeweils frisch angesetzt.

Tabelle 3-27. WTA- PAGE Gel für Tris/Tricine Puffer.

	Bestandteil	Volumen/Konzentration
Sammelgel	2 M Tris/HCl pH 8,5	3 ml
	H ₂ O	6 ml
	Rotiphorese Gel 40 (19:1)	1 ml
	10% APS	100 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel	2 M Tris/HCl pH 8,5	20 ml
	Rotiphorese Gel 40 (19:1)	40 ml
	10% APS	600 µl
	TEMED	60 µl
10x Tris- Tricine- Laufpuffer	Tris	1 M
	Tricine	1 M
	HCl	bis pH 8,2

Der Ansatz reicht für zwei große Gele. Der Ladepuffer besteht aus 50% Glycerin (v/v) in Ladepuffer mit einer Spur Bromphenolblau. Für die Große Gelkammer werden 3- 4 l Tris- Tricine- Laufpuffer benötigt.

Tabelle 3-28. WTA- PAGE- Gel für TBE- Puffer.

Bestandteil	Menge
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	8 ml
H ₂ O	0,5 ml
10X TBE	3,4 ml
TEMED	10 µl
10% APS	40 µl

Die angegebenen Mengen sind gerade ausreichend für zwei kleine Gele. Der Ladepuffer besteht aus 50% Glycerin (v/v) in H₂O mit einer Spur Phenolrot. Als Laufpuffer wird 0,25 M TBE- Puffer eingesetzt.

Tabelle 3-29. 10x TBE- Puffer.

	Bestandteil	Menge
10X TBE- Puffer	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA pH 8	20 ml
	H ₂ O	ad 1 l

Tabelle 3-30. Färbelösungen für die WTA- PAGE.

	Bestandteil	Konzentration
EAW- Puffer	EtOH	40%
	HAc	5%
Natrium- meta- periodat- Lösung	Natriummetaperiodat	0,7%
Silberlösung	Bio- Rad silver stain	10%
Entwickler- Lösung	Bio- Rad developer	8 g/250 ml
Essigsäure	HAc	5%

Da die Silberfärbung sehr sensitiv ist, verwendet man für die Herstellung der Lösungen H₂O aus der Millipore- Anlage.

3.6 Chemikalien und andere Materialien

Tabelle 3-31. Chemikalien und Materialien.

Chemikalie	Anbieter
3MM Papier	Whatman
Aceton	Sigma Aldrich
Acrylamid 30% (37,5:1)	Roth
Acrylamid 40% (19:1)	Roth
Acrylamid LösungA	Roth
Agar- Agar	Roth
Agarose	Gibco
Anti- Digoxigenin- Antikörper- Konjugat	Roche
APS	Serva
ATP	Fermentas
Biorad developer	Biorad
Biorad silver stain	Biorad
Bisacrylamid	Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Riedel-de Haën
CaCl ₂ * H ₂ O	Merck
Casaminosäuren	BD
Chloroform	Roth
CSPD	Roche
CuCl ₂ * 2H ₂ O	Merck
Desoxynukleotide	Boehringer
Dialyseschläuche 500- 1000 Dalton	Spectrum Labs
DIG DNA labeling mix	Roche
Dimethylformamid	Merck
DMSO	Merck
EDTA (Triplex III)	Merck
Eisessig	Roth
Ethidiumbromid	Serva
EtOH	Roth
FeCl ₃ * 6H ₂ O	Merck
FeSO ₄ * 7H ₂ O	Merck
Ficoll400	Serva
Glasperlen Ø 0,45- 5 mm	Roth
Glasperlen Ø 0,75- 1 mm	Roth
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl	Sigma Aldrich
HClO ₄	Merck
Hefeextrakt	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
K ₂ HPO ₄	Merck

Chemikalie	Anbieter
K_2SO_4	Riedel-de Haën
Kaliumacetat	Merck
KH_2PO_4	Merck
KOH	Merck
L- Ascorbinsäure Natrium- Salz	Appllichem
L- Prolin	Fluka
Lactose	Merck
LiCl	Sigma Aldrich
Maltose	Roth
Mannitol	Merck
McConkey- Agar	Roth
MES	Serva
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck
Milchpulver	Lasana
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Merck
$MnSO_4$	Merck
N- Lauroylsarkosin- Natrium- Salz	Sigma Aldrich
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Appllichem
$(NH_4)_2SO_4$	Merck
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Merck
Na_2CO_3	Merck
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Roth
NaCl	Riedel-de Haën
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Roth
NaOH	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriummetaperiodat	Merck
Nylonmembran (Hybond N)	Amersham
ONPG	Serva
PEG- 2000	Merck
Pepton	BD
Phenol- Chloroform sauer	Roth
Phenol-Chloroform pH neutral (1:1)	Roth
Phenolrot	Merck
Rhamnose	Sigma Aldrich
Saccharose	Roth
SDS	Serva
Sojamehl fettarm	Henselwerk GmbH
TCA	Merck
TEMED	Roth
TES	Sigma Aldrich
Thiamin	Merck
Toluol	Merck
Tricin	Roth

Chemikalie	Anbieter
Trizma Base	Sigma Aldrich
Toluol	Merck
X- Gal	Roth
ZnCl ₂	Merck
α- D- Glucose- Monohydrat	Roth
β- Mercaptoethanol	Roth

Tabelle 3-32. Kits.

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

Tabelle 3-33. Enzyme.

Enzym	Anbieter
DNase	Sigma Aldrich
Lysozym	Serva
<i>Proof- Start- Polymerase</i>	QIAGEN
ProteinaseK	Macherey- Nagel
Restriktionsendonukleasen	NEB, Fermentas
RNaseA	Fermentas
T4- Ligase	Fermentas
<i>Taq- Polymerase</i>	QIAGEN
Trypsin	Oxoid

Tabelle 3-34. Größenmarker.

Marker	Größen	Anbieter
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp	Fermentas
Digoxygenin markierter Längenstandard VII	8 576, 7 427, 6 106, 4 899, 3 639, 2 799, 1 953, 1 882, 1 515, 1 412, 1 164, 992, 718, 710, 492, 359, 81 bp	Roche

3.7 Die Kultivierung von Bakterien

3.7.1 Kulturbedingungen für *E. coli*

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

3.7.2 Die Herstellung einer Glycerinkultur

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

3.7.3 Kulturbedingungen für Streptomyceten

Streptomyceten werden, soweit nicht anders beschrieben, auf R5-Agar-Platten bei 30°C inkubiert. Für Flüssigkulturen werden ca 10 µl Sporensuspension oder 500 µl homogenisiertes Myzel in S- oder R5-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane, Spirale (sorgt für ein disperses Wachstum) und Silikonschaumstopfen (zur besseren Versorgung mit Sauerstoff) angeimpft. Die Kulturen werden bei 28°C oder 30°C im Luftschüttler 2 bis 4 Tage lang inkubiert.

3.7.4 Die Herstellung einer Sporensuspension von Streptomyceten

Zur Gewinnung von Sporen werden Streptomyceten auf Soja-Mannit-Agar-Platten ausplattiert und für die Dauer von 5-7 Tagen bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Sporen mit 10 ml H₂O pro Platte und einem sterilen Wattebausch abgeschwemmt, mit einer Spritze durch die Watte aufgezogen und pelletiert. Das Pellet wird je nach Größe in 0,5-1,0 ml 50%iger Glycerin-Lösung resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.8 DNA- Aufnahme durch Bakterien

3.8.1 Die Transformation von *E. coli*- Stämmen

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien. Durch die Behandlung mit z.B. CaCl_2 erhalten *E. coli*- Stämme diese Fähigkeit. Außerdem gibt es die Möglichkeit der Elektroporation.

3.8.1.1 Die CaCl_2 - Methode

3.8.1.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl_2 - Methode (Cohen *et al.*, 1972)

Ein 1 l- Kolben mit 400 ml LB^+ - Medium sowie 400 μl Selektionsantibiotikum versetzt, wird mit Zellen einer Übernachtskultur beimpft (OD_{600} ca 0,1). Die Kulturen werden bei 37°C im Luftschüttler inkubiert und in regelmäßigen Abständen die OD_{600} gemessen, bis diese zwischen 0,4- 0,8 liegt (2- 3 h). Daraufhin werden die Zellen für 10 min zentrifugiert (4°C, 4600 rpm, Heraeus Multifuge 3L- R). Der Überstand wird verworfen und die Pellets in eiskalter 50 mM CaCl_2 - Lösung resuspendiert. Die Zellen werden abermals zentrifugiert und in kaltem CaCl_2 resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und nochmals pelletiert. Das Pellet wird in ca 5ml eiskalter 50 mM CaCl_2 - Lösung + 15% Glycerin gelöst, für weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (je 100 μl). Die Aliquots werden im Ethanolbad bei -80°C schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.1.1.2 Die Transformation

Die kompetenten Zellen (100 μl) langsam auf Eis auftauen lassen und ca 10 μl Ligationsansatz (inaktiviert bzw. nachgespalten) oder 1- 10 μl Plasmidlösung zugeben. Die Zellen weitere 30 min auf Eis inkubieren. Es folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. Anschließend wird 1 ml LB^+ - Medium zugegeben und für mindestens weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Dies ist zur Expression der Resistenzgene erforderlich. Danach werden die Zellen pelletiert (1 min, 14000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wird verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert, in zwei verschiedenen Konzentrationen auf je eine LB^+ - Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.8.1.2 Die Elektroporation

Wird eine höhere Transformationseffizienz benötigt, z.B. für das Anlegen einer Genbank, ist die Elektroporation geeigneter als die CaCl_2 - Methode.

3.8.1.2.1 Die Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB^+ - Medium werden mit Zellen einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Nach ca. 2- 3 h ist eine OD_{600} von 0,6 erreicht. Die Zellsuspension wird in zwei 50 ml Falcontubes gefüllt und für 5 min bei 4600 rpm 4°C (Heraeus Multifuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml

eiskalter 10%iger Glycerin-Lösung (v/v) resuspendiert und mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen werden wiederum mit 4600 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert und anschließend in ca 100- 200 µl 10%iger Glycerin- Lösung resuspendiert. 50 µl Aliquots können nun sofort zur Elektroporation eingesetzt oder schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Möchte man elektrokompetente Zapper Zellen (*E. coli* NovaXG) herstellen, darf nicht mit mehr als 3000 rpm zentrifugiert werden, da die Zellen sehr empfindlich sind.

3.8.1.2.2 Die Elektroporation

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

Beachte: Zapper Zellen von Novagen dürfen nach der Elektroporation nicht zentrifugiert werden, sonst sinkt die Effizienz drastisch. Hier werden zehn Mal je 100 µl der Zellsuspension auf eine Agar-Platte ausplattiert.

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

3.8.2.1 Die Herstellung von Protoplasten

Eine 50 ml Streptomycceten- Kultur, welche für die Dauer von 2- 3 Tagen im Schüttler bei 30°C gewachsenen ist, wird 10 min lang bei 4600 rpm in der Heraeus Multifuge bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 ml P- Puffer, welcher frisch mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und steril filtriert wird, gelöst. Nach einer Inkubation von ca 10 min bei 37°C im Luftschtüttler, wird der Abbau der Zellwand mikroskopisch kontrolliert, die Zellen werden ohne das formgebende Peptidoglykan rund. Eventuell wird länger (bis zu 40 min) bei 37°C inkubiert. Um die Protoplastierung zu beenden, wird mit kaltem P- Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend läßt man die Zellsuspension durch eine mit steriler Watte gefüllten Spritze in ein neues Falcontube laufen, um das nicht protoplastierte Myzel abzutrennen. Der Durchfluss wird für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1- 2 ml P- Puffer gelöst. Aliquots von 200 µl werden auf Eis direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.8.2.2 Die PEG- induzierte Protoplastentransformation

Polyethylenglykol vermittelt die Aufnahme von DNA in Streptomycceten. Für die Transformation wird aus *E. coli* ET12567 isolierte unmethylierte DNA verwendet. 1- 10 µl DNA- haltiger Lösung werden zu

200 µl Protoplasten gegeben, unverzüglich mit 500 µl T- Puffer vermischt und sofort auf 2- 3 R2YE- oder R5- Platten ausplattiert. Die Platten werden für einen Zeitraum von 16 h bei 30°C inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren können, und dann mit dem entsprechendem Selektionsantibiotikum (37,5 µl Stammlösung in 1 ml H₂O pro Platte) überschichtet. Wenn die Platten getrocknet sind, werden sie weiter bei 30°C für eine Dauer von 2- 5 Tagen inkubiert.

3.8.3 Die Kolonie- PCR

Die Kolonie- PCR (Güssow & Clackson, 1989) ist ein schneller Nachweis für Mutanten bzw. die Komplementation von Mutanten. Hierfür wird eine Streptomycceten- Kolonie von einer Agar- Platte mit einem sterilen Zahnstocher in 100 µl H₂O eingerieben und mit einigen Glasperlen versetzt. Nach 15minütigem Kochen im Wasserbad wird mindestens eine Minute lang gevortext. Anschließend werden vom Überstand 5 µl als Template für die PCR eingesetzt.

Tabelle 3-35. Die Kolonie- PCR Reaktionsansatz und Programm.

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

3.9 Die Plasmidisolierung

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

3.9.1 Die alkalische Lyse (Minipräparation)

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

Für die alkalische Lyse wird eine Einzelkolonie in 5 ml LB⁺-Medium in einem 20 ml- Reagenzglas angeimpft und bei 37°C im Luftschüttler über Nacht inkubiert. Von der Übernachtskultur werden 2 Mal 1,5 ml im selben ERG bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird restlos abgenommen. Das Pellet kann nun bei -20°C gelagert oder gleich aufgeschlossen werden.

Zunächst löst man das Pellet in 300 µl Puffer1 und gibt 300 µl Puffer2 zu. Nach mehrmaligem Invertieren und 5 min bei RT, wird die Lösung viskos und die Zellen sind lysiert. Es werden nun 300 µl eiskalter Puffer3 zugegeben gut durchmischen und 10 min auf Eis inkubiert. Aufgrund der pH-Änderung fallen weiße Flocken aus, welche aus Proteinen, SDS und genomischer DNA bestehen. Diese werden anschließend 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Den Überstand gibt man in ein neues ERG, versetzt ihn mit gleichem Volumen Isopropanol, inkubiert 20 min bei -20°C und zentrifugiert 20 min bei 14000 rpm. Das Pellet wird mit 500 µl 70%igem EtOH gewaschen um Salze zu entfernen, bei 60°C für 5 min getrocknet und in 40 µl H₂O über Nacht im Kühlschrank gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.9.2 Die Plasmidisolierung aus BTH101- Zellen (Alkalische Lyse mit Phenol-Chloroform- Extraktion)

Aus den BTH101- Zellen werden mit der oben beschriebenen alkalischen Lyse nur stark degradierte Plasmide isoliert. Diese eignen sich zwar bedingt zur Transformation, aber nicht zum Restriktionsverdau, bzw. Sequenzieren. Deshalb wird der Überstand nach Zugabe von Puffer3 und Zentrifugation mit 200 µl Chloroform pHneutral versetzt, gevortext, 10 min zentrifugieren und die obere Phase in neues 2 ml- ERG überführt. Nachdem man 1/10 Vol 3 M Na- Acetat pH 5,2 und 2 1/2faches Volumen EtOH zugegeben und invertiert hat, lässt man die DNA 20 min bei -20°C fällen. Anschließend geht es weiter wie bei der alkalischen Lyse.

3.9.3 Die Qiagen- Lyse (Maxipräparation)

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

Eine Einzelkolonie wird in 50 ml LB⁺- Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Zunächst wird die Zellsuspension für 10 min bei 4600 rpm abzentrifugiert, der Überstand restlos verworfen. Das Zellpellet wird in 1,6 ml Puffer1 gelöst und auf vier ERGs à 400 µl verteilt. Anschließend werden je 400 µl Puffer2 zugegeben, die ERGs mehrfach invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 400 µl Puffer3 zugegeben, ebenfalls invertiert, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues ERG überführt und abermals zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die Säulchen mit je 1 ml QBT- Puffer äquilibriert und der Überstand zweier ERGs auf eine Säule gegeben. Jede Säule wird vier Mal mit je 1 ml QC- Puffer gewaschen. Vor dem Elutionsschritt wird ein neues beschriftetes ERG unter die Säule gestellt, jede Säule wird zwei Mal (jeweils in ein neues ERG) mit 0,8 ml QF- Puffer eluiert. Die DNA wird mit 560 µl Isopropanol bei -20°C für die Dauer von 20min gefällt. Danach geht es weiter wie bei der alkalischen Lyse.

3.9.4 Die Lyse nach Eckhardt

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

3.9.5 Die Plasmidisolierung aus Streptomyceten

1 ml einer zwei Tage lang gewachsenen Streptomycetenkultur wird mit 5 Glasperlen und einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 30 min im Luftschüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wird in der Eppendorf- Tischzentrifuge für 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl Puffer1 (alkalische Lyse) gelöst, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und nochmals für die Dauer

von 30 min im Luftschüttler bei 37°C inkubiert. Es werden 250 µl Puffer2 zugegeben, gevortext und 15 min lang bei 70°C inkubiert, nach dem Abkühlen gibt man 80 µl saures Phenol- Chloroform (1:1) zu und vortext, bis die Suspension weiß ist. Darauf zentrifugiert man 10 min mit 14000 rpm und überführt die obere Phase in ein neues ERG, wo sie mit 1/10fachem Volumen 3M Na- Acetat pH 5,2 und einfachem Volumen Isopropanol versetzt wird. Es wird wie oben beschrieben 5 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl H₂O gelöst, mit 1/10fachem Volumen 3 M Na- Acetat pH 5,2 und 2,5fachem Volumen EtOH versetzt und invertiert. Es wird 10 min lang zentrifugiert und das Pellet in 40 µl H₂O gelöst.

3.10 Vom PCR- Produkt zum Plasmid

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

3.10.1 Die PCR (polymerase chain reaction)

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

Tabelle 3-36. PCR- Pipettierschema und Programm.

Bestandteil		Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer [min]
0,5 µl	Primer forward	1	Denaturierung	95°C	2
0,5 µl	Primer reverse	2	Denaturierung	95°C	1
5 µl	10X Puffer	3	Annealing	primerabhängig	1
10 µl	Q- Solution	4	Elongation	72°C	fragmentlängenabhängig
0,5 µl	dNTP- Mix	5	Elongation	72°C	8
0,5 µl	Template	6	Kühlen	6°C	30
0,5 µl	Taq- Polymerase				
32,5 µl	H ₂ O				

Die PCR-Reaktion wird in einem Volumen von 50 µl durchgeführt: Nach einem ersten zweiminütigen Denaturierungsschritt, kommt es zu einer Abfolge von Denaturierung (Aufschmelzen der Doppelstränge), Annealing (Anlagerung der Primer) und Elongation (Verlängerung der 3'-Enden der angelagerten Primer), welche 28- 30 Mal wiederholt wird.

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

Anschließend wird ein weiterer Elongationsschritt von 8 min angehängt, um alle „angefangenen“ Fragmente fertig zu amplifizieren. Die vervielfältigten Fragmente werden im Agarosegel analysiert und gegebenenfalls für die Klonierung aufgereinigt.

3.10.2 Die Agarose- Gelelektrophorese

Im Agarosegel werden DNA- Fragmente nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats unter den gegebenen Bedingungen negativ geladen und wandert daher zum Pluspol. Ihre Laufstrecke im Gel ist bei linearen Fragmenten umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Mit Hilfe eines Längenstandards kann so die Größe unbekannter DNA- Fragmente bestimmt werden.

Die Agarose wird als 1%ige Lösung in einfach TAE- Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und in eine Gelkammer gegossen. Ein Kamm für die Taschen wird eingefügt. Wenn das Gel erstarrt ist, wird der Kamm entnommen und die Gelkammer mit Laufpuffer (einfach TAE) gefüllt. Die Taschen werden mit bis zu 20 µl Probe, welche zuvor mit 3 µl Bromphenolblau- Ladepuffer vermischt wurde, befüllt. Als Längenstandard wird die GeneRuler™ 1 kB DNA ladder verwendet. Es wird eine Spannung von 90-100 V angelegt. Das Gel läuft ca 40 Minuten bis die Bromphenolblau- Bande ungefähr 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist. Anschließend wird das Gel im Ethidiumbromidbad für eine Zeitspanne von 10 bis 30 min gefärbt und unter UV- Licht (Transilluminator von Herolab) betrachtet sowie mit der Geldokumentationsanlage von Herolab fotografiert.

3.10.3 Die Aufreinigung von PCR- Produkten

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

Die Gelelution mit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

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

3.10.4 Der Restriktionsverdau

Für Kontrollspaltungen wird die DNA gewöhnlich in einem Gesamtvolumen von 10 µl gespalten. Bei Spaltungen für Klonierungen setzt man 20 µl an. Spaltet man mehrere Proben mit denselben Enzymen empfiehlt es sich einen Mastermix anzusetzen, bei dem für 5 Proben eine Enzymmenge von 1 µl pro Enzym eingesetzt wird.

Tabelle 3-37. Pipettierschema für den Restriktionsverdau.

	Kontrollspaltung1	Kontrollspaltung2	Spaltung für Klonierung
DNA	1-3 µl	1-3 µl	8-12 µl
10fach Puffer	1 µl	1 µl	2 µl
Restriktionsenzym 1	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	---	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	6,5-8,5 µl	6-8 µl	9-5 µl

3.10.5 Die Phenol- Chloroform- Extraktion vor der Ligation

Um vor der Ligation Puffer- und Enzymreste der Restriktionsspaltung zu entfernen und so eine Lösung von aufgereinigtem gespaltenem PCR- Produkt und gespaltenem Vektor in H₂O zu erhalten, wird eine Phenol- Chloroform- Extraktion durchgeführt. Dies ist eine Möglichkeit die Ligationswahrscheinlichkeit zu erhöhen.

Tabelle 3-38. Phenol- Chloroform- Extraktion.

Menge	Bestandteil
10 µl	gespaltenes PCR- Produkt
5 µl	gespaltener Vektor
35 µl	H ₂ O
15 µl	Phenolchloroform pH neutral

Den Ansatz wie oben beschrieben in ein ERG pipettieren und kräftig vortexen. Anschließend wird er 10 min lang bei 14000 rpm in der Eppendorf- Tischzentrifuge zentrifugiert, um organische und wässrige Phase voneinander zu trennen. Die obere wässrige Phase wird in ein neues ERG überführt. Mit 1/10fachem Volumen 3 M Na Acetat sowie 2 1/2fachem Volumen EtOH wird die DNA 20 min lang bei -20°C gefällt und für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 17 µl H₂O gelöst.

3.10.6 Die Ligation

Tabelle 3-39. Ligationsansatz.

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

Tabelle 3-40. Ligationsansatz nach der Phenol- Cloroform- Extraktion.

Menge	Bestandteil
17 µl	Gespaltene PCR- Produkt & gespaltener Vektor aufgereinigt
2 µl	Ligasepuffer +ATP
1 µl	T4- Ligase

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

Nach Möglichkeit jedoch wird die Ligation vor der Transformation 1 h lang bei 37°C nachgespalten um zu verhindern, dass Plasmide ohne Insert transformiert werden. Zum Nachspalten wird ein Enzym verwendet, das nur in dem herausgeschnittenen Stück der „multiple cloning site“ und nicht im restlichen Vektor oder Insert spaltet.

3.11 Das Bacterial Two Hybrid System (BTH) (Karimova et al., 1998)

Das Bacterial Two Hybrid System verwendet die Adenylatzyklase von *B. pertussis*, welche aus zwei Domänen (T25 und T18) besteht. Nur wenn diese sich in räumlicher Nähe befinden, kommt es zur Synthese von cAMP. cAMP wird für die Transkription von Genen wie z. B. dem *lacZ*-Gen benötigt, was den Bakterien eine Verstoffwechslung von Lactose oder Maltose ermöglicht. Die T25- und die T18-Domäne liegen in unterschiedlichen Vektoren vor. Finden die beiden Domänen über interagierende Fusionsproteine zusammen, so ist die cAMP-Synthese wieder hergestellt. cAMP bindet dann an ein CAP-Protein (catabolite activator protein) und zusammen binden sie an die Promotoren von Genen des Katabolismus, wie z. B. dem *lacZ*-Gen, was zu einer messbaren β -Galaktosidaseaktivität führt (Abbildung 3-1).

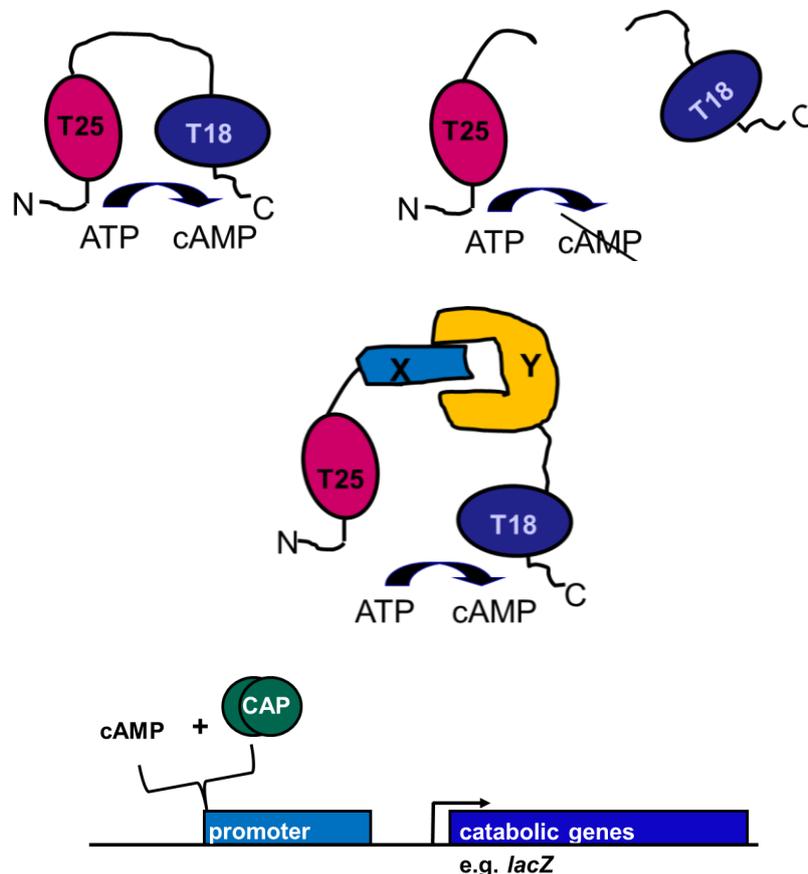


Abbildung 3-1. Das Prinzip des BTH. Die Adenylatzyklase (CyaA) von *B. pertussis* besteht aus zwei Domänen (T25 und T18). Sie stellt cAMP her. Sind die Domänen getrennt wird kein cAMP synthetisiert. Werden diese Domänen mit interagierenden Polypeptiden fusioniert und somit wieder in räumliche Nähe gebracht, wird die Produktion von cAMP wieder hergestellt. cAMP bindet zusammen mit einem Catabolite Activator Protein (CAP) unter anderem an den Promotor des *lacZ*-Gens. Dies führt zu einer messbaren β -Galaktosidaseaktivität.

3.11.1 Klonierungen für das BTH

Die Fragmente werden mit den Primern aus Tabelle 3-5 mittels PCR vervielfältigt (die PBPs zum Teil ohne Signalsequenz) und je nach Konstrukt mit *Xba*I und *Acc*65I bzw. mit *Xba*I und *Mun*I verdaut. Die Vektoren werden entweder mit *Xba*I und *Acc*65I oder mit *Xba*I und *Eco*RI verdaut und wie oben beschrieben ligiert. (*Acc*65I erkennt die gleiche Schnittstelle wie *Kpn*I und *Mun*I die gleiche Schnittstelle wie *Eco*RI). Die Schnittstellen sind in Abbildung 3-2 angegeben.

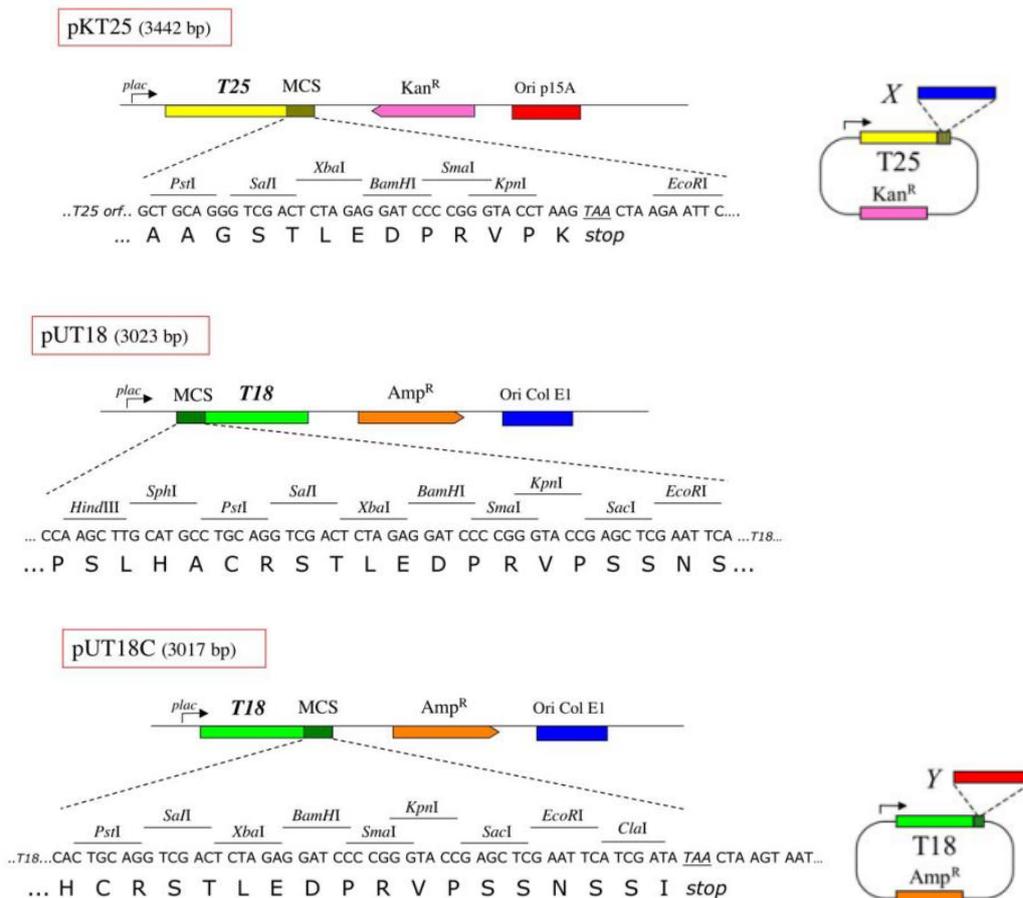


Abbildung 3-2. Die multiple cloning sites und die Lage der Domänen der Adenylatzyklase in den Vektoren (pKT25, pUT18 und pUT18C) für das BTH (Karimova et al., 1998).

3.11.2 Die Suche nach Interaktionspartnern mit dem BTH

Enthalten die adenylatzyklasedefizienten BTH101-Zellen zwei Plasmide mit interagierenden Fusionsproteinen, so wird die Adenylatzyklaseaktivität wiederhergestellt und die Zellen können Maltose, bzw. Lactose verstoffwechseln. Dies führt zu einer Ansäuerung des McConkey- Mediums verbunden mit einer Rotfärbung. Je stärker die Interaktion, desto intensiver die Rotfärbung.

Die adenylatzyklasedefizienten *E. coli*- Stämme BTH101 (oder DHM1) werden mit den beiden Vektoren (pUT18- Y bzw. pUT18c- Y und pKT25- X) transformiert. 100 µl CaCl₂- kompetente BTH101-

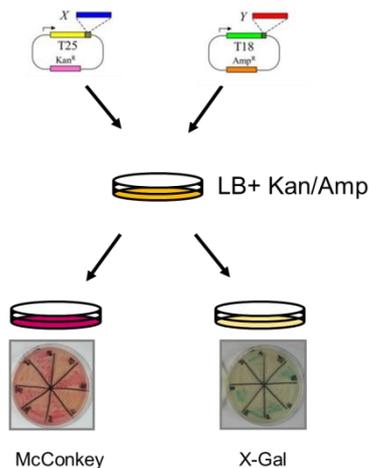


Abbildung 3-3. Die Suche nach Interaktionspartnern mit dem BTH: 1. Co-Transformation. 2. Selektion. 3. Überprüfen der β -Galaktosidaseaktivität.

sterilen Zahnstocher ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert, beobachtet und das Ergebnis dokumentiert. Auf Indikatormedien wie McConkey oder X-Gal-Agar (enthält 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galacto-pyranosid, ein chromogenes Substrat für die β -Galaktosidase; bei β -Galaktosidaseaktivität entsteht eine Blaufärbung) wird die Interaktion sichtbar gemacht (Abbildung 3-3).

Zellen werden mit jeweils 1 μ l Plasmid-DNA (Qiagen-Lyse) pKT25-X und pUT18c-Y wie oben beschrieben transformiert. Die Transformanten werden auf je einer LB⁺-Agarplatte, welche beide Selektionsantibiotika (Ampicillin und Kanamycin) enthält, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden mindestens zehn Transformanten pro Transformationsansatz auf eine McConkey-Agarplatte (oder X-Gal-Agarplatte) mit einem

sterilen Zahnstocher ausgestrichen und für ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert, beobachtet und das Ergebnis dokumentiert. Auf Indikatormedien wie

3.11.3 β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen

Für die β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen werden pro Co-Transformation mindestens drei Einzelkolonien in LB-Medium mit 0,5mM IPTG sowie den beiden Selektionsantibiotika Kanamycin und Ampicillin angeimpft und so über Nacht bei 30°C im Luftschüttler induziert. Als Negativkontrolle dient eine ebenso behandelte Kultur einer Einzelkolonie, welche die leeren Vektoren pKT25 und pUT18c enthält. Am nächsten Morgen wird 1 ml der Flüssigkultur mit 4 ml M63-Medium verdünnt und die optische Dichte im Photometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 1000) bei $\lambda = 600$ nm gemessen. Als Leerwert zum Einstellen des Photometers wird 1 ml LB-Medium mit 4 ml M63-Medium verdünnt. Die Negativkontrolle und der Leerwert werden während des gesamten Versuchs mitbehandelt. Die Negativkontrolle dient dazu, den Hintergrund herauszurechnen; der Leerwert wird benötigt, um das Photometer zu eichen. 2,5 ml der Zellsuspension werden mit 30 μ l Toluol und 35 μ l 0,1%igem SDS in ein 50 ml-Falcontube überführt und kräftig gevortext. Die Tubes werden mit einem Wattebausch verschlossen und bei 37°C im Luftschüttler für die Dauer von 40-60 min inkubiert, um die Zellen durchlässig zu machen. Für die enzymatische Nachweisreaktion entnimmt man 500 μ l und gibt 500 μ l PM2-Medium zu, welches kurz zuvor mit Mercaptoethanol versetzt wurde. Anschließend wird für 5 min bei 30°C inkubiert und auch die Substratlösung (ONPG) wird auf 30°C vorgewärmt. Mit der Zugabe von 250 μ l der ONPG-Lösung wird die Reaktion gestartet und die Zeit gemessen. Nach 4-6 min verfärbt sich die Lösung gelb. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung

abgebrochen. Die Zeit wird notiert, denn die Aktivität wird in $\mu\text{mol}/\text{min}$ angegeben und die Zeit fließt somit in die Rechnung ein. Es wird die OD bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ gemessen und die enzymatische Aktivität A in units/ml nach folgender Gleichung berechnet:

$$A = 200 * ((OD_{420} - OD_{420 \text{ negativ Kontrolle}}) / \text{Inkubationszeit}) * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Faktor 200 ist der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten des Produktes o-Nitrophenol bei pH 11. Der Verdünnungsfaktor ist für die oben beschriebene Vorgehensweise 2, da für die enzymatische Nachweisreaktion 500 μl Zellsuspension und 500 μl PM2-Medium eingesetzt wurden. Die Ergebnisse werden normalerweise in units/mg Bakterientrockengewicht angegeben. Dies kann man nach folgender Beziehung ausrechnen: 1 ml Kultur mit der $OD_{600} = 1$ entspricht 300 μg Bakterientrockengewicht (*E. coli*).

Die auf McConkey-Agar gefundenen Interaktionen können zum Teil nicht durch die Ergebnisse der β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen bestätigt werden. Es ist schwierig, die auf McConkey-Platten gefundenen Interaktionen zu quantifizieren: Eine dichter gewachsene Kolonie säuert das Medium stärker an und färbt es somit stärker als eine weniger gut oder lange gewachsene. Nach mehr als 48 Stunden Inkubation bei 30°C wirken die meisten Kolonien schwach rosa. Auf X-Gal-Platten ist dieser Effekt noch ausgeprägter. Nach 48 Stunden sind praktisch alle Kolonien hellblau. β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen mit ONPG sind quantifizierbar und liefern reproduzierbarere Werte. Für einen ersten Überblick sind sie jedoch vergleichsweise aufwendig in der Durchführung; deshalb empfiehlt es sich, sich zuerst einen Überblick mit McConkey-Platten zu verschaffen und dann ausgesuchte Interaktionen mit β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen zu überprüfen.

3.12 Die Konstruktion und das Screening einer *S. coelicolor*- Genbank

3.12.1 Die Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten

Das Pellet einer 20 ml Streptomycceten Kultur wird in 1 ml Puffer1 (siehe alkalische Lyse) versetzt mit 10 mg/ml Lysozym resuspendiert. Man gibt ein paar Glasperlen hinzu und inkubiert eine Stunde im Luftschüttler bei 37°C. Anschließend werden 200 µl einer 5%igen SDS- Lösung zugefügt und kräftig gevortext. Die Proben werden für die Dauer von mindestens 15 min bei 60°C inkubiert, zwischendurch gevortext, bis sich eine homogene, zähe Lösung bildet. Nach dem Abkühlen auf RT werden 200 µl Phenol- Chloroform pH neutral zugegeben und gut gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit auf Eis wird 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen, das 1/10fache Volumen an Na- Acetat 3M pH 5,2 und das einfache Volumen Isopropanol zugegeben und abermals gut durchmischt. Der DNA- Faden kann nun mit einer Pippettenspitzen aus der Lösung herausgefischt werden. Anschließend wird die DNA in 70%igem Ethanol gewaschen, kurz bei RT getrocknet und in ca 300 µl TE- Puffer oder H₂O über Nacht im Kühlschrank gelöst.

3.12.2 Die Konstruktion einer Genbank

Die aus *S. coelicolor* aufgereinigte genomische DNA wird partiell mit *Bfu*Cl, einem *Sau*3AI Isoschizomer, eine Stunde lang bei 37°C verdaut. Um die dafür geeignete Enzymkonzentration herauszufinden, werden im kleinen Maßstab Restriktionsverdaue mit unterschiedlichen Enzymverdünnungen durchgeführt und im Agarosegel kontrolliert. Die Enzymverdünnung, welche einen gleichmäßigen „Schmier“ im Bereich zwischen 500 und 2000 bp liefert (ungefähre Größe eines Gens), wird gewählt (Abbildung 3-4). Anschließend wird der Verdau nach folgendem Schema durchgeführt.

Tabelle 3-41. Der partielle Verdau der genomischen DNA.

Bestandteil	Menge
genomische DNA	100 µg
10fach Puffer	120 µl
<i>Bfu</i> Cl (verdünnt)	30 µl
H ₂ O	ad 1,2 ml

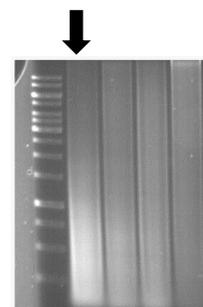


Abbildung 3-4. Enzymverdünnungen für den partiellen Verdau. Der schwarze Pfeil markiert eine geeignete Verdünnung.

Der Reaktionsansatz wird nach dem Verdau auf zwei ERGs aufgeteilt. Es folgen zwei Phenol-Chloroform- Extraktionen. Die so gewonnene wässrige Phase wird auf vier ERGs verteilt. Es werden jeweils 1/10faches Volumen 3M Na- Acetat pH 5,2 und 2,5faches Volumen EtOH zugegeben, um die DNA bei -20°C über Nacht zu fällen. Anschließend wird mit 14000 rpm in der Eppendorf

Tischzentrifuge für die Dauer von 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden in 500 µl 70%igem EtOH gewaschen und 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und die Pellets bei RT getrocknet. Jedes Pellet wird in 30 µl H₂O gelöst und das gesamte Volumen mit Ladepuffer versetzt auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Aus diesem Gel werden nach kurzem Anfärben mit Ethidiumbromid alle Fragmente in einer Größe von 500-2000 bp ausgeschnitten und aus dem Gel aufgereinigt (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit).

Der Vektor wird währenddessen mit *Bam*HI für die Dauer von 1,5 h bei 37°C verdaut.

Tabelle 3-42. Restriktionsverdau des Vektors für die Konstruktion der Genbank.

Bestandteil	Menge
Vektor DNA	2,5 µg
10fach Puffer	2 µl
BamHI	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Dieser Restriktionsansatz wird anschließend auf 45 µl mit H₂O verdünnt und es werden 5 µl 10fach CIP- Puffer sowie 0,15 µl CIP zugegeben. Die 20minütige Dephosphorylisierung bei 37°C verhindert das Religieren des Vektors. Diese Reaktion wird mit einer Phenol- Chloroform- Extraktion beendet, wobei die CIP denaturiert und entfernt wird, damit sie nicht im weiteren Verlauf auch die genomischen DNA- Fragmente dephosphoryliert und so die Ligation verhindert.

Es werden anschließend parallel mehrere Ligationsansätze nach folgendem Schema pipettiert.

Tabelle 3-43. Ligationsansatz Genbank.

Bestandteil	Menge
verdaute, dephosphorylierte Vektor DNA	3 µl
verdaute, aufgereinigte genomische DNA	12 µl
10fach Ligase- Puffer	2,5 µl
Hochkonzentrierte T4- Ligase	0,5 µl
H ₂ O	7 µl

Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Danach werden nochmals 0,5 µl T4- Ligase zugegeben und weiter über Nacht inkubiert.

Die Elektroporation von Novagen Zapper Zellen mit 1 µl der so gewonnenen Genbank- DNA ergibt einen Bakterienrasen auf 15 LB⁺- Platten mit Selektionsantibiotikum pro gelungener Elektroporation. Die Zellen werden mit 1- 2 ml LB- Medium abgeschwemmt. Von Aliquots der abgeschwemmt Zellen werden Glycerinkulturen hergestellt. Aus dem größeren Teil der Bakteriensuspension werden die Plasmide mittels Qiagen- Lyse aufgereinigt. Auf diese Weise werden in mehreren Elektroporationen genügend Transformanten erzeugt, um das komplette Genom theoretisch abdecken zu können. Die Plasmid- DNA der Genbank wird in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

3.12.3 Das Testen der Diversität und Insertrate einer Genbank

Es werden 40 Pools von Genbank Plasmid- DNA mittels Qiagen- Lyse aufgereinigt und auf ihre Qualität überprüft. Um die Insertrate und die Größenverteilung und somit die Unterschiedlichkeit der Inserts zu beurteilen, werden pro Pool 100 μ l *E. coli* XL1Blue- Zellen mit 1 μ l Genbank Plasmid- DNA transformiert. Die Transformanten werden zu Einzelkolonien ausgestrichen. Von jeweils 20 Einzelkolonien / Pool werden Plasmide isoliert, mit *Eco*RI sowie *Pst*I verdaut und im Agarosegel aufgetrennt.

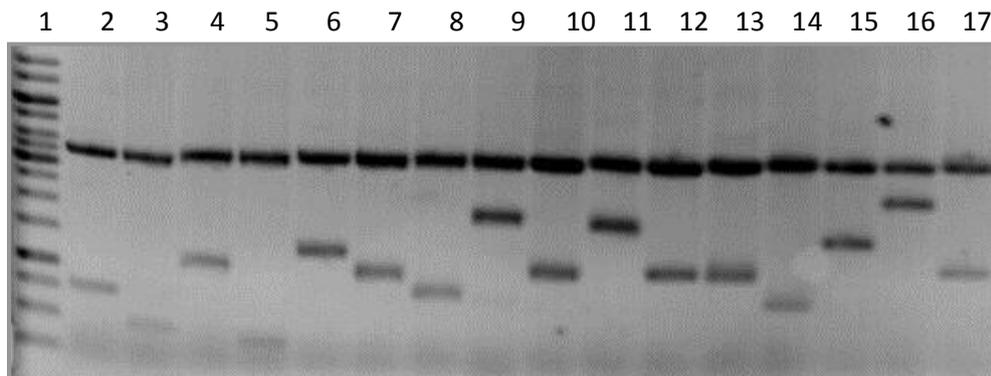


Abbildung 3-5. Die Diversität und die Insertrate der Genbank mittels Restriktionsverdau überprüfen. Bahn 1: 1kb- Marker. Bahnen 2- 17: mit *Eco*RI und *Pst*I verdaute Plasmide, welche aus Einzelkolonien von Genbanktransformanten isoliert wurden.

In Abbildung 3-5 enthält jeder Vektor ein Insert. Außerdem variieren die Größen der Inserts, was auf eine Unterschiedlichkeit der klonierten Fragmente schließen lässt.

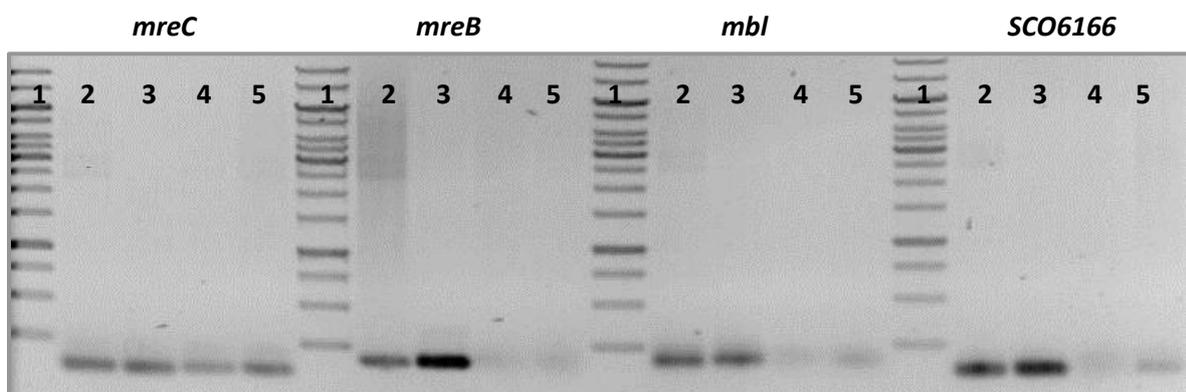


Abbildung 3-6. Die Diversität der Genbank mittels PCR überprüfen. Bahn 1: 1kb- Marker, Bahn 2: Pool D, Bahn 3: WT M145, Bahn 4: Unterpool 1, Bahn 5: Unterpool 3.

Mit RT- PCR Primer von *mreC*, *mreB*, *mbl*, *SCO6166*, *sfr*, *pbp2* und *mreD* werden die Pools auf das Vorkommen bestimmter Fragmente getestet, um die Diversität zu bestätigen (Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7). Es sollten alle Fragmente vervielfältigt werden. Ein Pool beinhaltet hierbei die Plasmid- DNA, welche von 15 Platten isoliert wurde, die Unterpools enthalten nur DNA von einer Platte.

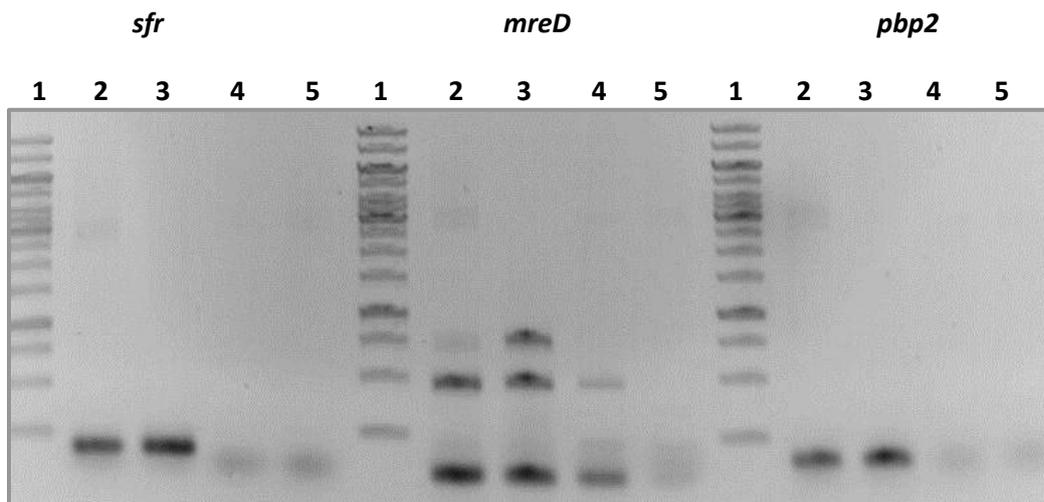


Abbildung 3-7. Die Diversität der Genbank mittels PCR überprüfen. Bahn 1: 1kb- Marker, Bahn 2: Pool D, Bahn 3: WT M145, Bahn 4: Unterpool 1, Bahn 5: Unterpool 3.

3.12.4 Das Screening einer Genbank

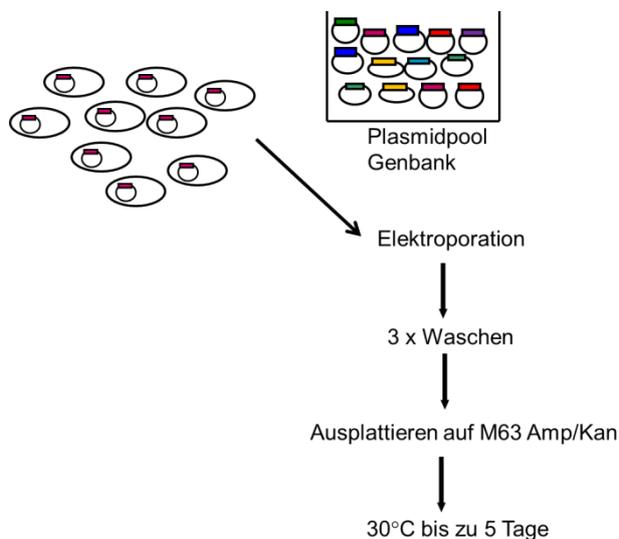


Abbildung 3-8. Das Screening der Genbank. 1. Elektroporation. 2. Waschen. 3. Selektion

Es werden elektrokompetente BTH101- Zellen hergestellt, welche den Baitvektor (ein pUT18c- Y, z. B. pUT18c- mreC) enthalten. Diese werden mit 0,5- 1 μ l der Genbank- Plasmid- DNA- Lösung durch Elektroporation transformiert. Nachdem die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert wurden, werden sie drei Mal mit sterilem M63- Medium gewaschen, anschließend in 1 ml M63- Medium gelöst und je 100 μ l Zellsuspension auf neun M63- Agarplatten mit beiden Selektionsantibiotika in halber Konzentration ausplattiert. Zur Kontrolle der Effizienz werden einmal 100 μ l

der Zellsuspension auf eine LB⁺- Platte mit beiden Selektionsantibiotika plattiert. Die M63- Platten werden bis zu einer Woche bei 30°C inkubiert (Abbildung 3-8).

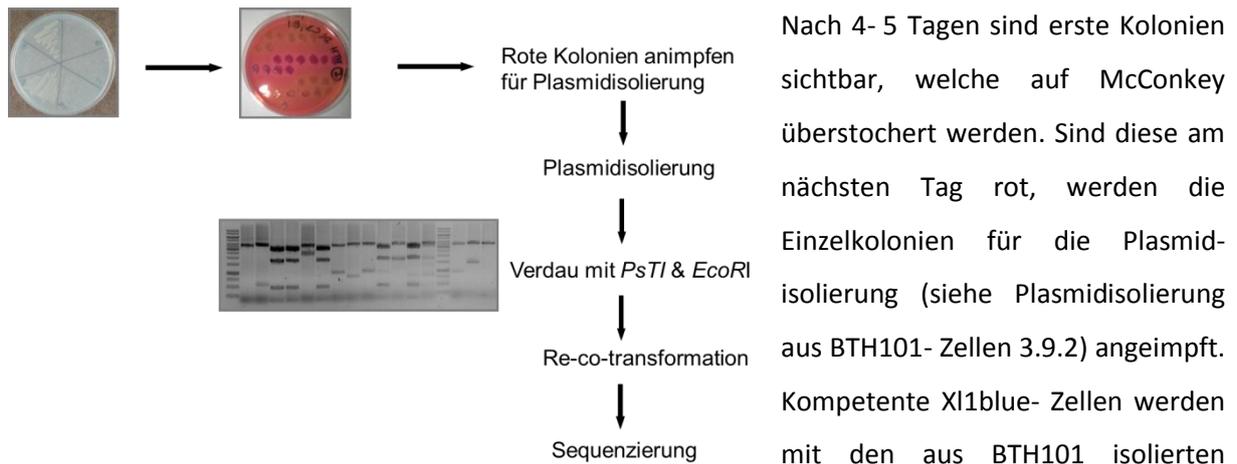


Abbildung 3-9. Die Überprüfung der Ergebnisse des Genbankscreens. 1. Selektionsagar M63. 2. McConkey- Agar. 3. Restriktionsverdau. 4. Re- co- Transformation. 5. McConkey- Agar. 6. Sequenzieren.

Plasmid isoliert und ein Restriktionsverdau mit *PstI* und *EcoRI* durchgeführt. Parallel wird das Plasmid wieder in BTH101 mit dem ursprünglichen Baitvektor cotransformiert und auf McConkey- Platten getestet. Sind die Transformanten auf McConkey immer noch rot und wird im Plasmidverdau ein Insert geeigneter Größe detektiert, werden die Plasmide zum Sequenzieren geschickt (Abbildung 3-9).

3.13 Die Erzeugung und der Nachweis von Deletionsmutanten

3.13.1 Die Erzeugung der Mutanten

Ein ca 1600 bp großes upstream und ein ebenso großes downstream Fragment des zu deletierenden Gens werden mittels PCR amplifiziert und in den pK18- Vektor kloniert. M145- Protoplasten werden mit diesem Vektor transformiert und auf single- crossover (Kanamycin- Resistenz) selektiert. Von Klonen, die eine single- crossover Insertion tragen, werden ohne Selektionsdruck Sporen hergestellt, welche ebenfalls ohne Selektionsdruck zu Einzelkolonien ausgestrichen werden. Es wird nun auf den Verlust der Kanamycin- Resistenz selektiert. Dies kann entweder Reversion zum WT oder doppel- crossover (Deletionsmutante) bedeuten. Zur Unterscheidung wird eine Kolonie- PCR durchgeführt (Kapitel 3.8.3).

3.13.2 Der Nachweis einer Deletionsmutanten mittels Southern Blot

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

3.13.2.1 Die Herstellung der Sonde

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

Tabelle 3-44. Die Labeling- PCR für den Southern Blot.

Bestandteil	Menge	Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Primer1	0,5 µl	1	Denaturierung	95	2
Primer2	0,5 µl	2	Denaturierung	95	1
10x Puffer	5 µl	3	Annealing	primerabhängig	1
PCR- Dig- Labeling- Mix	5 µl	4	Elongation	72	abhängig von der Fragmentlänge
Taq- Polymerase	0,5 µl	5	Elongation	72	8
Q- Solution	10 µl	6	Kühlen	6	30
Template	1 µl				
H ₂ O	27,5 µl				

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

3.13.2.2 Verdau, Auftrennung und Denaturierung der genomischen DNA

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

Tabelle 3-45. Der Restriktionsverdau für den Southern Blot.

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

Die genomische DNA aus WT und vermeintlicher Mutante wird bei 37°C mindestens für die Dauer von 4 h oder über Nacht verdaut. Anschließend werden die Fragmente im Agarosegel bei 70 V aufgetrennt. In Vorversuchen wird die Konzentration der einzelnen DNA- Proben bestimmt, so dass vergleichbare Konzentrationen eingesetzt werden können. Als Marker verwendet man den Digoxigenin markierter Längenstandard VII. Nach der Elektrophorese wird das Gel kurz (2 min) im Ethidiumbromidbad gefärbt, um den Verdau zu kontrollieren. Anschließend wird 10 min in H₂O gewaschen, zwei Mal 20 min in Denaturierungslösung und zwei Mal 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert.

3.13.2.3 Der Kapillarblot

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

3.13.2.4 Die Hybridisierung

Die Nylonmembran wird mit der Oberseite nach innen in ein Glasrohr gegeben und mit 25 ml Vorhybridisierungslösung 30 min bei 68°C im Hybridisierungsöfen gerollert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. In der Zwischenzeit wird die in Vorhybridisierungslösung gelöste Sonde (Hybridisierungslösung) bei 95°C im Wasserbad 10 min lang denaturiert und anschließend im Eis-Ethanol-Bad abgekühlt. Die Vorhybridisierungslösung wird entfernt und 10 ml Hybridisierungslösung zugegeben. Es wird 3 h bei 68°C im Ofen gerollt.

3.13.2.5 Lumineszenznachweis der markierten DNA mittels Antikörper

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

3.13.3 Die Komplementation einer Deletionsmutante

Für die Komplementation wird das zu komplementierende Genfragment und ein direkt angrenzendes upstream-Fragment, welches den Promotor enthält, in den integrativen Vektor pSET152 kloniert und mittels Protoplastentransformation in die Mutante eingebracht. Es wird auf die Resistenz des Vektors (Apra) selektiert und das Vorhandensein des Gens mittels Kolonie-PCR überprüft.

Alternativ kann das zu komplementierende Genfragment in einen Expressionsvektor z. B. pGM1202 kloniert werden und über Protoplastentransformation oder Konjugation in die Mutante gebracht werden. Es wird auch hier auf die Resistenz des Vektors (Apra) selektiert. Zur Komplementation wird mit 12,5 µg/ml Thiostrepton induziert.

3.14 Phänotypische Untersuchungen von Deletionsmutanten

3.14.1 Mikroskopie und Sporenmessungen

In eine Soja- Mannit- Agarplatte werden in einem Winkel von ca 45° sterile Deckgläschen gesteckt. An den unteren Rand der Deckgläschen werden 2- 3 µl einer Sporensuspension getropft. Die Platten werden für 3- 5 Tage bei 30°C inkubiert. Man gibt ca 60 µl in PBPs gelöste 1%ige Agarose auf einen Objektträger und legt das Deckgläschen darauf, so lange die Agarose noch flüssig ist. Das Deckgläschen kann vorsichtig auf der oberen Seite mit EtOH abgerieben werden. Anschließend werden die Präparate mit dem Olympus System Microscope BX60 mikroskopiert und mit der F-view II Kamera photographiert. Die Sporenlänge und -breite wird mit dem Programm AnalySYS von Olympus gemessen und ausgewertet.

3.14.2 Die physiologische Charakterisierung der Mutanten

3.14.2.1 Der Salzstress

Abnehmende Sporenverdünnungen werden auf große viereckige LB⁺- Agarplatten mit 0,5% bzw. 6,5% NaCl aufgetropft, für 2- 3 Tage bei 30°C inkubiert, beobachtet und photographiert.

3.14.2.2 Der SDS-Test

10 µl einer Sporenverdünnung mit ca 10⁶ Sporen/ml und 40 µl H₂O werden mit 50 µl einer 2%igen, 5%igen oder 10%igen SDS- Lösung für einen Zeitraum von einer halben Stunde bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle dient 10 µl Sporenverdünnung mit 90 µl H₂O. Anschließend werden je 10 µl einer 1:1000 Verdünnung ausgestrichen, bei 30°C für 2 Tage inkubiert und ausgezählt.

3.14.2.3 Der Hitzetest

10 µl einer Sporenverdünnung mit ca 10⁶ Sporen/ml und 90 µl H₂O werden 0, 2, 5, 10, 25, 35 min bei 60°C inkubiert und anschließend 10 µl einer 1:1000 Verdünnung ausplattiert, 2 Tage lang bei 30°C inkubiert und ausgezählt.

Alternativ, wird eine Sporenverdünnung mit ca 10⁶ Sporen/ml einmal bei 37°C und einmal bei 60°C für die Dauer von 30 min inkubiert, anschließend 5 µl jeder Probe auf LB⁺- Agarplatten getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert und photographiert.

3.14.2.4 Vancomycin- & Lysozymresistenztests

Sporen vergleichbarer Konzentration werden auf LB⁺- Platten ausplattiert und direkt nach dem Ausplattieren Filterplättchen mit entweder 50 µg Lysozym oder 5 µg Vancomycin auf die Sporen gelegt. Die Platten werden für 2- 3 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend photographiert.

3.14.3 Die TEM- Mikroskopie

WT- und Mutantensporen werden auf Soja- Mannit- Agarplatten bei 30°C für 4- 5 Tage inkubiert und die Sporen geerntet (siehe Herstellung einer Sporensuspension). Anstelle von H₂O werden die Sporen in 0,2 M PB- Puffer pH 7,4 resuspendiert und in 2%igem Glutaraldehyd fixiert. Die Sporen werden in 2%ige Agarose eingebettet und mit 1%igem OsO₄ in 0,1 M Phosphatpuffer auf Eis für die Dauer von 30 min inkubiert. Dann werden die Proben mit ansteigenden Konzentrationen von Ethanol entwässert und mit Ethanol : EPON infiltriert (im Verhältnis 2:1 1,5:1 und 1:2) und anschließend in EPON eingebettet. Dünnschnitte werden angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Die Proben werden mit einem Phillips Tecnai Elektronenmikroskop bei 80 kV betrachtet und fotografiert.

3.15 Die Aufreinigung von Peptidoglykan und WTA aus Streptomycceten

3.15.1 Aufschlussmethoden für Streptomycceten

Es gibt verschiedene Methoden, das Streptomyccetenmyzel aufzuschließen. Dazu gehören Ultraschall (Bandelin Sonoplus Ultraschall Homogenisator), French Press, FastPrep und Druckluft (Emulsiflex-B15 von Avestin). Für detaillierte Informationen siehe Herstellerangaben.

Die French Pressure Cell Press (American Instruments Cooperation, Silver Spring Maryland) eignet sich zum Aufschluss von Streptomycceten und *E.coli*. Die Zellen werden unter Druck durch eine enge Öffnung gepresst und durch Scherkräfte aufgebrochen. Der Vorgang wird mindestens drei Mal wiederholt, Gerät und Zellsuspension werden auf Eis vorgekühlt.

Die FastPrep (Precellys 24 homogenizer) eignet sich besonders für kleinere Volumina. Eine Zellsuspension von knapp 2 ml wird in ein Schraubdeckelgefäß, welches 0,5 g Glasperlen \varnothing 0,45- 0,5 mm enthält, gefüllt und im Gerät fünf Mal das Programm bestehend aus zwei Mal 30 s mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s eingestellt. Zwischen den Zyklen werden die Proben aufgrund der Hitzeentwicklung durch die Scherkräfte für 5 min auf Eis gestellt.

3.15.2 Die Zellwandisolierung aus Streptomycceten

Das Myzel einer 2-3 Tage lang bei 30°C in 200 ml R5- Medium gewachsenen Streptomyccetenkultur wird für 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml 50 mM Tris/HCl pH 7 gelöst und tropfenweise unter Rühren in 120 ml 4%iges kochendes SDS überführt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Pellet abzentrifugiert und zwei Mal mit 1 M NaCl sowie drei bis fünf Mal mit H₂O aus der Millipore- Anlage gewaschen, bis alles SDS entfernt ist. Die Abwesenheit von SDS wird mit einem Test nach (Hayashi, 1975) überprüft. Dies geschieht folgendermaßen: 335 µl des Überstandes werden mit 170 µl 0,7 M Natriumphosphat pH 7,2, 7 µl 0,5%iger Methylenblaulösung und 1 ml Chloroform kräftig durchmischt. Ist die untere Chloroformphase anschließend farblos, ist kein SDS mehr im Waschwasser vorhanden, ist sie jedoch blau, muss weiter gewaschen werden. Das gewaschene Pellet wird in wenig H₂O resuspendiert und weiter mit der FastPrep aufgeschlossen (siehe 3.15.1). Anschließend wird für die Dauer von 5 min bei 2000 g zentrifugiert, um die Glasperlen zu entfernen. Der Überstand wird dann für 15 min bei 21000 g RT zentrifugiert, das Pellet in 3 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 20 mM MgCl₂ gelöst und für 2 h im Schüttler bei 37°C mit 10 µg/ml DNase und 50 µg/ml RNase inkubiert. Daraufhin gibt man 1 mg/ml Trypsin zu und inkubiert weiter über Nacht im Schüttler. Am nächsten Tag wird SDS bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben und die Probe für 15 min auf 80°C im Wasserbad erhitzt. Es wird auf 20 ml mit H₂O aufgefüllt und für 30 min bei RT und 25000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml 8 M LiCl gelöst und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird wie oben zentrifugiert und das Pellet in 10 ml 100 mM EDTA pH 7 gelöst und

wieder für 15 min bei 37°C inkubiert und zentrifugiert. Danach wird das Pellet mit 20 ml H₂O, 20 ml Aceton und 20 ml H₂O gewaschen und zum Schluss in 1 ml H₂O gelöst, lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

3.15.3 Die WTA- Isolierung aus Zellextrakten (Peschel et al., 1999)

Die Zellpellets einer 2 Tage alten Streptomyccetenkultur werden fünf Mal 5 ml mit 20 mM Na- Acetat pH 4,6 gewaschen, in wenig 20 mM Na- Acetat resuspendiert und mit der FastPrep aufgeschlossen siehe oben. Die Glasperlen werden durch Zentrifugation entfernt, der Überstand abgenommen und die Proben mit DNase 200 U, RNase 400 U und 5 mM MgCl₂ versetzt über Nacht bei 37°C im Luftschtüttler inkubiert. Die Proben werden 20 min lang bei 14000 rpm und RT zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 20 mM Na- Acetat, versetzt mit 2%igem SDS, resuspendiert. Es folgt eine Ultraschallbehandlung (siehe 3.15.1). Anschließend wird für 1 h im Wasserbad bei 65°C inkubiert und ab und zu gevortext. Die unlöslichen Bestandteile werden pelletiert und fünf Mal mit 1 ml 20 mM Na- Acetat- Puffer gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 1 ml 20 mM Na- Acetat- Puffer gelöst und mit TCA (5% Endkonzentration) versetzt. Die Hydrolyse der Bindung zwischen WTA und N- Acetyl- Muraminsäure des Peptidoglykans erfolgt bei 60°C für die Dauer von 4 h oder bei RT über Nacht. Peptidoglykan und WTA werden durch Zentrifugation bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge abgetrennt. Die WTA befindet sich im Überstand.

3.15.4 Die WTA- Isolierung nach (Meredith et al., 2008)

Eine 2 bis 3 Tage lang in S- Medium gewachsene Streptomyccetenkultur (200 ml) wird bei 4600 rpm 10 min RT in der Multifuge zentrifugiert. Zuerst wird das Pellet in wenig Puffer1 gelöst und mit einem oder mehreren der oben genannten Verfahren zum Zellaufschluss behandelt. Danach wird nochmals zentrifugiert 4600 rpm 10 min RT. Das Pellet wird in 30 ml Puffer1 gewaschen, anschließend in 30 ml Puffer2 resuspendiert und 1 h lang bei 100°C im Wasserbad gekocht. Danach werden die Zellen für 10 min bei 10000 g RT (Sorvall RC6 Plus Zentrifuge) zentrifugiert, das Pellet in 1 ml Puffer2 resuspendiert und in ein 2 ml- ERG überführt. Nach der Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge für 10 min 14000 g RT wird das Pellet einmal mit Puffer2, einmal mit Puffer3 und zuletzt mit Puffer1 gewaschen. Es folgt der Verdau mit Proteinase K (in Puffer4) bei 50°C im Heizblock für die Dauer von ca 4 h. Anschließend wird einmal mit Puffer3 und so lange mit H₂O gewaschen, bis kein SDS mehr vorhanden ist (Test nach (Hayashi, 1975) siehe 3.15.2). Das Pellet wird nun sorgfältig in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst und über Nacht unter Schütteln bei RT inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile werden abzentrifugiert (14000 g 10 min RT). Die WTA befinden sich nun im Überstand, dieser kann direkt für die WTA- PAGE eingesetzt werden oder neutralisiert, dialysiert (Porengröße 500- 1000 Da) und lyophilisiert werden.

3.15.5 Die WTA- Isolierung nach dem Protokoll von K. Schirner, Boston

Das Pellet einer zwei Tage bei 30°C in 200 ml Medium im Luftschüttler gewachsenen Streptomycetenkultur wird in 10 ml 2 M NaCl resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wird bei 4°C für 15 min 14000 g in der Sorvall RC6 Plus Zentrifuge zentrifugiert, das Pellet in 5 ml PBS gewaschen, in 10 ml 4%igem SDS gelöst und bei 37°C im Hybridisierungssofen, unter Rollern über Nacht inkubiert. Danach wird das Pellet drei Mal mit 5 ml H₂O gewaschen und für die Dauer von 6 h bei 37°C in 50 mM Tris/HCl pH 7 versetzt mit 5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml Trypsin, 0,1 mg/ml RNase sowie 0,1 mg/ml DNase inkubiert. Anschließend wird für 5 min bei 14000 g 4°C zentrifugiert. Die Zellwände werden nacheinander je ein Mal mit 4 ml 1 M Tris/HCl pH 7, mit 4 ml 1 M Tris/HCl pH 7 1 M NaCl und wieder mit 4 ml 1 M Tris/HCl pH 7 sowie drei Mal mit 4 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wird in 4 ml eiskalter 10%iger TCA resuspendiert und bei 4°C für 48 h im Glasgefäß unter Rühren inkubiert. Das Peptidoglykan wird durch Zentrifugation bei 5300 g 45 min 21°C entfernt. Die Wandteichonsäuren befinden sich nun im Überstand. Sie werden mit dem 5fachen Volumen an eiskaltem 95%igem Ethanol für einige Stunden oder über Nacht bei 4°C gefällt. Anschließend wird für die Dauer von 30 min bei RT 5000 g zentrifugiert und das Pellet zwei Mal mit 5 ml 70%igem EtOH gewaschen (30 min bei RT 5000 g). Das Pellet wird in 1 ml H₂O resuspendiert, unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert und der Überstand in der Speedvac eingedampft. Für die Phosphatbestimmung wird das Pellet in 1 ml H₂O gelöst.

3.15.6 Der Phosphatnachweis zur Quantifizierung von WTA (Chen et al., 1956)

Um die aufgereinigten Teichonsäuren quantifizieren zu können, werden sie komplett hydrolysiert. Anschließend wird die Menge an freiem Phosphat gemessen. Der Phosphatnachweis ist sehr empfindlich. Es werden daher nur unbenutzte neue Glasgefäße sowie H₂O aus der Millipore- Anlage verwendet. Ein Aliquot der WTA- Lösung wird bei 110°C komplett eingetrocknet. Parallel dazu wird eine Phosphat- Standard- Reihe mit 1 µl, 2,5 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl einer 0,1 g/100 ml KH₂PO₄ – Lösung behandelt. Auf die abgekühlte Probe werden 75 µl konzentrierte HClO₄ gegeben und für weitere 3- 4 h bei 110°C inkubiert. Es werden 250 µl H₂O, 100 µl 1,25%ige Ammoniummolybdat- Lösung sowie 100 µl 5%ige L- Ascorbinsäurelösung zugegeben, gevortext, 5 min bei 110°C inkubiert und der blaue Farbkomplex photometrisch bei $\lambda = 750$ nm quantifiziert.

3.15.7 Die WTA- PAGE mit Tris/Tricin- Puffer (Meredith et al., 2008)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wird zur besseren Auftrennung mit 20 cm x 16 cm x 0,75 mm großen Gelen durchgeführt. Zuerst wird das Trenngel wie folgt gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol abgekippt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Der Ansatz reicht für zwei Gele. Die WTA- Proben werden in einer Konzentration von ungefähr 200 nmol Phosphat in einem möglichst kleinen Volumen (eventuell

vorher einengen) und im Verhältnis 3:1 mit Ladepuffer versetzt auf das Gel aufgetragen. Der Gel-Lauf wurde im Kühlraum entweder bei 40 mA über Nacht oder bei 200 V für eine Dauer von 4-5 h durchgeführt.

Tabelle 3-46. WTA- PAGE Gelzusammensetzung (Tris/Tricin).

	Bestandteil	Volumen
Sammelgel	2 M Tris/HCl pH 8,5	3 ml
	H ₂ O	6 ml
	Rotiphorese Gel 40 (19:1)	1 ml
	10% APS	100 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel	2 M Tris/HCl pH 8,5	20 ml
	Rotiphorese Gel 40 (19:1)	40 ml
	10% APS	600 µl
	TEMED	60 µl

3.15.8 Die WTA- PAGE mit TBE- Puffer (Brown *et al.*, 2008)

Alternativ ist es möglich WTAs, in kleinen Gelen mit TBE- Puffer aufzutrennen. Das Gel ist nicht in Trenn- und Sammelgel getrennt und wird wie folgt gegossen. Der Ansatz reicht gerade für zwei Gele 8,3 cm x 7 cm x 0,75 mm.

Tabelle 3-47. WTA- PAGE Gelzusammensetzung (TBE).

Bestandteil	Menge
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	8 ml
H ₂ O	0,5 ml
10X TBE	3,4 ml
TEMED	10 µl
10% APS	40 µl

Es werden 3- 10 µl konzentrierte WTA- Lösung mit 3 µl Ladepuffer aufgetragen. Das Gel läuft bei 100 V ca 100 min bis die Farbe des Ladepuffers noch ca 1 cm vom unteren Rand entfernt ist.

3.15.9 Die Alcianblue- und Silberfärbung von WTA- PAGE- Gelen

Da die Silberfärbung sehr empfindlich ist, wird das Gel mit Handschuhen nur am äußersten Rand berührt, da es sonst zu Verfärbungen kommt. Das H₂O für Lösungen und die Waschschrte wird aus der Millipore- Anlage entnommen. Zunächst wird das Gel in einer frisch angesetzten Alcianblue- Lösung inkubiert, bis Banden sichtbar werden, dies dauert sehr lange (über Nacht). Auch wenn man keine Banden sieht, kann mit der Silberfärbung fortgefahren werden. Anschließend wird 30- 60 min lang mit EAW- Lösung gewaschen und 20 min lang mit 0,7%igem Natriummetaperiodat oxidiert. Daraufhin wird fünf Mal für 5 min mit H₂O gewaschen, 20 min mit Silberlösung inkubiert und noch zwei Mal 1 min mit H₂O gewaschen. Dann wird mit Developer- Lösung inkubiert, bis Banden sichtbar

werden. Eventuell muss die Developer- Lösung erneuert werden. Die Reaktion wird durch Abgießen der Developer- Lösung und die Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt. Die Silber- und Developer- Lösung sowie die ersten Waschlösungen müssen gesondert entsorgt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Die Interaktionspartner der Mre- Proteine und ihre Beteiligung an der Sporenwandsynthese von *S. coelicolor*

4.1.1 Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis

Molecular Microbiology (2011) 79(5), 1367–1379 ■

doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07529.x
First published online 18 January 2011

Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis

Eva-Maria Kleinschnitz,^{1†} Andrea Heichlinger,^{1†} Kathrin Schirner,^{1‡} Juliane Winkler,^{1§} Annette Latus,¹ Iris Maldener,² Wolfgang Wohlleben¹ and Günther Muth^{1*}

¹Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Deutschland.

²Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Organismische Interaktionen, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany.

Summary

It is still an open question how an intracellular cytoskeleton directs the synthesis of the peptidoglycan exoskeleton. In contrast to MreB of rod-shaped bacteria, which is essential for lateral cell wall synthesis, MreB of *Streptomyces coelicolor* has a role in sporulation. To study the function of the *S. coelicolor* *mre* gene cluster consisting of *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2* and *sfr*, we generated non-polar replacement mutants. The individual mutants were viable and growth of substrate mycelium was not affected. However, all mutants produced enlarged spores, which frequently germinated prematurely and were sensitive to heat, high osmolarity and cell wall damaging agents. Protein–protein interaction assays by bacterial two-hybrid analyses indicated that the *S. coelicolor* Mre proteins form a spore wall synthesizing complex, which closely resembles the lateral wall synthesizing complex of rod-shaped bacteria. Screening of a genomic library identified several novel putative components of this complex. One of

them (*sco2097*) was deleted. The Δ *sco2097* mutant formed sensitive spores with an aberrant morphology, demonstrating that *SCO2097* is a new player in cell morphogenesis of *Streptomyces*. Our results suggest that all Mre proteins cooperate with the newly identified proteins in the synthesis of the thickened spore wall required to resist detrimental environmental conditions.

Introduction

Bacteria control their particular shape by specifically localizing cell wall synthesizing machineries (Errington *et al.*, 2003; Carballido-Lopez and Formstone, 2007; Divakaruni *et al.*, 2007). In one of the first *E. coli* mutants with an aberrant morphology *mreB* was affected (Wachi and Matsuhashi, 1989). Subsequently it was shown that most species with a complex, non-spherical morphology contain *mreB*. Despite low sequence similarity, the crystal structure of MreB confirmed that it represents a true homologue of the eukaryotic cytoskeletal element actin (van den Ent *et al.*, 2001). Fluorescence microscopy showed that MreB polymerizes into dynamic filaments in different bacteria (Jones *et al.*, 2001; Defeu Soufo and Graumann, 2004; Figge *et al.*, 2004). These filaments span the cell as a helical cable underneath the surface. Because the incorporation of newly synthesized peptidoglycan (PG) along the cylindrical part of the cell also occurs in a helical manner, a role of MreB in directing PG-synthesis was suggested (Daniel and Errington, 2003; Tianont *et al.*, 2006; Divakaruni *et al.*, 2007). MreB was shown to interact with other morphogenic proteins and probably forms a complex with MreC, MreD, PBP2 and RodA involved in lateral cell wall synthesis (Errington, 2003; White *et al.*, 2010). Depletion of MreB or one of the other Mre proteins in rod-shaped bacteria resulted in the formation of spherical cells that lysed or survived only under specialized growth conditions (Schirner and Errington, 2009). However, the precise functions of MreC, MreD and RodA are not known.

Recently, RodZ was identified as another component of the bacterial cytoskeleton and it has been demonstrated to specifically interact with MreB. It was

Accepted 22 December, 2010. *For correspondence. E-mail gmuth@biotech.uni-tuebingen.de; Tel. +4970712974637; Fax +497071295979. †Both authors contributed equally. ‡Present address: Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA02115, USA. §Present address: Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH), DKFZ-ZMBH Alliance, Heidelberg, Deutschland.

suggested that RodZ links the cytosolic MreB filaments with the membrane localized PG-synthesizing complex to incorporate new PG-precursors in the existing PG-meshwork (Shiomi *et al.*, 2008; Alyahya *et al.*, 2009; Gerdes, 2009; van den Ent *et al.*, 2010).

Actinomycetes grow by apical tip extension incorporating new cell wall material mainly at the hyphal tips rather than by elongation of the cell cylinder. This polarized growth does not require Mre proteins (Daniel and Errington, 2003), but depends on the coiled-coil protein DivIVA (Hempel *et al.*, 2008). Unexpectedly, some species like the antibiotic producing streptomycetes were shown to contain a complete *mre* gene cluster consisting of *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2* and *sfr* (*rodA*). *mreBCD* of *Streptomyces coelicolor* form an operon, while *pbp2*, which is translationally coupled to *sfr* is transcribed from a separate promoter (Burger *et al.*, 2000). Although MreB is expressed in considerable amounts in vegetative mycelium, inactivation experiments demonstrated that *mreB* is not required for vegetative growth, but has a role in sporulation (Mazza *et al.*, 2006). Mutant spores had an impaired spore wall causing premature germination and loss of resistance to detrimental environmental conditions. An MreB-eGFP fusion protein localized to sites where spore wall synthesis had to take place during sporulation. This suggested a role of MreB in directing the synthesis of the thickened spore wall (Mazza *et al.*, 2006). Beside MreB, *S. coelicolor* encodes two additional MreB-like proteins Mbl (SCO2451) and SCO6166. Mbl was colocalized with MreB and a role in sporulation had been shown. The

function of SCO6166 is still unknown (Heichlinger *et al.*, 2011).

To understand the mechanism of spore wall synthesis in more detail, we characterized all genes of the *S. coelicolor mre* cluster by deletion analysis. The distinct non-polar mutants had a nearly identical phenotype, suggesting that all Mre proteins cooperate in spore wall synthesis. Bacterial two-hybrid analyses of their interaction profile suggested a *Streptomyces* spore wall synthesizing complex (SSSC) with MreC having a central role. In addition, we identified several novel interaction partners as putative components of this complex. One of them (SCO2097) was confirmed as a novel morphogenic protein by mutational analysis.

Results

All genes encoded by the mre gene cluster can be inactivated without affecting viability

To analyse the putative role of the *mre* genes, we inactivated all genes by Redirect technology. In a two-step process, we replaced the respective genes by an *aac(3)IV* cassette, which was subsequently deleted to generate an in frame deletion mutant (Figs 1 and S1–S5). As many genes of the *mre* cluster are co-transcribed (Fig. S6; Burger *et al.*, 2000), or even show translational coupling, it was important to avoid polar effects on the transcription of the downstream genes. The mutants $\Delta mreD::aac$ and $\Delta sfr::aac$ still carry the *aac(3)IV* cassette. However, both genes are the last gene of the respective operon. There-

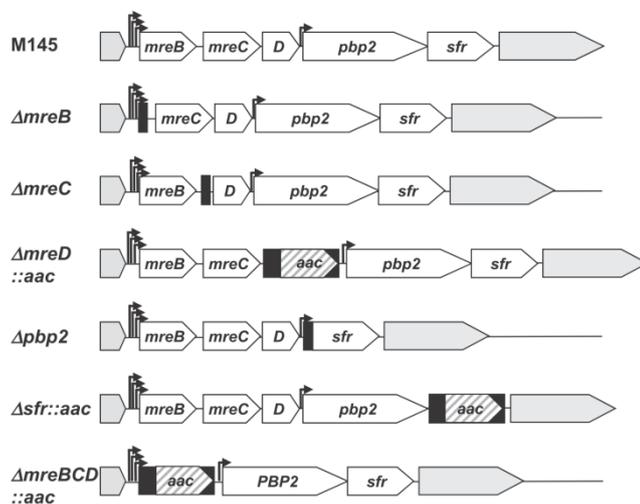


Fig. 1. *S. coelicolor mre* mutants. Mutants were generated by Redirect technology leaving a 81 bp scar sequence (black bar) in $\Delta mreB$ (Mazza *et al.*, 2006), $\Delta mreC$, $\Delta pbp2$. The mutants $\Delta mreD::aac$, $\Delta sfr::aac$ and $\Delta mreBCD::aac$ still carry the *aac(3)IV* cassette that was used to select the gene replacement. Arrows indicate the promoters identified by Burger *et al.* (2000).

fore, the *aac(3)IV* cassette is not assumed to cause polar effects in these mutants. In addition, a $\Delta mreBCD::aac$ mutant was generated where *mreB*, *mreC* and *mreD* were simultaneously deleted and replaced by the *aac(3)IV* cassette.

Whereas the *mre* genes are essential in rod-shaped bacteria, all *S. coelicolor* mutants were obtained readily, demonstrating that none of the *mre* genes was required for viability. All mutants showed normal growth under standard conditions and were able to sporulate (data not shown).

The mre mutant spores are sensitive to detrimental environmental conditions

A closer view revealed similar defects for each of the mutants. Morphology of all mutants resembled that of a strain deleted for *mreB* (Mazza *et al.*, 2006). Whereas growth of the substrate mycelium was not affected, the spores were swollen and had nearly doubled their volume compared with the wild-type M145 (Fig. 2A, Table 1). Mutant spores often germinated prematurely when still included in spore chains. Transmission electron

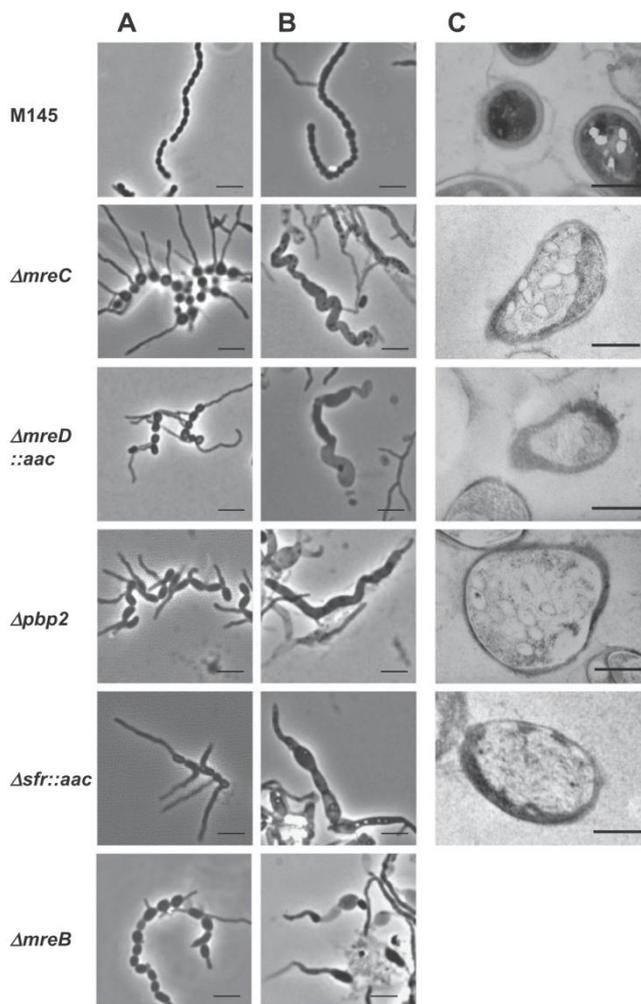


Fig. 2. Phenotype of mutants defective in one of the *mre* genes.

A. Whereas the vegetative mycelium was not affected, all mutants formed swollen spores (size given in Table 1) that frequently germinated prematurely.

B. On MS agar containing 10.3% sucrose large areas of the aerial mycelium lysed and aberrant spore like particles were formed. Bar = 4 μ m.

C. Transmission electron microscopic images showing aberrant mutant spores with an impaired wall. Bar = 500 nm.

Table 1. Spore sizes^a of *S. coelicolor* M145, the *mre* mutants and the complemented mutants.

Strain	Strain		Complemented strain		
	Length (μm)	Width (μm)	Length (μm)	Width (μm)	
M145	1.30 ± 0.14	0.77 ± 0.07	M145 (pGM190)	1.20 ± 0.15	0.64 ± 0.06
<i>ΔmreB</i> [<i>mreB-IFD</i>] ^b	1.64 ± 0.24	1.16 ± 0.21	<i>mreB-IFD</i> ^b	1.23 ± 0.27	0.84 ± 0.14
<i>ΔmreC</i>	1.83 ± 0.20	1.07 ± 0.16	<i>ΔmreC</i> (pMreC)	1.38 ± 0.19	0.71 ± 0.09
<i>ΔmreD::aac</i>	1.65 ± 0.22	1.07 ± 0.11	not done	–	–
<i>ΔmreBCD::aac</i>	1.63 ± 0.24	1.10 ± 0.15	not done	–	–
<i>Δpbp2</i>	1.84 ± 0.40	1.17 ± 0.16	<i>Δpbp2</i> (pMre _{total})	1.20 ± 0.16	0.74 ± 0.07
<i>Δsfr::aac</i>	1.61 ± 0.24	1.17 ± 0.11	<i>Δsfr</i> (pSfr)	1.21 ± 0.12	0.69 ± 0.06
<i>Δ2097</i>	1.53 ± 0.16	0.70 ± 0.08	<i>Δ2097</i> (p2097)	1.19 ± 0.15	0.62 ± 0.06

a. Analysis by light microscopy, *n* = 200.

b. Data from Mazza *et al.* (2006).

microscopic studies of the mutants revealed a distorted spore wall as previously reported for the *ΔmreB* mutant (Mazza *et al.*, 2006). Whereas M145 formed uniform round or ellipsoid spores with a confined outer layer, the *ΔmreC*, *ΔmreD::aac*, *Δpbp2* and *Δsfr::aac* spores were more irregular in shape with a very diffuse outer layer (Fig. 2C).

The mutant phenotypes were complemented by introducing plasmid encoded copies of the respective genes (Table 1). The mutants had a clear sporulation defect on agar containing 10.3% sucrose, while growth of vegetative substrate mycelium was not affected. Large areas of the aerial mycelium lysed and completely deformed spore structures were observed (Fig. 2B).

In addition to the morphological defects, mutant spores had lost their specific resistance to detrimental environmental conditions, as it was previously reported for the *ΔmreB* mutant (Mazza *et al.*, 2006). All mutants were sensitive to moderate heat (Fig. 3A), salt stress (Fig. 3C) and cell wall damaging agents, as lysozyme or vancomycin (Fig. 3B). The phenotypes of the individual mutants were very similar, all showed increased sensitivity to heat and produced aberrant spores on 10.3% sucrose. Only the *ΔmreD::aac* mutant was pigmented and appeared to be more resistant to lysozyme and vancomycin than the other mutants (Fig. 3B). If the plates were incubated for 12 h before placing the lysozyme and vancomycin discs to allow germination and growth, the effect of lysozyme or vancomycin was indistinguishable from that on the wild type, indicating that only the spores displayed increased sensitivity but not the vegetatively growing mycelium.

The very similar phenotypes of *ΔmreB* encoding an intracellular cytoskeletal protein, *ΔmreC*, *ΔmreD* and *Δsfr* encoding integral membrane proteins, *Δpbp2*, encoding an extracellular PG-synthesizing protein or the triple mutant deficient in *mreB*, *mreC* and *mreD* (data not shown), suggest that the corresponding proteins cooperate in the same cellular process, the synthesis of the thickened spore wall.

MreB-eGFP localizes independently of the other Mre proteins

An MreB-eGFP fusion protein localized to the sporulation septa and to the spore periphery (Mazza *et al.*, 2006). Attempts to localize MreC-eGFP, PBP2-eGFP or Sfr-eGFP fusion proteins failed, probably due to low expression levels or instability of the fusion proteins (data not shown). When *pbp2-egfp* or *sfr-egfp* were expressed under control of the thiostrepton inducible *tipA* promoter on a multi copy plasmid, fluorescence foci at putative septation sites and around the spore membrane were observed (Fig. S7).

In order to study whether MreB requires other Mre proteins for proper localization we analysed MreB-eGFP fluorescence in different mutant backgrounds. Plasmid pPM4, encoding the MreB-eGFP protein (Mazza *et al.*, 2006) was transferred to *ΔmreC*, *Δpbp2*, and *Δsfr* mutants and integrated into the chromosomal *attB* site. In all these mutants MreB-eGFP formed the characteristic ladder-like fluorescence pattern at the sporulation septa (Fig. 4) and around the spore membrane (Fig. S8), demonstrating that specific localization of MreB-eGFP does not require the presence of MreC, PBP2 or Sfr.

Mre protein interaction patterns suggest a complex resembling the lateral wall synthesizing complex of rod-shaped bacteria

The Mre proteins of rod-shaped bacteria interact to form a lateral wall synthesizing complex (White *et al.*, 2010). In order to study whether a similar complex is involved in the spore wall synthesis, we analysed interactions of the *S. coelicolor* Mre proteins using the bacterial two-hybrid system based on the adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. Translational fusions of the *mre* genes with the catalytic *cya* domains T25 and T18 were made. In addition, fusion of genes were included, which encode key enzymes in cell division and cell wall synthesis, as FtsZ

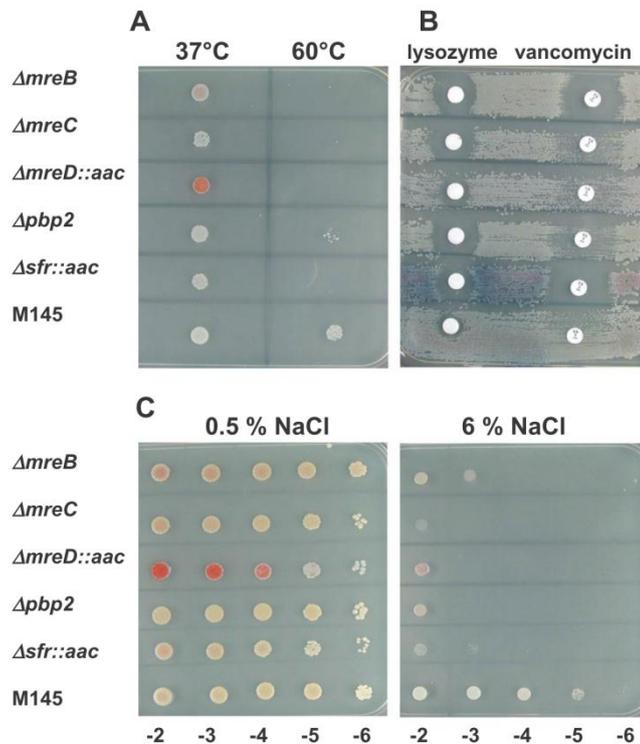


Fig. 3. Sensitivity of mutant spores to moderate heat, cell wall damaging agents and salt stress.

A. Spores of $\Delta mreB$, $\Delta mreC$, $\Delta mreD::aac$, $\Delta pbp2$, $\Delta sfr::aac$ and M145 were incubated for 30 min at 37°C or at 60°C, spotted onto LB agar and incubated for 3 days at 30°C. B. Spores were plated onto LB agar and filter discs with lysozyme (50 µg) or vancomycin (5 µg) were applied. The plates were incubated for 2 days before photographing. C. Serial spore dilutions were spotted on LB + 0.5% NaCl and LB + 6% NaCl and incubated for 3 days.

(SCO2082), RodZ (SCO5751) and the bifunctional penicillin binding proteins FtsI (SCO2090), SCO3901 and SCO3580. Protein–protein interaction was analysed in co-transformation experiments of the *E. coli cya* mutant BTH101. To achieve a better expression of the *Streptomyces* genes, BTH101 also carried the pRARE plasmid (Novagen), encoding tRNA genes of rarely used *E. coli* codons. For all Mre proteins interactions were observed and quantified by measuring β -galactosidase activities (Fig. 5A).

Most interactions were found for MreC and RodZ, suggesting a central role of these proteins in the spore wall synthesizing complex. With the exception of MreB, MreC interacted with all proteins encoded by the *mre*-cluster, MreC, MreD, PBP2 and Sfr. Furthermore, it strongly interacted with RodZ, FtsI, SCO3901 and weakly with SCO3580. RodZ showed positive interactions with itself, with all proteins encoded by the *mre*-cluster, and with the penicillin binding proteins FtsI and SCO3901 (Fig. 5B). In summary, the interactions found for the *S. coelicolor* Mre proteins resembled those reported for the Mre proteins of rod-shaped bacteria (Fig. S9; White *et al.*, 2010). This

suggests that the thickened *Streptomyces* spore wall is synthesized by a multi-protein complex, which is highly similar to the lateral wall synthesizing complex required for cell elongation of rod-shaped bacteria. We therefore propose the name SSSC (Streptomyces spore wall synthesizing complex).

Screening of a genomic library identifies putative additional components of the SSSC

To identify *Streptomyces*-specific components of the SSSC, we constructed a genomic library of *S. coelicolor* by cloning 250–2000 bp DNA fragments, obtained by a partial BfuCI digest into BamHI digested pKT25. Aliquots of the library were electroporated into *E. coli* delivering in total about 10^6 transformants. Plasmid isolation and restriction analysis of arbitrarily selected transformants revealed an insert for about 90% of the clones. All transformants were pooled and used in PCR-analyses to assay coverage of the genome (Fig. S10). The pooled plasmid DNA was used in co-transformation experiments with plasmids containing the *mre* genes fused to the

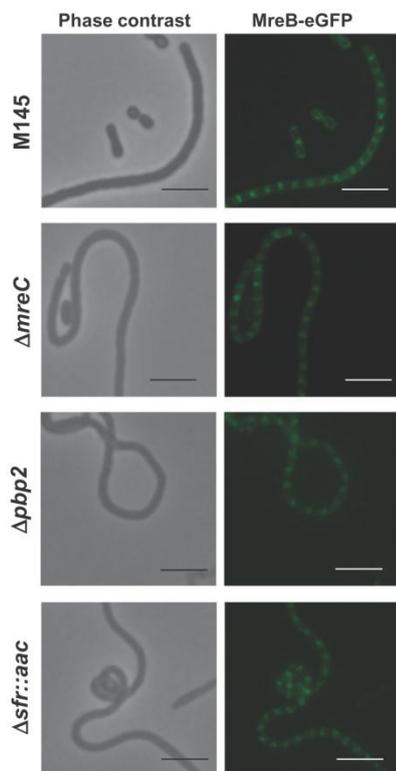


Fig. 4. Localization of MreB-eGFP in $\Delta mreC$, $\Delta pdp2$ and $\Delta sfr::aac$ backgrounds. Cultures were grown on MS agar for three days. MreB-eGFP localized to the sporulation septa of the aerial mycelium even in the absence of MreC, PBP2 or Sfr proteins. Bar = 4 μ m.

T18 domain. Reconstitution of a functional adenylate cyclase allowed growth on minimal agar supplemented with lactose. Co-transformants were confirmed by re-transformation of the respective plasmids and their β -galactosidase activity was assayed. Of positive clones inserts were characterized by sequencing and checked for in frame fusion to the KT25 domain. The inserts of 145 clones giving β -galactosidase activity were sequenced, 124 of which carried an insert fused to the *cya* domain in the correct reading frame (Table S1).

As already observed, the distinct Mre proteins differed in their ability to interact with other proteins. Most interactions were detected for MreC and Sfr, while MreB showed no interactions (about 350 000 transformants analysed). Interestingly, some interaction partners were fished more than once and some were picked using different bait proteins (Table S1).

SCO2097 was isolated three times with RodZ, two times with MreC, six times with MreD and 29 times with Sfr. Additionally, SCO2097 interacted with PBP2, SCO3580, SCO3901 and FtsI. *sco2097* is located next to the *dcw* cluster, containing *ftsI* and *ftsZ* in *S. coelicolor* and encodes a 135 aa membrane protein with unknown function.

SCO2578 was isolated three times with MreC and two times with MreD; it also interacted with PBP2, Sfr, RodZ, FtsI, SCO3580, SCO3901 and weakly with MreB. It is predicted to contain a Pfam domain (PF03816) characteristic for cell envelope related transcriptional regulators of the LytR_cpsA_psr family. Members of this family are involved in β -lactam resistance, biofilm formation and stress tolerance and are suggested to play an important role in cell wall maintenance (Hubscher *et al.*, 2008).

SCO2584 represents an uncharacterized membrane protein with similarity (56% identity/200 aa) to a phospholipid-transporting ATPase of *S. sp.* ACTE (NZ_ADFD01000003.1). Interestingly, *sco2584* is located close to genes encoding putative teichoic acid biosynthetic genes. SCO2584 was three times isolated with MreC and once with Sfr; in addition, it interacted with MreD, PBP2, RodZ and the penicillin binding proteins FtsI, SCO3580 and SCO3901.

SCO3754, which is annotated as an FtsX-like ABC transporter, was isolated with MreC and MreD (five times) and interacted also with PBP2, Sfr, FtsI, RodZ and SCO3901. FtsEX was shown to direct cellular differentiation and probably contributes to cytokinesis by affecting activity of the divisome (Corbin *et al.*, 2007; Garti-Levi *et al.*, 2008; Arends *et al.*, 2009).

SCO4129 was isolated as an interaction partner of MreC. It also interacted with RodZ, FtsI, MreD, PBP2, Sfr, SCO3580 and SCO3901. *sco4129* (*cmdD*) was recently characterized as part of an operon involved in sporulation. The precise function of *cmdD* is not known, but inactivation of *cmdD* produced abnormal branches in the spore chains (Xie *et al.*, 2009).

The eukaryotic type Ser/Thr protein kinase SCO4778 was fished eight times with MreC, five times with MreD, once with PBP2, six times with Sfr and twice with RodZ. It also interacted with FtsI, SCO3580 and SCO3901. Members of Ser/Thr protein kinases have been reported to control cell division and cell wall synthesis in actinomycetes, as in *Corynebacterium* or *Mycobacterium* (Molle and Kremer, 2010). A summary of the interaction network reflecting the composition of the SSSC is shown in Fig. 5B.

SCO2097 is a novel morphogenic protein involved in spore wall synthesis

To study whether the identified Mre interaction partners have a role in spore wall synthesis as it is suggested by

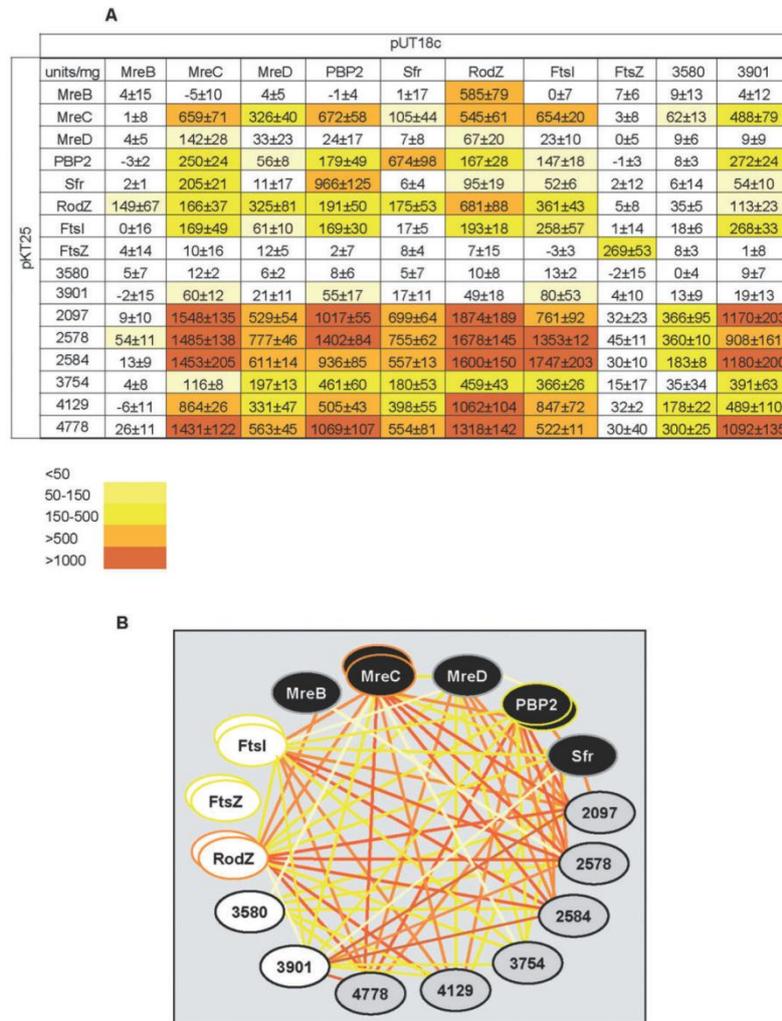


Fig. 5. Bacterial two-hybrid interaction assays of Mre proteins and other morphogenic proteins of *S. coelicolor*.

A. BTH101 was co-transformed with plasmids encoding the indicated T25 and T18 *cya* fusions and β -galactosidase activity of the co-transformants was determined. Numbers indicate units of activity of at least three independent transformants, represented as averages (\pm standard deviations).

B. Interaction network of the putative SSSC. Interaction partners identified by screening the genomic library are shown in grey colour. Mre proteins are drawn in black, other morphogenic proteins are given in white. The line colour indicates interaction strength. Double ellipses mark proteins that showed self-interaction.

their interaction pattern, we characterized one of them in more detail. *sco2097* was selected because it was identified most frequently and as its genomic context suggests a role in cell wall synthesis. In most actinomycetes

the *sco2097* homologue lies close/next to the *dcw* cluster involved in cell division and cell wall remodelling (Mingorance *et al.*, 2004). Surprisingly, it is not only present in sporulating actinomycetes but is also present in *Mycobac-*

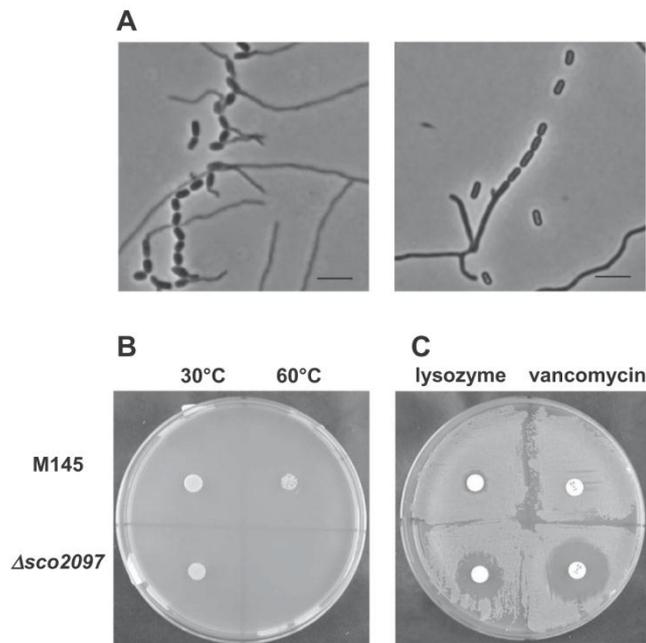


Fig. 6. Effect of *sco2097* inactivation on the morphology and resistance of spores to heat and cell wall damaging agents. A. Phase microscopy of Δ *sco2097* grown on MS agar revealed elongated rod-shaped spores that often germinated prematurely. Bar = 4 μ m. B. Spores of Δ *sco2097* and M145 were incubated for 30 min at 37°C or at 60°C, spotted onto LB agar and incubated for 3 days at 30°C. C. Spores were plated onto LB agar and filter discs with lysozyme or vancomycin were applied. The plates were incubated for 2 days before photographing.

terium and *Corynebacterium*, which do not sporulate and do not contain an *mre*-cluster. Homologues of SCO2097 are not found in *E. coli* or *Bacillus subtilis* (data not shown), indicating a specific role for actinomycetes growth. SCO2097 is annotated as an uncharacterized putative membrane protein and predicted to contain two significant transmembrane helices.

To elucidate the function of SCO2097, a non-polar deletion mutant was constructed (*Experimental procedures*, Fig. S11). The Δ *sco2097* mutant was viable and had a phenotype that strikingly resembled that of the *mre* mutants. Interestingly, the spore length was increased, but the spore width was not affected (Fig. 6A). Whereas the wild-type spores were $1.30 \pm 0.14 \mu\text{m}$ long and $0.77 \pm 0.07 \mu\text{m}$ wide, the Δ *sco2097* spores had a size of $1.53 \pm 0.16 \times 0.70 \pm 0.08 \mu\text{m}$. This phenotype was complemented by introducing plasmid p2097 encoding a SCO2097-His₆ fusion protein (Table 1). Growth of the vegetative mycelium was not affected, but spores were sensitive to heat (Fig. 6B), lysozyme, vancomycin (Fig. 6C) and salt stress (data not shown), suggesting an impaired spore wall. Furthermore, overexpression of *sco2097* was lethal, similar to overexpression of *mreB* and *mreC* (Fig. S12), probably reflecting miss-localization of essential proteins, e.g. involved in cell wall remodelling.

These phenotypes suggest that SCO2097 is a novel component of the SSSC and a novel morphogenic protein that seems to be specific for actinomycetes.

Discussion

While in rod-shaped organisms the Mre proteins are thought to orchestrate PG-synthesis during cell elongation, *Streptomyces* growth by apical tip extension does not involve lateral PG-synthesis (Daniel and Errington, 2003; Flardh, 2003; Flardh and Buttner, 2009), raising the question for the need of such a PG-synthesizing complex. Because for MreB of *S. coelicolor* a role in synthesis of the thickened spore wall has been shown (Mazza *et al.*, 2006), we speculated that the other Mre proteins might cooperate with MreB and form a multi-protein complex (SSSC) involved in spore wall synthesis. The very similar phenotypes of non-polar single *mre* mutants are in agreement with the proposed role of the Mre proteins. Swollen, prematurely germinating spores that have lost their resistance to detrimental environmental conditions and cell wall damaging agents suggest, that the integrity of the spore wall is impaired, resulting in water influx and premature germination. This defect is supported by transmission electron microscopy. As previously shown for the

$\Delta mreB$ mutant (Mazza *et al.*, 2006), also the newly constructed mutants had a distorted spore wall. Whereas wild-type spores were ellipsoid with a sharply visible external wall, electron microscopic images showed irregular shaped $\Delta mreC$, $\Delta mreD::aac$, $\Delta pbp2$ and $\Delta sfr::aac$ spores with a more diffuse wall (Fig. 2C). However, as the mutant spores are sensitive to many treatments, we can not fully exclude that the appearance of the spores and the spore surface was affected by the fixation/staining process. The integrity of the spore wall might be influenced by the inability of the mutants to properly position the penicillin binding proteins, like PBP2, SCO3901, SCO3580 or FtsI within the SSSC.

MreB-eGFP had previously been shown to localize to sites where the PG-synthesis occurs during morphological differentiation (Mazza *et al.*, 2006), suggesting that MreB positions the SSSC. Unfortunately, attempts to localize the other components of the SSSC did not result in satisfying data. Fluorescence mediated from single copies of *mreC-egfp*, *pbp2-egfp* or *sfr-egfp* was hardly visible, probably due to the low expression or instability/non-functionality of the respective fusion proteins. Only when overexpressed, the localization pattern of PBP2-eGFP and Sfr-eGFP resembled that of MreB-eGFP (Fig. S7). But in these experiments it can not be completely ruled out that the fluorescence is affected by overexpression effects and does not exactly show the native localization of PBP2 or Sfr.

The proper localization of MreB-eGFP in different mutant backgrounds ($\Delta mreC$, $\Delta pbp2$, $\Delta sfr::aac$) demonstrated that MreB is able to assemble independently of the other Mre proteins at the septal crosswalls. Whereas MreB of *Caulobacter* was able to form helical spirals in MreC depleted cells, a distorted MreB localization was reported for *E. coli* cells depleted for MreC, MreD or RodA (Dye *et al.*, 2005; Kruse *et al.*, 2005).

The concept of a SSSC consisting of the Mre proteins is further supported by the protein-protein interaction data obtained by bacterial two-hybrid analyses. These studies showed that MreC might have a central role in the SSSC. Apart from MreB, which was already reported to be problematic in the *cya* based bacterial two-hybrid system (Formstone *et al.*, 2008), MreC interacted with all proteins encoded by the *mre* cluster. In addition, it showed interactions with the RodZ homologue SCO5751 and the bifunctional transglycosylase/transpeptidase penicillin binding proteins SCO3580, SCO3901 and FtsI (SCO2090). Because PBP2 is a monofunctional transpeptidase, involvement of a further PBP providing the transglycosylase activity for spore wall synthesis had to be postulated. FtsI and SCO3901 also interacted with RodZ supporting their putative role in spore wall synthesis.

RodZ of *Thermotoga maritima* interacted with MreB probably providing a scaffold for the MreB filaments and

the assembly of the lateral wall synthesizing machinery (van den Ent *et al.*, 2010). *rodZ* (*yfgA*) mutants of *E. coli* were growth deficient and had a spherical shape instead of the normal rod-shape (Alyahya *et al.*, 2009; Bendezu *et al.*, 2009; Niba *et al.*, 2010). The *S. coelicolor* *rodZ* homologue *sco5751* is located downstream of *ftsK*, which is involved in the segregation of chromosomal DNA during sporulation. Surprisingly, a *sco5751* mutant had no striking phenotype. Because a more detailed characterization of the mutant has not been carried out (Wang *et al.*, 2007), it is tempting to speculate about a role of SCO5751 in sporulation of *Streptomyces*.

Although MreC and RodZ interacted with most of the Mre proteins, they were not identified as interaction partners in the *S. coelicolor* library. This can be attributed to the method used for the construction of the library, because functional fusion proteins can only be obtained if the BfuCI site is in the correct reading frame with respect to the *cya* domain. But all three internal BfuCI sites in *mreC* and the six BfuCI sites within *sco5751* are not in frame, explaining why these genes were not retrieved in the screening experiment. This also implies that the interacting clones presented in *Supplementary Information*, Table S1 do not represent a complete list of *S. coelicolor* interaction partners, as all genes lacking BfuCI sites or those that have BfuCI sites in wrong reading frames could not be correctly fused to the T25 domain in this experiment. Nevertheless, the constructed *S. coelicolor* library resulted in the identification of several candidate genes, which, from sequence similarity or their genomic context, might represent novel putative components of the SSSC.

For one of them, *sco2097*, the proposed role in spore wall synthesis could be proven by constructing a deletion mutant. Although the phenotype seemed to be less dramatic compared with the *mre* mutants, the formation of sensitive spores with an aberrant morphology (Fig. 6A–C) strongly supports its role in spore wall synthesis. The size of the $\Delta sco2097$ spores, which had normal width but were elongated, suggest a function of SCO2097 in controlling spore length.

The Ser/Thr protein kinase SCO4778, also named PkaI (Petrickova and Petricek, 2003), was isolated from the genomic library with five different bait proteins. Interestingly, it interacted with four different PBP proteins (PBP2, SCO3580, SCO3901 and FtsI) although it does not contain a predicted PASTA (penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated) domain (Yeats *et al.*, 2002). Because Ser/Thr kinases have a well-documented role in controlling proteins involved in cell division and cell wall synthesis in actinomycetes (Molle and Kremer, 2010), it is tempting to speculate that activity of the SSSC is controlled by SCO4778 mediated protein phosphorylation.

Table 2. Oligonucleotides used for mutant constructions.

Name	Sequence ^a
RedmreCup	TCCGGAATTCGACGACGAGGAAGGCACGGCCGCGCACGTGATTGGGATCCGTGCACC
RedmreClow	AGCAGGATCCGGTTGACGCGCATGGGGTGATGGCTCCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RedmreDup	AGAACGAGCAGCCCGAGCCGTAGGAGCCATACCCCATGATTCGGGATCCGTGCACC
RedmreDlow	TCACGAAGTGTGCGCTGCTGGAATGCTGCCGCTGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RedPBPup	CAGCAGCGCACACTTCGTGAGGGGGAGCCAGAACCAGTGATTGGGATCCGTGCACC
RedPBPdown	CGGGCCGTAACCCGAGACGTGGAAGCTGTTGCCGCTATGATAGGCTGGAGCTGCTTC
RedSfrup	CGGGCCGACGGGAAGAAGCCGGAGGGCACGCGTATGACCACTAGTATTGGGATCCGTGCACC
RedSfrdown	CCCCCGGGCGCCGTACCGCTGCCGCCCGGGTGCCGTACTAAGTAGTTGATAGGCTGGAGCTGCTTC
2097upfwE	AAGAATTCAGGTGCTGCCCGAGAT
2097uprevB	AAGGATCCACGGAGTCCCTCTCA
2097lowfwB	AAGGATCCACGGAGTCCCGAGCA
2097lowrevH	GGAAAGCTTACTGGTACGCGCAGGA
Kd-2097up	GTAAGGCGCTGATCAG
Kd-2097r	TGGACGGCCCTGAAA

a. Relevant restriction sites underlined.

Experimental procedures

Bacterial strains and media

Streptomyces coelicolor strains were cultivated on MS agar plates. Cultivation of strains and procedures for DNA manipulation were performed as previously described for *E. coli* (Sambrook and Russel, 2001) and *S. coelicolor* (Kieser et al., 2000). Oligonucleotides used for mutant constructions and bacterial two-hybrid analyses are given in Tables 2 and 3 respectively. A plasmid and strain list is given in Table 4.

Construction of *S. coelicolor* mutants

All *mre* genes were deleted by PCR targeting (Gust et al., 2003) of cosmid C88 (Redenbach et al., 1996). Following λ

red mediated replacement of the respective gene by a PCR-amplified *aac(3)IV* cassette (primers are given in Table 2), the resulting cosmid C88-aac was introduced into M145 by intergeneric conjugation and a replacement mutant (double crossover) carrying the *aac(3)IV* cassette was selected. Subsequently, the *aac(3)IV* cassette was deleted from cosmid C88-aac by FRT recombination using *E. coli* BT340 and the resulting cosmid was introduced into the *S. coelicolor* replacement mutant carrying *aac(3)IV*. Finally, apramycin sensitive colonies were selected in which the respective gene was replaced by a remaining 81 bp scar sequence. The Δ *mreBCD::aac* mutant was generated by PCR targeting of Cosmid C88 using primers PM9 (Mazza et al., 2006) and RedmreDlow (Table 2).

To delete *sco2097* a 1547 bp upstream fragment (primer pair 2097upfwE/2097uprevB) including the start codon of *sco2097* and a 1502 bp downstream fragment (primer pair 2097lowfwB/2097lowrevH) including the *sco2097* stop codon were amplified by PCR and cloned into pK18, yielding pKO2097. After transformation of M145 and integration of the deletion vector pKO2097 by a single crossover (kanamycin-resistant), a Δ *sco2097* mutant was isolated by selecting for the second crossover (kanamycin-sensitive).

The correct gene replacement was confirmed by PCR-analyses and/or Southern-blotting (Figs S1–S5 and S11).

Bacterial two-hybrid interaction assays

To detect protein interactions, the *S. coelicolor* genes were amplified with primers listed in Table 2 containing XbaI and KpnI or MunI sites respectively. Subsequently, PCR fragments were cloned as XbaI/KpnI or XbaI/MunI fragments into plasmids pKT25 and pUT18c to generate translational fusions with the catalytic domains of the *B. pertussis* adenylate cyclase (Karimova et al., 1998). The *E. coli* *cya* mutant BTH101 was co-transformed with pUT18c and pKT25 derivatives and spotted on MacConkey agar or LB-X-Gal plates (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside 40 μ g ml⁻¹/IPTG 0.5 mM) and incubated at 30°C. The ability of co-transformants to use lactose resulting in red colour on

Table 3. Oligonucleotides used in bacterial two-hybrid studies.

Name	Sequence ^a
MreBXbaI	ACTCTAGAGGGGAACTCAATGTCG
MreBKpnI	T CGGTACCGATCTACGGGCGAGGC
MreCXbaI	ACTCTAGAGAGGGACACGAAAGAG
MreCKpnI	AAGGTACCACGGCTCGGGCTGCTC
MreDXbaI	ACTCTAGAGCGGTCAACCCGATC
MreDKpnI	AAGGTACCACAGCCGCTTGACCCC
PBP2XbaI	ACTCTAGAGACCAACATCCCGAG
PBP2KpnI	AAGGTACCATACGGGTGCCCTCC
SfrXbaI	ACTCTAGAGACCGGCAACAGCTTC
SfrKpnI	AAGGTACCACGGACATCGGTCT
FtsIXbaI	ACTCTAGAGACGGAAGTGTCCGAC
FtsIMunI	CCCAATTGCAGGGTTTGAAGGTG
FtsZXbaI	ACTCTAGAGGCAGCACCCGAGAAC
FtsZKpnI	AAGGTACCCTTCAGGAAGTCCGGC
RodZXbaI	ACTCTAGAGTCCAACGGCAAATCC
RodZKpnI	TTGGTACCATCCGACCTGCGGGT
SCO3901XbaI	ACTCTAGAGTCTTCGGCTGCCTG
SCO3901MunI	CTCAATTGTAGCGTTGCGTCCCGAG
SCO3580XbaI	ACTCTAGAGCCAAAGAAGCGCTCG
SCO3580MunI	CTCAATTGCAGCGTCTGCCCGGG

a. Restriction sites underlined.

Table 4. Strains and plasmids used in this study.

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> XI1 blue	F ⁺ ::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacP supE44 ΔlacZM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁺ cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (Str ^r) hsdR2 mcrA1 mcrB1	Karimova <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coli</i> BW 25113/pJ790	Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-4) lacIp-4000(lacF) λ ⁻¹ rpoS369(Am) rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsd514; pJ790:[oriR101] [repA101(ts)] araBp-gam-beta-exo	Gust <i>et al.</i> (2003)
<i>E. coli</i> NovaXG	F ⁺ mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 Φ80dlacZΔM15ΔlacX74 araΔ139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ ⁻¹ tonA	Novagen
<i>S. coelicolor</i> M145	prototrophic, SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	Kieser <i>et al.</i> (2000)
<i>S. lividans</i> TK64	pro, str-6	Kieser <i>et al.</i> (2000)
ΔmreB[mreB-IFD]	mreB replacement mutant of M145 (mreB-IFD)	Mazza <i>et al.</i> (2006)
ΔmreC	mreC replacement mutant of M145	Present study
ΔmreD::aac	mreD replacement mutant of M145, aac	Present study
Δpbp2	pbp2 replacement mutant of M145	Present study
Δsfr::aac	sfr replacement mutant of M145, aac	Present study
ΔmreBCD	mreB-mreC-mreD replacement mutant of M145, aac	Mazza <i>et al.</i> (2006)
Δ2097	sco2097 replacement mutant of M145	Present study
ΔmreB::pPM6 [mreB-IFDc]	mreB replacement mutant of M145 (mreB-IFD) complemented by the integration of pPM6, aac	Mazza <i>et al.</i> (2006)
pTST101	bla, male-egfp fusion	J. Altenbuchner, pers. comm.
pPM4	pSET152 derivative, mreB-egfp fusion	Mazza <i>et al.</i> (2006)
pJW6	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a PBP2-eGFP fusion protein	Present study
pJW4	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a Sfr-eGFP fusion protein	Present study
pUZ8002	aphII, RP4 transfer region	Kieser <i>et al.</i> (2000)
pJ773	bla, aac, oriT	Gust <i>et al.</i> (2003)
pK18	aphII, lacZα	Pridmore (1987)
pMreB	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a MreB	Present study
pMreC	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a MreC-His ₆ fusion protein	Present study
pMreD	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a MreD-His ₆ fusion protein	Present study
pMre _{total}	pSET152 derivative encoding the complete mre cluster, aac	Present study
pSfr	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a Sfr-His ₆ fusion protein	Present study
p2097	pGM190 derivative, aphII, tsr, P _{tipA} , encoding a SCO2097-His ₆ fusion protein	Present study
pKT25	aph, cya-T25	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18	bla, cya-T18	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18c	bla, cya-T18	Karimova <i>et al.</i> (1998)

MacConkey agar or blue colour on LB-X-gal plates, is based on a functional adenylate cyclase due to the interaction of the fusion proteins.

For a quantification, we performed β-galactosidase assays as described (Karimova *et al.*, 2005). Briefly, co-transformants were inoculated in 5 ml LB- broth containing 0.5 mM IPTG and the appropriate antibiotics, and incubated overnight at 30°C. After diluting 1:5 with M63-medium, the optical density was measured at 600 nm. 2.5 ml samples of the cell suspension was permeabilized with 30 μl toluol and 35 μl 0.1% SDS at 37°C. 500 μl aliquots was added to 500 μl of P2 buffer containing β-mercaptoethanol and incubated at 30°C for 5 min. 250 μl of 0.4% ONPG in P2-buffer was added and incubated at room temperature. The reaction was stopped after 4–6 min with 500 μl 1 M Na₂CO₃ solution and the optical density was determined at 420 nm. Enzymatic activities were calculated as follows: 200[(OD₄₂₀-OD_{420control})/incubation time]*dilution. The dry weight of bacteria was calculated from the OD₆₀₀ as 1 ml of culture of OD₆₀₀ = 1 corresponds to 300 μg dry weight bacteria to give the results in units mg⁻¹.

Construction of a *S. coelicolor* genomic library for two-hybrid analysis

The genomic DNA of *S. coelicolor* M145 was purified and partially digested by BfuCI, a Sau3A isoschizomer. The digested DNA was purified by a phenol chloroform extraction. Fragments of about 250–2000 bp were eluted from an agarose gel. The library vector pKT25 was digested with BamHI, dephosphorylated with CIP and extracted with phenol/chloroform. Several pools of digested DNA and pKT25 were ligated for 2 days at 4°C using high concentration T4 ligase (Fermentas). 1 μl of the ligation-mix was transformed into NovaXG Zapper cells (Novagen) by electroporation and plated onto 10 plates containing kanamycin. This was repeated 30 times. Transformants of each experiment were pooled and plasmid DNA was isolated. 2 μl of each pool of DNA was pooled and this mixture was used for the bacterial two-hybrid screening procedure.

To characterize the diversity of the genomic library, 20 arbitrarily chosen transformants of each pool were picked

and plasmid DNA was isolated. By restriction analysis an insert rate of > 90% was detected. The pools were also analysed by PCR with RT-PCR primers (A. Heichlinger *et al.*, unpublished) developed to detect *mreB*, *mreC*, *pbp2*, *str*, *mbi* and *sco6166* fragments. All fragments could be amplified from the pooled library (Fig. S10).

Electro-competent BTH101 cells containing one of the pUT18c derivatives (Fig. 5A) were prepared and electroporated with 1 µl of the genomic library. The transformants were grown on M63 plates (containing lactose as only carbon source) at 30°C for up to 5 days and re-tested on McConkey plates. Plasmid DNA of positive clones was isolated and introduced again into BTH101 cells containing the respective pUT18c derivative. Plasmid DNA of still positive clones was isolated and the insert was sequenced (Table S1).

Fluorescence and phase contrast microscopy

For the localization of MreB–eGFP, plasmid pPM4 (Mazza *et al.*, 2006) carrying a *mreB–egfp* fusion gene under control of its native promoter or a kanamycin resistant derivative was integrated into the Φ C31 *att*-site of M145, Δ *mreC*, Δ *pbp2* and Δ *sfr::aac*. About 10⁷ spores were plated onto MS agar and sterile coverslips were inserted in a certain angle of 45°. After 2–4 days of incubation at 30°C the coverslips were removed and mounted on slides coated with 1% agarose in PBS. Fluorescent microscopy was performed with a Zeiss DM5500B microscope, equipped with a Leica DFC360FX camera.

For the phenotypic characterization of the mutants, spores were spread onto MS agar and MS agar containing 10.3% sucrose. Sample preparation was done as described above. Images were taken with an Olympus System Microscope BX60 equipped with a F-view II camera (Olympus).

Spore size measurements

Spores of the wild-type M145 and the mutants were inoculated on MS agar plates and samples were prepared as described above. Coverslips were removed after 4 days of inoculation and observed with a Olympus System Microscope BX60. The average values (length and width) of 200 spores were measured with ANALYSIS (Olympus).

Transmission electron microscopy

Streptomyces coelicolor strains were grown on MS agar for 5 days. Spores were harvested and fixed with 2% glutaraldehyde, embedded in 2% agarose and treated with 1% OsO₄ in 0.1 M phosphate buffer on ice for 30 min. Subsequently, the samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, infiltrated by ethanol : EPON (2:1 up to 1:2 ratio) and embedded in pure EPON. Ultra-thin sections were stained with uranylacetate and leadcitrate. The samples were examined with a Phillips Tecnai electronmicroscope at 80 kV.

Analyses of heat, salt, lysozyme and vancomycin resistance

Heat resistance was analysed by incubating spores (10⁶ ml⁻¹) for 30 min at 37°C and at 60°C. Subsequently, 5 µl of the spore samples was spotted onto LB-agar and incubated for 3

days. To analyse salt resistance, serial dilutions of spore suspensions (titre 10⁸–10⁹ ml⁻¹) were plated on LB-agar with 6% and 0.5% NaCl respectively.

Resistance to cell wall damaging agents was analysed by plating spores on LB agar and directly placing filter discs containing 50 µg lysozyme or 5 µg vancomycin on top. Plates were inoculated for 2 days at 30°C before photographing.

Acknowledgements

We thank D. Ladant for providing the bacterial two-hybrid system, C. Menzel for help with TEM analyses and the DFG (SFB766) for financial support.

References

- Alyahya, S.A., Alexander, R., Costa, T., Henriques, A.O., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 1239–1244.
- Arends, S.J., Kustusch, R.J., and Weiss, D.S. (2009) ATP-binding site lesions in FtsE impair cell division. *J Bacteriol* **191**: 3772–3784.
- Bendezu, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A. (2009) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J* **28**: 193–204.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, M.J. (1987) X-L1blue, a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376–378.
- Burger, A., Sichler, K., Kelemen, G., Buttner, M., and Wohlleben, W. (2000) Identification and characterization of the *mre* gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* **263**: 1053–1060.
- Carballido-Lopez, R., and Formstone, A. (2007) Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **10**: 611–616.
- Corbin, B.D., Wang, Y., Beuria, T.K., and Margolin, W. (2007) Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *J Bacteriol* **189**: 3026–3035.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767–776.
- Defeu Soufo, H.J., and Graumann, P.L. (2004) Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep* **5**: 789–794.
- Divakaruni, A.V., Baida, C., White, C.L., and Gober, J.W. (2007) The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol* **66**: 174–188.
- Dye, N.A., Pincus, Z., Theriot, J.A., Shapiro, L., and Gitai, Z. (2005) Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18608–18613.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Lowe, J. (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39–44.
- van den Ent, F., Johnson, C.M., Persons, L., de Boer, P., and Lowe, J. (2010) Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *EMBO J* **29**: 1081–1090.
- Errington, J. (2003) Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat Cell Biol* **5**: 175–178.

- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 52–65.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., and Gober, J.W. (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **51**: 1321–1332.
- Flardh, K. (2003) Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 564–571.
- Flardh, K., and Buttner, M.J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**: 36–49.
- Formstone, A., Carballido-Lopez, R., Noiro, P., Errington, J., and Scheffers, D.J. (2008) Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**: 1812–1821.
- Garti-Levi, S., Hazan, R., Kain, J., Fujita, M., and Ben Yehuda, S. (2008) The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **69**: 1018–1028.
- Gerdes, K. (2009) RodZ, a new player in bacterial cell morphogenesis. *EMBO J* **28**: 171–172.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 1541–1546.
- Heichlinger, A., Ammelburg, M., Kleinschnitz, E.-M., Latus, A., Maldener, I., Flardh, K., Wohlleben, W., and Muth, G. (2011) The MreB-like protein Mbl of *S. coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J. Bacteriol* (in press).
- Hempel, A.M., Wang, S.B., Letek, M., Gil, J.A., and Flardh, K. (2008) Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 7579–7583.
- Hubscher, J., Luthy, L., Berger-Bachi, B., and Stutzmann, M.P. (2008) Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. *BMC Genomics* **9**: 617.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913–922.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752–5756.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**: 2233–2243.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K. (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol* **55**: 78–89.
- 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. *Mol Microbiol* **60**: 838–852.
- Mingorance, J., Tamames, J., and Vicente, M. (2004) Genomic channeling in bacterial cell division. *J Mol Recognt* **17**: 481–487.
- Molle, V., and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* **75**: 1064–1077.
- Niba, E.T., Li, G., Aoki, K., and Kitakawa, M. (2010) Characterization of *rodZ* mutants: RodZ is not absolutely required for the cell shape and motility. *FEMS Microbiol Lett* **309**: 35–42.
- Petrickova, K., and Petricek, M. (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* **149**: 1609–1621.
- Pridmore, R.D. (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**: 309–312.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaita, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., and Hopwood, D.A. (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* **21**: 77–96.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schirner, K., and Errington, J. (2009) Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **155**: 3611–3621.
- Shiomi, D., Sakai, M., and Niki, H. (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J* **27**: 3081–3091.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z., and Walker, S. (2006) Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11033–11038.
- Wachi, M., and Matsushashi, M. (1989) Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **171**: 3123–3127.
- Wang, L., Yu, Y., He, X., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K.F., and Tao, M. (2007) Role of an FtsK-like protein in genetic stability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **189**: 2310–2318.
- White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W. (2010) Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol* **76**: 616–633.
- Xie, P., Zeng, A., and Qin, Z. (2009) *cmdABCDE*, a cluster of genes encoding membrane proteins for differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Microbiol* **9**: 157.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**: 438.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

4.1.2 Die Mre- Proteine von *S. coelicolor* interagieren mit bifunktionellen PBPs

PBP2 von *S. coelicolor* besitzt nur eine Transpeptidaseaktivität; für die Synthese von Murein wird aber auch eine Transglykosylaseaktivität benötigt. Deshalb wurden BTH- Untersuchungen mit weiteren PBPs durchgeführt. Es handelt sich bei den meisten um bifunktionelle PBPs, d. h., sie besitzen eine Transpeptidase- und eine Transglykosylaseaktivität (Tabelle 4-1). SCO4132 ist wahrscheinlich eine sekretierte lytische Transglykosylase. FtsI gehört zum *dcw*- Gencluster und ist an der Zellteilung beteiligt.

Tabelle 4-1. Die Eigenschaften der PBPs, die in den BTH- Studien auf Interaktionen getestet wurden.

PBP	Klasse	Transpeptidase	Transglykosylase	mögliche Funktion
PBP2 (SCO2608)	B	✓		Elongation
FtsI (SCO2090)	B	✓		Zellteilung
SCO2897	A	✓	✓	
SCO3580	A	✓	✓	
SCO3901	A	✓	✓	
SCO4132 (CmdD)			✓	Sporulation
SCO5039	A	✓	✓	

Tabelle 4-2. Die Ergebnisse der β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen der PBPs mit den Mre- Proteinen und RodZ.

		pUT18c					
units/mg		FtsI	SCO2897	SCO3580	SCO3901	SCO4132	SCO5039
pKT25	MreB	0±7		9±13	4±12		
	MreC	645±20		62±13	488±79		
	MreD	23±10		9±6	9±9		
	PBP2	147±18		8±3	727±24		
	Sfr	52±6		6±14	54±10		
	SAM						
	RodZ	361±43		35±6	113±23		
	FtsI	258±57		18±6	268±33	6±4	
	SCO2897	-1±15		5±2	8±8		
	SCO3580	13±2		0±4	9±7		
	SCO3901	80±53		13±9	19±13		
	SCO4132	3±8		8±6	9±9		
	SCO5039			3±11	4±15		

<50 units/mg

50-150 units/mg

150-500 units/mg

500-1000 units/mg

>1000 units/mg

nicht bestimmt, da keine Interaktion auf McConkey

Es interagierten nur FtsI, SCO3901 und SCO3580 mit den Mre- Proteinen. FtsI und SCO3901 zeigten ein breites Spektrum an Interaktionen. So interagierte FtsI mit MreC, PBP2, RodZ, SCO3901 und mit sich selbst. Außerdem zeigte es eine schwache Interaktion mit Sfr. SCO3901 interagierte mit Sfr, RodZ und FtsI. Es zeigte außerdem starke Interaktionen mit MreC und PBP2. SCO3580 interagierte schwach mit MreC. Die anderen getesteten PBPs interagierten weder untereinander noch mit den Mre-

Proteinen. Eine vollständige Übersicht befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.2, Tabelle 7-4 und Tabelle 7-10).

Die Mre- Proteine und RodZ interagieren nicht nur untereinander, sondern auch mit bifunktionellen PBPs, wie z. B. SCO3901 und SCO3580. Dies liefert einen Hinweis auf einen Sporenwandsynthesekomplex bestehend aus den Mre- Proteinen, RodZ und PBPs bei *S. coelicolor*.

4.1.3 Das morphogene Membranprotein, SCO2097, ist an der Sporenwandsynthese beteiligt

Um für Streptomyceten spezifische Interaktionspartner der Mre- Proteine zu finden, wurde eine Genbank im BTH angelegt und insgesamt ca 4 Millionen Transformanten gescreent (Kapitel 4.1.1). Eine Übersicht über die Anzahl aller sequenzierten Gene (Tabelle 7-2) sowie eine ausführliche Auflistung aller mit der Genbank gefundenen Interaktionspartner (Tabelle 7-1) befinden sich im Anhang.

Zur Bestätigung der mit der Genbank gefundenen Interaktionen, wurde eine *SCO2097*-Deletionsmutante erzeugt (Seite 101). Der Genotyp dieser Mutanten wurde durch PCR mit genomischer DNA nachgewiesen (Kapitel 7.1.1.2).

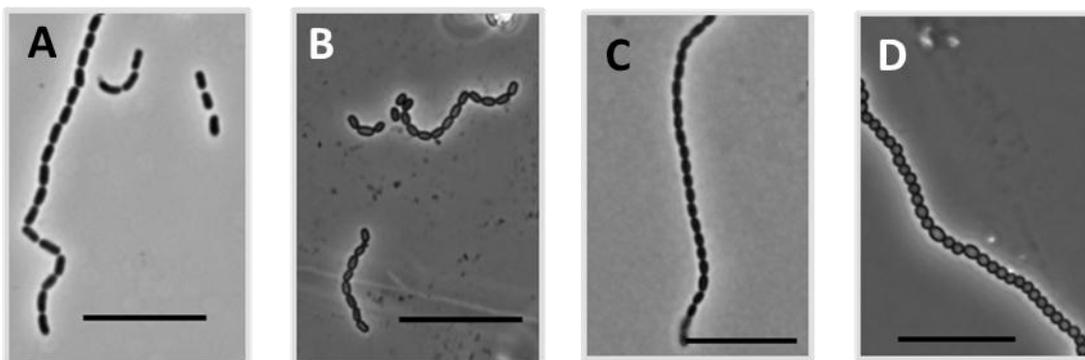


Abbildung 4-1. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Sporen von $\Delta 2097$ sehr regelmäßig geformt sind. A. $\Delta 2097$ nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar. B. Wildtyp M145 nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar. C. $\Delta 2097$ nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar mit 10,3% Saccharose. D. Wildtyp M145 nach einer Inkubationszeit von fünf Tage bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar mit 10,3% Saccharose (Balken 10 µm).

Im vegetativen Wachstum war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen, und auch die Sporen unterschieden sich auf den ersten Blick nur geringfügig vom WT M145. Die Sporen von $\Delta 2097$ waren sehr regelmäßig geformt; sie waren jedoch eckiger und etwas größer als die Wildtypsporen (Abbildung 4-1). Auf Agar- Platten, die 10,3% Saccharose enthielten, produzierte die

Mutante ebenfalls normale Sporen. Außerdem schien die Mutante dort früher als der Wildtyp zu sporulieren (Abbildung 4-2).

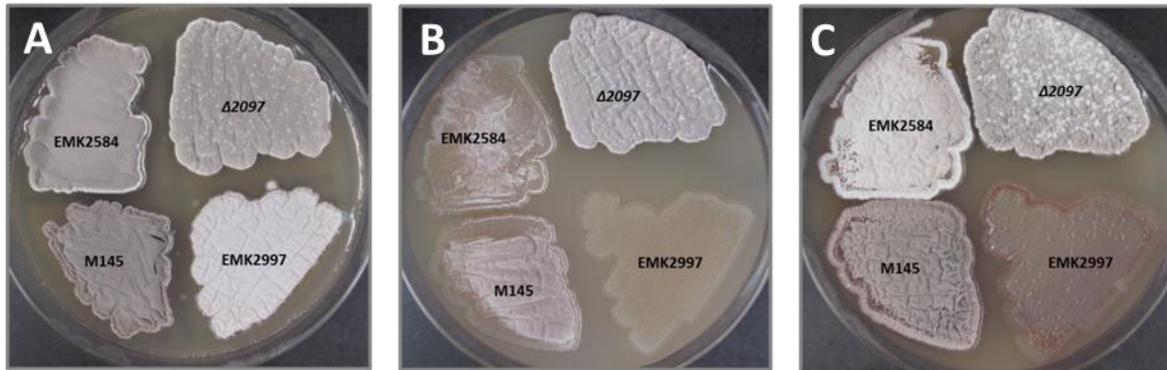


Abbildung 4-2. $\Delta 2097$ sporulierte früher als der Wildtyp. Zum Vergleich der WT M145, sowie die beiden Mutanten EMK2584 und EMK2997, die auf saccharosehaltigem Agar wesentlich langsamer, bzw. gar nicht sporulierten. A. Wachstum der Stämme für fünf Tage bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar B. Wachstum der Stämme für fünf Tage bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar mit 10,3% Saccharose C. Wachstum der Stämme für neun Tage bei 30°C auf Soja- Mannit- Agar mit 10,3% Saccharose.

$\Delta 2097$ sporulierte auch bei Wachstum auf saccharosehaltigem Soja- Mannit- Agar ohne Auffälligkeiten. Der Wildtyp hingegen und auch die beiden anderen Mutanten sporulierten auf Soja- Mannit- Agar mit 10,3% Saccharose entweder nicht oder erst deutlich später.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die diffuse, dünnere und ungleichmäßige Zellhülle der Mutantensporen sichtbar (Abbildung 4-3).

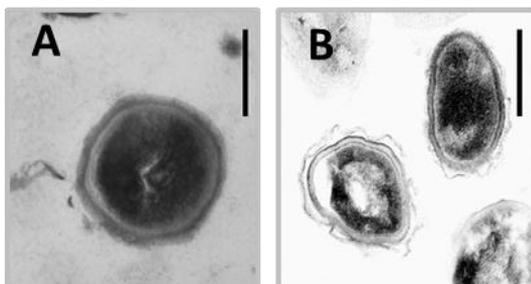


Abbildung 4-3. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der $\Delta 2097$ Sporen zeigten eine diffuse Zellhülle. A. Wildtyp M145. B. $\Delta 2097$ (Balken 400 nm).

Eine Messung der Sporengößen zeigte für $\Delta 2097$ eine deutliche Verschiebung hin zu längeren wie auch breiteren Sporen (Abbildung 4-4). Sowohl die Länge als auch die Breite der Sporen waren statistisch signifikant unterschiedlich zu der des Wildtyp. Auch zeigte die Mutante sowohl in der Länge als auch in der Breite der Sporen eine größere Streuung.

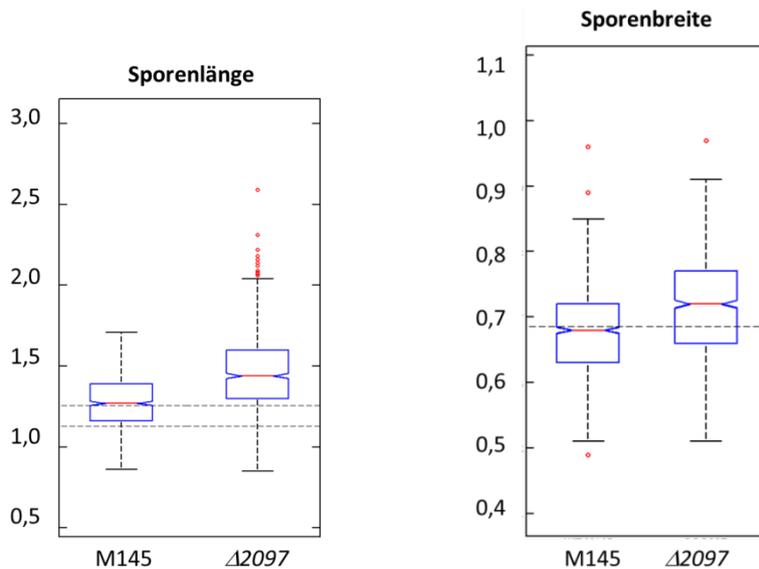


Abbildung 4-4. Die Sporen von $\Delta SCO2097$ sind signifikant länger und breiter als die Sporen des WT M145. Der Boxplot zeigt die Sporenlänge bzw. -breite von 750 ausgezählten Sporen aus Sporenketten in $[\mu\text{m}]$. In den blauen Boxen befinden sich 50% der Werte. Die Größe dieser Boxen sagt etwas aus über die Streuung der Werte. Die rote Linie innerhalb der Box gibt den Median an. Innerhalb der kleinen schwarzen horizontalen Balken liegen Werte, die weniger als drei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt sind. Die roten Kreise kennzeichnen die Ausreißer. Wenn die Einkerbungen der blauen Boxen überlappen, bedeutet es, dass die Messwerte mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht unterschiedlich sind.

Neben den morphologischen Veränderungen wies $\Delta 2097$ auch physiologische Defekte auf. In Bezug auf die Resistenz gegenüber Lysozym und Vancomycin verhielt sich $\Delta 2097$ den *mre*-Mutanten ähnlich. Der Wildtyp zeigte deutlich kleinere Hemmhöfe für Lysozym sowie Vancomycin als die Mutante. Für die mit p2097 komplementierte Mutante wurden beide Hemmhöfe wieder kleiner (Abbildung 4-5).

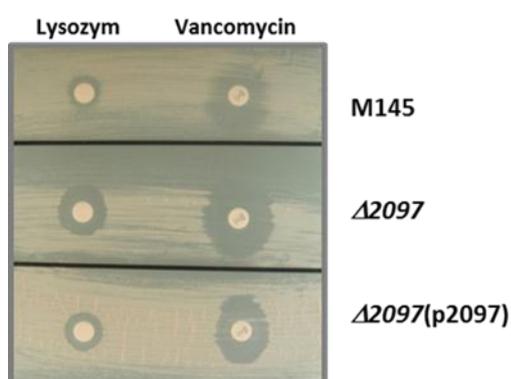


Abbildung 4-5. $\Delta 2097$ ist sensitiv gegenüber Lysozym und Vancomycin. Sporenverdünnungen von WT M145, $\Delta 2097$ und der komplementierten Mutante wurden auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und direkt anschließend Plättchen mit $50 \mu\text{g}$ Lysozym bzw. $5 \mu\text{g}$ Vancomycin aufgelegt. Die Agar-Platte wurde für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

$\Delta 2097$ war im Gegensatz zur *mreB*-Mutanten nicht sensitiv gegenüber einer erhöhten Konzentration von NaCl (Abbildung 4-6). Auch in der Empfindlichkeit gegenüber Hitze (60°C) konnte kein Unterschied zum Wildtyp gefunden werden.

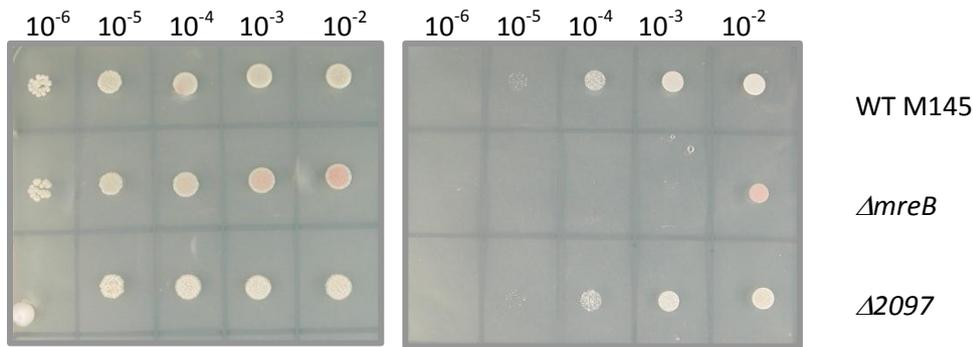


Abbildung 4-6. $\Delta 2097$ ist im Gegensatz zu $\Delta mreB$ nicht sensitiv gegenüber osmotischem Stress. Das linke Bild zeigt Tropfen von Sporenverdünnungen von WT M145, $\Delta mreB$ und $\Delta 2097$ auf LB- Agar- Platten mit 0,5% NaCl nach drei Tagen Inkubationszeit bei 30°C. Das rechte Bild zeigt Tropfen von Sporenverdünnungen von WT M145, $\Delta mreB$ und $\Delta 2097$ auf LB- Agar- Platten mit 6% NaCl nach drei Tagen Inkubationszeit bei 30°C.

Die beeinträchtigte Resistenz von $\Delta 2097$ gegenüber Vancomycin und Lysozym deutet auf eine geschädigte Sporenwand hin. Zudem belegt die veränderte Morphologie der Sporen eine Beteiligung von SCO2097 an der Sporenwandsynthese. SCO2097, welches als Interaktionspartner von MreC, MreD, Sfr und RodZ mit der Genbank identifiziert wurde, ist ein morphogenes Protein mit einer Funktion bei der Sporenwandsynthese von *S. coelicolor*.

4.1.4 Die Überexpression von Mre- Proteinen hat bei *E. coli* Auswirkungen auf die Zellform und beeinträchtigt das Wachstum von Streptomyceten

4.1.4.1 Die Überexpression von RodZ und MreC bei *E. coli* führt zu filamentartig wachsenden Zellen

Die Überexpression von MreC oder RodZ (SCO2751) aus *S. coelicolor* führte zu verlängerten filamentartig wachsenden *E. coli* Zellen (Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8).

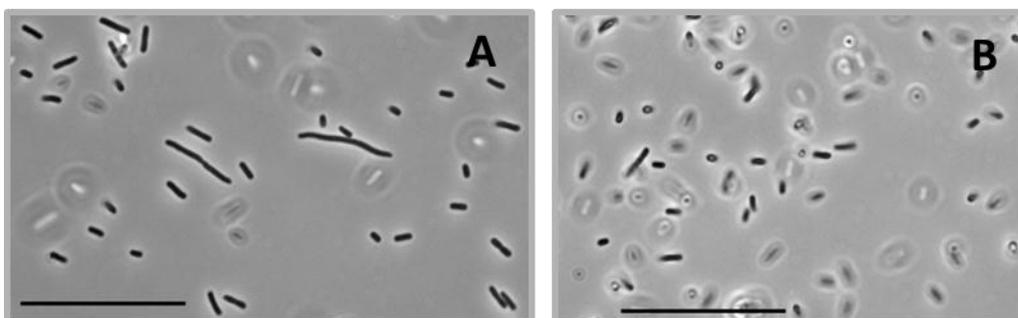


Abbildung 4-7. Die Überexpression von MreC führte zu verlängerten *E. coli*- Zellen. A. pYTMreC in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose für fünf Stunden bei 30°C induziert. B. pYT1 in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose für fünf Stunden bei 30°C induziert (Balken 20 μm).

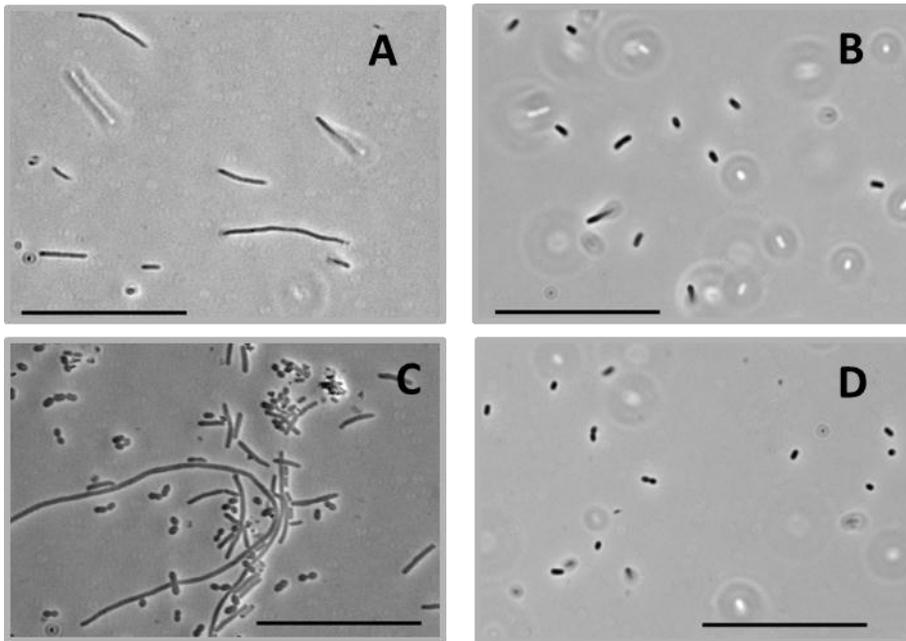


Abbildung 4-8. Die Überexpression von RodZ führte zu langen, filamentösen *E. coli*- Zellen. A. pJoeRodZ in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose für fünf Stunden bei 30°C induziert. B. pJoe2775 in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose für fünf Stunden bei 30°C induziert. C. pJoeRodZ in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose über Nacht bei 30°C induziert. D. pJoe2775 in *E. coli* BL21 mit 0,2% Rhamnose über Nacht bei 30°C induziert (Balken 20 µm).

Offensichtlich interferieren die Mre-Proteine von *S. coelicolor* mit dem lateralen Zellwandsynthesekomplex von *E. coli*, so dass eine ordnungsgemäße Zellteilung gestört ist. Dies führte zu filamentartigem Wachstum.

4.1.4.2 Die Überexpression von MreC in Streptomyceten verzögert das Wachstum

Die Auswirkungen einer Überexpression von MreB, MreC, MreD, Sfr oder SCO2097 wurden in *S. lividans* untersucht (Kapitel 7.1.1.4). Die Stämme, welche Expressionsplasmide für MreB, MreC oder SCO2097 enthielten, wuchsen nach der Induktion mit Thiostrepton auch nach mehrtägiger Inkubationszeit nicht (Kapitel 4.1.1).

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von MreC die Sporenkeimung verhindert oder das vegetative Wachstum des Substratmyzels beeinträchtigt, wurden *S. lividans* (pMreC) Sporen für 24 Stunden ohne Zusatz von Antibiotika bei 30°C im Schüttelkolben inkubiert und anschließend auf Soja-Mannit-Agar mit Thiostrepton (12,5 mg/ml) ausplattiert. Selbst nach 48 Stunden zeigte *S. lividans* (pMreC) kein Wachstum. Die Überexpression von MreC verhinderte jedoch nicht die Sporenkeimung. Der Stamm, welcher MreC überexprimiert, wuchs nur wesentlich langsamer und er sporulierte später (Abbildung 4-9).

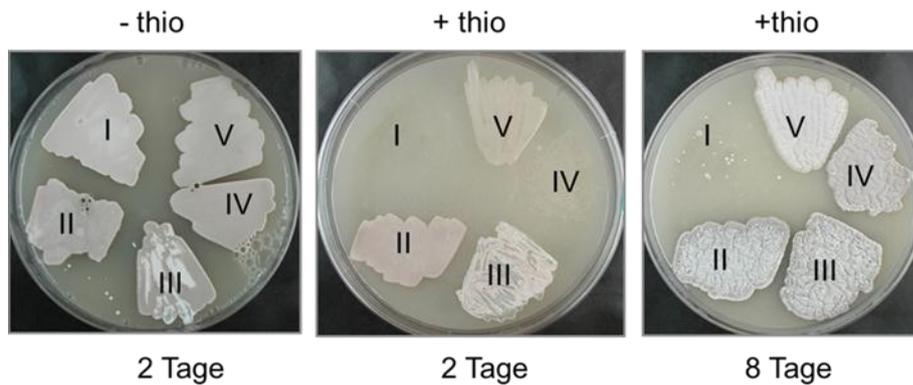


Abbildung 4-9. Die Überexpression von MreC ist nicht letal, sondern führt zu einem deutlich verzögerten Wachstum. Nach Vorinkubation von 24h in S- Medium wurden die Stämme auf Soja- Mannit- Agar- Platten ausgestrichen. I TK64 WT, II TK64 (pGM190), III TK64 (pMreD), IV TK64 (pMreC), V TK64 (pSfrMreD) (enthält sowohl Sfr als auch MreD). Die Induktion erfolgte durch Thiostrepton 12,5 mg/ml für zwei bzw. acht Tage bei 30°C.

Es sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt an einer defekten Thiostreptonresistenz des pGM190 liegt. Deshalb wurde MreC aus pMreC wieder ausgeschnitten, der Vektor religiert und mit ihm *S. lividans* transformiert. Während *S. lividans* (pMreC) auf thiostreptonhaltigem Medium ein gestörtes Wachstum zeigte, wuchs *S. lividans* mit dem 'leeren' Plasmid (bei dem das MreC wieder aus dem pMreC herausgeschnitten wurde) normal (Abbildung 4-10). Die Thiostreptonresistenz war also intakt.

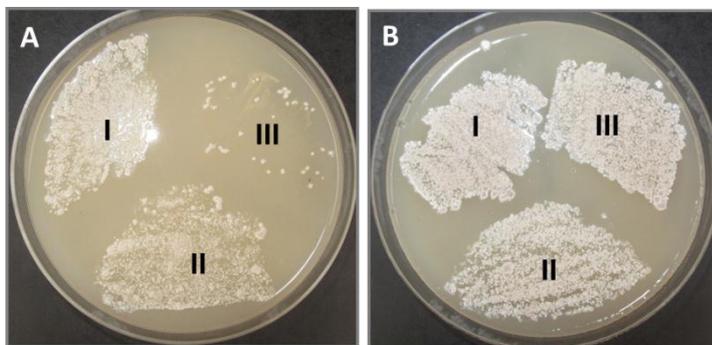


Abbildung 4-10. Die Thiostreptonresistenz ist intakt. Nach einer Vorinkubation von 24 h in Flüssigkultur (S- Medium) bei 30°C im Luftschüttler ohne Thiostrepton wurden Aliquots auf Soja- Mannit- Platten mit Thiostrepton 12,5 mg/ml (A) bzw. ohne Thiostrepton (B) ausplattiert und für 48 Stunden bei 30°C inkubiert. I *S. lividans* p(MreC) aus dem MreC wieder heraus geschnitten wurde. II *S. lividans* (pGM190) III *S. lividans* (pMreC).

Das Wachstum von *S. lividans* wurden durch die Überexpression von MreC nicht vollständig gehemmt. Auf Soja- Mannit- Agar mit Thiostrepton war nach zwei Tagen Inkubationszeit praktisch kein Wachstum sichtbar, nach acht Tagen zeigte *S. lividans* (pMreC) jedoch ein fast normales Wachstum. Dies bedeutet, dass die Überexpression von MreC nicht letal für *S. lividans* ist, sondern zu einem deutlich verzögerten Wachstum führt.

4.1.5 The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis

Die MreB Homologen Mbl und SCO6166 interagierten weder mit sich selbst, noch mit den Mre- oder anderen an der Zellwandsynthese beteiligten Proteinen (Übersicht der Interaktionen in Kapitel 7.1.2).

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Apr. 2011, p. 1533–1542
0021-9193/11/\$12.00 doi:10.1128/JB.01100-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 193, No. 7

The MreB-Like Protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Depends on MreB for Proper Localization and Contributes to Spore Wall Synthesis^{∇†}

Andrea Heichlinger,¹ Moritz Ammelburg,² Eva-Maria Kleinschnitz,¹ Annette Latus,¹ Iris Maldener,³ Klas Flärdh,⁴ Wolfgang Wohleben,¹ and Günther Muth^{1*}

¹Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany¹; Abteilung 1, Proteinevolution, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Spemannstr. 35, 72076 Tübingen, Germany²; ³Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Organismische Interaktionen, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany³; and ⁴Department of Biology, Lund University, Sölvegatan 35, 22362 Lund, Sweden⁴

Received 15 September 2010/Accepted 23 December 2010

Most bacteria with a rod-shaped morphology contain an actin-like cytoskeleton consisting of MreB polymers, which form helical spirals underneath the cytoplasmic membrane to direct peptidoglycan synthesis for the elongation of the cell wall. In contrast, MreB of *Streptomyces coelicolor* is not required for vegetative growth but has a role in sporulation. Besides MreB, *S. coelicolor* encodes two further MreB-like proteins, Mbl and SCO6166, whose function is unknown. Whereas MreB and Mbl are highly similar, SCO6166 is shorter, lacking the subdomains IB and IIB of actin-like proteins. Here, we showed that MreB and Mbl are not functionally redundant but cooperate in spore wall synthesis. Expression analysis by semiquantitative reverse transcription-PCR revealed distinct expression patterns. *mreB* and *mbl* are induced predominantly during morphological differentiation. In contrast, *SCO6166* is strongly expressed during vegetative growth but switched off during sporulation. All genes could be deleted without affecting viability. Even a $\Delta mreB \Delta mbl$ double mutant was viable. $\Delta SCO6166$ had a wild-type phenotype. $\Delta mreB$, Δmbl , and $\Delta mreB \Delta mbl$ produced swollen, prematurely germinating spores that were sensitive to various kinds of stress, suggesting a defect in spore wall integrity. During aerial mycelium formation, an Mbl-mCherry fusion protein colocalized with an MreB-enhanced green fluorescent protein (MreB-eGFP) fusion protein at the sporulation septa. Whereas MreB-eGFP localized properly in the Δmbl mutant, Mbl-mCherry localization depended on the presence of a functional MreB protein. Our results revealed that MreB and Mbl cooperate in the synthesis of the thickened spore wall, while SCO6166 has a nonessential function during vegetative growth.

The peptidoglycan (PG) layer, consisting of long glycan strands cross-linked by short peptides, is a major determinant of bacterial cell shape (51). Most species with a complex, non-spherical morphology contain the actin-like MreB protein, which belongs to the HSP70-actin-sugar kinase (ASHKA) superfamily of proteins (4, 48). MreB was shown to polymerize into a dynamic helical filament underneath the cytoplasmic membrane spanning the long axis of the cells (11, 17, 25, 30, 33). In rod-shaped bacteria, MreB is thought to interact with other proteins to position a cell wall-synthesizing complex at the lateral cell wall (16, 17, 32). The incorporation of new PG at the lateral wall results in cell elongation, thus determining rod-shaped morphology. Gram-negative bacteria seem to have a single *mreB* gene, usually in an operon with *mreC* and *mreD*. Gram-positive bacteria often encode three MreB-like proteins

that show a considerable degree of similarity (>50%). All three *mreB* homologues of *Bacillus subtilis*, *mreB*, *mbl*, and *mreBH*, have an important role in cell shape determination. Whereas *mreB* and *mbl* are essential under normal growth conditions and mutants could survive only after supplementation with 3 mM Mg²⁺ (18, 25, 27), *mreBH* inactivation was less severe (8). *B. subtilis* mutants that are depleted for or defective in a single MreB homologue differed slightly in their phenotype. *mreB* mutants were straight with an increased diameter, suggesting that MreB controls cell width. *mbl* mutants were twisted, indicating that Mbl controls the linear axis (27). *mreBH* probably regulates autolytic activity, since it interacts with the cell wall hydrolase LytE (8). Nevertheless, the three *mreB* homologues are able to partially complement the defects of the single mutants when overexpressed (27, 44). Also, the three MreB homologues colocalize to the same helical structure in the cell (7, 8). From the phenotype of the mutants and the localization pattern, it was concluded that the three MreB homologues in particular were required to maintain growth and cell shape under stress conditions (27). Besides positioning the lateral wall-synthesizing complex, the MreB cytoskeleton seems to be involved in many other cellular processes, such as the positioning of the DNA replication machinery for proper

* Corresponding author. Mailing address: Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany. Phone: 4970712974637. Fax: 497071295979. E-mail: gmuth@biotech.uni-tuebingen.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jbb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 21 January 2011.

TABLE 1. Strains and plasmids

Strain/plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>E. coli</i> X11 blue	F ⁺ ::Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^r <i>supE44</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	5
<i>E. coli</i> ET 12567	GM2929 <i>zji-202</i> , mutant <i>hsdM</i> , mutant <i>hsdR</i>	36
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁻ <i>cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1</i> (Str ^r) <i>hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	26
<i>E. coli</i> BW 25113/pIJ790	Δ(<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>:rmB-4</i>) <i>lacI</i> p-4000(<i>lacI</i> ^r) λ ⁻¹ <i>rpoS369(Am) rph-1</i> Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsd514</i> ; pIJ790[<i>oriR101</i>] [<i>repA101(ts)</i>] <i>araBp-gam-beta-exo</i>	21
<i>S. coelicolor</i> M145	Prototrophic, SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	29
Δ <i>mreB</i>	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>)) 7
Δ <i>mreB</i> ::pPM6 [mreB-IFDc]	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>) complemented by the integration of pPM6, <i>aac</i>	37
Δ <i>mbl</i>	<i>mbl</i> replacement mutant of M145	Present study
Δ <i>mreB</i> Δ <i>mbl</i>	<i>mreB</i> replacement mutant of M145, <i>mbl</i> replaced by an <i>aac</i> cassette	Present study
Δ <i>sco6166</i>	<i>sco6166</i> replacement mutant of M145	Present study
Δ <i>pbp2</i>	<i>pbp2</i> replacement mutant of M145	Kleinschnitz et al., unpublished
Δ <i>mreB</i> ::pPM4 [SCPM6]	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>), complemented by the integration of pPM4, <i>aac</i>	37
Δ <i>pbp2</i> ::pPM4	<i>pbp2</i> replacement mutant of M145 with integration of pPM4, <i>aac</i>	Present study
Δ <i>mbl</i> ::pPM4	<i>mbl</i> replacement mutant of M145 with integration of pPM4, <i>aac</i>	Present study
M145::pAH5	pK18- <i>mbl-mcherry</i> integrated into <i>mbl</i> of M145, <i>aphII</i>	Present study
Δ <i>mreB</i> ::pAH5	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>), with pAH5 integrated into <i>mbl</i> , <i>aphII</i>	Present study
Δ <i>pbp2</i> ::pAH5	<i>pbp2</i> replacement mutant of M145 with integration of pAH5, <i>aphII</i>	Present study
pK18	<i>aphII</i> , <i>lacZα</i>	40
C24	<i>aphII</i> , <i>S. coelicolor</i> chromosomal fragment encoding SCO2431-SCO2461	41
pTST101	<i>bla</i> , <i>malE-egfp</i> fusion	J. Altenbuchner, personal communication
pTST101-mcherry	<i>bla</i> , <i>malE-mcherry</i> fusion	G. Muth, unpublished
pPM4	pSET152 derivative, <i>mreB-egfp</i> fusion	37
pUZ8002	<i>aphII</i> , RP4 transfer region	29
pCP20	[<i>repA101(ts)</i>], <i>bla</i> , <i>frt</i>	9
pIJ773	<i>bla</i> , <i>aac</i> , <i>oriT</i>	21
pKT25	<i>aph</i> , <i>cya-T25</i>	26
pUT18c	<i>bla</i> , <i>cya-T18</i>	26
pKO6166	pK18 derivative, <i>aphII</i> , <i>sco6166</i> deletion vector	Present study
pAH4	pK18, <i>aphII</i> , <i>mbl-egfp</i> fusion	Present study
pAH5	pK18, <i>aphII</i> , <i>mbl-mcherry</i> fusion	Present study
M145::pAH5-pPM4	pAH5 integrated into <i>mbl</i> of M145, integration of pPM4, <i>aphII</i> , <i>aac</i>	Present study
pGM202-Mbl	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{apA} encoding a Mbl-His ₆ fusion protein	Present study

chromosome segregation during cell division and localizing other proteins to distinct sites (12, 13, 14, 28, 34).

In contrast to the rod-shaped bacteria that depend on MreB proteins to control their cell wall assembly, many Gram-positive bacteria of the phylum *Actinobacteria* grow in a different way by building their cell walls at the cell poles (10). Corynebacteria and mycobacteria do not contain *mreB* genes, yet they acquire rod shape by polarized growth, and this depends on the coiled-coil protein DivIVA (35). Similarly, streptomycetes do not divide by binary fission and grow by apical tip extension to form a multiply branching mycelium (22).

Against this background, it was a surprise that an *mreB* cluster is present in *S. coelicolor* (6). It was later shown that *mreB* was dispensable for the apical growth of vegetative hyphae, and loss affected the assembly of the spore wall (37). However, like *B. subtilis*, *S. coelicolor* encodes three MreB homologous proteins, MreB (SCO2611), Mbl (SCO2451), and SCO6166, and it could not be excluded that the dispensability of MreB for vegetative growth was due to some redundancy among these proteins. In this work, we characterized the role of the three *S. coelicolor* MreB-like proteins. We analyzed their expression profile, generated mutants, and localized Mbl and

MreB fusion proteins in the wild-type and different mutant backgrounds. We report that the three MreB homologues of *S. coelicolor* have clearly different functions. Whereas MreB and Mbl cooperate in spore wall synthesis, SCO6166 has a nonessential function during vegetative growth.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *S. coelicolor* strains were cultivated on mannitol soya flour (MS) agar plates or in S medium (29). The cultivation of strains and procedures for DNA manipulation were performed as previously described for *Escherichia coli* (43) and *S. coelicolor* (29). Oligonucleotides used for reverse transcription-PCR (RT-PCR) and subcloning are given in Tables 2 and 3, respectively.

Inactivation of *mbl* and *sco6166*. Mbl was deleted by the PCR targeting (21) of cosmid C24 (41). Following the λ red-mediated replacement of *mbl* by a PCR-amplified *aac(3)IV* cassette (primer pair mblredup/mblredrev), the resulting cosmid, C24-aac, was introduced into M145 by intergeneric conjugation, and an *mbl* replacement mutant, Δ*mbl-aac* (double crossover), was selected.

Subsequently, the *aac(3)IV* cassette was deleted from cosmid C24-aac by FLP recombination target (FRT) recombination using *E. coli* BT340 (9), and the resulting cosmid was introduced into the *S. coelicolor* mutant Δ*mbl-aac*. Finally, apramycin-sensitive Δ*mbl* colonies were selected in which *mbl* was replaced by a remaining 81-bp scar sequence. The Δ*mreB* Δ*mbl* double mutant was generated by introducing cosmid C24-aac in the Δ*mreB* mutant (37) and screening for

TABLE 2. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
RThrdBleft3	GGTCGAGGTCATCAACAAGC	205
RThrdBrig3	CTCGATGAGGTCACCGAACT	
RT-mreBf	GGGGAACCAATGTCGTTCA	174
RT-mreBr	CCGATCATCTTCTTCGCTTC	
RT-mblleft4	CATGCTGCGTTCATCTGCT	172
RT-mblright4	GATGAGCGTGTGCGACGAGT	
RT-6166f	ATCTCACGGAGGTGGTGCT	140
RT-6166r	AGCATCGAGGTCGTCATGT	

apramycin-resistant and kanamycin-sensitive colonies. Note that the $\Delta mreB$ Δmbl mutant still contains the *aac(3)IV* gene.

To delete *scob166*, a 1.6-kb upstream fragment (primer pair Ecoupfw/uprchBgBc), including the start codon of *scob166*, and a 1.6-kb downstream fragment (primer pair loupchBgBc/HloreV), including the *scob166* stop codon, were amplified by PCR and cloned into pK18, yielding pKO166. After the transformation of M145 and the integration of the deletion vector pKO166 by a single crossover (kanamycin resistant), a *scob166* mutant was isolated by selecting for the second crossover (kanamycin sensitive). Correct gene replacement was confirmed by PCR analyses and Southern blotting. Hybridization probes were amplified with primers CHSTeup2/HKHrev2 and loupchBgBc/HloreV.

Construction of *gfp* and *mcherry* fusions. To construct a C-terminal fusion with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) or mCherry protein, *mbl* and *scob166* genes were amplified using the primers mblupNde/mblloBg-gfp and 6166upNde/6166loBg, respectively, cut with NdeI and BglII, and fused to the *egfp* or *mcherry* gene in plasmids pTST101 (J. Altenbuchner, personal communication) or pTST101mCherry (G. Muth, unpublished data) cut with NdeI and BamHI. The resulting fusion genes were cut from pTST101 and cloned in the nonreplicative vector pK18, generating pK18-Mbl-eGFP (pAH4), pK18-Mbl-mCherry (pAH5), and pK18-6166-mCherry. The plasmids then were integrated into chromosomal *mbl* or *scob166* genes of *S. coelicolor* M145 via homologous recombination.

For colocalization experiments, the plasmid pPM4 (37), carrying an *mreB-egfp* fusion gene, was integrated into the $\Phi C31$ *att* site of M145:pAH5.

RNA extraction. Total RNA was isolated from wild-type M145 grown for 48 and 72 h on LB agar or 48, 72, and 96 h on MS agar overlaid with cellophane discs. Cells were harvested, resuspended in RNAprotect bacteria reagent (Qiagen), centrifuged, and resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer. Cell disruption was performed with glass beads (0.45 to 0.5 mm) and a Precellys homogenizer from Peqlab (for substrate mycelium, 2× 6,500 rpm for 30 s; for aerial mycelium and spores, 4× 6,500 rpm for 30 s). RNA was isolated with an RNeasy kit from Qiagen as described previously (46). The RNA samples were resuspended in H₂O and quantified spectrophotometrically at 260 nm with a Nanodrop photometer (Peqlab). All RNA isolates had an optical density at 260 nm (OD₂₆₀)/OD₂₈₀ ratio between 1.8 and 2.0, indicating clean RNA isolates. The RNA quality also was checked by 1.0% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. To exclude the contamination of the RNA with DNA, a control PCR was done with primers for the housekeeping gene *hndB* (RNA polymerase principal sigma factor HrdB; SCO5820).

Semiquantitative RT-PCR analysis. A two-step semiquantitative RT-PCR method was used to measure gene expression during the morphological differentiation of M145. RNA was isolated from two independently grown cultures, and RT-PCR was repeated twice. cDNA synthesis was performed as described in reference 46 using 3 μ g of RNA. Sixty ng of cDNA was used for RT-PCR. The housekeeping gene *hndB* was used as an internal control. The optimal PCR annealing temperature of all primers was 62°C. Primer sequences are listed in Table 2. PCRs were performed with the Bio-Rad MJ mini personal thermal cycler using 60 ng of cDNA, 400 nM each primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1× polymerase buffer (Qiagen), and 1 U *Taq* polymerase (Qiagen) in a 25- μ l volume. All reactions were done with the same program: 95°C for 2 min, and then 28 cycles of 95°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 30 s, followed by an additional 7-min extension step at 72°C. The RT-PCR samples were loaded on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

Bacterial two-hybrid analyses. To detect protein interactions, respective *S. coelicolor* genes were amplified with primers (listed in Table 3) containing XbaI and KpnI sites. Subsequently, PCR fragments were cloned as XbaI/KpnI fragments into plasmids pKT25, pUT18, and pUT18c to generate translational fusions

TABLE 3. Oligonucleotides used for cloning experiments

Primer	Sequence ^a (5'→3')
Ecoupfw	AAGAATCTGATCTCCTGCGCCTG
uprchBgBc	TCATGATCAGATCTCACGGTCATCGTCCG
loupchBgBc	GTGAGATCTGATCATGATCCGGTACCGGG
HloreV	GGAAAGCTTGACAGCGGTGAGAGAC
mblupNde	GGCATATGACCGCCAGTACTG
mblloBg-gfp	GGAGATCTGTCGGAGTCCGGCGTG
6166upNde	GGCATATGACCGTGTCTCGGG
6166loBg	CCAGATCTGTGCGGGTGGGTGTC
mblredup	GGCCCCGACGGTCCGCGCTCTCGGGAG GATTCGCCATG GATATCATTCGGGGGA TCCGTCGACC
mblredrev	TGCGTCAGGCTTCCCCGGTCCGCCCGCGG CGGCGGATCA GATATCTGTAGGCTGGA GCTGCTTC
loupchBgBc	GTGAGATCTGATCATGATCCGGTACCGGG
HloreV	GGAAAGCTTGACAGCGGTGAGAGAC
CHSTeup2	AGGATTCGCCATGGAAATCCACGCCGACT CCGACTG
HKHrev2	CCAAGCTTGGCGGTTCGGGTGCAGG
mreBXba	AATCTAGAGAACGACATTGAGTTC
mreBK	TCGGTACCGATCTACGGGGCGGAGGC
mblXba	AATCTAGAGTATTGGCAGTACTG
mblK	CTGGTACCCAGTCCGGAGTCCGGCGTG
6166Xba	ACTCTAGAGACCGGTTCGGGGCGG
6166K	AAGGTACCCAGTCCGGGTGGGTGTC
rodZXba	ACTCTAGAGTCCAACGGCAATCC
rodZK	TTGGTACCCATCCGACCTCGGGGT
mreCXba	ACTCTAGAGAGGGGACAGAAAGAG
mreCK	AAGGTACCACGGTCCGGGTGCTC
mreDXba	ACTCTAGAGCGCGTCAACCGGATC
mreDK	AAGGTACCACAGCCGCTTGACCC
pbp2Xba	ACTCTAGAGACCAACATCCCGGAC
pbp2K	AAGGTACCATACCGGTGCCCTCC
sfrXba	ACTCTAGAGACCGGCAACAGCTTC
sfrK	AAGGTACCACGGGACATCGGTCT

^a Restriction sites are underlined.

sions with the catalytic domains of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (26). The *E. coli* *cya* mutant BTH101 was cotransformed with pUT18c and pKT25 derivatives and spotted on 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) plates. The ability of cotransformants to metabolize X-Gal, resulting in blue color, is based on a functional adenylate cyclase due to the interaction of the fusion proteins.

Phase-contrast microscopy. For light and fluorescence microscopy of substrate mycelium, aerial mycelium and spore chains cultures were plated on MS agar, and sterile coverslips were inserted at a 45° angle into the agar. Coverslips were removed after 2 to 4 days of incubation at 30°C and mounted on slides coated with phosphate-buffered saline (PBS) with 1% agarose. For the phenotypic characterization of the mutants, pictures were taken with an Olympus system microscope BX60 equipped with an F-view II camera (Olympus). Fluorescent microscopy was done with a Zeiss DM5500B microscope equipped with a Leica DFC360FX camera.

For colocalization studies, the samples were viewed using a Zeiss Axio Imager.Z1 microscope equipped with X-Cite 120 illumination (EXFO Photonic Solution, Inc.), and images were captured and processed using a 9100-02 electron multiplier charge-coupled device camera (Hamamatsu Photonics) and Volocity 3DM software (Im-provision).

Spore size measurements. The wild-type M145 and the mutants Δmbl , $\Delta mreB$ Δmbl , and $\Delta scob166$ were inoculated on MS agar. Coverslips were inserted and removed after 4 days of inoculation and observed with an Olympus system BX60 microscope. Average values (length and width, in μ m) of 200 spores of M145, Δmbl , $\Delta mreB$, $\Delta mreB$ Δmbl , $\Delta scob166$, and Δmbl (pGM202-Mbl) were measured with AnalySIS software (Olympus).

Transmission electron microscopy. *S. coelicolor* strains were grown on MS agar for 5 days. Spores were harvested and fixed with 2% glutaraldehyde, embedded in 2% agarose, and treated with 1% OsO₄ in 0.1 M phosphate buffer on ice for 30 min. Subsequently, the samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, infiltrated by ethanol:EPON (2:1 to 1:2 ratio), and

embedded in pure EPON. Ultrathin sections were stained with uranylacetate and lead citrate. The samples were examined with a Phillips Tecnai electron microscope at 80 kV.

Analyses of heat, salt, lysozyme, and vancomycin resistance. Heat resistance was assayed by incubating spores (10^9 /ml) for 30 min at 30 and 60°C. Subsequently, 5 μ l of the spore samples was spotted onto LB agar and incubated for 3 days at 30°C. To analyze salt resistance, serial dilutions (H_2O) of spore suspensions (titer, 10^8 to 10^9 /ml) were plated on LB agar with 6 and 0.5% NaCl, respectively. Plates were cultivated for 2 days at 30°C. The survival rate was calculated as the percentage of the colony titer on plates with 6% NaCl divided by the titer on plates with 0.5% NaCl. Resistance to cell wall-damaging agents was assayed by plating spores (10^5) of the different mutants and the wild type on LB agar and applying filter discs containing 50 μ g lysozyme or 5 μ g vancomycin. Plates were inoculated for 2 days at 30°C before being photographed.

Bioinformatic analyses. HHpred (45), a remote homology detection method based on the comparison of profile-hidden Markov models, was used to search the Protein Data Bank (PDB) (3) for homologues of known structure. Searches with MreB and Mbl from *S. coelicolor* retrieved the rod shape-determining protein MreB from *T. maritima* (PDB accession no. 1jce) (48) as the closest homolog of known structure. For the MreB-like protein SCO6166, the ethanol utilization protein EutJ from *Carboxydotherrus hydrogeniformans* (3h1q) had the highest score.

Homology models of the three MreB-like proteins of *S. coelicolor* were generated by Modeller (42) using HHpred alignments to the best hit as a template. The models were superimposed interactively in Swiss-PDB Viewer (20). Molecular structures were rendered in PyMol (www.pymol.org).

RESULTS

***S. coelicolor* has three *mreB*-like genes.** *S. coelicolor* contains three genes encoding MreB-like proteins. *mreB* is located in a cluster with the other rod shape-determining genes *mreC*, *mreD*, *ppp2*, and *sfr* (6). The second *mreB* homologue, *mbl*, lies between two genes encoding protein kinases. MreB and Mbl have sizes of 36.5 and 37.5 kDa, respectively, show a similarity of 42% (identical amino acids), and can be aligned over the whole length (Fig. 1A). In contrast, the third MreB-like protein, SCO6166, is shorter and has a molecular size of 28.7 kDa. *sco6166* is translationally coupled to *sco6165*, encoding a 121-amino-acid (aa) protein homologous to the DnaK suppressor DksA of *E. coli* and TR: O83134 (EMBL:AE001194) from *Treponema pallidum*. The modeling of SCO6166 on the template of *Thermotoga maritima* MreB showed that SCO6166 lacks the subdomains IB and IIB of actin-like proteins (Fig. 1B). Whereas homologues of MreB and Mbl are present in all streptomycetes, some strains, such as *S. avermitilis* (NC_003155.4) or *S. viridochromogenes* (NZ_ACEZ00000000), do not contain a homologue of SCO6166, indicating a nonessential function for SCO6166.

The three *mreB*-like genes have different expression profiles. Previous S1 mapping experiments identified three promoters upstream of *mreB*, one strongly induced during the morphological differentiation of *S. coelicolor* (6). To characterize the expression profile of the other *mreB* homologues, we performed semiquantitative RT-PCR experiments with RNA isolated from surface-grown cultures at different time points (Fig. 2). After 48 and 72 h on LB agar, when only substrate mycelium was formed, *mreB* was expressed but a *mbl* transcript could not be detected; *sco6166* showed the strongest expression. This was in agreement with detailed microarray data from *S. coelicolor* liquid cultures (38) showing the strong expression of *sco6166*, intermediate expression of *mreB*, and only very weak expression of *mbl* during a period of 40 h (K. Nieselt, personal communication). After 48 h on MS agar, when aerial mycelium already was developed, *mreB* transcription increased

and *mbl* transcription was detectable at a low level. In contrast, *sco6166* expression strongly decreased (Fig. 2). After 72 and 96 h on MS agar, when spore chains have been formed in the aerial mycelium, the transcription of both *mreB* and *mbl* further increased, while *sco6166* expression was no longer detectable. The expression profile suggested a role for *mreB* and *mbl* in sporulation, whereas the third *mreB*-like gene, *sco6166*, seems to have a function in vegetatively growing mycelium.

A $\Delta mreB \Delta mbl$ double mutant is viable. In contrast to *B. subtilis*, where *mreB* and *mbl* are essential under normal growth conditions and mutants require high concentrations of Mg^{2+} for survival (18, 25), the inactivation of *mreB* in *S. coelicolor* was tolerated (37). The phenotype of the $\Delta mreB$ (*mreB-IFD*) mutant suggested a defect in spore wall synthesis. To analyze whether the other *mreB*-like proteins also are involved in spore wall synthesis, we inactivated *mbl* and *sco6166*. *mbl* was replaced by PCR targeting as described in Materials and Methods and in Fig. S1 in the supplemental material, while *sco6166* was deleted from the chromosome by homologous recombination using a nonreplicative deletion vector (see Fig S2). We also deleted *mbl* in the $\Delta mreB$ mutant (37), generating a $\Delta mreB \Delta mbl$ double mutant. All mutants were isolated readily, demonstrating that none of the *mreB* homologues had an essential role for viability. Even the growth of the $\Delta mreB \Delta mbl$ double mutant was not affected under standard growth conditions.

Δmbl and $\Delta mreB \Delta mbl$ had phenotypes very similar to that of the $\Delta mreB$ mutant, with swollen, prematurely germinating spores (Fig. 3). Whereas *S. coelicolor* M145 spores had a size of 1.28 by 0.71 μ m, Δmbl and $\Delta mbl \Delta mreB$ spores were 1.72 by 0.95 and 1.7 by 1.15 μ m, respectively (Table 4). The mutant phenotype was more severe when the mutants were grown on MS agar supplemented with 10.3% sucrose, as also reported for *ftsI* and *ftsW* mutants (2). Under these conditions, $\Delta mreB$, Δmbl , or $\Delta mreB \Delta mbl$ did not sporulate (see Fig. S3 in the supplemental material). Microscopic analyses showed that large areas of the aerial mycelium lysed, and aberrant spore-like particles were formed (Fig. 3B).

By immunogold labeling, MreB has been localized to the inner spore wall, suggesting a role in spore wall synthesis (37). This was confirmed by electron microscopic images showing aberrant $\Delta mreB$ spores whose spore wall integrity was affected. To demonstrate the involvement of Mbl in spore wall synthesis, we performed electron microscopic studies. These images clearly revealed a distorted spore wall (see Fig. S4 in the supplemental material). Whereas M145 formed uniform round or ellipsoid spores with a confined outer layer, the Δmbl spores were more irregular with a very diffuse outer layer (see Fig. S4 in the supplemental material).

Furthermore, the mutant spores were impaired in their resistance to moderate heat (Fig. 4A), 5% SDS (data not shown), and salt stress (Fig. 4C). Whereas about 100% of M145 spores were able to germinate on LB plus 6% NaCl, only 0.001% of $\Delta mreB$, 0.003% of Δmbl , and 0.02% of $\Delta mreB \Delta mbl$ spores were able to form colonies (mean values from three independent experiments). In contrast, $\Delta sco6166$ spores were almost as resistant (89.4% survival) to salt stress as the wild type (Fig. 4C). The transformation of the Δmbl mutant with plasmid pGM202-Mbl, which contains an *mbl-his6* fusion gene under the control of the thiostrepton-inducible *tipA* promoter (Table

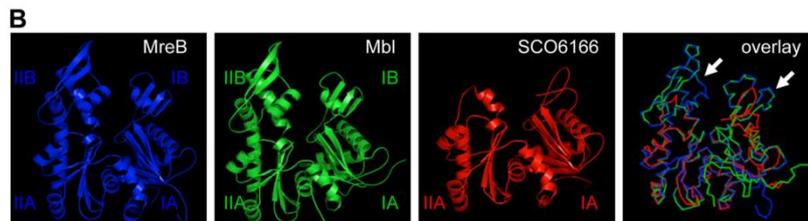
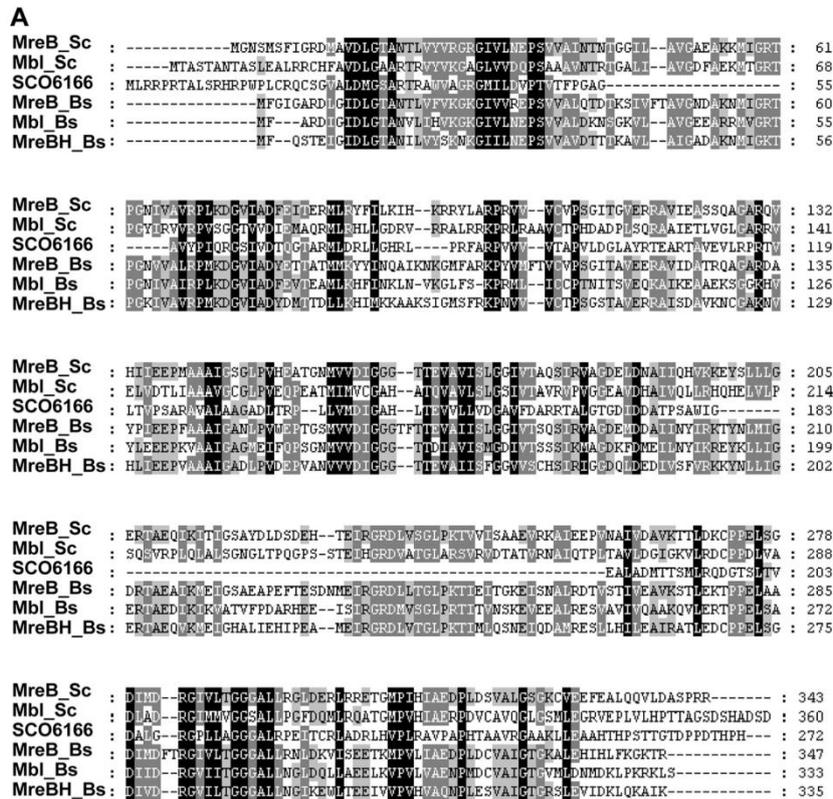


FIG. 1. Similarity of the three *S. coelicolor* MreB homologues. The MreB homologues of *S. coelicolor* and *B. subtilis* were compared by ClustalW sequence alignment (A) and homology modeling (B) using MreB of *Thermotoga maritima* as a template. MreB and Mbl are highly similar to the *B. subtilis* MreB homologues and have an identical structure; SCO6166 lacks subdomains IB and IIB (arrows). The colors in the superposition (lower right panel) correspond to the colors chosen for the individual homology models. MreB is given in blue, Mbl in green, and SCO6166 in red.

1), complemented spore size (Table 4) and heat sensitivity (Fig. 4A), demonstrating that the mutant phenotype was caused solely by *mbl* inactivation.

Since heat and detergent sensitivity is a hallmark for a defective spore wall (37), we studied the effect of lysozyme and vancomycin. Spores of M145 and the mutants were plated onto LB agar, and filter discs soaked with lysozyme or vancomycin were placed on the plates. After incubation at 30°C for 24 h,

only very small inhibition zones were formed on M145, Δ *SCO6166*, and the Δ *mbl* mutant. However, the Δ *mreB* mutant and the Δ *mreB* Δ *mbl* mutant were much more sensitive, and large inhibition zones were observed (Fig. 4B). If the agar plates were incubated overnight to allow spore germination before the use of the lysozyme or vancomycin discs, no inhibition zones were formed (data not shown), demonstrating that the germinating spores were sensitive but substrate mycelium was resistant.

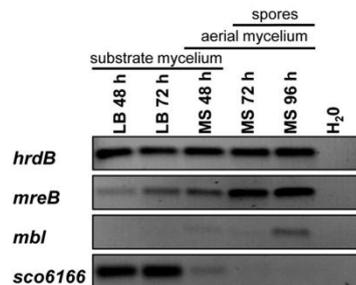


FIG. 2. Transcriptional analysis of the *mreB*-like genes of *S. coelicolor* by semiquantitative RT-PCR. Cultures of *S. coelicolor* M145 were grown on cellophane discs on LB agar or MS agar for different time periods. The stage of morphological differentiation is indicated for the different time points. Following RNA isolation and cDNA synthesis, the amounts of transcripts were compared by PCR. The expression of *hrdB* served as an internal control. The expression of *mreB* and *mbl* increased during morphological differentiation. In contrast, *sco6166* is highly expressed in vegetative mycelia but no longer is transcribed after the onset of sporulation.

These mutant phenotypes indicated that *mreB* and *mbl* are involved in spore wall synthesis, with a less important role for *mbl*. In contrast, the Δ *sco6166* mutant behaved like the parent strain M145 in all aspects.

Only MreB, but not Mbl or SCO6166, interacts with RodZ. RodZ, a remarkable multidomain protein that localizes in a helical manner, recently was shown to interact with MreB, probably linking the cytosolic MreB filaments with the membrane-localized lateral wall-synthesizing machinery (1, 49). To analyze the protein-protein interaction of the MreB-like proteins, we used the bacterial two-hybrid system based on the reconstitution of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (26). The three *S. coelicolor* *mreB*-like genes, the *rodZ* homologue *sco5751*, and the other genes of the *mre* cluster (*mreC*, *mreD*, *php2*, and *sfr*) were fused to the catalytic domains of *cya* and analyzed in cotransformation experiments of the *cya* mutant BTH101 for protein-protein interaction. The MreB homologues were poor interaction partners in these two-hybrid assays, and they did not show the self interaction that would be expected for actin-like proteins. MreB also did not interact with any of the other proteins encoded by the *mre* cluster (data not shown). However, MreB showed a strong interaction with the scaffold protein RodZ (SCO5751). Neither Mbl nor SCO6166 interacted with RodZ or any of the tested fusion proteins (Fig. 5).

MreB and Mbl colocalize during sporulation. An MreB-eGFP fusion protein showed a dynamic localization pattern during morphological differentiation: disperse distribution in substrate mycelium, localization to the sporulation septa in aerial mycelium, and finally the formation of a shell at the inner spore wall (37). To address whether Mbl and SCO6166 had a similar localization pattern, we generated C-terminal fusions of Mbl and SCO6166 with either eGFP or mCherry. The fusion genes were integrated into the chromosome at the original gene locus via homologous recombination. No fluorescence of Mbl-eGFP or Mbl-mCherry was observed in substrate mycelium, probably reflecting the very low *mbl* expres-

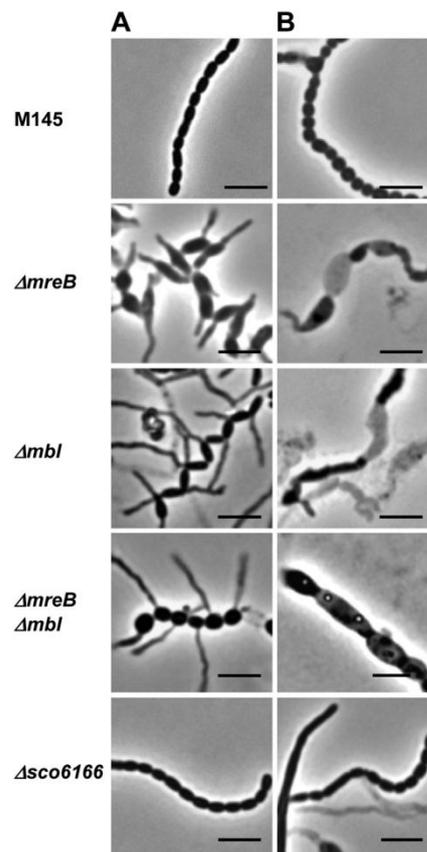


FIG. 3. Aberrant spore phenotype of *S. coelicolor* mutants defective in *mreB*-like genes. Phase-contrast microscopy of spore chains from strains grown for 4 days on MS agar (A) and MS agar plus 10.3% sucrose (B), respectively. Whereas the vegetative mycelium was not affected, Δ *mreB*, Δ *mbl*, and Δ *mreB* Δ *mbl* formed swollen spores (sizes are given in Table 4) that frequently germinate prematurely. In contrast, Δ *sco6166* spores had a wild-type appearance. On MS agar containing 10.3% sucrose, large areas of the aerial mycelium of the Δ *mreB*, Δ *mbl*, and Δ *mreB* Δ *mbl* mutants were lysed, and aberrant spore-like particles were formed (B). Bar, 4 μ m.

sion, as demonstrated by RT-PCR. However, in aerial mycelium, Mbl localized to the sporulation septa, like MreB. In young spores, Mbl was found underneath the membrane (Fig. 6A). To prove that Mbl really localizes to the same sites as MreB, we performed colocalization studies by integrating plasmid pPM4 (37), which encodes the MreB-eGFP fusion protein, into the Φ C31 attachment site of M145::pAH5. Mbl-mCherry and MreB-eGFP always colocalized (Fig. 6B).

In contrast, SCO6166-mCherry showed a dispersed fluorescence of the total substrate mycelium without distinct localization patterns (see Fig. S5 in the supplemental material).

TABLE 4. Spore dimensions^a of *S. coelicolor* and mutants deficient in *mreB* homologous genes

Strain	Length (μm)	Width (μm)
M145	1.28 \pm 0.20	0.71 \pm 0.07
M145 (pGM190)	1.20 \pm 0.15	0.64 \pm 0.06
ΔmreB [<i>mreB</i> -IFD] ^b	1.64 \pm 0.24	1.16 \pm 0.21
ΔmreB ::pPM6 [IFDc] ^b	1.23 \pm 0.27	0.84 \pm 0.14
Δmbl	1.72 \pm 0.38	0.95 \pm 0.16
Δmbl (pGM202-Mbl)	1.31 \pm 0.18	0.67 \pm 0.08
ΔmreB Δmbl	1.70 \pm 0.33	1.15 \pm 0.11
$\Delta\text{sco6166}$	1.31 \pm 0.25	0.78 \pm 0.08

^a $n = 200$.^b From reference 38.

Mbl requires MreB for proper localization. To analyze whether MreB and Mbl depend on each other for proper localization, fluorescence generated by MreB-eGFP (pPM4) and Mbl-mCherry (pAH5) (Table 1) was analyzed in a ΔmreB or Δmbl background. Mutant Δpbp2 (30a) was used as a control, since it showed the same morphological defects, swollen and prematurely germinating spores, as the ΔmreB or Δmbl mutant. In Δmbl ::pPM4, ΔmreB ::pPM4, and Δpbp2 ::pPM4 strains, the characteristic ladder-like fluorescence structure at the sporulation septa of the aerial mycelium (Fig. 7A) and around the spore membrane (see Fig. S6 in the supplemental material) was observed, demonstrating that MreB-eGFP was able to localize independently of Mbl or PBP2.

Whereas Mbl-mCherry localized properly in the Δpbp2 ::pAH5 strain, no clear Mbl-mCherry foci were observed in the ΔmreB mutant (Fig. 7B). RT-PCR analyses demonstrated that the transcription of *mbl-mcherry* was not affected in the ΔmreB mutant (see Fig. S7 in the supplemental material). This clearly suggested that Mbl requires MreB for correct localization.

DISCUSSION

Most rod-shaped bacteria achieve their morphology by incorporating new peptidoglycan at the lateral wall in a helical manner (10, 14, 47), probably directed by cytoplasmic MreB filaments (25, 31). Whereas Gram-negative rods require a single MreB homologue for growth and cell shape determination, Gram-positive ones, like *B. subtilis*, depend on three MreB homologues (27, 44). The precise role of the three MreB homologues in directing lateral cell wall growth is not known, and some redundancy has been reported (27).

S. coelicolor is a useful model system to study the role of MreB homologues, since none of the three *mreB*-like genes is essential for viability, demonstrating that they are not involved in vegetative growth by apical tip extension. This provided the unique possibility to analyze the function of the distinct *mreB* homologues in a defined mutant background. The conservation of *mreB* in *Streptomyces* and other sporulating actinomycetes, its mutant phenotype, and its localization to sites where spore wall synthesis occurs demonstrated its role in spore wall synthesis (37). In this report, we provide evidence that Mbl also is involved in sporulation, while the third MreB homologue, SCO6166, has a completely different function. This conclusion is supported by homology modeling, expression analysis, mu-

tant phenotypes, electron microscopy, protein-protein interaction studies, and protein localization experiments.

MreB and Mbl cooperate in the synthesis of a thickened spore wall. The role of *mreB* in directing the synthesis of a thickened spore wall has been reported already (37). There are several lines of evidence that suggest a related function for Mbl. The structure of Mbl, deduced from homology modeling, is nearly identical to that of MreB, indicating a very similar function.

Expression analysis by semiquantitative RT-PCR analysis showed the induction of *mreB* and *mbl* during morphological differentiation. Whereas *mbl* expression was not detectable in substrate mycelium but increased considerably during sporu-

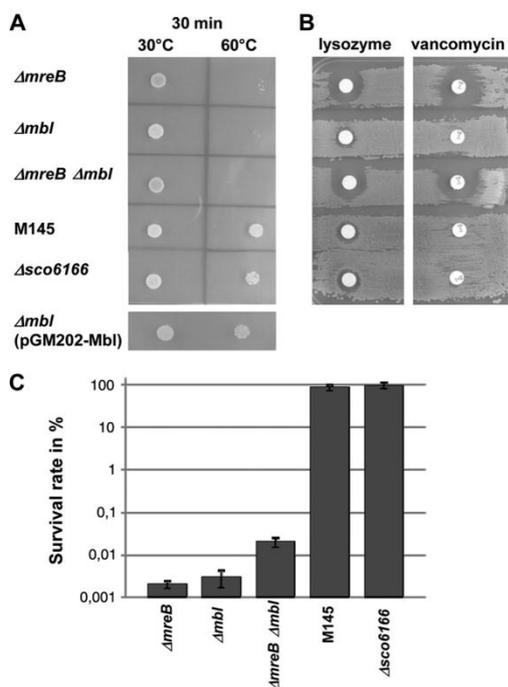


FIG. 4. Sensitivity of mutant spores to moderate heat, cell wall-lytic agents, and salt stress. (A) To assess resistance to moderate heat, spores of M145, ΔmreB , Δmbl , ΔmreB Δmbl , $\Delta\text{sco6166}$, and Δmbl (pGM202-Mbl) were incubated for 30 min at 30 or at 60°C, spotted onto LB agar, and incubated for 3 days at 30°C. (B) Resistance to cell wall-lytic agents was studied by plating spores onto LB agar, and filter discs with lysozyme (50 μg) or vancomycin (5 μg) were applied. The growth of M145, Δmbl , and $\Delta\text{sco6166}$ is only slightly affected, while ΔmreB and ΔmreB Δmbl show large inhibition zones. (C) Survival rates of mutant strains exposed to salt stress. Spore dilutions (in H_2O) were plated on LB agar plates containing 0.5% NaCl or 6% NaCl. The survival rates (mean values of three independent experiments) represent the percentage of colony titer on LB plus 6% NaCl in relation to the titer on LB plus 0.5% NaCl. In contrast to those of M145 and $\Delta\text{sco6166}$, the spores of ΔmreB , Δmbl , and ΔmreB Δmbl were impaired in germination and colony formation under high salt concentrations.

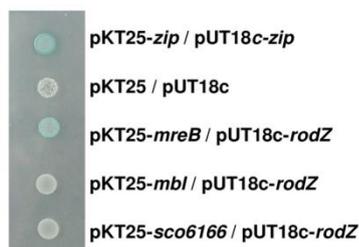


FIG. 5. Bacterial two-hybrid analysis demonstrating the interaction of MreB with the scaffold protein RodZ (SCO5751). *mreB*, *mbl*, *sco6166*, and further morphogenic genes (see Material and Methods for details) of *S. coelicolor* were fused to the functional *cya* domains T25 (pKT25) and T18 (pUT18c) of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (26). Cotransformants of the *cya* mutant BTH101 were spotted onto X-Gal plates. The blue color indicates the reconstitution of a functional adenylate cyclase due to the interaction of the fusion proteins. MreB, but neither Mbl nor SCO6166, interacted with the *S. coelicolor* RodZ homologue SCO5751. pKT25-*zip*/pUT18c-*zip* represent the positive control. As a negative control, BTH101 carrying the empty vector plasmids pKT25 and pUT18c was used.

lation, *mreB* also was transcribed in vegetatively growing mycelium. This indicates that besides its function in directing spore wall synthesis, MreB has an additional role in vegetatively growing mycelium under certain conditions. The *mreB* RT-PCR data are in agreement with previous reports by S1 mapping experiments that identified three promoters, one strongly induced during sporulation (6). Interestingly, the -35 and -10 regions (GGAAC-N₁₇-CGTCTTC) of the *mreB* P1

promoter (6) closely resemble σ^E -dependent promoters (GCAAC-N₁₇-CGTCTTC) (23), suggesting the transcription of P1 by SigE and therefore the induction of *mreB* by cell wall stress. σ^E is part of a signal transduction system sensing certain changes in the integrity of the cell envelope (24) and transcribing the *cwg* operon putatively involved in cell wall glycan synthesis (23). The phenotype of a σ^E mutant, with an altered cell wall structure and increased sensitivity to cell wall-lytic enzymes, resembled somewhat that of the $\Delta mreB$ mutant (37, 39). However, whereas the $\Delta mreB$ mutant had an impaired spore wall, the *sigE* mutants suffered from a defective cell wall during vegetative growth (39).

The phenotype of the Δmbl mutant closely resembled that of $\Delta mreB$, with swollen prematurely germinating spores that had lost their resistance to detrimental environmental conditions, such as heat, detergents, and salt stress. This clearly indicated that Mbl and MreB cooperate in directing the synthesis of a stress-resistant spore wall, and that both are necessary for this process. Interestingly, Δmbl and $\Delta mreB$ spores showed a different behavior when exposed to cell wall-lytic agents. Whereas spore germination in the $\Delta mreB$ strain was highly sensitive to lysozyme and vancomycin, Δmbl spores were almost as resistant as the wild type, revealing a less crucial role for Mbl. The localization of *mreB* in the same gene cluster as that of *pbp2*, encoding a monofunctional transpeptidase, allows speculation on the defect leading to the impaired spore wall of the $\Delta mreB$ mutant and its increased sensitivity. Due to the missing MreB filaments, PBP2 might not be positioned properly in relation to the spore periphery, causing the spore wall to be less cross-linked.

As previously shown for the $\Delta mreB$ mutant (37), Δmbl also

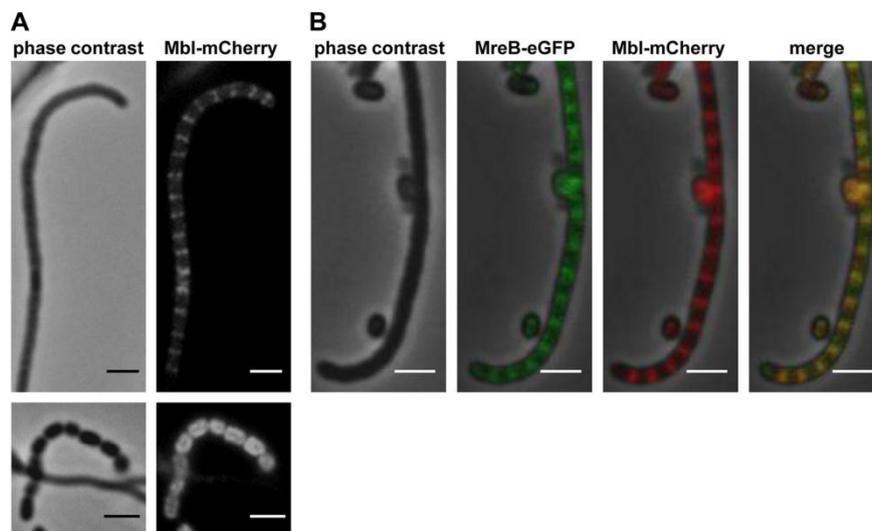


FIG. 6. Colocalization of Mbl and MreB to putative sporulation septa. (A) Plasmid pAH5 was integrated into the chromosomal *mbl* gene of *S. coelicolor* M145 via homologous recombination. The Mbl-mCherry fusion protein forms a ladder-like structure at putative sporulation septa and localizes around the cell periphery in young spores (bottom panels). (B) Colocalization of Mbl-mCherry and MreB-eGFP in the aerial mycelium. Plasmid pPM4 carrying a *mreB-egfp* fusion gene was integrated into the $\Phi C31$ *att* site of M145::pAH5, generating M145::pAH5-pPM4. Bar, 2 μ m.

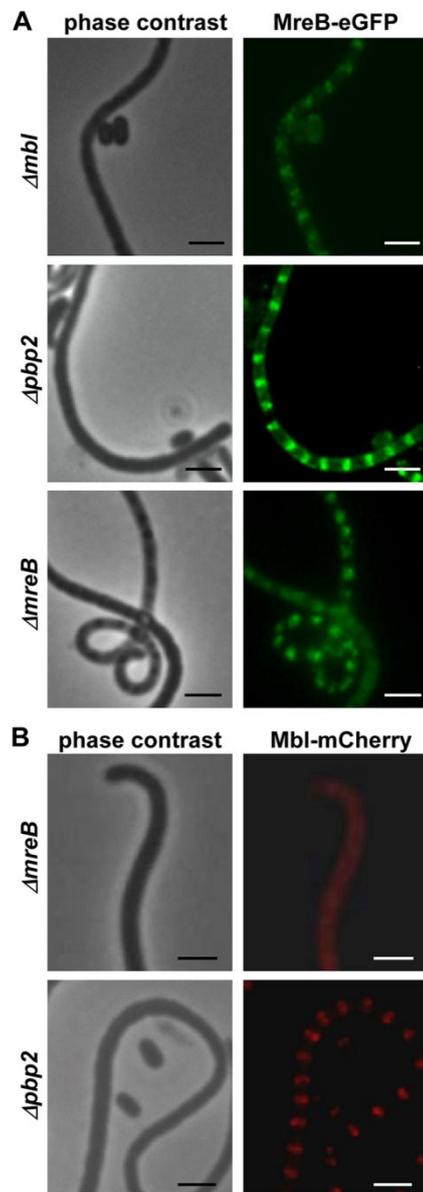


FIG. 7. Mbl-mCherry dependence on MreB for proper localization. The localization of MreB-eGFP and Mbl-mCherry was studied in $\Delta mreB$, $\Delta pbp2$, and Δmbl mutants, which have similar morphological defects. (A) MreB-eGFP localizes to the sporulation septa even in the absence of Mbl or PBP2. (B) While the localization of Mbl-mCherry was not affected in the $\Delta pbp2$ mutant, it was unable to localize to the sporulation septa in the $\Delta mreB$ mutant, suggesting that Mbl depends on the presence of MreB for proper localization. Bar, 2 μ m.

had a distorted spore wall. Whereas wild-type spores are ellipsoid with a sharply visible external wall, electron microscopic images showed irregularly shaped Δmbl spores with a more diffuse wall (see Fig. S4 in the supplemental material). Since the Δmbl spores are sensitive to many treatments, we cannot exclude that the appearance of the spore surface is affected by the fixation/staining process.

MreB localized to the sporulation septa and the spore periphery even in the absence of Mbl. It also localized properly in a $\Delta pbp2$ mutant, which showed the same morphological defects as those of the $\Delta mreB$ and Δmbl mutants (30a). Also, MreB of *Caulobacter crescentus* was able to form normal helical spirals in MreC-depleted cells (15). In contrast, a distorted MreB localization pattern was observed in *E. coli* MreC-, MreD-, and RodA-depleted cells (32). Mbl, however, seems to rely on the presence of MreB filaments. While Mbl-eGFP or Mbl-mCherry properly localized at the sporulation septa in M145 or $\Delta pbp2$, no clear Mbl-mCherry fluorescence foci were observed in the $\Delta mreB$ mutant.

Although MreB and Mbl seem to cooperate in spore wall synthesis, MreB has a more important role than Mbl. This also is supported by the protein-protein interaction studies that showed the strong interaction of MreB with RodZ, which probably represents the main scaffold protein for the peptidoglycan-synthesizing complex (1, 19, 49).

SCO6166 has a nonessential role during vegetative growth. SCO6166 differs in many aspects from the other MreB homologues. Whereas homology modeling revealed a highly similar structure for MreB and Mbl, SCO6166 lacks subdomains IB and IIB of actin-like proteins. Deviations in the IB and IIB subdomains from MreB and actins also are displayed by ParM, which is involved in plasmid partitioning, and this was proposed to influence the structure of the respective filaments (50).

The localization of *sco6166* in an operon with *sco6165* and their translational coupling suggest that both proteins cooperate. SCO6165 is homologous to DksA, a suppressor of DnaK. This suggests a function of SCO6165/SCO6166 in heat shock or stress response. Although many *Streptomyces* strains encode an SCO6165/SCO6166 pair, several *Streptomyces* strains without an SCO6166 homologue also exist, indicating an ancillary function of SCO6165/SCO6166.

In contrast to *mreB* and *mbl*, which are induced during morphological differentiation, *sco6166* had a completely different expression profile, being highly expressed in vegetative mycelium but completely switched off during sporulation. The RT-PCR experiments are in agreement with fluorescence microscopy studies, which detected SCO6166-mCherry only in substrate mycelium and not in aerial mycelium or spores. This clearly indicates a role of SCO6166 during vegetative growth and not in sporulation.

In summary, we showed that the three MreB proteins of *S. coelicolor* have distinct functions. MreB and Mbl are involved in the synthesis of a stress-resistant spore wall, with MreB probably providing a scaffold for the assembly of Mbl filaments. The role of SCO6166 during vegetative growth still is unclear and remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Ladant for providing the bacterial two-hybrid system, C. Menzel for help with TEM analyses, and K. Nieselt for providing microarray data.

The DFG (SFB766) provided financial support.

REFERENCES

- Alyahya, S. A., et al. 2009. RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:1239–1244.
- Bennett, J. A., et al. 2009. Medium-dependent phenotypes of *Streptomyces coelicolor* with mutations in *fstI* or *fstW*. *J. Bacteriol.* **191**:661–664.
- Berman, H. M., et al. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**:235–242.
- Bork, P., C. Sander, and A. Valencia. 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:7290–7294.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and M. J. Short. 1987. X-L1blue, a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques* **5**:376–378.
- Burger, A., K. Sichter, G. Kelemen, M. Buttner, and W. Wohlleben. 2000. Identification and characterization of the *mre* gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* **263**:1053–1060.
- Carballido-López, R. 2006. The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:888–909.
- Carballido-López, R., et al. 2006. Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev. Cell* **11**:399–409.
- Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9–14.
- Daniel, R. A., and J. Errington. 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**:767–776.
- Defeu Soufo, H. J., and P. L. Graumann. 2004. Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep.* **5**:789–794.
- Defeu Soufo, H. J., and P. L. Graumann. 2005. *Bacillus subtilis* actin-like protein MreB influences the positioning of the replication machinery and requires membrane proteins MreC/D and other actin-like proteins for proper localization. *BMC Cell Biol.* **6**:10.
- Defeu Soufo, H. J., et al. 2010. Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:3163–3168.
- Divakaruni, A. V., C. Baida, C. L. White, and J. W. Gober. 2007. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol. Microbiol.* **66**:174–188.
- Dye, N. A., Z. Pincus, J. A. Theriot, L. Shapiro, and Z. Gitai. 2005. Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:18608–18613.
- Errington, J. 2003. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell Biol.* **5**:175–178.
- Figge, R. M., A. V. Divakaruni, and J. W. Gober. 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **51**:1321–1332.
- Formstone, A., and J. Errington. 2005. A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol. Mar.* **55**:1646–1657.
- Gerdes, K. 2009. RodZ, a new player in bacterial cell morphogenesis. *EMBO J.* **28**:171–172.
- Guex, N., and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714–2723.
- Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, and K. F. Chater. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:1541–1546.
- Hempel, A. M., S. B. Wang, M. Letek, J. A. Gil, and K. Flardh. 2008. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**:7579–7583.
- Hong, H. J., M. S. Paget, and M. J. Buttner. 2002. A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol. Microbiol.* **44**:1199–1211.
- Hutchings, M. I., H. J. Hong, E. Leibovitz, I. C. Sutcliffe, and M. J. Buttner. 2006. The sigma(E) cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *J. Bacteriol.* **188**:7222–7229.
- Jones, L. J., R. Carballido-Lopez, and J. Errington. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**:913–922.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:5752–5756.
- Kawai, Y., K. Asai, and J. Errington. 2009. Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **73**:719–731.
- Kawai, Y., R. A. Daniel, and J. Errington. 2009. Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol. Microbiol.* **71**:1131–1144.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, CT.
- Kim, S. Y., Z. Gitai, A. Kinkhabwala, L. Shapiro, and W. E. Moerner. 2006. Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmill motion in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:10929–10934.
- Kleinschnitz, E.-M., A. Heichlinger, K. Schirmer, J. Winkler, A. Latus, I. Maldener, W. Wohlleben, and G. Muth. 18 January 2011. Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Mol. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07529.x. [Epub ahead of print.]
- Kruse, T., et al. 2006. Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **20**:113–124.
- Kruse, T., J. Bork-Jensen, and K. Gerdes. 2005. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol. Microbiol.* **55**:78–89.
- Kruse, T., and K. Gerdes. 2005. Bacterial DNA segregation by the actin-like MreB protein. *Trends Cell Biol.* **15**:343–345.
- Kruse, T., J. Moller-Jensen, A. Lobner-Olesen, and K. Gerdes. 2003. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **22**:5283–5292.
- Letek, M., et al. 2008. DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **190**:3283–3292.
- MacNeil, D. J., et al. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**:61–68.
- Mazza, P., et al. 2006. MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol. Microbiol.* **60**:838–852.
- Nieselt, K., et al. 2010. The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* **11**:10.
- Paget, M. S., L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, and M. J. Buttner. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **181**:204–211.
- Pridmore, R. D. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**:309–312.
- Redenbach, M., et al. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**:77–96.
- Sali, A., and T. L. Blundell. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**:779–815.
- Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Schirmer, K., and J. Errington. 2009. Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **155**:3611–3621.
- Söding, J., A. Biegert, and A. N. Lupas. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**:W244–W248.
- Tiffert, Y., et al. 2008. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **67**:861–880.
- Tiyanont, K., et al. 2006. Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:11033–11038.
- van den Ent, F., L. A. Amos, and J. Lowe. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**:39–44.
- van den Ent, F., C. M. Johnson, L. Persons, P. de Boer, and J. Lowe. 2010. Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *EMBO J.* **29**:1081–1090.
- van den Ent, F., J. Moller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes, and J. Lowe. 2002. F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**:6935–6943.
- Vollmer, W., and S. J. Seligman. 2010. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* **18**:59–66.

4.2 Teichonsäuren und ihre Beteiligung an der morphologischen Differenzierung von *Streptomyces coelicolor* A3(2)

4.2.1 Genetic analysis of *SCO2997* encoding a TagF homologue indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2011, p. 6080–6085
0021-9193/11/\$12.00 doi:10.1128/JB.05782-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 193, No. 21

Genetic Analysis of *SCO2997*, Encoding a TagF Homologue, Indicates a Role for Wall Teichoic Acids in Sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)^{†§}

Eva-Maria Kleinschnitz,¹ Annette Latus,¹ Steffen Sigle,¹ Iris Maldener,²
Wolfgang Wohlleben,¹ and Günther Muth^{1*}

¹Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany, ¹and Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Organismische Interaktionen, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany²

Received 12 July 2011/Accepted 22 August 2011

***Streptomyces coelicolor* contains two gene clusters putatively involved in wall teichoic acid biosynthesis. Inactivation of the *tagF* homologue *SCO2997* or *SCO2584*, a component of the *Streptomyces* spore wall synthesizing complex, affected sporulation. The mutant phenotypes resembled those of *mre* mutants, suggesting a function of wall teichoic acids in the differentiation of *Streptomyces*.**

The cell wall of Gram-positive bacteria consists of peptidoglycan (PG), lipoteichoic acids (LTA), wall teichoic acids (WTA), and other polysaccharides and proteins (34). Thirty percent to 60% of the cell wall is made of teichoic acids (26, 37). Common types of WTA consist of glycerolphosphate or ribitolphosphate subunits that are connected by phosphodiester bonds (40). WTA are involved in cation homeostasis (1, 14), antibiotic resistance (20, 21), and the release of secreted proteins (27). Glycerol-WTA biosynthesis in *Bacillus subtilis* 168 starts in the cytosol by the synthesis of the linker made of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylmannosamine (ManNAc), and one to three glycerolphosphate units. The first step is the transfer of GlcNAc phosphate from UDP-GlcNAc to an undecaprenyl phosphate carrier catalyzed by TagO (35). Then, TagA, an *N*-acetylmannosaminyl transferase, adds ManNAc from UDP-ManNAc to the C-4 hydroxyl of undecaprenyl-PP-GlcNAc and the glycerolphosphate transferase TagB transfers one to three phosphoglycerol units from CDP-glycerol to the C-4 hydroxyl of ManNAc (26, 37). The glycerol-3-phosphate cytidyltransferase TagD is involved in the synthesis of the precursor CDP-glycerol for the polymerization reaction performed by the cytidyltransferase TagF, which attaches normally more than 30 glycerolphosphates. TagE, a glycosyltransferase, modifies the lipid-linked WTA by glucosylation (26, 37). The two-component ABC transporter TagGH exports the WTA (31) to the outside of the membrane, where it is coupled to PG by a so-far-unknown mechanism. In many Gram-positive genomes, these enzymes of early WTA biosynthesis are conserved and organized similarly (41). In *B. subtilis* 168, besides *tagO*, all WTA-synthesizing genes are clustered

(*tagABDEFGH*) (23, 35, 41). *tagF* or *tagB* deletion mutants could be constructed only in the absence of a functional *tagO* gene (8). The loss of WTA in *B. subtilis* is associated with loss of the rod shape, swelling of the cells, a nonuniform thickening of the PG layer, an aberrant placement of the division septum, and a reduced growth rate (2, 8, 32). WTA of *Staphylococcus aureus* were shown to play a role in biofilm formation and adhesion to host tissues (39) as well as artificial surfaces (11) and are therefore an important factor of virulence (41).

Antibiotic-producing streptomycetes have a complex life cycle (7). They grow as a vegetative mycelium by apical tip extension (9, 13). When nutrition is depleted, an aerial mycelium and spores with a thickened wall are formed. This process involves the Mre proteins, which interact with other proteins to form the *Streptomyces* spore wall-synthesizing complex (SSSC) for the synthesis of the thickened spore wall (19). *Streptomyces* spores are resistant to different kinds of stress. They have a hydrophobic surface and contain hopanoids in their membrane for protection against oxygen and water loss (28).

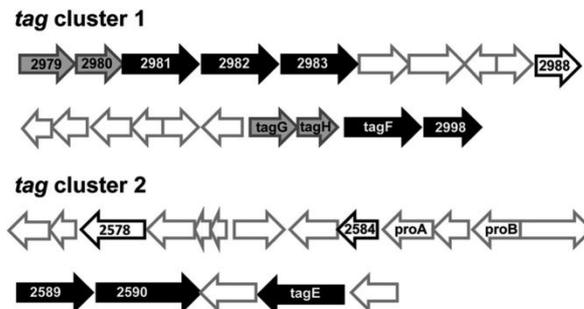
Most streptomycetes possess glycerolphosphate or ribitolphosphate wall teichoic acids (25). Some strains produce also teichuronic acids (33, 38), LTA (30), Kdn polymers (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid) (33), or poly(glycosylpolyol phosphate) (36). *Streptomyces coelicolor* M145 contains a phosphoglycerol LTA (30), but so far there is nothing known about the WTA type of *S. coelicolor*, about the role of teichoic acids in differentiation, or about their occurrence in spores. Spores of *Bacillus* were reported to contain only membrane teichoic acids and no wall teichoic acids (16).

BLAST analyses of the *S. coelicolor* genome with WTA genes of *B. subtilis* identified clear homologues of *tagB*, *tagE*, *tagF*, *tagG*, *tagH*, and *tagO* (Fig. 1). Most of the TagB/TagF-like glycosyl/glycerolphosphate transferase genes were located next to each other, forming two putative gene clusters involved in teichoic acid biosynthesis (Fig. 1). Size, sequence similarity, and the localization of *SCO2997* next to a *tagG/tagH*-like ABC transporter pair (*SCO2995/SCO2996*) which resembles the genetic organization in *B. subtilis* or *Staphylococcus aureus* (41)

* Corresponding author. Mailing address: Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Mikrobiologie/Biotechnologie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany. Phone: 4970712974637. Fax: 497071295979. E-mail: gmuth@biotech.uni-tuebingen.de.

† § Supplemental material for this article may be found at <http://j.b.asm.org/>.

‡ Published ahead of print on 2 September 2011.



SCO # name	identity to tag (%)	putative function	SCO # name	identity to tag (%)	putative function
2979		ABC transporter	2576		phosphoglycerate mutase
2980		ABC transporter	2577		hypothetical protein
2981	TagB (25) TagF (27)	glycosyl/glycerophosphate transferase	2578		LytR-like regulatory protein
2982	TagB (22) TagF (31)	glycosyl/glycerophosphate transferase	2579		adenyltransferase
2983	TagB (21) TagF (30)	glycosyl/glycerophosphate transferase	2580		membrane protein
2984		integral membrane protein	2581		membrane protein
2985		integral membrane protein	2582		protease
2986		redox protein	2583		membrane protein
2987		regulatory protein	2584		membrane protein
2988 (galE)		UDP-glucose 4-epimerase	2585		γ -glutamyl phosphate reductase
2989		integral membrane protein	2586		hypothetical protein
2990		hypothetical protein	2587		glutamate 5-kinase
2991		hypothetical protein	2588		integral membrane protein
2992		acetyltransferase	2589	TagB (23) TagF (31)	glycosyl/glycerophosphate transferase
2993		hypothetical protein	2590	TagB (29) TagF (42)	glycosyl/glycerophosphate transferase
2994		regulatory protein	2591		secreted protein
2995 (tagG)	TagG (23)	ABC transporter	2592 (tagE)	TagE (27)	glycosyltransferase
2996 (tagH)	TagH (47)	ABC transporter	2593		hypothetical protein
2997 (tagF)	TagF (33) TagB (24)	glycosyl/glycerophosphate transferase			
2998		glycosyltransferase			

FIG. 1. Schematic drawing of the two *S. coelicolor* gene clusters putatively involved in teichoic acid synthesis. The predicted functions of the genes and their new designations in accordance to the naming of the *B. subtilis* homologues are indicated in the table. Similarities to *B. subtilis* 168 Tag proteins involved in WTA biosynthesis are given as percentages of identical amino acids over the core regions. Transferase genes are shown in black and ABC transporters in gray.

suggest that *SCO2997* represents the *S. coelicolor tagF* homologue. For the sake of clarity, we will refer to the homologous *tag* names instead of the SCO numbers in the following text. The *tagGHF* homologous genes probably form a cluster with genes encoding four glycosyl/glycerophosphate transferases (*SCO2981*, *SCO2982*, *SCO2983*, and *SCO2998*), one UDP-glucose-4-epimerase (*SCO2988*), two regulators (*SCO2987* and *SCO2994*), and another ABC transporter (*SCO2979/SCO2980*), whereas the *tagO* homologue (*SCO5365*) is encoded somewhere else in the genome. A second putative teichoic acid-synthesizing cluster containing two glycosyl/glycerophosphate transferases (*SCO2589* and *SCO2590*) and a *tagE* homologue (*SCO2592*) is present close to the *mre* gene cluster (*SCO2607-SCO2611*). This cluster also contains two genes (*SCO2578* and *SCO2584*) which were identified previ-

ously by a bacterial two-hybrid genomic screen as components of the SSSC involved in spore wall synthesis (19). *SCO2578* encodes a LytR type transcriptional regulator of cell envelope-associated functions (15), and *SCO2584* encodes an uncharacterized membrane protein of 228 amino acids.

MreC and *MreD*, which are involved in PG synthesis during elongation growth of *B. subtilis*, were reported to interact with teichoic acid-synthesizing enzymes TagO, TagA, TagB, and TagF, indicating a close interconnection of PG and WTA syntheses (10). To confirm this interconnection, several putative WTA-synthesizing proteins of *S. coelicolor* were analyzed with the same adenylate cyclase-based bacterial two-hybrid system (17) used in the *B. subtilis* study. However, *MreC* and *MreD* of *S. coelicolor* showed no interaction with TagF, TagH, or TagO (data not shown). For *SCO2584*, strong interactions with

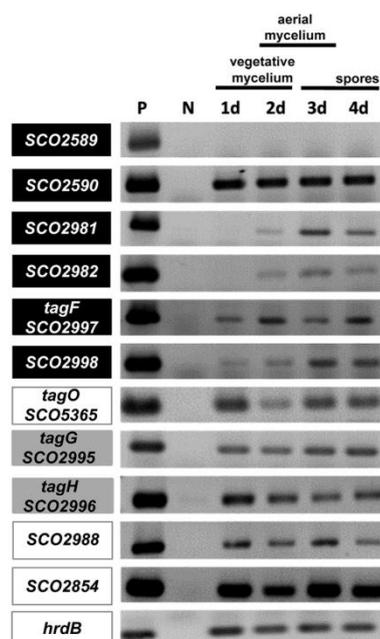


FIG. 2. Semiquantitative RT-PCR of selected genes putatively involved in WTA synthesis. *S. coelicolor* M145 was grown on SM agar, and RNA was isolated at different time points corresponding to the stages of morphological differentiation (12), as indicated. Following cDNA synthesis and PCR, the amplified fragments were run on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide (EtBr). Most of the WTA genes are transcribed during morphological differentiation. The glycosylglycerophosphate transferase genes *SCO2981* and *SCO2982* are transcribed only after the onset of sporulation. P, positive control (genomic DNA); N, negative control (H_2O); 1d, day 1 (vegetative mycelium); 2d, day 2 (vegetative mycelium and aerial mycelium); 3d, day 3 (aerial mycelium and spores); 4d, day 4 (mainly spores).

MreC, MreD, Sfr, RodZ, and the penicillin-binding proteins PBP2, FtsI, SCO3580, and SCO3901 were found (19). Also, SCO2980, an integral membrane transport protein that is encoded by the putative WTA cluster I, showed weak interactions with the SSSC proteins SCO2584 and SCO4129 (*cmdD*) and the serine/threonine kinase SCO4778 (data not shown).

The expression patterns of selected genes of the two putative gene clusters involved in WTA biosynthesis were determined by semiquantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). RNA was isolated from *S. coelicolor* M145 grown on cellophane on SM agar for 1 to 4 days (12), corresponding to the different phases of the *Streptomyces* life cycle. These analyses demonstrated that most of the putative WTA biosynthetic genes are expressed during the whole life cycle, even after the onset of sporulation, indicating a role of WTA in morphological differentiation. Interestingly, the glycosylglycerophosphate transferase genes differed in their expression profiles (Fig. 2). Expression of *tagF* and *SCO2590* did not change during differentiation. In contrast, expression of *SCO2981* and *SCO2982* was not detectable in young vegetative mycelia (Fig. 2, day 1) but increased during sporulation (Fig. 2, days 3 and 4), indicating a specific role of these transferases in sporulation.

To characterize the role of WTA in morphological differentiation, we intended to construct *S. coelicolor* deletion mutants defective in *tagF* and *SCO2584*. Derivatives of the nonreplicative pK18 plasmid containing ~1.6-kb DNA fragments corresponding to the upstream (including the start codon) and downstream regions (containing the stop codon) of *tagF* and *SCO2584* were used to delete the chromosomal genes via homologous recombination, yielding strains EMK2997 and EMK2584, respectively (Table 1; see also the supplemental material). Mutant genotypes were confirmed by PCR analysis and/or Southern blotting (see Fig. S2 and S3 in the supplemental material). Apart from retarded growth, there was no obvious phenotype detectable in the vegetatively growing mycelium of EMK2997 or EMK2584 (see Fig. S1A and B in the supplemental material), demonstrating that neither *tagF* nor *SCO2584* is essential for viability.

This is in contrast to the situation in *B. subtilis*, where *tagF* was reported to be essential (4). Maybe either one of the other

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacZΔM15 F':proA⁺B⁺ lacI^q Tet^r</i>	6
<i>E. coli</i> ET12567	<i>F⁻ dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR lacY1</i>	22
<i>S. coelicolor</i> M145	Prototrophic, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	18
EMK2997	<i>SCO2997</i> (<i>TagF</i>) replacement mutant of M145	Present study
EMK2997comp	EMK2997::pSET2997	Present study
EMK2584	<i>SCO2584</i> replacement mutant of M145	Present study
EMK2584(pGM2584)	EMK2584 complemented by plasmid pGM2584	Present study
pK18	<i>aphIII lacZ'α</i>	29
pKO2997	pK18 containing 1,610-bp upstream and 1,620-bp downstream fragments including start and stop codons of <i>SCO2997</i>	Present study
pKO2584	pK18 containing 1,521-bp upstream and 1,539-bp downstream fragments including start and stop codons of <i>SCO2584</i>	Present study
pSET152	<i>lacZ'α</i> φC31- <i>int oriT aac</i>	5
pSET2997	pSET152 + <i>SCO2997</i> with native promoter	Present study
pGM1202	pGM190 derivative, <i>oriT aac tsr P_{tipA}</i>	G. Muth, unpublished
pGM2584	pGM1202 + <i>SCO2584-His₆</i>	Present study

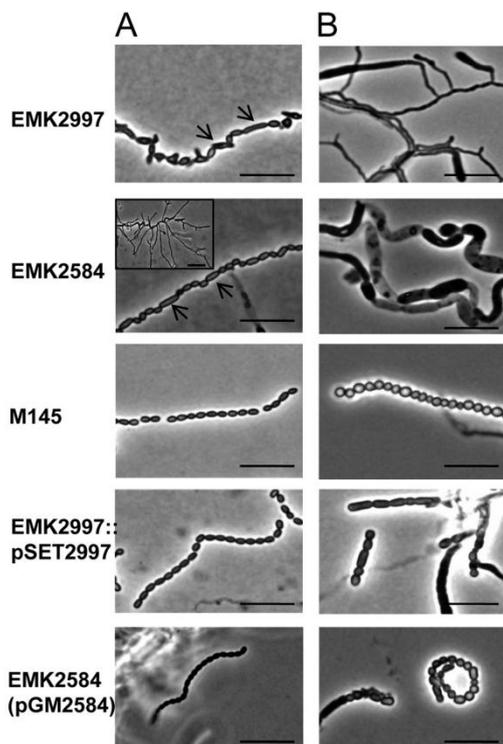


FIG. 3. The spore morphology of mutants defective in *tagF* and *SCO2584*. (A) After growth on SM agar for 4 to 5 days, the spore chains of the mutants contained irregular spores, strongly differing in size. They frequently germinated while still in the spore chain (inset). Black arrows indicate especially elongated spores. (B) On SM agar containing 10.3% sucrose, the defect was more severe and only aberrant sporelike particles were formed. Bar, 10 μm .

six glycosyl/glycerophosphate transferases partially supplants the TagF function in WTA synthesis or *S. coelicolor* does not require WTA for growth. Since *Streptomyces* growth as substrate mycelia does not rely on cell division (9), several genes involved in PG synthesis and cell division (e.g., *mreBCD*, *PBP2*) have been also shown to be dispensable, despite their essential roles in other bacteria (19). While the vegetative mycelium was not affected, differentiation was slightly retarded, and the spore chains contained aberrant spores (Fig. 3; see Fig. S1A in the supplemental material). Frequently, the mutant spores germinated prematurely in the spore chain, a phenotype characteristic for *mre* mutants of *S. coelicolor* (12, 19, 24). After 4 days of incubation on SM agar at 30°C, spore sizes ($n = 750$) were measured with the AnalySIS program and compared by box plot analysis (Fig. 4). The spores of EMK2997 and EMK2584 were significantly shorter than those of M145. While *S. coelicolor* M145 produced uniform ovoid spores of $1.27 \pm 0.16 \mu\text{m}$ by $0.68 \pm 0.07 \mu\text{m}$ in size, mutant spores were shorter and showed a wider variation in length,

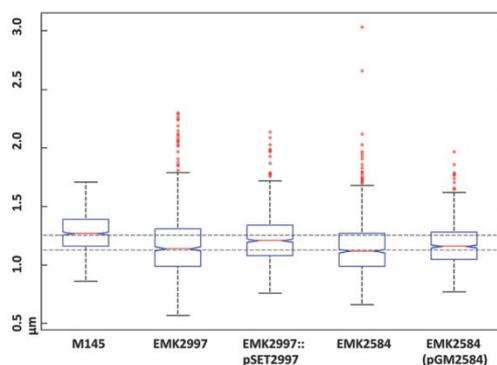


FIG. 4. Box plot analysis of the spore length of EMK2997 and EMK2584. Spores ($n = 750$) included in spore chains were analyzed by phase-contrast microscopy. The variation of spore length is shown in a box plot. The blue boxes contain 50% of the values. The sizes of these boxes are a measurement for the variation of the spore length. Within the horizontal black bars, values that differ less than three standard deviations from the mean value are shown. The red marks give the outliers. The red line inside the box is the median. If the indentations of the blue boxes overlap (see dotted horizontal lines), it means that the spores are statistically not different in length. The y axis gives the spore length in μm ; on the x axis the names of the strains are given.

from 0.6 μm up to 2.4 μm . The mutant phenotype was even more severe when the mutants were grown on SM agar supplemented with 10.3% sucrose, as has been also reported for *ftsI* and *ftsW* mutants (3) or mutants affected in genes of the SSSC (12, 19). Genetic complementation of the mutants by integrating an intact copy of *tagF* into the ϕC31 attachment site of EMK2997 or by introducing plasmid pGM2584 (Table 1) carrying *SCO2584*-His₆ under the control of the thiostrepton-inducible *P_{tipA}* promoter into EMK2584 partially restored spore dimensions (Fig. 3 and 4).

The mutant phenotype coincided with changes in the morphology of the spore envelope. Electron microscopy revealed aberrant spores showing alterations in the thickness of the outer layer (see Fig. S1C in the supplemental material). Since the stability of the spore walls of mutants might be affected (12, 19), the morphology of the mutant spores could be influenced by the fixation/staining procedure affecting them in a different way than in the wild-type spores. As the EMK2997 and EMK2584 spores somewhat resembled spores of the *mre* mutants, their sensitivity to detrimental environmental conditions, hallmark of an impaired spore wall, was analyzed. After incubation of the spores at 60°C for 15 min or longer, significantly fewer spores of EMK2997 and EMK2584 than spores of the wild-type M145 survived. As with the *mre* mutants (19), EMK2997 spores were also more sensitive to lysozyme and vancomycin (Fig. 5). Although resistance to vancomycin was not affected in EMK2584, the germinating spores were also sensitive to lysozyme (Fig. 5).

Conclusions. We provide evidence that WTA are involved in the differentiation of *S. coelicolor*, indicating that WTA are an important component of the *Streptomyces* spore wall. First, putative teichoic acid biosynthetic genes are transcribed during

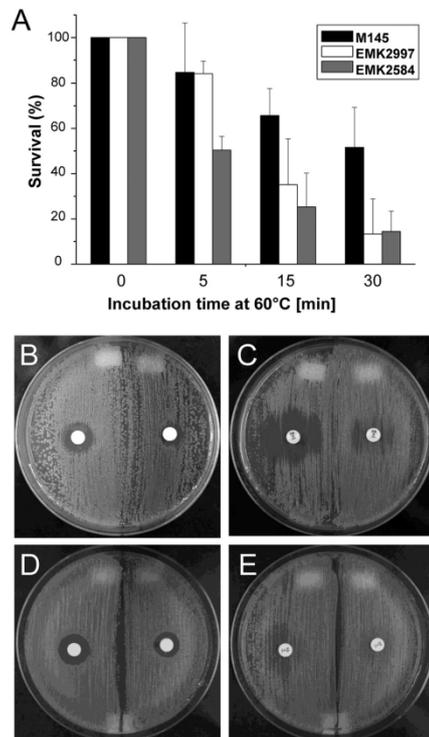


FIG. 5. Resistance of EMK2997 and EMK2584 spores to heat and cell wall-damaging agents. (A) The percentage of surviving spores incubated at 60°C in relation to samples incubated at room temperature is given. After an incubation time of more than 15 min at 60°C, significantly fewer mutant spores (white, EMK2997; gray, EMK2584) than wild-type spores (black) survived. (B to E) Sensitivity of EMK2997 (B and C) and EMK2584 (D and E) to cell wall-damaging agents. Spores of the mutants (left side) and the wild-type M145 (right side) were plated onto LB agar, filter discs with lysozyme (50 µg) (B and D) or vancomycin (5 µg) (C and E) were applied, and the plates were incubated at 30°C for 2 days. The sizes of the inhibition zones showed that both mutants were more sensitive to lysozyme than was the wild type. Only the *tagF* mutant EMK2997 showed a decreased resistance to vancomycin (C), while the resistance of EMK2584 spores did not differ significantly from that of M145.

sporulation. Second, *tagF* and *SCO2584* mutants are impaired in proper sporulation and suffer from a defective spore envelope. Resemblance of the expression profiles and mutant phenotypes to those of the *mre* genes of *S. coelicolor* A3 (2) (19), as well as the interaction of *SCO2584* with proteins of the SSSC, suggests a close interrelation of PG and WTA syntheses in the spore wall.

We thank G. Xia for helpful discussions, K. Blin for helping with the analysis of the spore length measurements in the box plot, and C. Menzel for help with TEM analyses.

We thank the DFG (SFB766) for financial support.

REFERENCES

- Archibald, A. R., J. J. Armstrong, J. Baddiley, and J. B. Hay. 1961. Teichoic acids and the structure of bacterial walls. *Nature* **191**:570–572.
- Atifano, M. L., et al. 2010. Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:18991–18996.
- Bennett, J. A., et al. 2009. Medium-dependent phenotypes of *Streptomyces coelicolor* with mutations in *fstI* or *fstW*. *J. Bacteriol.* **191**:661–664.
- Bhavsar, A. P., L. K. Erdman, J. W. Schertzer, and E. D. Brown. 2004. Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid. *J. Bacteriol.* **186**:7865–7873.
- Bierman, M., et al. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**:43–49.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and M. J. Short. 1987. X-L1blue, a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques* **5**:376–378.
- Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:685–713.
- D'Elia, M. A., K. E. Millar, T. J. Beveridge, and E. D. Brown. 2006. Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**:8313–8316.
- Flårdh, K., and M. J. Buttner. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:36–49.
- Formstone, A., R. Carballido-López, P. Noiro, J. Errington, and D. J. Scheffers. 2008. Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**:1812–1821.
- Gross, M., S. E. Cramton, F. Götz, and A. Peschel. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**:3423–3426.
- Heichlinger, A., et al. 2011. The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J. Bacteriol.* **193**:1533–1542.
- Hempel, A. M., S. B. Wang, M. Letek, J. A. Gil, and K. Flårdh. 2008. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**:7579–7583.
- Heptinstall, S., A. R. Archibald, and J. Baddiley. 1970. Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* **225**:519–521.
- Hübscher, J., L. Lüthy, B. Berger-Bächi, and P. Stutzmann-Meier. 2008. Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. *BMC Genomics* **9**:617.
- Johnstone, K., F. A. Simion, and D. J. Ellar. 1982. Teichoic acid and lipid metabolism during sporulation of *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. J.* **202**:459–467.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann, and D. Ladant. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:5752–5756.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Kleinschmitz, E. M., et al. 2011. Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Mol. Microbiol.* **79**:1367–1379.
- Kovács, M., et al. 2006. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **188**:5797–5805.
- Kristian, S. A., et al. 2003. Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J. Infect. Dis.* **188**:414–423.
- MacNeil, D. J., et al. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**:61–68.
- Mauël, C., M. Young, and D. Karamata. 1991. Genes concerned with synthesis of poly(glycerol phosphate), the essential teichoic acid in *Bacillus subtilis* strain 168, are organized in two divergent transcription units. *J. Gen. Microbiol.* **137**:929–941.
- Mazza, P., et al. 2006. MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol. Microbiol.* **60**:838–852.
- Naumova, I. B., V. D. Kuznetsov, K. S. Kudrina, and A. P. Bezubenkova. 1980. The occurrence of teichoic acids in streptomycetes. *Arch. Microbiol.* **126**:71–75.
- Neuhaus, F. C., and J. Baddiley. 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:686–723.
- Nouaille, S., et al. 2004. Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1600–1607.
- Poralla, K., G. Muth, and T. Härtner. 2000. Hopanoids are formed during

- transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). FEMS Microbiol. Lett. **189**:93–95.
29. Pridmore, R. D. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. Gene **56**:309–312.
30. Rahman, O., S. P. Cummings, and I. C. Sutcliffe. 2009. Phenotypic variation in *Streptomyces* sp. DSM 40537, a lipoteichoic acid producing actinomycete. Lett. Appl. Microbiol. **48**:226–229.
31. Schirner, K., L. K. Stone, and S. Walker. 2011. ABC transporters required for export of wall teichoic acids do not discriminate between different main chain polymers. ACS Chem. Biol. **6**:407–412.
32. Schlag, M., et al. 2010. Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. Mol. Microbiol. **75**:864–873.
33. Shashkov, A. S., et al. 2002. A polymer with a backbone of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a β -glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124. Eur. J. Biochem. **269**:6020–6025.
34. Silhavy, T. J., D. Kahne, and S. Walker. 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **2**:a000414.
35. Soldo, B., V. Lazarevic, and D. Karamata. 2002. *tagO* is involved in the synthesis of all anionic cell-wall polymers in *Bacillus subtilis* 168. Microbiology **148**:2079–2087.
36. Streshinskaya, G. M., et al. 2007. A novel teichoic acid from the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM Ac-2275. Carbohydr. Res. **342**:659–664.
37. Swoboda, J. G., J. Campbell, T. C. Meredith, and S. Walker. 2010. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. Chembiochem **11**:35–45.
38. Tul'skaia, E. M., et al. 2007. Anionic polymers of the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM An-2534. Bioorg. Khim. **33**:269–276. (In Russian.)
39. Weidenmaier, C., et al. 2004. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. Nat. Med. **10**:243–245.
40. Weidenmaier, C., and A. Peschel. 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. Nat. Rev. Microbiol. **6**:276–287.
41. Xia, G., and A. Peschel. 2008. Toward the pathway of *S. aureus* WTA biosynthesis. Chem. Biol. **15**:95–96.

4.2.2 Teichonsäuren synthetisierende Enzyme interagieren mit Komponenten des Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex

Für TagO (SCO5365), TagF (SCO2997) und TagH (SCO2996) sowie SCO2980, ein integrales Membrantransportprotein aus dem putativen WTA Synthesecoluster 1, wurden keine Interaktionen mit den Mre- Proteinen, den PBPs, FtsZ oder RodZ im BTH auf McConkey- Agar gefunden (Kapitel 7.1.2, Tabelle 7-4). Jedoch konnten einige schwache Interaktionen mit den beim Genbankscreen identifizierten Interaktionspartnern der Mre- Proteine identifiziert werden (Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4).

Tabelle 4-3. BTH Studien von Teichonsäuren synthetisierenden Proteinen und mit der Genbank gefundenen Interaktionspartnern der Mre- Proteine. Farbentwicklung auf McConkey- Agar.

		pKT25			
		SCO2578	SCO2584	SCO4129	SCO4778
pUT18c	SCO2980				
	TagF				
	TagH				
	TagO				

		pKT25			
		SCO2578	SCO2584	SCO4129	SCO4778
pUT18	SCO2980				
	TagF				
	TagH				
	TagO				

	keine Interaktion
	schwache Interaktion
	Interaktion
	starke Interaktion

So interagiert SCO2980 aus dem Teichonsäuresynthesecoluster 1, schwach mit SCO2584, einem Protein aus dem Teichonsäuresynthesecoluster 2, sowie mit SCO4129 aus dem *cmd*- Gencluster und mit

der Serin / Threoninkinase SCO4778. TagH zeigte ebenfalls eine Interaktion mit SCO2584. TagO zeigte schwache Interaktionen mit SCO2578, einem LCP- Protein aus dem Teichonsäuresynthesecluster 2, mit SCO2584, SCO4129, sowie SCO4778. Für TagF wurden keine Interaktionspartner gefunden. Um diese Hinweise zu bestätigen, wurden β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen durchgeführt (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4. β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen von Interaktionen der Teichonsäuren synthetisierenden Proteine mit durch die Genbank gefundenen Interaktionspartnern der Mre- Proteine.

		pKT25				
		units/mg	SCO2578	SCO2584	SCO4129	SCO4778
pUT18c	SCO2980	47±10	65±21	50±12	80±21	
	TagF		1±16			
	TagH					
	TagO			4±5		

		pKT25				
		units/mg	SCO2578	SCO2584	SCO4129	SCO4778
pUT18	SCO2980	46±13			20±25	
	TagF		3±3			
	TagH		13±13			
	TagO	6±6	46±18	5±9	8±16	

	keine Interaktion
	schwache Interaktion
	nicht bestimmt

Die β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen ergaben schwache Interaktionen für SCO2980 mit SCO2578, SCO2584, SCO4129 sowie SCO4778, außerdem eine schwache Interaktion von TagO mit SCO2584. Die anderen Interaktionen wurden nicht bestätigt. Es handelt sich insgesamt um nur sehr niedrige Werte mit zum Teil recht hohen Schwankungen. Die Ergebnisse können deshalb bestenfalls als Anhaltspunkte gewertet werden und sollten mit anderen Methoden bestätigt werden.

Die Ergebnisse der BTH- Experimente geben Hinweise auf Interaktionen zwischen Teichonsäuren synthetisierenden Enzymen und den Proteinen des Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex und somit eine Verknüpfung von Peptidoglykan- und Wandteichonsäuresynthese bei Streptomyceten.

4.2.3 Die Zellwände der *Δ mreB*- Mutanten und der *SCO2997(tagF)*- Mutanten enthalten weniger Wandteichonsäuren als die des WT

Um den Einfluss von *mreB*, *SCO2097*, und den mutmaßlichen Teichonsäuresynthesegenen *SCO2997* (*tagF*) sowie *SCO2584* auf den Teichonsäuregehalt der Zellwand von *S. coelicolor* zu bestimmen, wurden Wandteichonsäuren aus dem Wildtyp M145, sowie den entsprechenden Mutanten

aufgereinigt. Die Aufreinigungen erfolgten aus Substratmyzel (ca 2 g) nach einem Wachstum von drei Tagen in Flüssigkultur. Die aufgereinigten Teichonsäuren wurden mittels Phosphattest quantifiziert (Chen et al., 1956), indem sie komplett hydrolysiert wurden und die Konzentration an freiem Phosphat in der Lösung gemessen wurde. Die Phosphatwerte für die verschiedenen Aufreinigungsmethoden schwankten beträchtlich (Kapitel 7.2.3). Insgesamt konnte ein Trend zu geringeren Phosphatkonzentrationen bei den Mutanten $\Delta mreB$ und EMK2997 gesehen werden, was auf weniger WTA in den Zellwänden schließen ließ (Tabelle 4-5 und Abbildung 4-11).

Tabelle 4-5. Die Mittelwerte der Phosphatkonzentrationsbestimmung aller WTA- Aufreinigungen.

	Mittelwert [nmol/ml]	Standardabweichung	Anzahl der Aufreinigungen
M145	61743	35947	12
EMK2997	30703	22366	15
$\Delta mreB$	26151	22542	9
$\Delta SCO2097$	52013	17576	3
EMK2584	93470	53795	4
EMK2997::pSET2997	72400		1

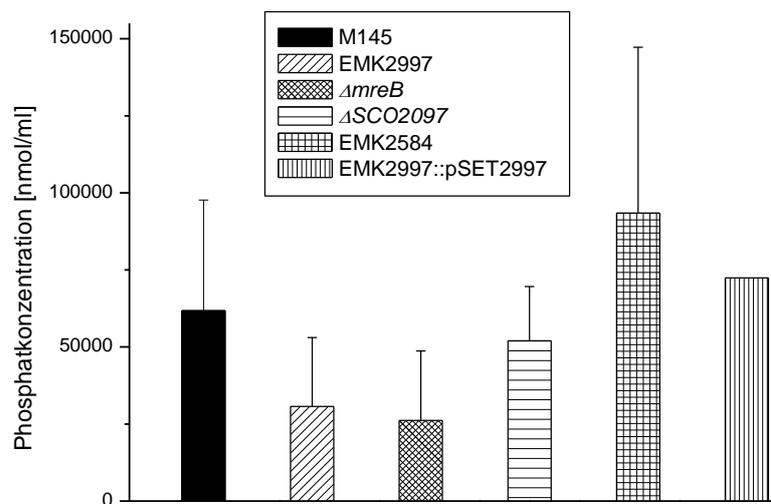


Abbildung 4-11. Die Mittelwerte der Phosphatkonzentrationsbestimmung [nmol/ml] aller WTA-Aufreinigungen. $\Delta mreB$ und EMK2997 zeigten im Vergleich zum WT M145 und den anderen Mutanten deutlich geringere Phosphatkonzentrationen.

Ein Zweistichproben- t- Test zeigte, dass sowohl die Mittelwerte der Phosphatkonzentration von EMK2997 als auch $\Delta mreB$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% signifikant vom Mittelwert der des WT M145 verschieden sind. Der WT, $\Delta SCO2097$ sowie die komplementierte EMK2997 Mutante enthielten durchschnittlich ca doppelt so viel Phosphat wie EMK2997 und $\Delta mreB$. EMK2584 hingegen enthielt deutlich mehr Phosphat als der WT, zeigte aber auch eine sehr hohe Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Phosphatmessungen sollten sich in einer veränderten Teichonsäurezusammensetzung widerspiegeln; was in WTA- PAGE- Gelen sichtbar werden sollte. Für die Gele wurde eine Teichonsäuremenge, die ca 200 nmol Phosphat entsprach, eingesetzt.

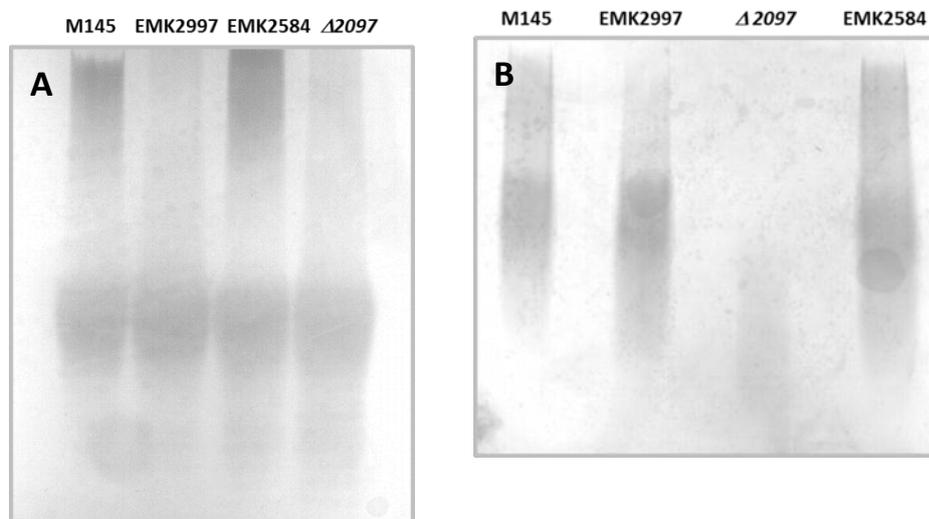


Abbildung 4-12. WTA- PAGE. A. WTA- PAGE vom WT M145, EMK2997, EMK2584 und $\Delta 2097$. Die Aufreinigung der Wandteichonsäuren erfolgte nach (Meredith et al., 2008). Das Gel (20 cm x 16 cm x 0,75 mm) lief in einem Tris/Tricin- Puffer bei 40 mA. Anschließend erfolgte eine Alcianblue- und Silberfärbung. B. WTA- PAGE vom WT M145, EMK2997, $\Delta 2097$ und EMK2584. Die Aufreinigung der Wandteichonsäuren erfolgte nach dem Protokoll von Kathrin Schirner (siehe 3.15.5). Das Gel (8,3 cm x 7 cm x 0,75 mm) lief in TBE- Puffer bei 100 V (Brown et al., 2008). Anschließend erfolgte eine Alcianblue- und Silberfärbung.

Trotz verschiedener Aufreinigungs- und Auftrennungsmethoden konnten keine definierten Wandteichonsäurebanden detektiert werden. Es war immer ein "Schmier" zu sehen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Verunreinigung mit DNA sein, welche auch mit Silber angefärbt wird. Die nachträgliche Überprüfung einiger Proben mit dem Nanodrop ergaben DNA- Verunreinigungen von 0,6 ng / μ l bis 1254,6 ng / μ l (Kapitel 7.2.4). Diese schienen zumindest teilweise von der verwendeten Methode abzuhängen. Die Methode von Schirner lieferte im Durchschnitt die größte WTA- Menge (Phosphatgehalt) bei geringster Kontamination mit DNA. Sie scheint deshalb für die Isolierung von Wandteichonsäuren aus Streptomyceten am geeignetsten zu sein (Kapitel 7.2.3 und 7.2.4).

Die Zellwände von EMK2997 ($\Delta tagF$) und $\Delta mreB$ enthielten weniger Phosphat und somit weniger Wandteichonsäuren als der WT oder die anderen Mutanten. Dies könnte ein weiterer Hinweis für das Zusammenwirken von Teichonsäuren synthetisierenden Enzymen und dem MreB- Zytoskelett bei der Sporenwandsynthese von Streptomyceten sein.

5 Diskussion

5.1 Die Sporenwandsynthese bei *S. coelicolor* erfolgt durch einen Komplex, welcher dem Peptidoglykansynthesekomplex für die laterale Zellwandsynthese von stäbchenförmigen Bakterien entspricht

S. coelicolor zeigt kein laterales Elongationswachstum, sondern ein von DivIVA abhängiges apikales Spitzenwachstum (Flärth, 2003a). Dennoch besitzt er einen, dem für das Längenwachstum bei stäbchenförmigen Bakterien wie *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus* ähnlichen, Proteinkomplex. Wie BTH-Experimenten ergeben haben (Kapitel 4.1.1, 4.1.2 und 7.1.2), besteht dieser Komplex bei *S. coelicolor* aus den Mre-Proteinen (MreB, MreC, MreD, Sfr und PBP2), zwei weiteren PBPs und RodZ. Fasst man diese Daten bildlich zusammen kommt man zu folgendem Modell (Abbildung 5-1). Geninaktivierungsexperimente zeigten, dass *S. coelicolor* diesen Komplex für die Synthese einer stressresistenten Sporenwand benötigt (Kapitel 4.1.1).

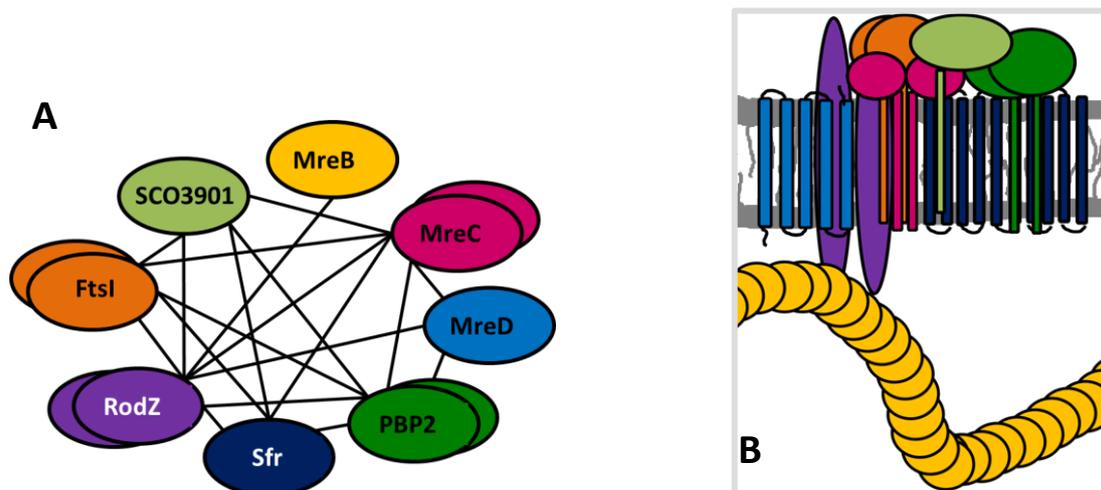


Abbildung 5-1. Ein Modell des Peptidoglykansynthesekomplex während der Sporenbildung von *S. coelicolor* A3(2) basierend auf den Ergebnissen der Proteininteraktionsstudien des BTH. A. Proteininteraktionsschema. Doppelte Ellipsen bedeuten Interaktion mit sich selbst, die Linien stellen die Interaktionen mit anderen Proteinen dar. B. Aus dem Interaktionsschema und Computervorhersagen wurde ein Modell für den Peptidoglykansynthesekomplex abgeleitet. Die Proteine entsprechen in den Farben jenen des Interaktionsschemas.

5.1.1 RodZ und MreC spielen zentrale Rollen im Sporenwandsynthesekomplex

Bei *S. coelicolor* wurden die meisten BTH- Interaktionen für RodZ und MreC gefunden (Kapitel 4.1.1 und 7.1.2). RodZ interagiert im BTH mit allen am Peptidoglykansynthesekomplex beteiligten Proteinen, einschließlich MreB und sich selbst. Für *C. crescentus* wurden ebenfalls BTH- Interaktionsstudien durchgeführt (White et al., 2010). Stellt man deren Ergebnisse, den Ergebnissen dieser Arbeit gegenüber, erhält man erstaunlich ähnliche Interaktionsmuster (Abbildung 5-2).

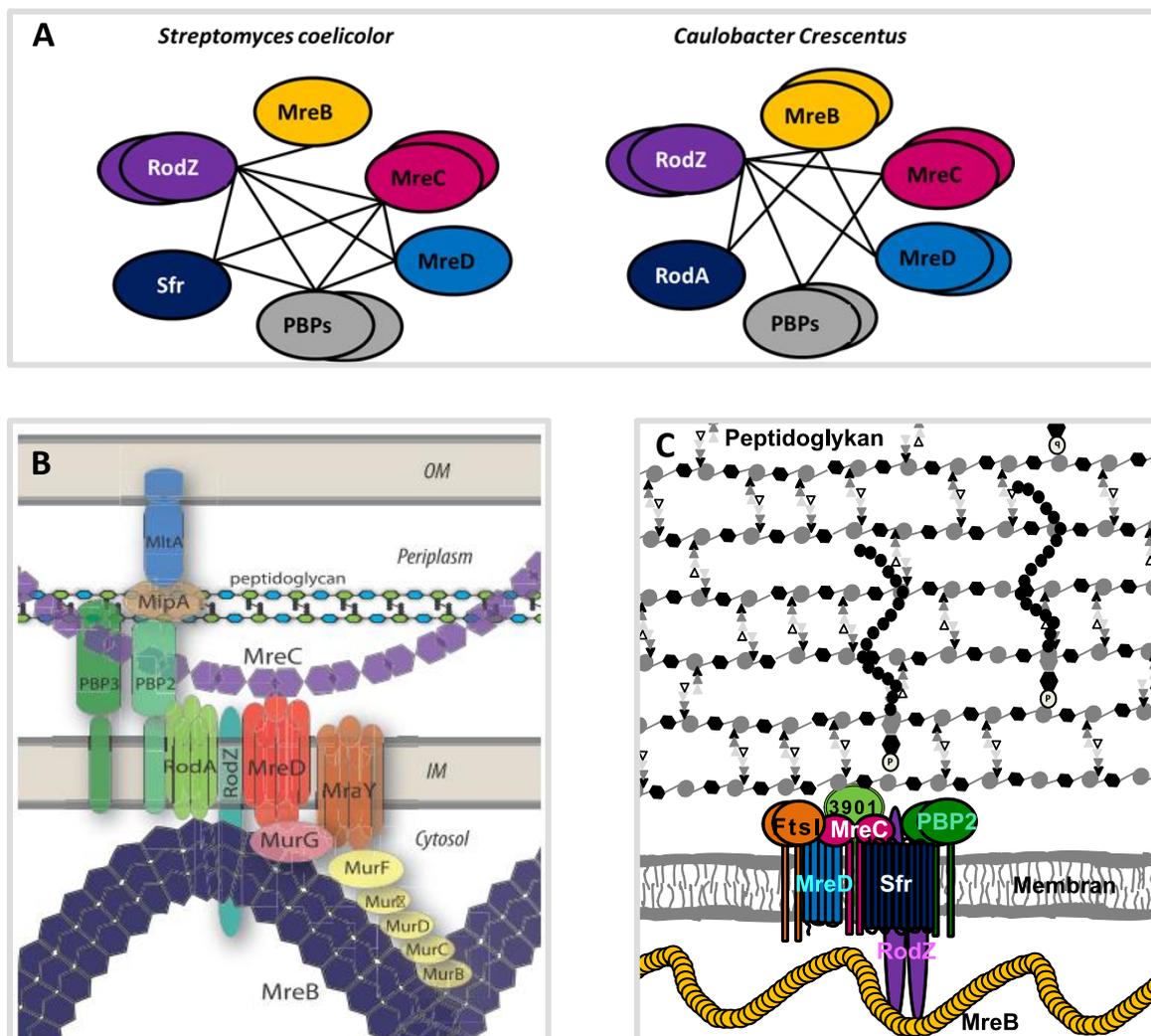


Abbildung 5-2. Vergleich der Peptidoglykansynthesekomplexe von *C. crescentus* zusammengestellt aus (White et al., 2010) und von *S. coelicolor* (Daten aus den BTH- Experimenten). A. PBPs steht für HMW PBPs. Bei *S. coelicolor* interagiert RodZ mit allen Mre- Proteinen sowie mit diversen HMW PBPs. MreC und MreD interagieren mit allen Mre- Proteinen mit Ausnahme von MreB. Bei *C. crescentus* interagiert MreB mit fast allen Mre- Proteinen und RodZ, Ausnahmen sind MreC und die PBPs. RodZ interagiert ebenfalls mit den Mre- Proteinen und PBPs. B. Der Peptidoglykansynthesekomplex von *C. crescentus*. Die MreB- Filamente stehen über Transmembranproteine (MreD, RodA, RodZ) mit den PG synthetisierenden PBPs in Kontakt; zudem gibt es Interaktionen von MreB mit den PG- Vorstufen synthetisierenden Enzymen (MurB, C, D, F, G) im Zytosol. C. Der Peptidoglykansynthesekomplex von *S. coelicolor*. Auch hier stehen über das Transmembranprotein RodZ die PG synthetisierenden PBPs (PBP2, FtsI, SCO3901) mit dem intrazellulären MreB in Kontakt.

Leider ist die Übersicht in Abbildung 5-2A unvollständig, da für beide Organismen nicht dieselben Versuche durchgeführt wurden und für *C. crescentus* folgende Daten fehlen: Die Interaktionen von

MreC mit RodA und MreD sowie von den PBPs mit RodA and MreD wurden in (White et al., 2010) nicht getestet. Folglich lässt sich hier über mögliche Interaktionen keine Aussage treffen. Außerdem wurden bei *C. crescentus* teilweise N-terminale Fusionsproteine untersucht, wohingegen für *S. coelicolor* nur bei C-terminalen Fusionen Interaktionen nachgewiesen werden konnten. Trotzdem sind sich die Peptidoglykansynthesekomplexe sehr ähnlich. Von insgesamt 37 bei beiden Organismen untersuchten Interaktionsmöglichkeiten stimmen 23 – d. h., fast zwei Drittel – überein. RodZ ist sowohl bei *S. coelicolor* als auch bei *C. crescentus* ein zentrales Bindeglied im Peptidoglykansynthesekomplex.

MreC, ein Membranprotein mit einer Transmembrandomäne, zeigte im BTH Interaktionen mit allen am Peptidoglykansynthesekomplex beteiligten Proteinen, einschließlich sich selbst jedoch mit Ausnahme von MreB (Kapitel 4.1.1 und 7.1.2). Es interagiert mit den Membranproteinen MreD und RodZ. Zudem zeigte MreC Interaktionen mit SCO2608, einem PBP2 Homolog, mit FtsI, einem PBP3 Homolog, und mit SCO3901, einem hochmolekularen PBP mit Transpeptidase- und Transglykosylaseaktivität. MreC interagiert des Weiteren mit Sfr, einem Protein der SEDS-Familie und RodA Homolog.

Bekanntlich interagieren MreC und MreD von *B. subtilis* im BTH sehr stark miteinander (van den Ent et al., 2006). MreD ist ein integrales Membranprotein mit mehreren Transmembranhelices, von dem nur wenige Aminosäuren ins Zytoplasma ragen (Kruse et al., 2005, van den Ent et al., 2010). MreC hat eine größere extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze N-terminale Domäne, welche ins Zytoplasma reicht. Über seine periplasmatische Domäne bildet MreC Dimere oder Multimere (Kruse et al., 2005). Es wird vermutet, dass MreC mit MreD eine Gerüstfunktion bei der Peptidoglykansynthese innehat. Dabei ist jedoch fraglich, ob eine stabile Interaktion mit MreB erreicht werden kann, denn diese ist nur möglich, wenn MreB, ein zytoplasmatisches Protein, welches mit der Membran assoziiert ist, direkt an die Membran heranreicht (Mazza, 2005, Slovak et al., 2005, Salje et al., 2011).

RodZ, ein weiterer Interaktionspartner von MreC, könnte diese Gerüstfunktion von MreC und MreD unterstützen, indem es MreB an der Membran lokalisiert (van den Ent et al., 2010). Die MreB-Filamente könnten so indirekt über das Transmembranprotein RodZ die Penicillinbindeproteine außerhalb der Zelle lokalisieren (Alyahya et al., 2009, van den Ent et al., 2010). RodZ ist ein Protein der Zytoplasmamembran; es besitzt eine N-terminale Domäne mit Helix-Turn-Helix Motiv, eine Transmembrandomäne und eine periplasmatische bzw. extrazelluläre C-terminale Domäne (Shiomi et al., 2008, Alyahya et al., 2009, Bendezú et al., 2009). Die konservierte zytoplasmatische N-terminale HTH-Region ist für seine helikale Lokalisierung entlang der Längsachse des Zellzylinders wichtig (Bendezú et al., 2009, Alyahya et al., 2009). Sie könnte auch DNA binden oder Protein-

Interaktionen bilden (Aravind *et al.*, 2005) und so das MreB Zytoskelett mit dem Nucleoid verbinden (Gerdes, 2009). Für *T. maritima* wurde gezeigt, dass RodZ über das HTH- Motiv mit MreB interagiert, was eine DNA- Interaktion ausschließt (van den Ent *et al.*, 2010). Die zytoplasmatische und die periplasmatische / extrazelluläre Domäne könnten unabhängig voneinander mit den die Zellform bestimmenden Proteinen im Zytoplasma (MreB, Mbl) bzw. außerhalb der Zelle (PBPs) interagieren (Shiomi *et al.*, 2008, Bendezú *et al.*, 2009).

MreB und RodZ zeigen nicht nur Proteininteraktionen sondern co- lokalisieren auch in *E. coli* und *C. crescentus*. In *E. coli* ist RodZ für die korrekte Ausbildung der MreB- Spiralen notwendig In *C. crescentus* hingegen benötigt RodZ MreB für seine Lokalisation. (Bendezú *et al.*, 2009, Alyahya *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist RodZ am Ort der Peptidoglykansynthese lokalisiert (Alyahya *et al.*, 2009). Dies und die Interaktionen von RodA mit sowohl RodZ als auch mit MreB (White *et al.*, 2010), sprechen für eine Rolle von RodZ bei der Lokalisierung der Peptidoglykansynthese. RodA sowie FtsW sind Proteine der SEDS- Familie mit jeweils zehn Transmembranhelices. RodA ist an der Peptidoglykansynthese während des Elongationswachstums beteiligt; FtsW spielt eine Rolle bei der Zellteilung. Für FtsW wurde bereits gezeigt, dass es direkt am Transport von Lipid II beteiligt ist, und für RodA wird dies ebenfalls angenommen (Ehlert & Höltje, 1996, Mohammadi *et al.*, 2011).

Aufgrund seiner vielfältigen Interaktionspartner, insbesondere den starke Interaktionen mit drei verschiedenen PBPs, kann angenommen werden, dass MreC im Sporenwandsynthesekomplex von *S. coelicolor* eine wichtige Rolle spielt. MreC interagiert jedoch nicht mit MreB. Die beiden morphogenen Membranproteine MreC und MreD könnten dennoch mit Hilfe von RodZ das zytoplasmatische MreB mit der extrazellulären PG- Synthese verbinden. RodZ wäre ein weiteres zentrales Gerüstprotein im Peptidoglykansynthesekomplex. Sfr könnte den Transport der Peptidoglykanvorstufen für die Sporenwandsynthese durch die Membran bewirken, wo diese dann durch die PBPs (PBP2, FtsI und SCO3901) mit dem Mureinsacculus verknüpft werden könnten.

5.1.2 MreB interagiert nicht mit sich selbst oder den anderen Mre- Proteinen im Peptidoglykansynthesekomplex

Es wird davon ausgegangen, dass MreB Filamente bildet. Die Ergebnisse der BTH- Untersuchungen gaben jedoch keine Anhaltspunkte dafür, dass MreB oder seine Homologen (Mbl und SCO6166) mit sich selbst interagierten (Kapitel 4.1.1, 4.1.5 und 7.1.2). Für *S. coelicolor* wurde keine Interaktion von Mbl oder SCO6166 im BTH gefunden. Für MreB konnte nur eine Interaktion mit RodZ und eine schwache Interaktion mit SCO2578, einem LCP- Protein, nachgewiesen werden.

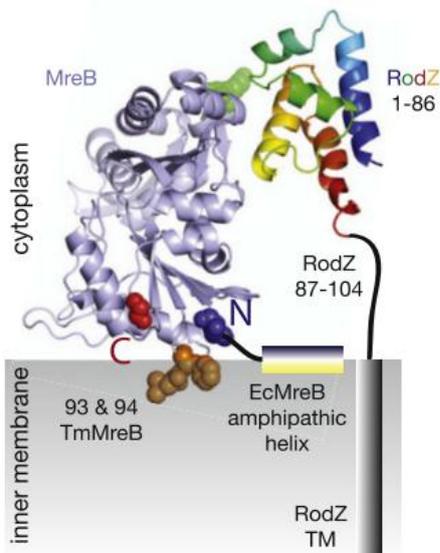


Abbildung 5-3. Die Interaktion von RodZ mit MreB (Salje et al., 2011).

MreB von *E. coli* bindet mittels einer N-terminalen amphipathischen Helix an die Membran. *T. maritima* MreB bindet mit einer hydrophoben N-terminalen Schleife ebenfalls an Lipidmembranen (Salje et al., 2011). Diese Bindung an die Membran ist für die Funktion von MreB notwendig. Das erklärt warum N- und C-terminale Fusionen mit GFP nicht vollständig funktionell sind. Beide Enden liegen direkt an der Membran, so dass dort kein Platz für Fusionskonstrukte ist. Ein Fusionskonstrukt ist nicht mit der für die Funktion notwendigen Membranbindung vereinbar (Salje et al., 2011).

Die Bindestelle für RodZ von *T. maritima* an MreB wurde durch Co-Kristalle nachgewiesen. Sie befindet sich nicht in der Nähe der Membranbindung von MreB (Abbildung 5-3) und stört weder die Polymerisation noch die Membranbindung der MreB-Untereinheiten (van den Ent et al., 2010, Salje et al., 2011). Das bedeutet, die RodZ-Bindung würde auch nicht durch die N- oder C-terminale Fusionsproteine gestört werden. Eine BTH-Interaktion von MreB mit RodZ ist somit möglich.

Für das *S. coelicolor* MreB-Fusionsprotein könnte im BTH Ähnliches wie für die GFP-Fusionskonstrukte gelten. MreB wurde mit seinem N-Terminus an den C-Terminus der T18- bzw. T25-Domäne der Adenylatzyklase fusioniert (Kapitel 3.11.1). Die Plasmide für das BTH wurden sequenziert und die Sequenzen überprüft. Eine korrekte Sequenz sagt jedoch noch nichts über die 3D-Struktur des Fusionsproteins aus. Es kann keine Interaktion detektiert werden, wenn das Protein nicht richtig gefaltet ist, oder wenn die Interaktionsstelle durch die Fusion nicht zugänglich ist. Die MreB-Fusionsproteine konnten vermutlich nicht mit den anderen Mre-Proteinen interagieren, weil durch die Fusion ihre Membranbindung gestört war. So kamen sie vielleicht nicht nahe genug an die Membranproteine MreC, MreD und Sfr heran, um mit diesen interagieren zu können. Zur Klärung dieser Frage könnte man einzelne Domänen von *S. coelicolor* MreB klonieren, bzw. MreB mit einem Linker so klonieren, dass die N-terminale Domäne von MreB frei wäre, mit der Membran zu interagieren. Dann könnte vielleicht eine Interaktion mit den Mre-Proteinen detektiert werden. Andererseits könnte es aber auch sein, dass für eine stabile Interaktion von MreB mit den Mre-Proteinen weitere Interaktionspartner, wie z. B. RodZ, nötig gewesen wären, um MreB an die Membran heranzubringen.

Bei *C. crescentus* oder *E. coli* interagiert MreB im BTH problemlos mit den anderen Mre-Proteinen (Kruse et al., 2005, White et al., 2010). Bei *B. subtilis* jedoch waren weder MreB, Mbl noch MreBH in

BTH- Experimenten funktionell (Formstone et al., 2008). Vielleicht liegt hier ein wesentlicher Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien.

Untersuchungen von *C. crescentus*, *E. coli* und *B. subtilis* weisen darauf hin, dass MreB auch mit zytosolische Zellwandvorstufen synthetisierenden Enzymen wie MurG, MurF oder MraY interagiert (Abbildung 5-2) (Mohammadi et al., 2007, White et al., 2010, Kawai et al., 2011). Bei *S. coelicolor* wurde dies noch nicht untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente könnten weitere Aufschlüsse geben, ob und wie MreB die Peptidoglykansynthese in *S. coelicolor* lokalisiert bzw. koordiniert.

5.2 Der *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien mit ausgewählten *S. coelicolor* Proteinen im BTH führten zu einem ähnlichen Komplex, wie er für das laterale Elongationswachstum bei stäbchenförmigen Bakterien bekannt ist. Anschließend wurde mittels Screening einer *S. coelicolor* Genbank auch nach für die Sporenwandsynthese von Streptomyceten spezifischen Interaktionspartnern gesucht (Kapitel 4.1.1 und 7.1.1.1). Aus den Interaktionen der ausgewählten Proteine mit den Genbankfunden ergab sich ein komplexes Netzwerk. Dies führte zum Modell des *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex (SSSC) (Abbildung 5-4).

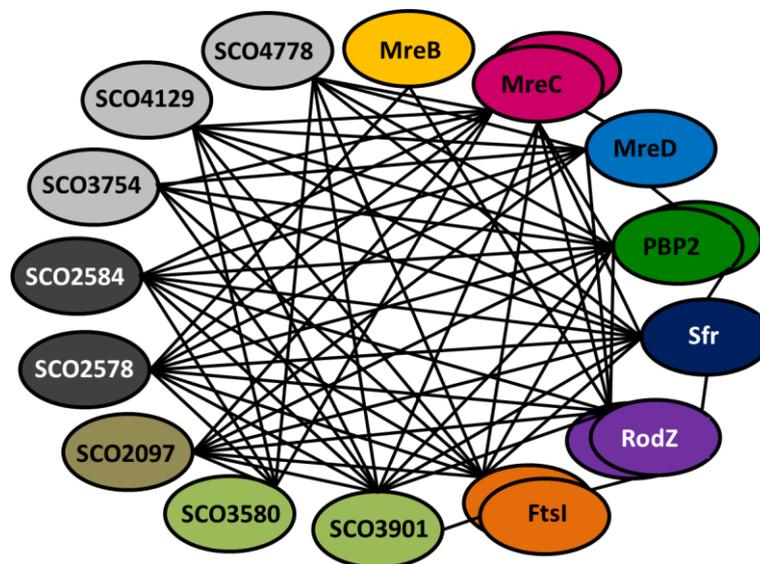


Abbildung 5-4. Der *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex. Neben den Mre- Proteinen beinhaltet der SSSC drei weitere PBPs (FtsI, SCO3580 und SCO3901), das morphogene Protein SCO2097 (braun), zwei Proteine aus dem Teichonsäuresynthesecluster 2 (SCO2578 und SCO2584; dunkelgrau) sowie SCO3754 (Teil eines ABC- Transporters), SCO4129 aus der *cmd* Region und SCO4778, eine Serin / Threoninkinase (hellgrau). Die Mre- Proteine sowie RodZ und FtsI sind in denselben Farben dargestellt wie in Abbildung 5-1. Die zusätzlichen PBPs sind in hellem olivgrün dargestellt.

Der SSSC besteht aus den Mre-Proteinen, RodZ, drei weiteren PBPs, einem morphogenen Membranprotein, zwei Proteinen aus dem Teichonsäuresynthesecluster 2, einem ABC- Transporter Protein, einem Protein aus der *cmd* Region sowie einer Serin / Threoninkinase. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die mit der Genbank identifizierten Interaktionspartner (SCO2097, SCO2578, SCO2584, SCO3754, SCO4129 und SCO4778) auch mit sich selbst oder untereinander interagieren, weil sie nur als Fusionskonstrukte im pKT25 vorlagen. Hierzu müsste man, die entsprechenden Genfragmente in den pUT18c klonieren, um zu untersuchen, ob und wie diese Komponenten untereinander interagieren.

5.2.1 SCO2097 ist ein morphogenes Protein des *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex

SCO2097 ist ein für Actinomyceten spezifisches Membranprotein von 135 Aminosäuren. Seine Funktion ist unbekannt. Es interagiert mit allen Mre-Proteinen mit der Ausnahme von MreB (Kapitel 4.1.1). Zudem zeigte Δ 2097 einen ähnlichen Phänotyp bezüglich der Vancomycin- und Lysozymresistenz wie die *mre*-Mutanten. Die Sporen dieser Mutante waren größer und eckiger geformt und die Sporenhülle war diffuser als beim Wildtyp M145 (Kapitel 4.1.3). SCO2097 befindet sich zwischen einem Gen, das für eine Methyltransferase (SCO2098) und einem Gen, das für ein Membranprotein aus der Superfamilie der Transglutaminase ähnlichen Proteine (SCO2096) kodiert. Diese Anordnung scheint konserviert zu sein (Abbildung 5-5). SCO2097 ist Teil des *dcw*-Gencluster, welches an der Peptidoglykansynthese während der Zellteilung beteiligt ist und das Penicillinbindeprotein FtsI (SCO2090) sowie das Zellteilungsprotein und Tubulin Homolog FtsZ (SCO2082) beinhaltet.

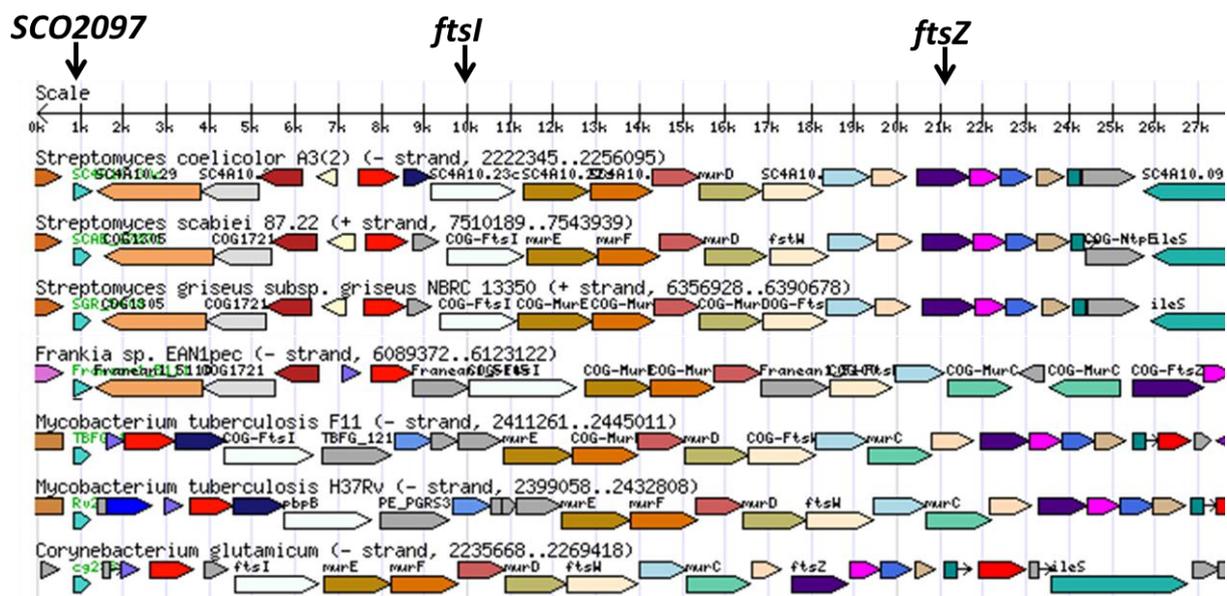


Abbildung 5-5. Die Umgebung von SCO2097 (hellblau) scheint bei Actinomyceten konserviert zu sein (Quelle: <http://www.microbesonline.org>). SCO2097 befindet sich im *dcw*-Gencluster, welches auch *ftsI* (weiß) und *ftsZ* (lila) umfasst. Gleiche Farbe bedeutet gleicher COG (cluster of orthologous genes) oder Ortholog. Grau bedeutet, dass diese Gene nicht verwandt sind.

Es ist bekannt, dass Multienzymkomplexe oft membranassoziierte Gerüstproteine enthalten (Mattei et al., 2010). SCO2097 interagiert nicht nur mit Mre-Proteinen, sondern auch mit RodZ und PBPs. Es kann daher vermutet werden, dass das Membranprotein SCO2097 ein weiteres Gerüstprotein ist, welches den Sporenwandsynthesekomplex von *S. coelicolor* zusammenhält.

Die Tatsache, dass Δ SCO2097 signifikant längere Sporen bildet als der Wildtyp und die Lage von SCO2097 im *dcw*- Gencluster, lassen spekulieren, ob SCO2097 auch eine Funktion bei der Zellteilung wahrnehmen könnte.

5.2.2 Kann die konstruierte Genbank alle *S. coelicolor* Gene enthalten?

Eine umfassende Analyse der Interaktionspartner mit dem BTH erfordert die Klonierung aller chromosomalen Gene im richtigen Leseraster. Die folgende Formel berechnet, wie viele unterschiedliche Klone theoretisch dazu nötig wären: $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$

N = die Anzahl der benötigten rekombinanten Plasmide

P = die gewünschte Wahrscheinlichkeit mit der das Genom abgedeckt sein soll

f = der Anteil der Größe des Fragments an der Größe des Genoms

Wählt man für P 99% und geht von einer Größe eines Gens von 500 bp bei einem Genom von 8 000 000 bp aus, kommt man zu folgendem Ergebnis:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)} = \frac{\ln(1-0,99)}{\ln\left(1 - \left(\frac{500bp}{8\,000\,000bp}\right)\right)} = 73\,680, \text{ d. h., man würde mindestens 73\,680 Transformanten}$$

benötigen.

Es gibt zwei Orientierungen und drei verschiedene Leseraster, deshalb bestehen sechs Möglichkeiten, wie das Fragment kloniert sein kann. Von diesen sechs Möglichkeiten ergibt aber nur eine ein funktionelles Fusionsprotein.

➔ $73\,680 \times 6 = 442\,080$, da man davon ausgehen muss, dass die meisten Fragmente keine korrekten Fusionsproteine ergeben, bräuchte man folglich mindestens 442 080 Transformanten.

Bei einer Insertion im Vektor von 80- 90%, benötigt man ca 550 000 Transformanten.

Es wurde eine Genbank aus hochgerechnet ca 2 000 000 Transformanten konstruiert. Darin könnte theoretisch jedes Gen des Genoms im richtigen Leseraster enthalten sein. Bei einer Überprüfung der Diversität mittels PCR konnten kleine Fragmente aus *mreB*, *mbl*, *SCO6166*, *mreC*, *mreD*, *PBP2* und *sfr* amplifiziert werden (siehe Kapitel 3.12.3 und Kapitel 7.1.1.3). Die Genbank wurde mit Hilfe von Restriktionsverdau konstruiert, weshalb die Fragmente nur so erzeugt werden können, wie es die Schnittstellen des Enzyms vorgeben. Statistisch gesehen sollte *BfuCI*, ein *Sau3AI* Isoschizomer, mit einer Erkennungssequenz von 4 bp, Fragmente von einer Länge von 256 bp

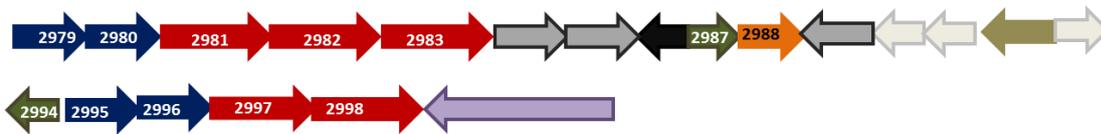
erzeugen. Streptomyeten haben einen sehr hohen GC- Gehalt, daher ist die Wahrscheinlichkeit für G und C höher als für A und T. Bei einer Schnittstelle 5'...GATC...3' und einem GC- Gehalt von 75% beträgt die durchschnittlich zu erwartende Fragmentlänge ca 455 bp. Außerdem wurde nur ein partieller Verdau durchgeführt, weshalb die erhaltenen Fragmente größer sind. Für die Konstruktion der Genbank wurden Fragmente mit einer Länge von 500- 2000 bp verwendet. Zudem können mit dieser Methode nur Gene analysiert werden, die eine *Sau3AI*- Schnittstelle im gleichen Leseraster bezogen auf die *BamHI*- Schnittstelle des *cyA*- Gens des Vektor haben. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass es weitere mögliche Interaktionspartner der Mre- Proteine gibt. Diese konnten nicht detektiert werden, weil sie kein funktionsfähiges Fusionsprotein mit der T25- Domäne der Adenylatzyklase bilden können. Auch hätten mit jedem Bait- Vektor mindestens 550 000 Co- Transformanten erzeugt werden müssen, um ein bestimmtes Interaktionspaar mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% zu erhalten. Bei der Analyse der *BfuCI*- Genbank wurden jedoch bereits mehr positive Interaktionspartner isoliert, als durch weitere Tests und Sequenzierungen hätten bestätigt werden können. Um alle möglichen Interaktionspartner in einer Genbank erhalten zu können, hätte man die zu klonierenden DNA- Fragmente mit Hilfe einer mechanischen Methode, z. B. durch Zerkleinern der DNA mittels Ultraschall oder Scherkräften herstellen können.

Dennoch lieferte die Genbanksuche eine Vielzahl interessanter Ergebnisse. So wurde unter anderem SCO2097, ein morphogenes an der Sporenwandsynthese beteiligtes Membranprotein entdeckt. Außerdem wurden zwei Proteine aus dem putativen Teichonsäuresynthesecluster 2 (SCO2578, SCO2584) als Interaktionspartner des SSSC identifiziert. Die Beteiligung dieser Interaktionspartner an der Sporenwandsynthese konnte durch die Konstruktion und Charakterisierung von Deletionsmutanten bestätigt werden.

5.3 Die Verknüpfung von Sporenwand- und Wandteichonsäuresynthese

Im *S. coelicolor* Genom gibt es wahrscheinlich zwei Teichonsäuresynthesecluster (Kapitel 4.2.1 und Abbildung 5-6). Diese wurden durch Blast- Analysen mit den Homologen von *B. subtilis* gefunden. Im Teichonsäuresynthesecluster 1 befindet sich das TagF Homolog *SCO2997* und im Teichonsäuresynthesecluster 2 zwei mit der Genbank identifizierte Interaktionspartner der Mre- Proteine (*SCO2578* und *SCO2584*). Ihre Gene befinden sich in der Nähe des *mre*- Genclusters (*SCO2607*-*SCO2611*).

Teichonsäuresynthesecluster 1



Teichonsäuresynthesecluster 2

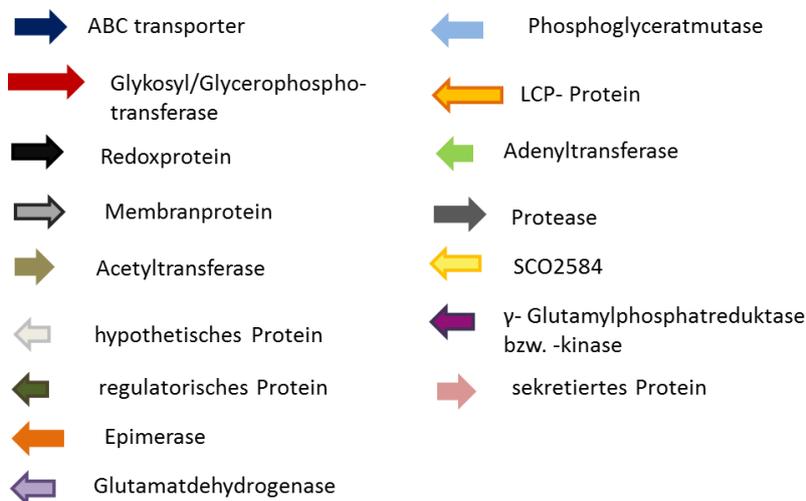


Abbildung 5-6. Die putativen Teichonsäuresynthesecluster von *S. coelicolor*. Das Teichonsäuresynthesecluster 1: Neben fünf Genen, die für Glykosyl / Glycerophosphotransferasen kodieren (*SCO2981*, *SCO2982*, *SCO2983*, *SCO2997* und *SCO2998*) enthält das Gencluster vier Gene, welche für zwei ABC Transporter Paare kodieren (*SCO2979/2980* und *SCO2995/2996*) und ein Gen, das für eine Epimerase kodiert (*SCO2988*). Das Teichonsäuresynthesecluster 2. Neben Genen für die zwei durch BTH- Analysen identifizierte Proteine (*SCO2578* und *SCO2584*) enthält es eine Phosphoglyceratmutase (*SCO2576*), eine Adenyltransferase (*SCO2579*), die γ - Glutamylphosphatreduktase bzw. -kinase, ProA und ProB (*SCO2585* und *SCO2587*) sowie drei Glykosyltransferasen (*SCO2589*, *SCO2590* und *SCO2592*).

5.3.1 Das LCP- Protein SCO2578 interagiert mit den Mre- Proteinen

Die TagO (SCO5365), TagF (SCO2997) und TagH (SCO2996) homologen Proteine von *S. coelicolor* zeigten keine Interaktionen mit den Mre- Proteinen im BTH (Tabelle 7-4 und Tabelle 7-10). Es wurde jedoch eine schwache Interaktion zwischen dem LCP- Protein SCO2578 (Teichonsäuresynthesecluster 1) und MreB beobachtet. SCO2578, ein Mitglied der LytR- CpsA- Psr- (LCP)- Familie, interagiert darüber hinaus mit allen Mre- Proteinen, RodZ, FtsI und den beiden bifunktionellen PBP_s SCO3580 und SCO3901 (Kapitel 4.1.1 und 7.1.2, Tabelle 7-13 und Tabelle 7-14).

In BTH- Experimenten von *B. subtilis* wurden starke Interaktionen von MreB mit den LCP- Proteinen (TagT, TagU und TagV) gefunden. LCP- Proteine sind Transmembranproteine mit einer kurzen N-terminalen intrazellulären Domäne und einem großen extrazellulären Fragment, welches die LCP- Domäne enthält (Over *et al.*, 2011). Sie spielen eine Rolle bei der β - Lactamresistenz, der Bildung von Biofilmen und der Erhaltung der Zellwand. LCP- Proteine kommen in erster Linie bei grampositiven Bakterien, weniger bei gramnegativen und nicht bei zellwandlosen Bakterien vor. Das lässt eine Funktion bei der Zellwandsynthese vermuten (Hübscher *et al.*, 2008). Sie übertragen vermutlich anionische Zellwandpolymere wie Teichonsäuren oder Kapselpolysaccharide auf das Peptidoglykan (Kawai *et al.*, 2011). Bei *S. aureus* gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen LCP- Proteinen und WTA- Gehalt (Hübscher *et al.*, 2009). Außerdem interagieren sie mit dem MreB- Zytoskelett. Möglicherweise koordiniert MreB so das Einfügen von PG- Vorstufen und anionischen Polymeren in die Zellwand (Kawai *et al.*, 2011). Von 30 durch Computeranalysen untersuchten Stämmen besitzt *S. coelicolor* mit elf LCP- Proteinen die meisten. *S. aureus* und *B. subtilis* haben nur drei, Corynebakterien und Mykobakterien zwei oder drei und *T. maritima* nur ein LCP- Protein (Hübscher *et al.*, 2008). LCP- Proteine können nach Sequenzähnlichkeit in unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden. SCO2578, ein Protein von 592 Aminosäuren, gehört zur Gruppe A3, welche nur bei Streptomyceten vorkommt und außergewöhnlich lange LCP- Proteine enthält (Hübscher *et al.*, 2008). Die anderen zehn LCP- Proteine von *S. coelicolor* gehören zur Gruppe A1, zu der die meisten LCP- Proteine grampositiver Organismen mit hohem GC- Gehalt gehören. TagT (*ywtF*) und TagU (*lytR*) von *B. subtilis* hingegen gehören zur Gruppe F2. Die Gruppen A1, Ch, F1, F2 und M sind sich untereinander jedoch sehr ähnlich (Hübscher *et al.*, 2008).

GFP- TagT sowie GFP- TagU von *B. subtilis* zeigen eine ähnliche Lokalisierung wie MreB. Es wird daher von einer Rolle für MreB bei der Wandteichonsäuresynthese ausgegangen (Kawai *et al.*, 2011). Außerdem wurden vielfältige Interaktionen zwischen MreC bzw. MreD und Teichonsäuren synthetisierenden Enzymen gefunden. Dies deutet ebenfalls auf eine enge Verknüpfung zwischen Teichonsäure- und Peptidoglykansynthese hin (Formstone *et al.*, 2008).

Bei Formstone wurden die N-terminalen Fusionsproteine von MreC und MreD untersucht. Auch einige der Tag-Proteine waren N-terminale Fusionen. Unsere *S. coelicolor* Fusionsproteine, bei denen an das N-terminale Ende von T18 fusioniert wurde, zeigten jedoch keine Interaktionen (Tabelle 7-5 und Tabelle 7-6). Eine Ausnahme war FtsZ. Es interagiert sowohl im pUT18 als auch im pUT18c mit pKT25-FtsZ. Andererseits hat FtsZ sonst mit keinem getesteten Protein interagiert. Die Fusionskonstrukte interagierten insgesamt, je nachdem in welchen Vektor sie kloniert waren (pUT18c oder pKT25), unterschiedlich gut. So interagiert z. B. PBP2 in pUT18c nicht mit pKT25-MreD – aber umgekehrt (pUT18c-MreD / pKT25-PBP2) ist eine Interaktion vorhanden. Ebenfalls interagiert pUT18c-MreB nur sehr schwach mit pKT25-RodZ, wohingegen umgekehrt eine sehr starke Interaktion sichtbar wurde. Dies könnte daran liegen, dass der pUT18c ein Vektor mit hoher und der pKT25 ein Vektor mit niedriger Kopienzahl ist. Je nachdem welches Protein im Überfluss vorhanden ist, könnte eine Interaktion mehr oder weniger begünstigt sein.

Um die Verknüpfung von WTA- und PG- Synthese bei *S. coelicolor* zu untersuchen wurde versucht, eine SCO2578- Deletionsmutante zu konstruieren. Unter 30 000 getesteten Klonen konnte jedoch keine Mutante gefunden werden.

Eine *tagOTUV*- Mutante von *B. subtilis* zeigte den selben Phänotyp wie eine *tagO*- Mutante (Kawai et al., 2011). Bei *B. subtilis* war es nicht möglich, eine Tripelmutante *tagTUV* zu konstruieren, ohne vorher auch *tagO* zu deletieren. Auch bei *S. aureus* ist eine Dreifach- Mutante kaum lebensfähig (Over et al., 2011). Fehlen alle LCP- Proteine, so fehlen der Zelle Zellwandstrukturen wie WTA, was zur Folge hat, dass autolytische Enzyme oder PBPs nicht mehr richtig lokalisiert werden können (Atilano et al., 2010, Schlag et al., 2010). Mutanten, welchen die LCP- Proteine fehlen, haben veränderte Zellwände, veränderte Autolyseaktivitäten, eine geringere Antibiotikaresistenz und zeigen eine geringere Virulenz (Hübscher et al., 2008). Außerdem enthalten sie einen geringeren Anteil an phosphathaltigen Zellwandpolymeren im Peptidoglykan (Kawai et al., 2011); dies unterstützt ihre vermutete Funktion bei der Synthese von anionischen Zellwandpolymeren wie z. B. Wandteichonsäuren.

S. coelicolor besitzt insgesamt elf LCP- Proteine (Hübscher et al., 2008). Es sollte daher möglich sein, eines davon auszuschalten. Vielleicht erfüllt SCO2578 eine spezielle Funktion bei der Sporenwandsynthese und kann nicht durch ein anderes LCP- Protein ersetzt werden. Dafür, dass SCO2578 eine spezifische Funktion erfüllt, würde auch die Tatsache sprechen, dass SCO2578 als einziges der für Streptomyceten spezifischen Gruppe A3 zugeteilt wird und nicht wie die anderen zehn zur Gruppe A1 gehört. Die Konstruktion der Deletionsmutanten verlief über die Herstellung von Sporen, weshalb keine Mutante gefunden werden konnte, falls eine SCO2578- Deletionsmutante keine Sporen produziert.

5.3.2 Mutationen in Genen, welche für Teichonsäuren synthetisierende Enzyme kodieren, führen zu einer gestörten Sporenwandsynthese

Ein Zusammenhang zwischen Wandteichonsäure- und Sporenwandsynthese wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurden die beiden Deletionsmutanten EMK2997 (*tagF*; Teichonsäuresyntheseclass 1) und EMK2584 (*SCO2584*; Teichonsäuresyntheseclass 2) erzeugt. *SCO2997* ist die Glycerophosphotransferase, welche dem TagF von *B. subtilis* am ähnlichsten ist (33% identische Aminosäuren in der Kernregion) (Kapitel 4.2.1). *SCO2584* ist ein Membranprotein, welches mittels Genbankscreening als Bestandteil des *Streptomyces* Spore wall Synthesizing Complex identifiziert wurde (Kapitel 4.1.1). Die Phänotypen von EMK2997 und EMK2584 ähneln dem Phänotyp der *mre*-Mutanten. Sie zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hitze, Vancomycin (nur EMK2997) und Lysozym. Außerdem ließen die Sporen eine unregelmäßige Größenverteilung erkennen und keimten noch in der Sporenkette aus (Kapitel 4.2.1). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine diffuse Sporenwand (Kapitel 7.2.1.3).

Bekanntlich zeigen *B. subtilis* Mutanten mit einem Defekt der lateralen Zellwandsynthese, bzw. mit Mutationen in den *mre*- Genen sowie Mutanten, die in der Synthese von Wandteichonsäuren beeinträchtigt sind, eine ähnliche Morphologie, nämlich eine runde bzw. rundliche Zellgestalt (Henriques et al., 1998, Wei et al., 2003, Bhavsar et al., 2004, Leaver & Errington, 2005, D'Elia et al., 2006). Der Verlust von MreB bei *B. subtilis* kann jedoch durch hohe Konzentrationen von Magnesium im Medium ausgeglichen werden (Formstone & Errington, 2005). Mutationen in allen drei MreB Homologen gleichzeitig oder *tag*- Mutationen können jedoch nicht durch eine erhöhte Mg²⁺- Zugabe kompensiert werden (Kawai et al., 2011). Eine *tagO*- Mutation wiederum hebt die Letalität einer dreifachen *mreB*- Mutanten auf. Eine *tagO*- Mutation hebt ebenso die Letalität einer *tagF*- Deletionsmutanten (Bhavsar et al., 2004). Dies deutet auf eine funktionelle Beziehung der MreB Homologen zu den Enzymen der späten WTA- Synthese hin (Kawai et al., 2011).

Wandteichonsäuren sind nicht essentiell für *B. subtilis* (Silhavy et al., 2010). Sowohl die Synthese von Peptidoglykan als auch von Wandteichonsäuren findet am Undecaprenylphosphatlinker statt. Wenn die Teichonsäuresynthese angefangen, aber nicht abgeschlossen wird, bleibt der Linker blockiert und die Peptidoglykansynthese kann nicht mehr in ausreichendem Maße stattfinden, deshalb können die späteren Wandteichonsäuresynthesegene nur deletiert werden, wenn vorher *tagO* ausgeschaltet wurde (D'Elia et al., 2009b).

Bei *S. coelicolor* ist es möglich, *SCO2997*, ein TagF Homolog, zu deletieren. *S. coelicolor* besitzt mindestens fünf weitere Glycosyl/Glycerophosphotransferasen und zwei Glykosyltransferasen, welche den Verlust von *SCO2997* teilweise kompensieren könnten. Es stellt sich die Frage, ob es auch möglich wäre, mehrere oder alle Glycosyltransferasen von *S. coelicolor* gleichzeitig auszuschalten, um

so die Funktionen der Glykosyltransferasen bei der Peptidoglykan- und WTA- Synthese genauer zu charakterisieren.

Um herauszufinden, ob Wandteichonsäuren für die Sporenwand von *S. coelicolor* essentiell sind, wurde versucht, eine *tagO* (SCO5365)- Deletionsmutante zu konstruieren. Hierfür wurden fast 40 000 Klone erfolglos untersucht. Eine Erklärung hierfür könnte im Konstruktionsprozess der Mutante liegen. Dieser verläuft über die Herstellung und Selektion von Sporen. Die *tagF*- Mutante, EMK2997, sporulierte nur sehr langsam und bildete wesentlich weniger Sporen als der WT. Dies lässt vermuten, dass eine *tagO*- Mutante eventuell gar nicht mehr sporulieren kann. Deshalb wurde auch versucht, die Mutante nicht über Sporen, sondern über die Selektion von Protoplasten zu gewinnen. Es konnte jedoch auch so keine Mutante isoliert werden. Dies deutet darauf hin, dass eine Deletion von *tagO* bei *S. coelicolor* unter diesen Umständen nicht möglich ist. TagO (SCO5365) ist eine Glykosyltransferase (UDP- N- Acetylmuramyl- pentapeptidphosphotransferase / UDP- N- Acetylglucosamin- 1- Phosphattransferase), welche in der Kernregion eine Identität von 31% mit dem *B. subtilis* TagO aufweist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das *S. coelicolor* TagO auch für andere Stoffwechselwege, wie z. B. die Peptidoglykansynthese, benötigt werden könnte und es deshalb nicht möglich ist eine *tagO*- Mutante zu konstruieren.

Der Phänotyp von EMK2997 machte deutlich, dass ein TagF Homolog und somit auch Teichonsäuren an der Sporenwandsynthese beteiligt sind. SCO2584 ist ein weiteres mögliches Wandteichonsäuresynthesegen, dessen Deletion eine Auswirkung auf die Sporenwandsynthese hat. Zudem ist SCO2584 ein Interaktionspartner des SSSC und zeigte eine schwache Interaktion mit TagO (Kapitel 4.2.2). Das bekräftigt eine Rolle des SSSC nicht nur bei der Peptidoglykan-, sondern auch bei der Teichonsäuresynthese während der Sporulation.

5.4 Wird die Sporenwandsynthese durch Serin / Threoninkinasen reguliert?

Beim Genbankscreen mit dem BTH wurde SCO4778 (*pkaI*) als Interaktionspartner im SSSC identifiziert (Kapitel 4.1.1). SCO4778 ist mit 380 Aminosäuren die kürzeste ESTPK (eukaryotic-type serin / threonine protein kinase) von *S. coelicolor*. Direkt vor *mbI* liegt SCO2450, ebenfalls eine ESTPK von 1349 Aminosäuren. Sie besitzt neben einer katalytischen Serin / Threonin Kinase- Domäne auch eine DNA- bindende Domäne eines Transkriptionsfaktors der SARP- Familie (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*).

Die Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung ist ein geeigneter Mechanismus, um molekulare Prozesse als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale zu regulieren. ESTPKs sind an der Differenzierung, der Antibiotikaproduktion und der Stressantwort von Bakterien beteiligt (Umeyama et al., 2002, Oh et al., 2011); sie sind jedoch nicht essentiell für den Primärmetabolismus (Ogawara et al., 1999). Deshalb werden sie nur bei Bakterien gefunden, die einen komplexen Lebenszyklus mit morphologischer und physiologischer Differenzierung vorweisen (Ogawara et al., 1999, Petricková & Petricek, 2003). Bei *B. subtilis* gibt es nur drei und bei *E. coli* gibt es gar keine ESTPK.

S. coelicolor hingegen besitzt laut Computeranalysen mehr als 30 ESTPKs (Petricková & Petricek, 2003). SCO4778 liegt im Proteinkinasegencluster zwischen vier weiteren ESTPKs (SCO4775 (*pkaH*), SCO4776, SCO4777 (*pkaD*) und SCO4779 (*pkaJ*)) (Abbildung 5-7).

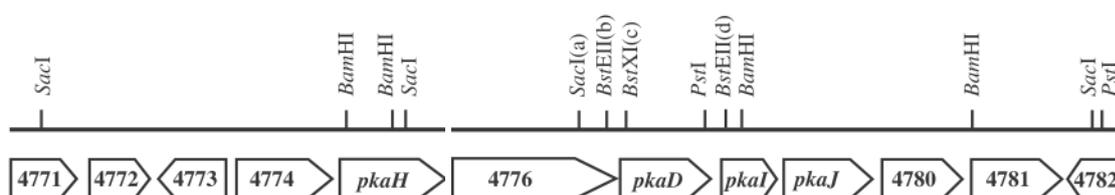


Abbildung 5-7. Das Proteinkinasegencluster von *S. coelicolor* (Urabe et al., 2008). Fünf ESTPKs (*pkaH*, SCO4776, *pkaD*, *pkaI* und *pkaJ*) unterschiedlicher Größe liegen hier direkt nebeneinander. Ihre N- terminalen katalytischen Domänen sind homolog, sie unterscheiden sich jedoch in ihren C- terminalen Domänen.

RT- Experimente haben gezeigt, dass diese fünf Proteinkinasen kein Operon formen (Urabe et al., 2008); *pkaI* (SCO4778) wird als einzige nach 24 Stunden Wachstum auf Festmedium nicht exprimiert (Urabe et al., 2008). *pkaD* (SCO4777) hingegen wird konstitutiv während des gesamten Lebenszyklus exprimiert. Eine *pkaD*- Mutante zeigt keine Verzögerung bei der morphologischen Differenzierung und keine Probleme bei der Sporulation; jedoch eine auf 20% des WT- Niveau reduzierte Actinorhodinproduktion (Urabe et al., 2008). PkaD ist homolog zu PkaH, PkaI und PkaJ. Ihre Identität

in der N-terminalen katalytischen Domäne beträgt mehr als 50%. Zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne von ESTPKs liegt oft eine Transmembrandomäne. Zwei Drittel der ESTPKs von *S. coelicolor* sind Membranproteine, welche den eukaryontischen Rezeptorkinasen ähneln; so auch SCO4775- SCO4779 (Petrícková & Petříček, 2003, Urabe et al., 2008). Die C-terminale Region der Proteinkinase ist oft für die Ligandenbindung notwendig und befindet sich wahrscheinlich außerhalb der Zelle; dort finden sich keine Homologien für PkaD, PkaH, PkaI und PkaJ. (Petrícková & Petříček, 2003). Dies deutet darauf hin, dass diese Proteinkinasen unterschiedliche Substrate binden und wahrscheinlich unterschiedliche regulatorische Aufgaben im Sekundärmetabolismus erfüllen.

Die beiden am besten charakterisierten ESTPKs von *S. coelicolor* sind RamC und AfsK. RamC ist an der Bildung des Luftmyzels beteiligt (O'Connor et al., 2002, Hudson et al., 2002). Es liegt zusammen mit *ramS* dem Gen, das für SapB kodiert in einem Operon (Capstick et al., 2007). AfsK ist ein globaler Regulator des Sekundärmetabolismus (Umeyama et al., 2002).

Die Rolle von ESTPKs und ihre möglichen Liganden bei der Regulation der morphologischen Differenzierung von *S. coelicolor* sind bislang nicht näher erforscht. SCO4778 wird nach 24 Stunden nicht exprimiert (Urabe et al., 2008). Dies bedeutet, dass SCO4778 nicht für das vegetative Wachstum benötigt wird, was wiederum für eine Rolle bei der Sporulation sprechen könnte. Die Tatsache, dass die ESTPK SCO4778 mehrfach (insgesamt 22 Mal) und mit unterschiedlichen Interaktionspartnern des SSSC (MreC, MreD, PBP2, Sfr und RodZ) beim BTH-Genbankscreen isoliert wurde, ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivität verschiedener Komponenten des SSSC durch Proteinphosphorylierung reguliert werden könnte. Dies führt zu einem völlig neuen Blickwinkel auf die zellulären Vorgänge bei der morphologischen Differenzierung und der Synthese der stressresistenten Sporenwand von Streptomyeten.

6 Eigenanteil

1. **Kleinschnitz, E.-M., A. Heichlinger, K. Schirner, J. Winkler, A. Latus, I. Maldener, W. Wohlleben, and G. Muth.** 2011. Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Molecular Microbiology* **79**:1367-1379.
2. **Heichlinger, A., M. Ammelburg, E.-M. Kleinschnitz, A. Latus, I. Maldener, K. Flärdh, W. Wohlleben, and G. Muth.** 2011. The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *Journal of Bacteriology* **193**:1533-1542.
3. **Kleinschnitz E.-M., A. Latus, S. Sigle, I. Maldener, W. Wohlleben, and G. Muth.** 2011. Genetic analysis of *SCO2997*, encoding a TagF homolog, indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **193**:6080-6085.

Eigenanteil an den oben aufgelisteten Publikationen:

1. Zur Publikation "Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis" habe ich wesentliche Teile beigetragen. Alle BTH-Experimente, die Konstruktion und das Screening der Genbank sowie die Proteinüberexpressionsexperimente wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Interaktionsstudien führten zur Kernaussage der Publikation. Die Konstruktion der Mutanten erfolgte durch A. Latus, K. Schirner und J. Winkler. Die phänotypische Charakterisierung der Mutanten wurde von A. Latus und A. Heichlinger durchgeführt. Die licht- und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde von A. Heichlinger angefertigt. Die TEM- Aufnahmen und die Probenvorbereitung erfolgten in Zusammenarbeit mit C. Menzel.
2. Am Manuskript "The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis" war ich mit Anmerkungen, Korrekturen sowie der Verfassung meines Teils beteiligt. Die darin enthaltenen BTH- Experimente und deren Auswertung wurden von mir durchgeführt.
3. Die Publikation „Genetic analysis of *SCO2997*, encoding a TagF homolog, indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ wurde von mir konzipiert und verfasst. Die darin enthaltenen Ergebnisse basieren auf eigenen experimentellen Arbeiten und wurden von mir ausgewertet. Die Vancomycin-, Lysozym- und Hitzetests sowie die Komplementierung von EMK2584 habe ich mit Unterstützung von A. Latus durchgeführt. Die TEM- Aufnahmen habe ich in Zusammenarbeit mit C. Menzel angefertigt und selbst ausgewertet. Die Daten der RT- Experimente hat S. Sigle beigetragen.

7 Anhang

7.1 Der *Streptomyces* Spore Wall Synthesizing Complex

7.1.1 Supplementary information: Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) co- operate in spore wall synthesis

7.1.1.1 Supplementary: Genbank

Tabelle 7-1. Durch das Screening einer Genbank von *S. coelicolor* M145 identifizierte Interaktionspartner der Mre- Proteine.

SCO	gefunden mit	Bezeichnung des Klons	Blast	Leserahmen	Aminosäuren	vermutete Funktion
305	PBP2	7PBP- F8	N	?		Membranprotein
434	RodZ	A10rodZ- G5	X	FALSCH	205- 478	Transporteruntereinheit eines maltose- und glucosespezifischen PTS- Systems
434	PBP2	PBP- gb- 2	X	FALSCH	205- 478	
1064	PBP2	9PBP- F10	X	KORREKT	113- 149	Integrales Zuckertransport Membranprotein
1070	Sfr	C15rodA- C6	N	FALSCH		Response Regulator
1385	Sfr	rodA- gb- 6	X	KORREKT	1- 246	Hypothetisches Protein
1403	RodZ	A3rodZ- G1	X	KORREKT	33- 143	Integrales Membranprotein
1403	MreC	mreC- DoGB14	X	KORREKT	33- 143	
1787	RodZ	gbrodZ1	X	FALSCH	315- 340	Transmembrankomponente eines Eisensiderophoraufnahmesystems
1940	Sfr	C48rodA- D2	X	FALSCH	216- 240	Sekretiertes Protein
1994	PBP2	B4PBP- G10	X	KORREKT	32- 110	Integrales Membranprotein
2097	MreD	9mreD- F12	X	KORREKT	21- 120	Membranprotein
2097	Sfr	A6rodA- A2	X	KORREKT	21- 120	
2097	RodZ	A9rodZ- G4	N	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	A20rodA- A3	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	A21rodA- A4	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	A25rodA- A5	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B1rodA- A6	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B7rodA- A8	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B12rodA- A9	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B14rodA- A11	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B15rodA- A12	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B17rodA- B1	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B19rodA- B2	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B22rodA- B4	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B23rodA- B5	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B26rodA- B7	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B27rodA- B8	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C2rodA- B10	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C3rodA- B11	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C4rodA- B12	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C5rodA- C1	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C6rodA- C2	X	KORREKT	21- 120	

SCO	gefunden mit	Bezeichnung des Klons	Blast	Leserahmen	Aminosäuren	vermutete Funktion
2097	Sfr	C7rodAfra- P2C2	X	KORREKT	21- 120	Membranprotein
2097	Sfr	C10rodA- C3	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C14rodA- C5	N	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C16rodA- C7	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	C17rodA- C8	N	KORREKT	21- 120	
2097	MreC	C21kmreC- E8	N	KORREKT	21- 120	
2097	MreD	D9mreD- D5	X	KORREKT	21- 120	
2097	MreD	F9mreD- E1	X	KORREKT	21- 120	
2097	MreD	mreD6- H9	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	B4rodA- A7	X	KORREKT	21- 120	
2097	RodZ	gbrodZ- 6	X	KORREKT	21- 120	
2097	MreD	mreDgbklon9	X	KORREKT	21- 120	
2097	MreC	mreCklon2	X	KORREKT	21- 120	
2097	MreD	mreD- gb-9	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	rodAgbklon11	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	rodAgbklon14	X	KORREKT	21- 120	
2097	RodZ	gbrodZ- 7	X	KORREKT	21- 120	
2097	Sfr	rodA- gb- 8	X	KORREKT	21- 120	
2124	Sfr	C36rodA- P2G1	X	KORREKT	139- 202	Membranprotein
2124	MreC	mreC- gb11	X	KORREKT	139- 202	
2124	MreC	mreCklon4	X	KORREKT	139- 202	
2187	MreD	gb- mreD- 5	X	KORREKT	29- 213	Konserviertes hypothetisches Protein
2520	PBP2	PBP- gb- 8	X	KORREKT	1- 219	Hypothetisches Protein
2578	MreC	mreC- gb- 14	X	KORREKT	176- 246	Membranprotein
2578	MreD	mreDgbklon7	X	KORREKT	176- 246	
2578	MreD	mreDgbklon3	X	KORREKT	176- 246	
2584	Sfr	B21rodA- B3	X	KORREKT	245- 228	Membranprotein
2584	MreC	mreC- gb- 7	X	KORREKT	145- 228	
2584	MreC	mreC- gb- 20	X	KORREKT	145- 228	
2584	MreC	mreCgbklon1	X	KORREKT	145- 228	
2669	MreC	C19kmreC- E7	N	?		Hypothetisches Protein
2836	Sfr	B24rodA- B6	X	FALSCH	400- 476	Glykosyltransferase
3045	RodZ	A13rodZ- G6	N	?		Sekretiertes Protein
3110	MreC	mreCklon5	X	KORREKT	1- 96	ABC Transportsystem
3110	MreC	mreC- gb- c7	X	KORREKT	1- 96	
3513	PBP2	B12PBP- H1	X	KORREKT	1- 169	Sekretiertes Protein
3513	Sfr	C26rodAfra- P2E2	X	KORREKT	1- 169	
3513	RodZ	gbrodZ- 2	X	KORREKT	1- 169	
3513	RodZ	gbrodZ- 14	X	KORREKT	1- 169	
3513	PBP2	pbpgbklon11	X	KORREKT	1- 169	
3513	PBP2	PBP- gb- 5	X	KORREKT	1- 169	

SCO	gefunden mit	Bezeichnung des Klons	Blast	Leserahmen	Aminosäuren	vermutete Funktion
3754	MreD	mreD1- H7	X	KORREKT	1- 197	integrale Membranuntereinheit eines ABC-Transporters
3754	MreD	D2kmreD- F4	X	KORREKT	1- 197	
3754	MreD	D3mreD- D4	X	KORREKT	1- 197	
3754	MreD	mreD- gb- b9	X	KORREKT	1- 197	
3754	MreC	mreC- gb- 10	X	KORREKT	1- 197	
3754	MreD	mreD- gb- 7	X	KORREKT	1- 197	
3927	MreD	mreD5- H8	X	KORREKT	19- 199	Membranprotein
4129	MreC	mreCGB- 2	X	KORREKT	51- 108	Membranprotein
4155	RodZ	A6rodZ- G2	X	KORREKT	36- 156	Response Regulator
4155	PBP2	B19PBP- H6	X	KORREKT	36- 156	
4155	PBP2	B6PBP- G11	X	KORREKT	36- 156	
4199	MreC	mreC- gb- 17	X	FALSCH		Hypothetisches Protein
4199	PBP2	PBP- gb- 10	X	FALSCH		
4597	MreD	G5mreD- E2	X	KORREKT	1- 249	Sensorkinase
4597	MreC	mreCGB- 6	X	KORREKT	1- 249	
4732	MreC	mreC- gb- 13	X	KORREKT	13- 286	Membranprotein
4733	MreC	mreC- gb- 10	X	FALSCH		Integrales Membranprotein
4754	MreD	E6mreD- D8	X	FALSCH		Transkriptionsregulator
4778	RodZ	A14rodZ- G7	X	KORREKT	257- 357	Serin/ Threoninkinase
4778	RodZ	A17rodZ- H3	X	KORREKT	257- 357	
4778	PBP2	B7BPB- G12	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C1kmreC- E4	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C2kmreC- E5	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C6rodA- P2B1	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C8rodA- P2C1	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C18kmreC- E6	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C25rodA- P2F1	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C27kmreC- E9	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C29kmreC- E10	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C30rodA- C10	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C32kmreC- E11	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C34rodA- C12	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C43kmreC- E12	X	KORREKT	257- 357	
4778	Sfr	C42rodA- P2A2	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreC	C50kmreC- F2	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreD	D2mreD- D3	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreD	D6kmreD- F5	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreD	D10mreD- D6	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreD	F2mreD- D9	X	KORREKT	257- 357	
4778	MreD	G9mreD- E3	X	KORREKT	257- 357	
4825	MreC	C51kmreC- F2	X	KORREKT	33- 178	Integrales Membranprotein
4825	PBP2	pbpgbklon12	X	KORREKT	33- 178	
4825	PBP2	PBP- gb- 4	X	KORREKT	33- 178	
4928	MreD	mreD20- H12	X	KORREKT	26- 212	Adenylatzyklase

SCO	gefunden mit	Bezeichnung des Klons	Blast	Leserahmen	Aminosäuren	vermutete Funktion
5039	MreC	mreCGB- 2	X	KORREKT	608- 716	PBP
5051	RodZ	A7rodZ- G3	X	FALSCH		Glykosyltransferase
5142	RodZ	A16rodZ- G9	X	KORREKT	1- 119	Sekretiertes Protein
5142	Sfr	C40rodA- D1	X	KORREKT	1- 119	
5142	MreC	mreC- 6	X	KORREKT	1- 119	
5317	Sfr	A5rodA- A1	X	FALSCH		Polyketid- β - ketoacylsynthase
5681	PBP2	3PBP- F7	N	?		Sensorkinase
5774	MreC	mreC- GB3	X	KORREKT	1- 102	Glutamatpermease
6494	MreD	mreD- gb- 17	X	KORREKT	27- 205	Membranprotein
6771	RodZ	A15rodZ- G8	X	KORREKT	1- 39	Kleines hydrophobes sekretiertes Protein
6771	Sfr	C11rodA- C4	X	KORREKT	1- 39	
6899	PBP2	8PBP- F9	X	KORREKT	1- 251	Membranprotein
6899	RodZ	B13PBP- H5	X	KORREKT	1- 251	
6899	Sfr	C33rodA- C11	X	KORREKT	1- 251	
7048	MreD	2mreD- F11	X	KORREKT	13- 306	Delta- Fettsäure -Desaturase
7048	PBP2	B23PBP- H2	X	KORREKT	13- 306	
7048	MreD	E3mreD- D7	X	KORREKT	13- 306	
7048	MreD	F8mreD- D12	X	KORREKT	13- 306	
7048	MreD	mreD7- H10	X	KORREKT	13- 306	
7048	MreD	mreD8- H11	X	KORREKT	13- 306	
7454	MreC	mreCklon1	X	KORREKT	1- 261	Membranprotein
7553	RodZ	A19rodZ- H4	X	FALSCH		Oxidoreduktase
7819	PBP2	1PBP- F6	X	FALSCH		Integrales Membranprotein

Tabelle 7-2. Die Anzahl der mit der Genbank gefundenen und sequenzierten Klone.

Bait	Cotransformanten auf LB ⁺ - Platten (berechnet)	Cotransformanten auf M63- Platten (nicht alle getestet)	Sequenzierte Konstrukte	Korrekt Leserahmen
pUT18c- mreB	250 000	12	4	0
pUT18- mreB	100 000	1000	0	0
pUT18c- mreC	180 000	1800	31	31
pUT18c- mreD	400 000	1740	30	26
pUT18c- pbp2	200 000	451	20	13
pUT18c- sfr	300 000	264	49	41
pUT18c- mbl	300 000	11	2	0
pUT18c- SCO6166	230 000	13	4	0
pUT18c- rodZ	100 000	100	14	13
pUT18- SCO2997	500 000	35	2	2
pUT18c- SCO2997	440 000	107	0	0
pUT18- SCO5365	400 000	9	0	0
pUT18c- SCO5365	420 000	200	0	0
Summe	3 820 000	5742	156	126

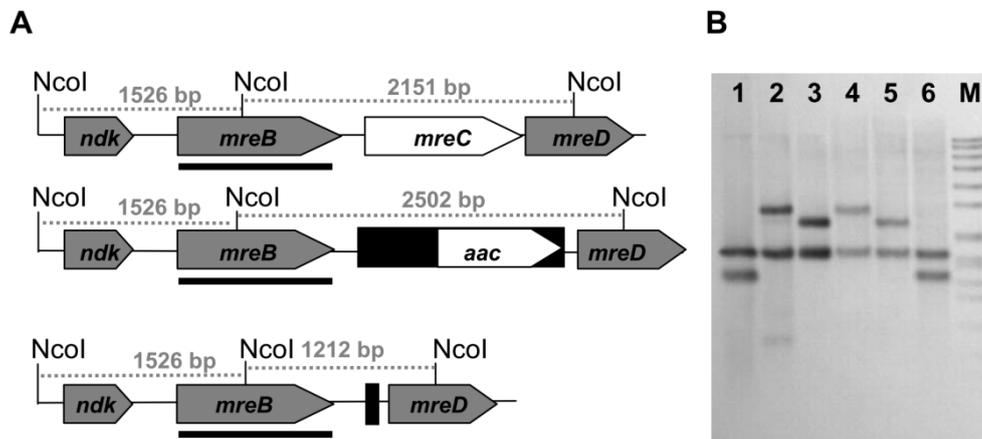
7.1.1.2 Supplementary: Geninaktivierungen *mre*- Gencluster und *SCO2097*

Fig. S1. Confirmation of the $\Delta mreC$ mutant genotype by Southern blotting. A) schematic drawing, B) Southern-blot. NcoI digested DNA was hybridized with an *mreB* probe (black line). The sizes of the hybridising fragments (grey dotted lines) are indicated. 1, SC88 $\Delta mreC$; 2, SC88 $\Delta mreC::aac$; 3, SC88; 4, $\Delta mreC::aac$; 5, M145; 6, $\Delta mreC$; M, DigVII Standard, Roche

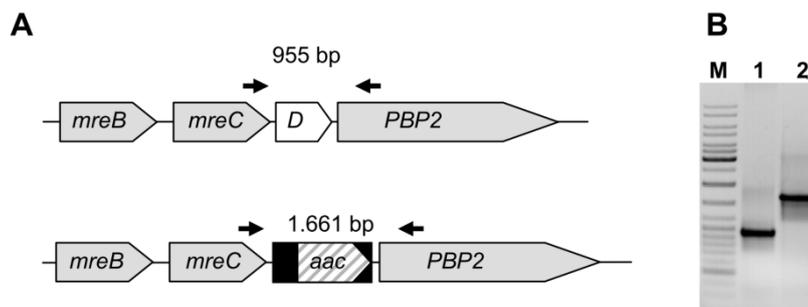


Fig. S2. Confirmation of the $\Delta mreD::aac$ mutant genotype by PCR. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. B) PCR-Analysis. M, 1 kb ladder, Fermentas, 1, M145, 2, $\Delta mreD-aac$

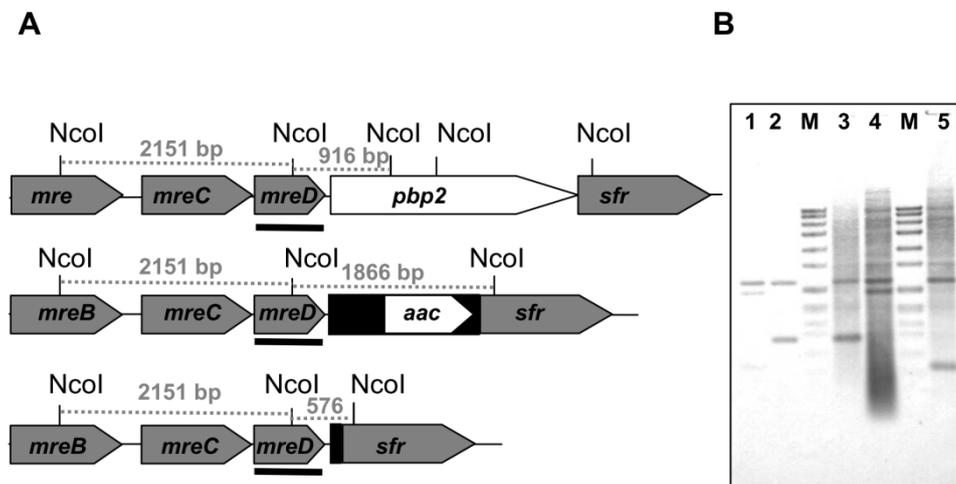


Fig. S3. Confirmation of the Δ *pbp2* mutant genotype by Southern blotting. A) schematic drawing, **B)** Southern-blot. NcoI digested DNA was hybridized with an *mreD* probe (black line). The sizes of the hybridising fragments (grey dotted lines) are indicated. 1, SC88 Δ *pbp2*; 2, SC88; M, DigVII Standard, Roche; 3, M145; 4, Δ *pbp2*::*aac*; M, DigVII Standard, Roche; 5, Δ *pbp2*

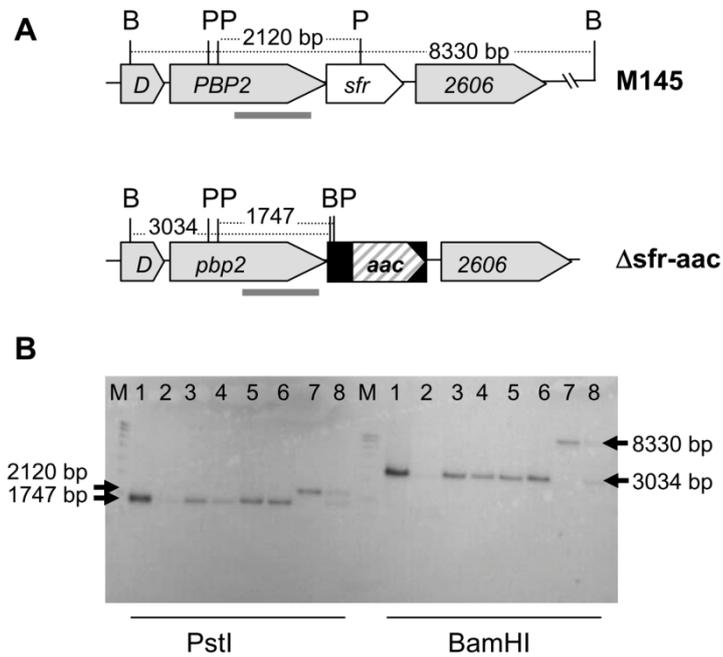


Fig. S4. Confirmation of the Δ sfr::aac mutant genotype by Southern-blotting. A) schematic drawing, Relevant restriction sites are given. B, BamHI; P, PstI. **B)** Southern-blot. PstI (left) and BamHI (right) digested DNA was hybridized with a *pbp2* probe (grey line). The sizes of the hybridizing fragments (dotted lines) are indicated. 1-6, Δ sfr::aac; 7, M145; 8, M145::C88 Δ sfr-aac; M, DigVII Standard, Roche

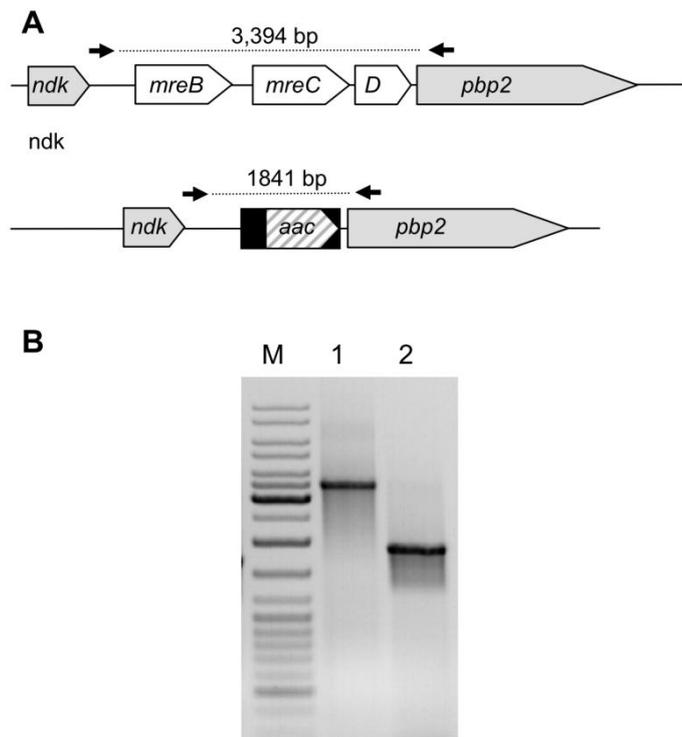


Fig. S5. Confirmation of the $\Delta mreBCD::aac$ mutant genotype by PCR analysis. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. **B)** PCR-analysis. M, 1 kbp ladder; 2, M145; 3, $\Delta mreBCD::aac$

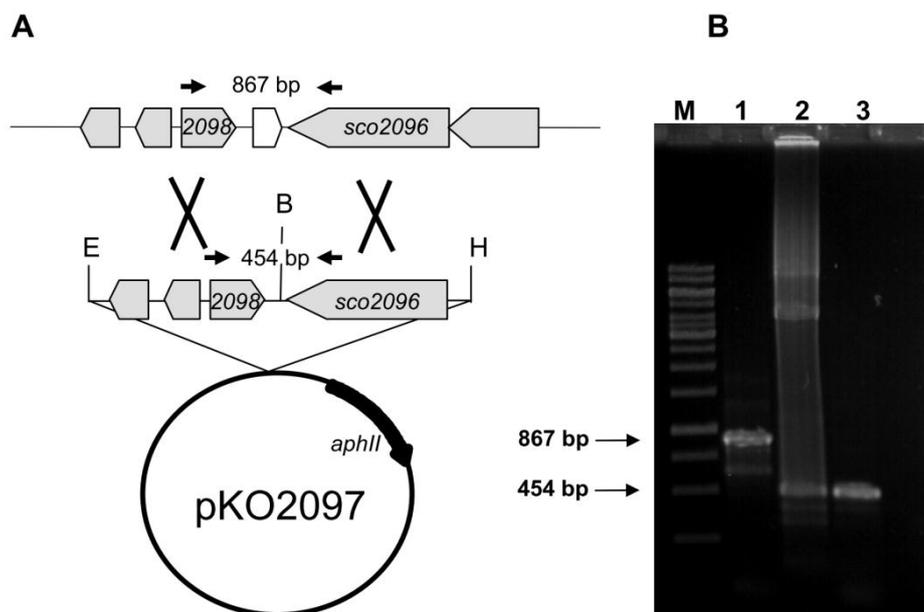


Fig. S11. Confirmation of the $\Delta sco2097$ mutant genotype by PCR analysis. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. **B)** PCR-analysis. M, 1 Kbp ladder, Fermentas; 1, M145; 2, pKO2097; 3, $\Delta sco2097$

7.1.1.3 Supplementary: Die Diversität der Genbank

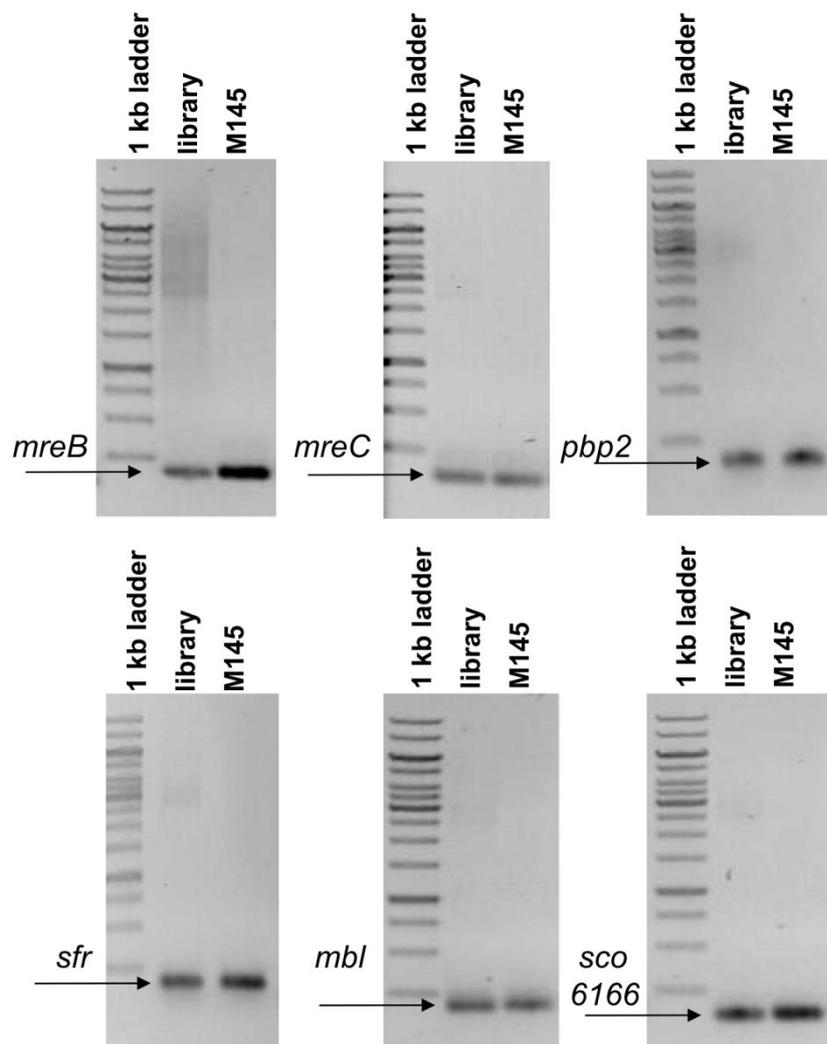


Fig. S10. Diversity of the *S. coelicolor* genomic library. Transformants were pooled, plasmid DNA was isolated from all pooled transformants and analysed by PCR with primer pairs, designed to amplify fragments of *mreB*, *mreC*, *pbp2*, *sfr*, *mbi*, and *sco6166*. All fragments could be amplified from the pooled library. 1kb ladder, Fermentas; library, pooled M145 library; M145, *S. coelicolor* genomic DNA

7.1.1.4 Supplementary: Die Überexpression von Mre- Proteinen

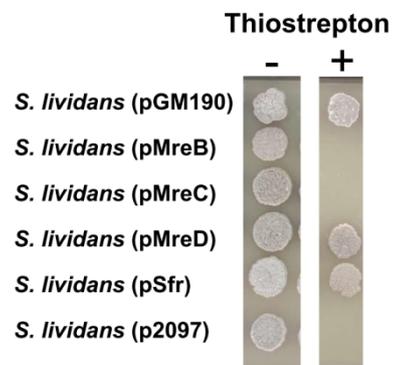


Fig. S12. Effect of over-expression of *sco2097* and *mre* genes on viability. All genes were cloned under control of the thiostrepton inducible *tipA* promoter on derivatives of the high copy number vector pGM190. Transformants were spotted on MS agar (-) and MS agar containing 25 µg/ml thiostrepton (+). Strains, expressing *mreB*, *mreC* or *sco2097* survived only under non-inducing conditions.

Tabelle 7-4. BTH: Farbentwicklung auf McConkey. Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18c.

		pUT18c											
		2890	TagH	TagF	TagO	FtsI	2897	3580	3901	4132	5039		
pKT25	MreB												
	MreC												
	MreD												
	PBP2												
	Sfr												
	SAM												
	Mbl												
	SCO6166												
	FtsZ												
	RodZ												
	SCO2980												
	TagH												
	TagF												
	TagO												
	FtsI												
	SCO2897												
	SCO3580												
	SCO3901												
	SCO4132												
	SCO5039												

Tabelle 7-5. BTH: Farbentwicklung auf McConkey: Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18.

		pUT18										
		MreB	MreC	Mbl	SCO6166	FtsZ	RodZ	TagA	TagF			
pKT25	MreB											
	MreC											
	MreD											
	PBP2											
	Sfr											
	SAM											
	Mbl											
	SCO6166											
	FtsZ											
	RodZ											
	SCO20980											
	TagF											
	TagH											
	TagO											
	FtsI											
	SCO2897											
	SCO3580											
	SCO3901											
	SCO4132											
	SCO5039											

Tabelle 7-6. BTH: Farbentwicklung auf McConkey: Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18.

		pUT18							
		TagH	TagO	FtsI	SCO2897	SCO3580	SCO3901	SCO4132	SCO5039
pKT25	MreB								
	MreC								
	MreD								
	PBP2								
	Sfr								
	SAM								
	Mbl								
	SCO6166								
	FtsZ								
	RodZ								
	SCO2980								
	TagF								
	TagH								
	TagO								
	FtsI								
	SCO2897								
	SCO3580								
	SCO3901								
	SCO4132								
	SCO5039								

Tabelle 7-7. Interpretation der Interaktionsstärke auf McConkey- Agar.

	keine Interaktion
	schwache Interaktion
	Interaktion
	starke Interaktion

Tabelle 7-8. Interpretation der β - Galaktosidaseaktivität [units/mg].

	<50 units/mg	Keine Interaktion
	50-150 units/mg	Schwache Interaktion
	150-500 units/mg	Interaktion
	500-1000 units/mg	Starke Interaktion
	>1000 units/mg	Sehr starke Interaktion
	nicht bestimmt,	da keine Interaktion auf McConkey

Tabelle 7-9. BTH: β - Galaktosidasemessungen. Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18c.

		pUT18c									
units/mg	MreB	MreC	MreD	PBP2	Sfr	SAM	Mbl	SCO6166	FtsZ	RodZ	
pKT25	MreB	4±15	-5±10	4±5	-1±4	1±17	7±26	1±5	3±1	7±6	585±79
	MreC	1±8	659±71	326±40	672±58	105±44	2±10	6±8	-4±7	3±8	545±61
	MreD	4±5	142±28	33±23	24±17	7±8	-2±4	4±9	3±4	0±5	67±20
	PBP2	-3±2	250±24	65±8	179±49	674±98	2±9	4±9	1±6	-1±3	167±28
	Sfr	2±1	205±21	11±17	966±125	6±4	4±11	-3±6	-9±10	2±12	95±19
	SAM										
	Mbl	-8±8	-5±9	7±7	13±3	8±14	3±7	1±5	9±5	1±6	8±3
	SCO6166	-4±7	-2±6	1±0	10±19	0±9	3±4	4±5	4±1	-3±5	2±10
	FtsZ	4±14	10±16	12±5	2±7	8±4	8±13	-9±11	6±20	269±53	7±15
	RodZ	149±67	166±37	325±81	191±50	175±53	-3±4	6±7	4±5	5±8	681±88
	SCO2980					5±9					
	TagH										
	TagF										
	TagO										
	FtsI	0±16	169±49	61±10	169±30	17±5	-4±5	2±5	5±12	1±14	193±18
	SCO2897										
	SCO3580	5±7	12±2	6±2	8±6	5±7	3±11	1±3	3±6	-2±15	10±8
	SCO3901	-2±15	60±12	21±11	55±17	17±11	-13±0	-4±8	-1±6	4±10	49±18
SCO4132	-2±8	5±11	-1±5	-6±8	-9±13	0±13	3±18	7±8	2±8	2±8	
SCO5039											

Tabelle 7-10. BTH: β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen. Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18c.

		pUT18c									
units/mg	2980	TagH	TagF	TagO	FtsI	2897	3580	3901	4132	5039	
pKT25	MreB				0±7		9±13	4±12			
	MreC				645±20		62±13	488±79			
	MreD				23±10		9±6	9±9			
	PBP2				147±18		8±3	727±24			
	Sfr	-1±7			52±6		6±14	54±10			
	SAM										
	Mbl				-5±10		-3±3	19±11			
	SCO6166				-5±19		2±2	6±6	-1±5		
	FtsZ				-3±3		8±3	1±8			
	RodZ				361±43		35±6	113±23			
	SCO2980										
	TagH										
	TagF										
	TagO										
	FtsI			-1±10	2±3	258±57		18±6	268±33	6±4	
	SCO2897					-1±15		5±2	8±8		
	SCO3580					13±2		0±4	9±7		
	SCO3901					80±53		13±9	19±13		
SCO4132					3±8		8±6	9±9			
SCO5039							3±11	4±15			

Tabelle 7-11. BTH: β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen. Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18.

		pUT18							
	units/mg	MreB	MreC	Mbl	SCO6166	FtsZ	RodZ	SCO2980	TagF
pKT25	MreB				-1±7				
	MreC								
	MreD								
	PBP2								
	Sfr							2±1	
	SAM								
	Mbl				4±1				
	SCO6166				1±8				
	FtsZ					56±15			-3±4
	RodZ								
	SCO2980								
	TagF								
	TagG								
	TagO								
	FtsI								
	SCO2897								
	SCO3580								
	SCO3901			4±8	7±1				
SCO4132				12±11					
SCO5039									

Tabelle 7-12. BTH: β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen: Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18.

		pUT18							
	units/mg	TagH	TagO	FtsI	SCO2897	SCO3580	SCO3901	SCO4132	SCO5039
pKT25	MreB								
	MreC								
	MreD								
	PBP2								
	Sfr								
	SAM								
	Mbl								
	SCO6166							4±9	
	FtsZ								
	RodZ								
	SCO2980								
	TagF								
	TagH								
	TagO								
	FtsI								
	SCO2897								
	SCO3580								
	SCO3901								
SCO4132									
SCO5039									

Tabelle 7-13. BTH: Interaktionen von mit der Genbank identifizierten Proteinen. Farbentwicklung auf McConkey- Agar.

		pKT25					
		SCO2097	SCO2578	SCO2584	SCO3754	SCO4129	SCO4778
pUT18c	MreB						
	MreC						
	MreD						
	PBP2						
	Sfr						
	SAM						
	Mbl						
	SCO6166						
	FtsZ						
	RodZ						
	SCO2980						
	TagH						
	TagF						
	TagO						
	FtsI						
	SCO2897						
	SCO3580						
	SCO3901						
	SCO4132						
	SCO5039						
pUT18	MreB						
	MreC						
	Mbl						
	SCO6166						
	FtsZ						
	RodZ						
	SCO2980						
	TagH						
	TagF						
	TagO						
	FtsI						
	SCO2897						
	SCO3580						
	SCO3901						
	SCO4132						
	SCO5039						

Tabelle 7-14. BTH: β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen von mit der Genbank identifizierten Proteinen.

		pKT25					
units/mg	SCO2097	SCO2578	SCO2584	SCO3754	SCO4129	SCO4778	
pUT18c	MreB	9±10	54±11	13±9	4±8	-6±11	26±12
	MreC	1548±135	1485±138	1453±205	116±8	864±26	1431±122
	MreD	529±54	777±46	611±14	197±13	331±47	563±45
	PBP2	1017±55	1402±84	936±85	461±60	505±43	1069±107
	Sfr	699±64	755±62	557±13	180±53	398±55	554±81
	SAM						
	Mbl		-2±1				
	SCO6166		-8±5				
	FtsZ	32±23	45±11	30±10	15±17	32±2	30±40
	RodZ	1847±189	1678±145	1600±150	459±43	1062±104	1318±142
	SCO2980	38±17	47±10	65±21	8±4	50±12	80±21
	TagH						
	TagF	-1±3	5±8	1±16	0±3	2±3	5±7
	TagO			23±9		4±5	
	FtsI	761±92	1353±12	1747±203	366±26	847±72	522±11
	SCO2897						
	SCO3580	366±95	360±10	183±8	35±34	178±22	300±26
	SCO3901	1170±203	908±161	1180±200	391±63	489±110	1092±135
	SCO4132						
	SCO5039						
pUT18	MreB						
	MreC						
	Mbl		1±2				
	SCO6166						
	FtsZ					16±17	
	RodZ	36±25					
	SCO2980		46±13			20±25	
	TagH			13±13			
	TagF			3±3			
	TagO		6±6	46±18		5±9	8±16
	FtsI						
	SCO2897						
	SCO3580						
	SCO3901						
	SCO4132						
SCO5039							

7.1.3 Das BTH: Konstruierte Plasmide

Tabelle 7-15. Für das BTH konstruierte Plasmide.

	pUT18	pUT18c	pKT25
<i>mreB</i> (SCO2611)	☺	☺	☺
<i>mreC</i> (SCO2610)	☺	☺	☺
<i>mreD</i> (SCO2609)	-	☺	☺
<i>PBP2</i> (SCO2608)	-	☺	☺
<i>Sfr</i> (SCO2607)	-	☺	☺
<i>SAM</i> (SCO2606)	-	☺	☺
<i>mbl</i> (SCO2451)	☺	☺	☺
<i>SCO6166</i>	☺	☺	☺
<i>ftsZ</i> (SCO2082)	☺	☺	☺
<i>ftsI</i> (SCO2090)	☺	☺	☺
<i>rodZ</i> (SCO2751)	☺	☺	☺
<i>SCO2897</i>	☺	☺	☺
<i>SCO3580</i>	☺	☺	☺
<i>SCO3901</i>	☺	☺	☺
<i>SCO4132</i>	☺	☺	☺
<i>SCO5038</i>	☺	☺	☺
<i>SCO2980</i>	☺	☺	☺
<i>SCO2996 (tagH)</i>	☺	☺	☺
<i>SCO2997 (tagF)</i>	☺	☺	☺
<i>SCO5365 (tagO)</i>	☺	☺	☺

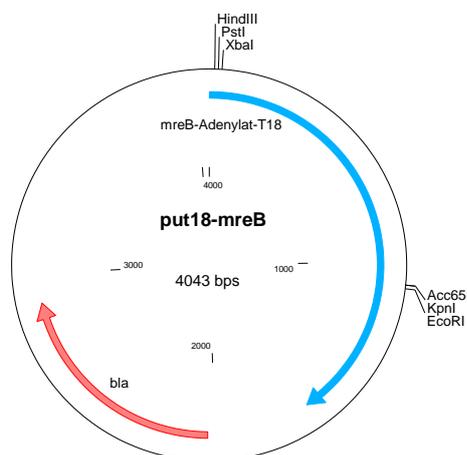


Abbildung 7-1. pUT18- mreB

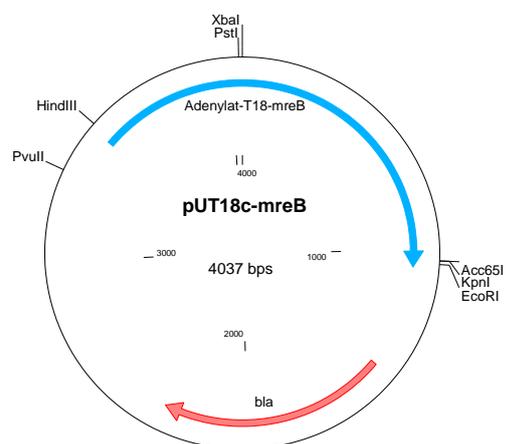


Abbildung 7-2. pUT18c- mreB

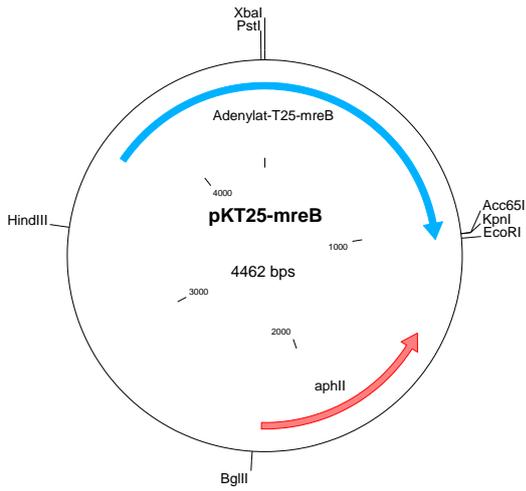


Abbildung 7-3. pKT25- mreB

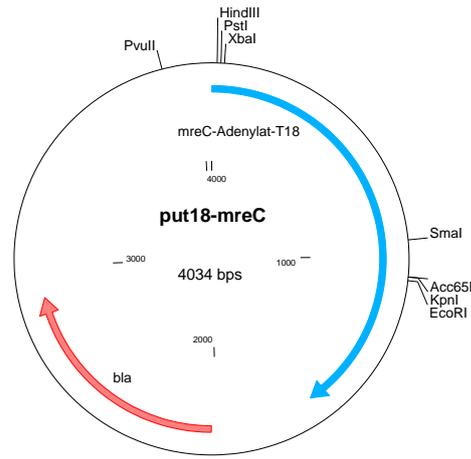


Abbildung 7-4. pUT18- mreC

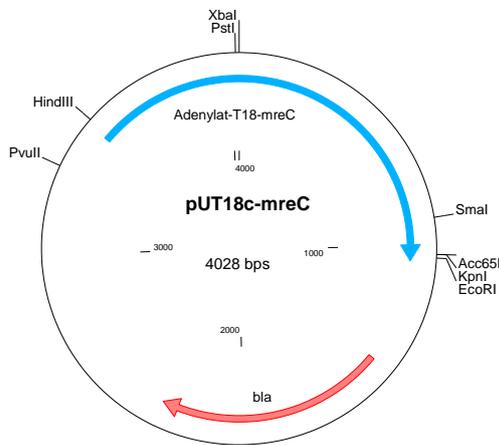


Abbildung 7-5. pUT18c- mreC

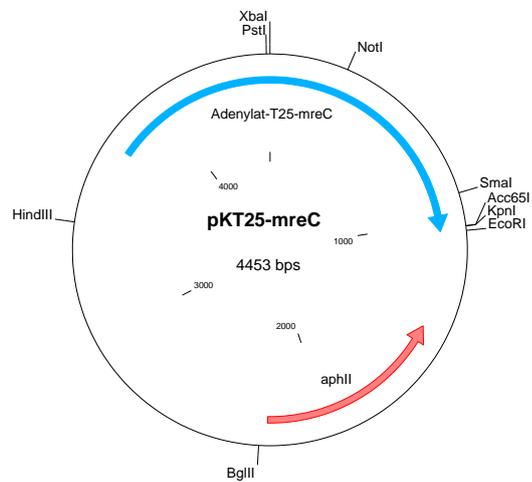


Abbildung 7-6. pKT25- mreC

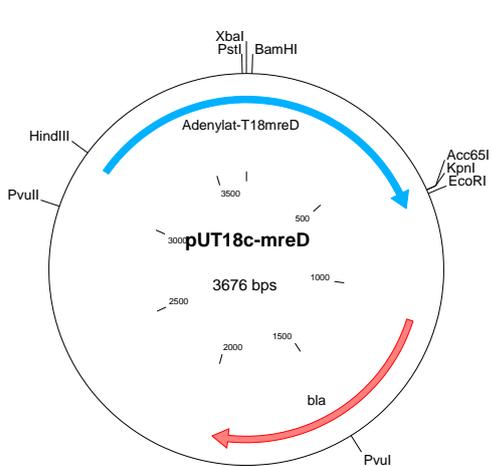


Abbildung 7-7. pUT18c- mreD

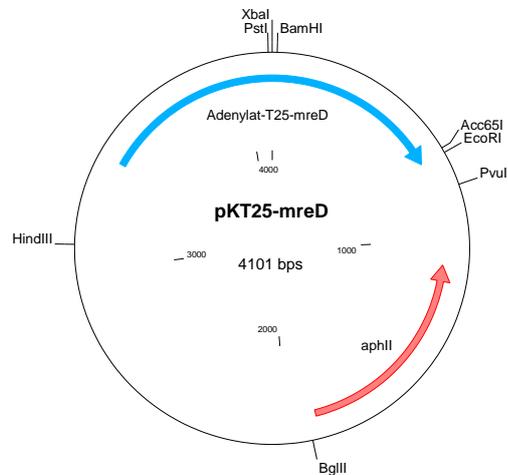


Abbildung 7-8. pKT25- mreD

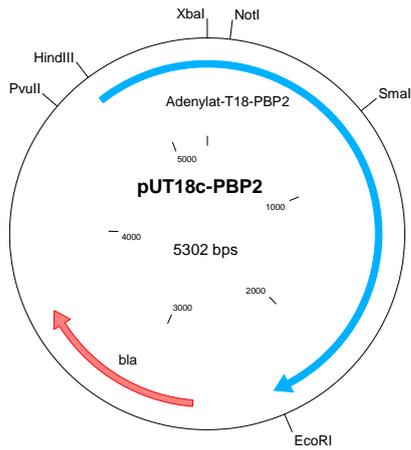


Abbildung 7-9. pUT18c- PBP2

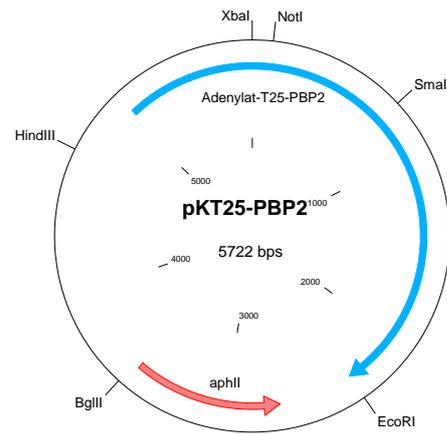


Abbildung 7-10. pKT25- PBP2

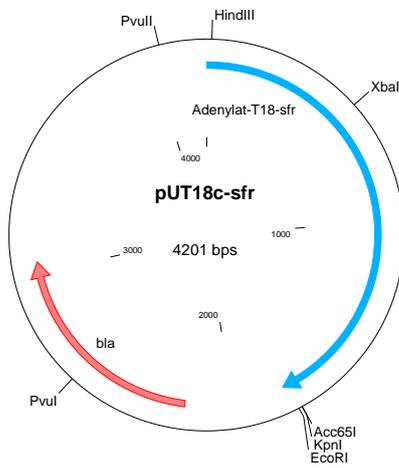


Abbildung 7-11. pUT18c- sfr

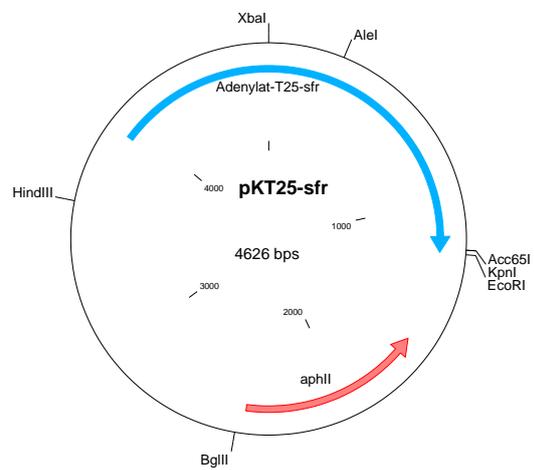


Abbildung 7-12. pKT25- sfr

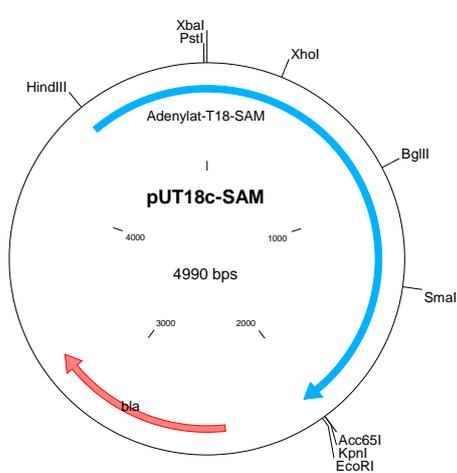


Abbildung 7-13. pUT18c- SAM

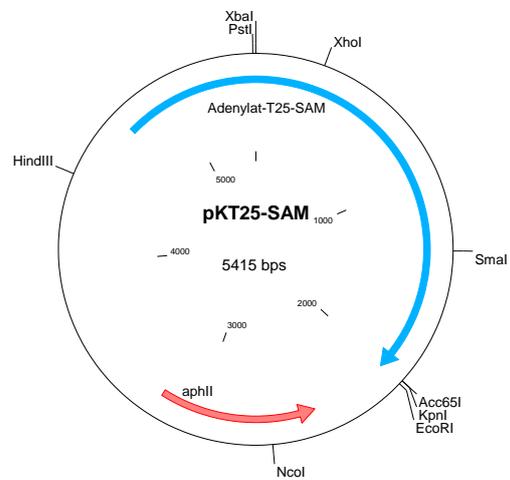


Abbildung 7-14. pKT25- SAM

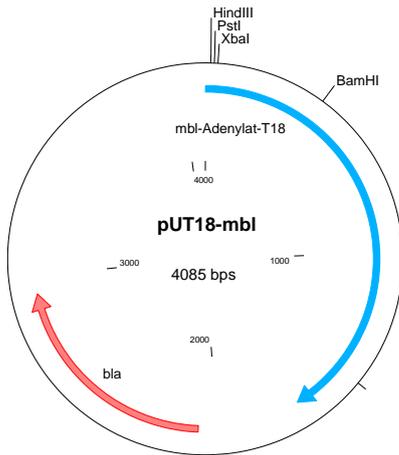


Abbildung 7-15. pUT18- mbl

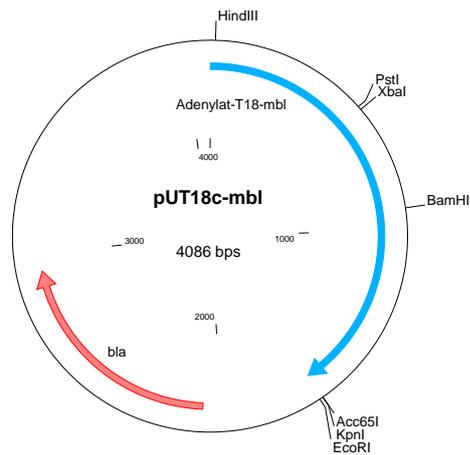


Abbildung 7-16. pUT18c- mbl

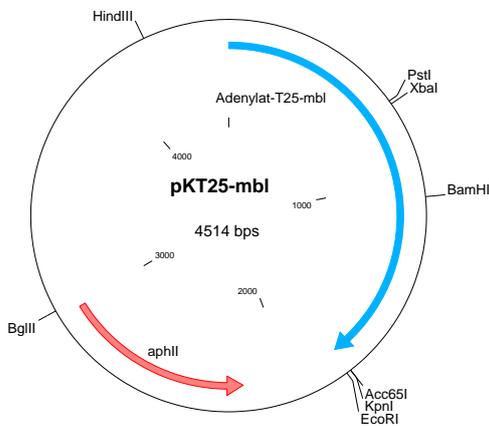


Abbildung 7-17. pKT25- mbl

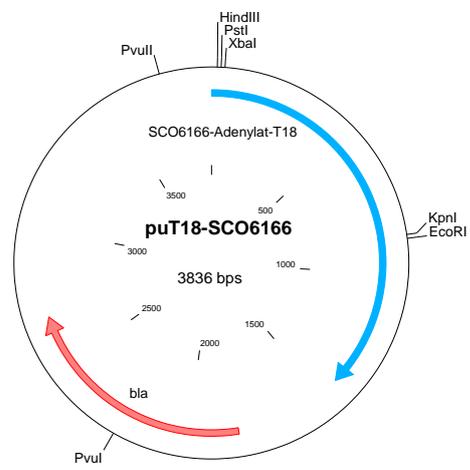


Abbildung 7-18. puT18- SCO6166

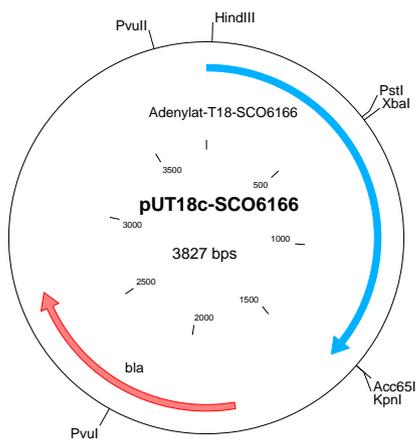


Abbildung 7-19. pUT18c- SCO6166

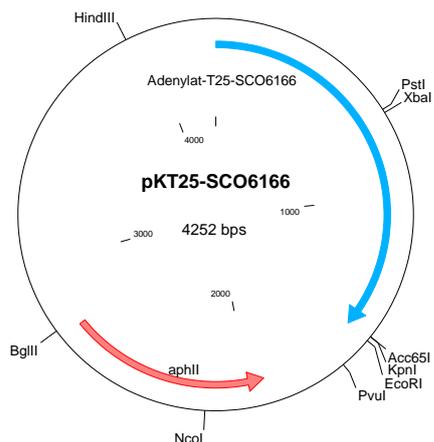


Abbildung 7-20. pKT25- SCO6166

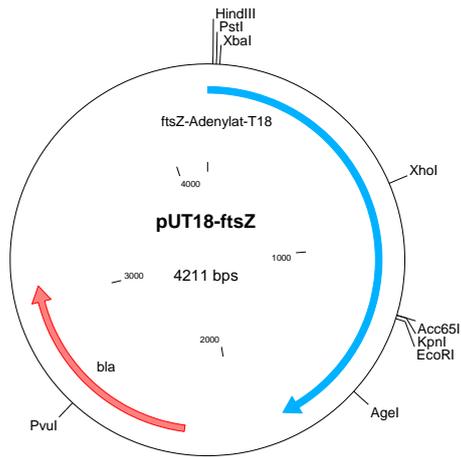


Abbildung 7-21. pUT18- ftsZ

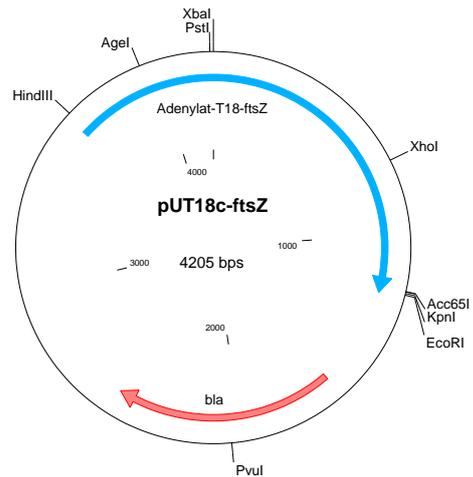


Abbildung 7-22. pUT18c- ftsZ

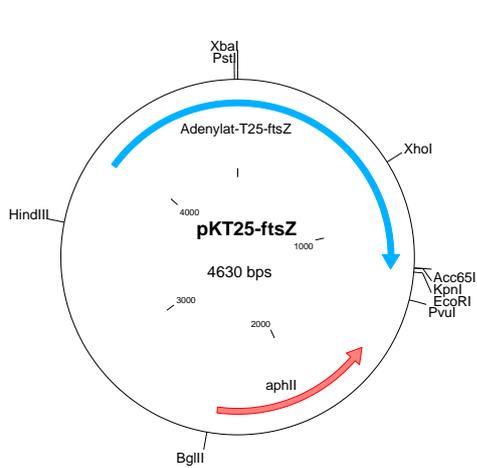


Abbildung 7-23. pKT25- ftsZ

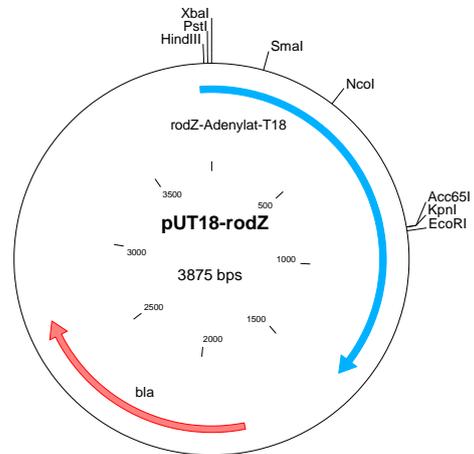


Abbildung 7-24. pUT18- rodZ

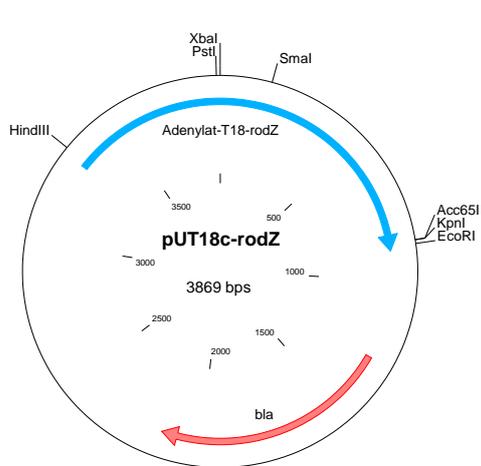


Abbildung 7-25. pUT18c- rodZ

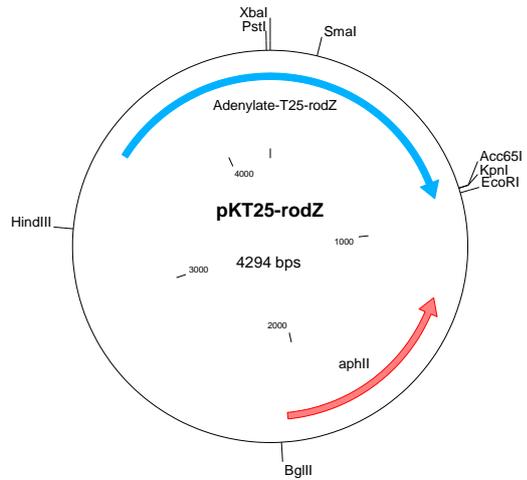


Abbildung 7-26. pKT25- rodZ

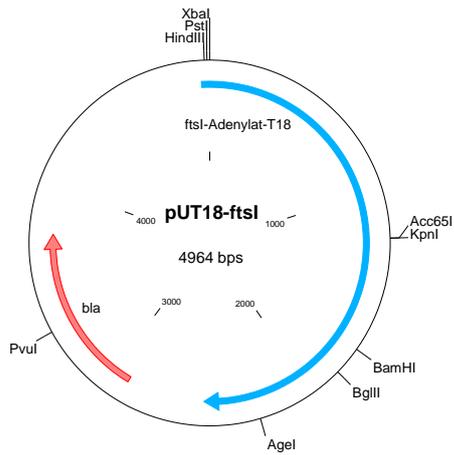


Abbildung 7-27. pUT18- ftsI

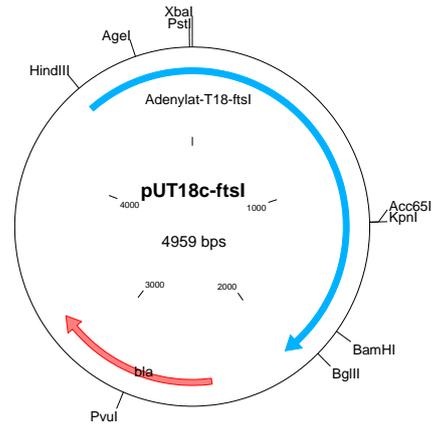


Abbildung 7-28. pUT18c- ftsI

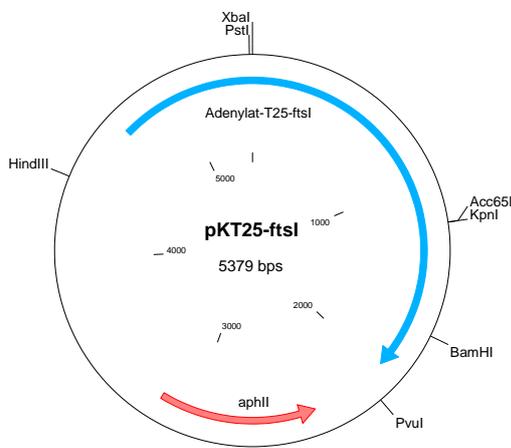


Abbildung 7-29. pKT25- ftsI

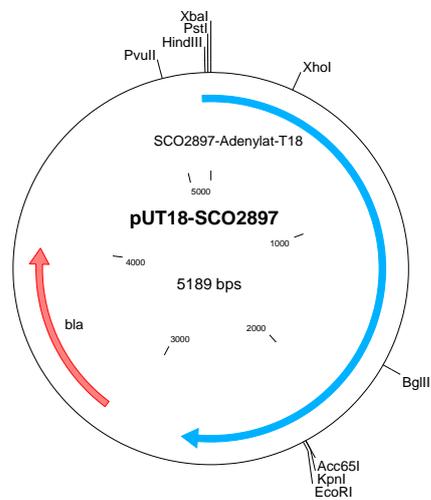


Abbildung 7-30. pUT18- SCO2897

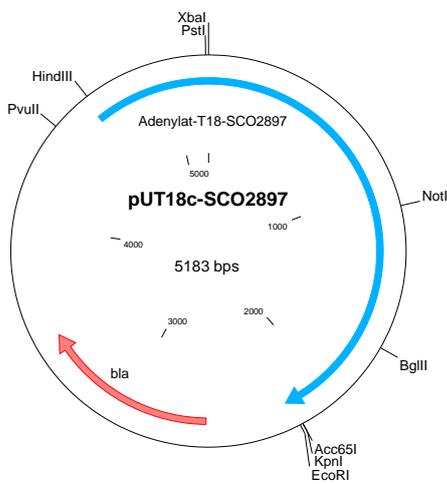


Abbildung 7-31. pUT18c- SCO2897

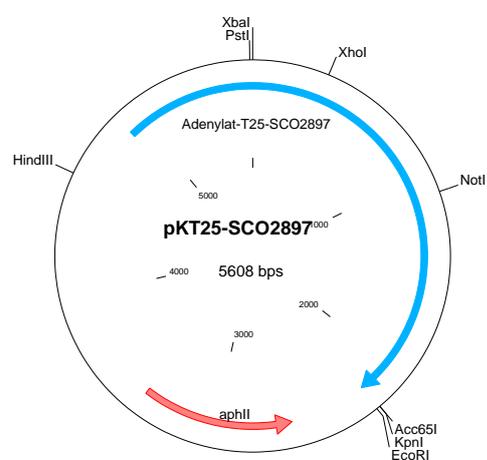


Abbildung 7-32. pKT25- SCO2897

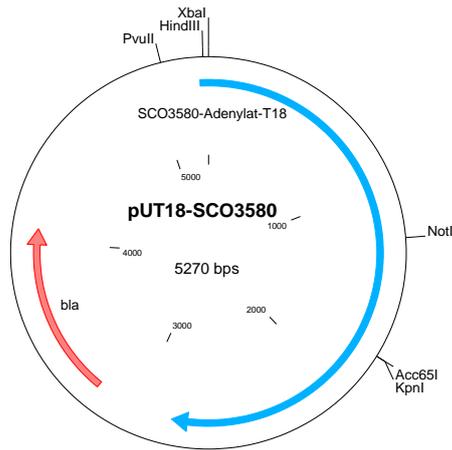


Abbildung 7-33. pUT18- SCO3580

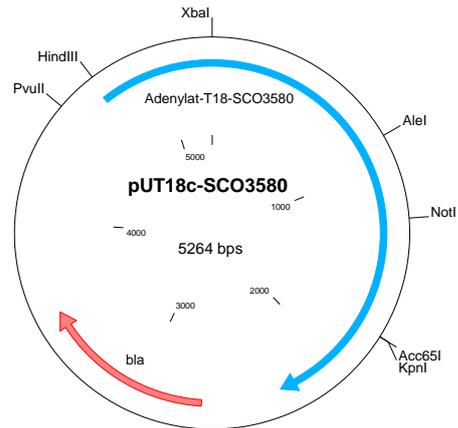


Abbildung 7-34. pUT18c- SCO3580

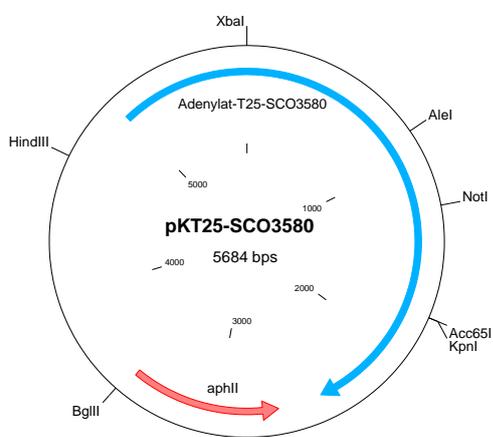


Abbildung 7-35. pKT25- SCO3580

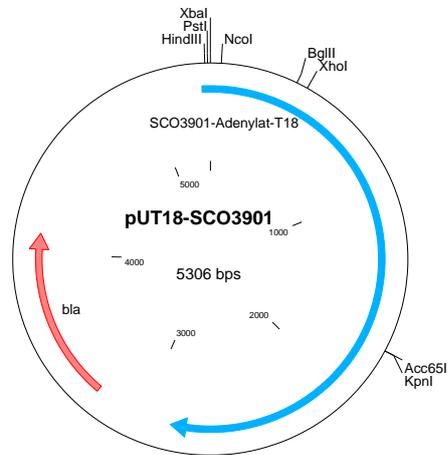


Abbildung 7-36. pUT18- SCO3901

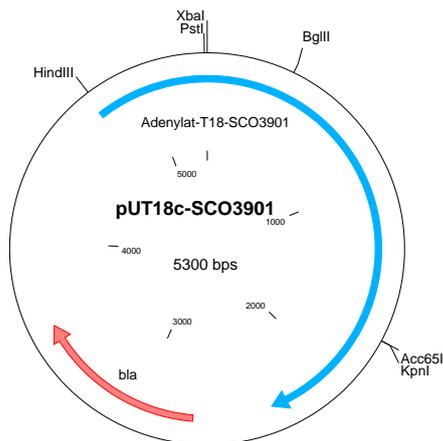


Abbildung 7-37. pUT18c- SCO3901

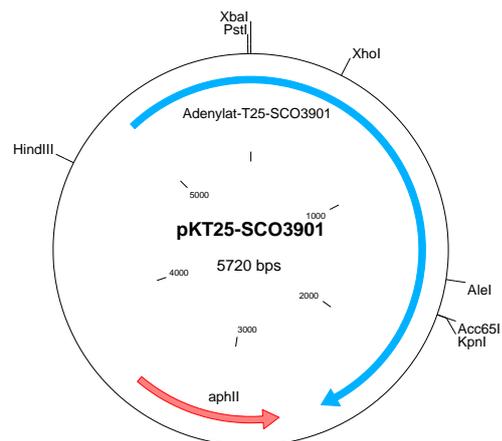


Abbildung 7-38. pKT25- SCO3901

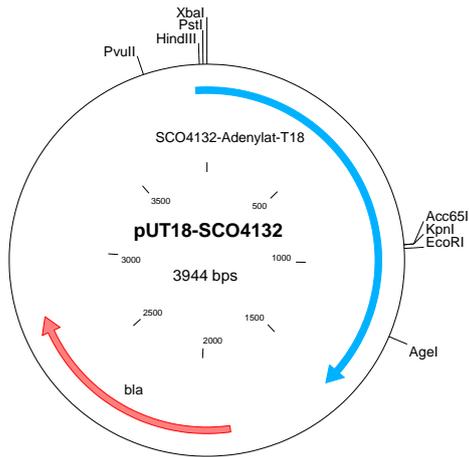


Abbildung 7-39. pUT18- SCO4132

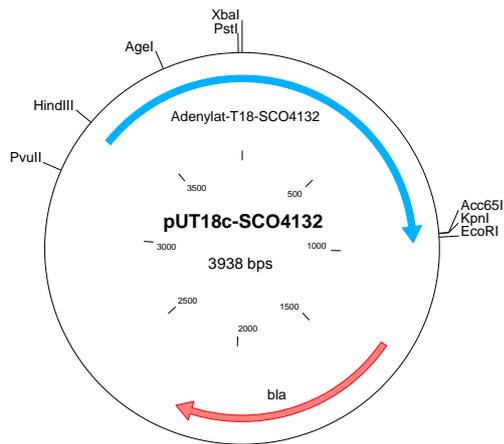


Abbildung 7-40. pUT18c- SCO4132

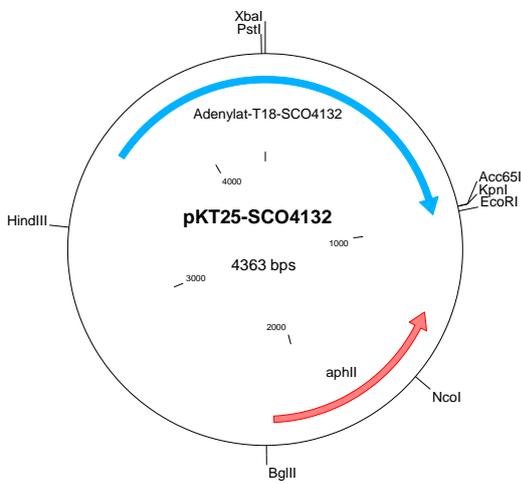


Abbildung 7-41. pKT25- SCO4132

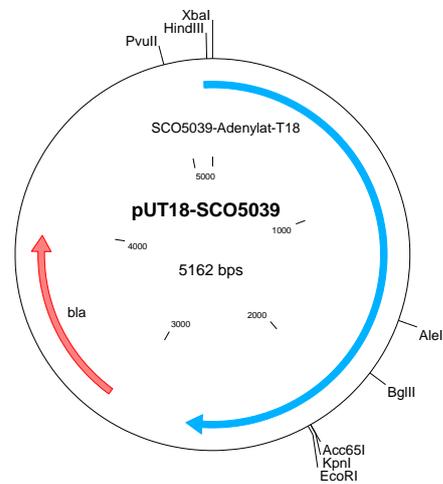


Abbildung 7-42. pUT18- SCO5039

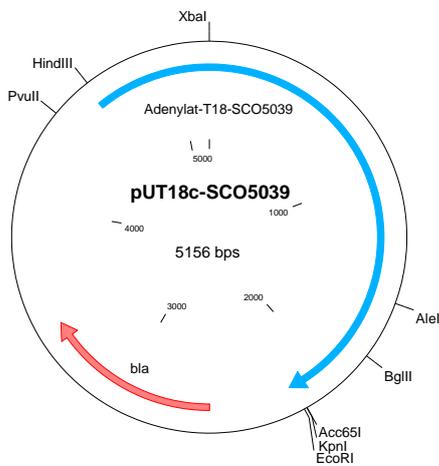


Abbildung 7-43. pUT18c- SCO5039

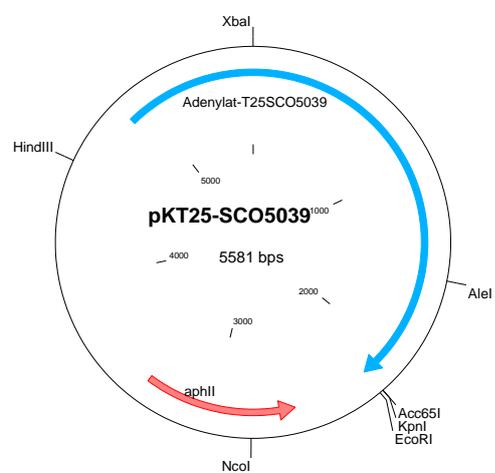


Abbildung 7-44. pKT25- SCO5039

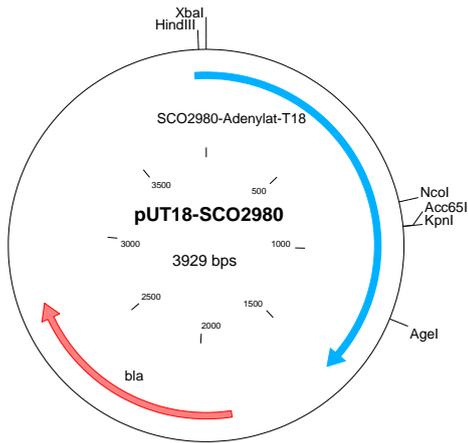


Abbildung 7-45. pUT18- SCO2980

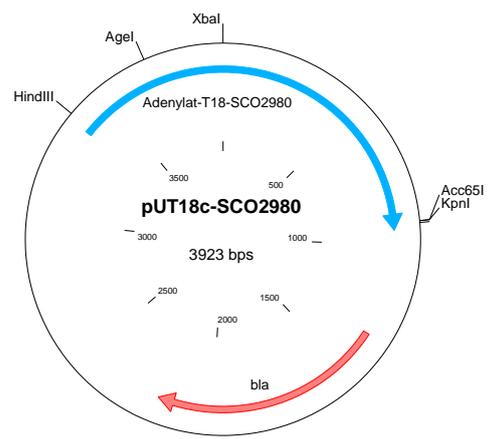


Abbildung 7-46. pUT18c- SCO2980

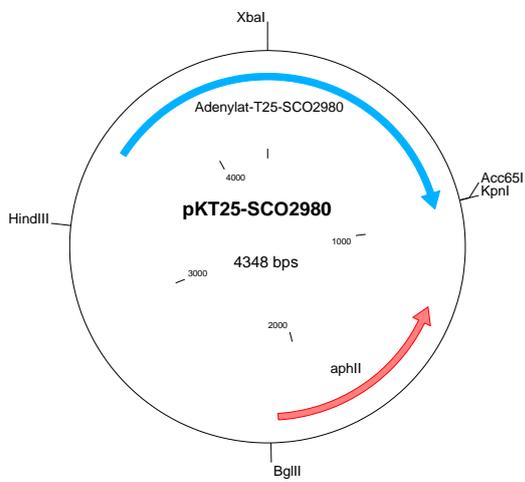


Abbildung 7-47. pKT25- SCO2980

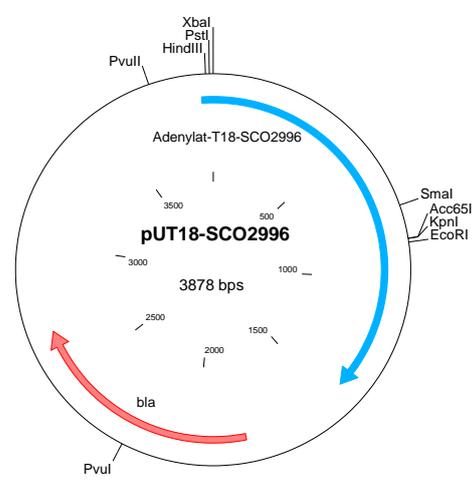


Abbildung 7-48. pUT18- SCO2996

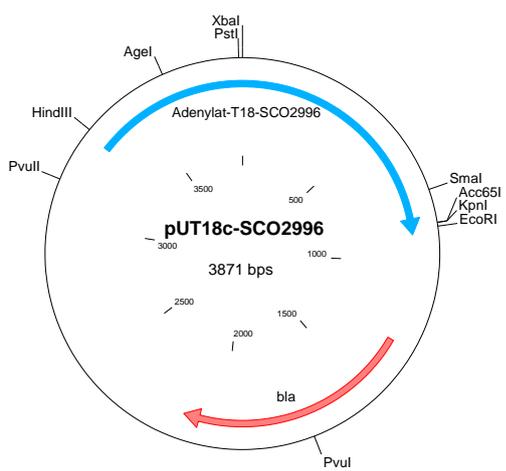


Abbildung 7-49. pUT18c- SCO2996

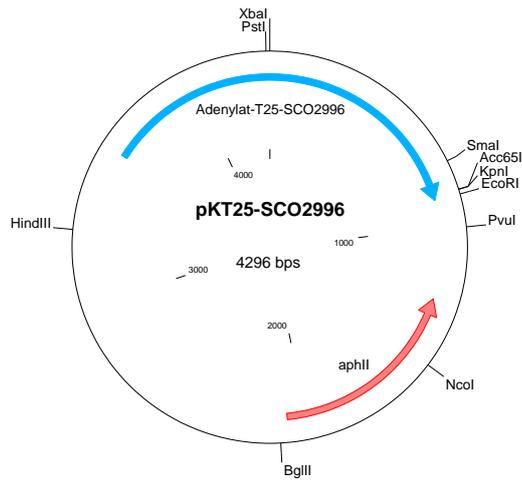


Abbildung 7-50. pKT25- SCO2996

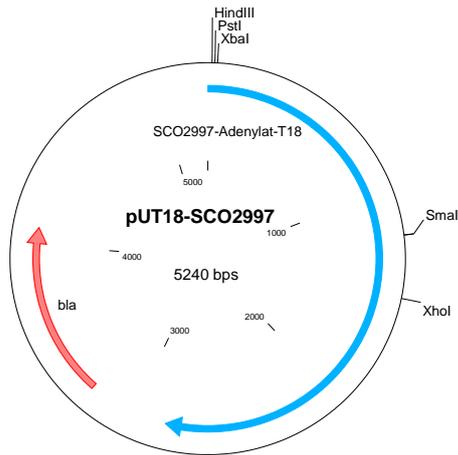


Abbildung 7-51. pUT18- SCO2997

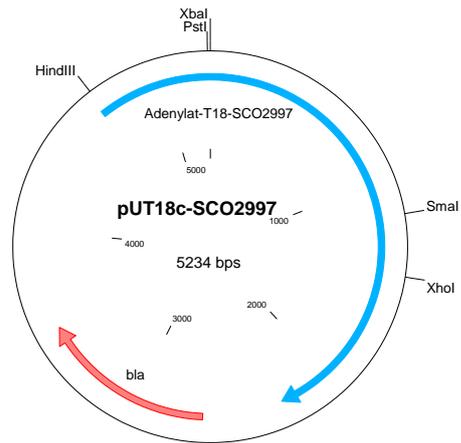


Abbildung 7-52. pUT18c- SCO2997

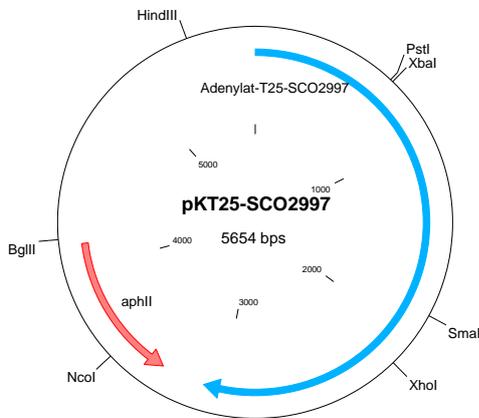


Abbildung 7-53. pKT25- SCO2997

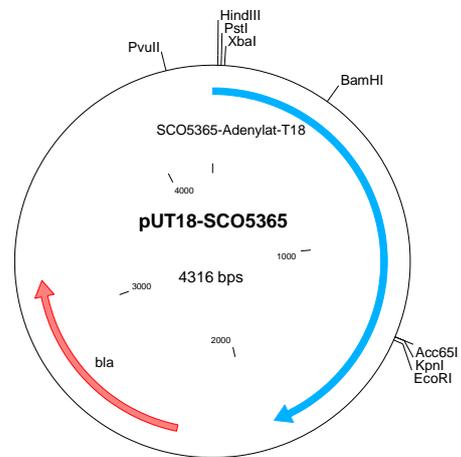


Abbildung 7-54. pUT18- SCO5365

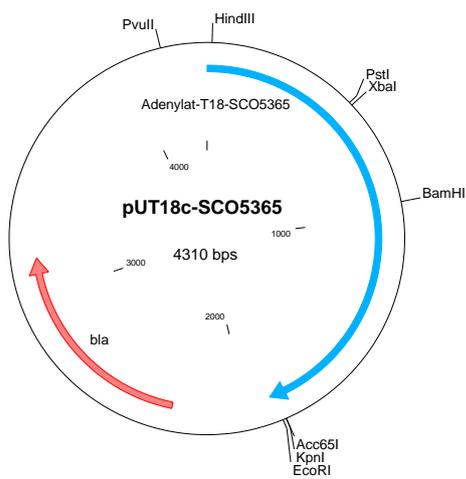


Abbildung 7-55. pUT18c- SCO5365

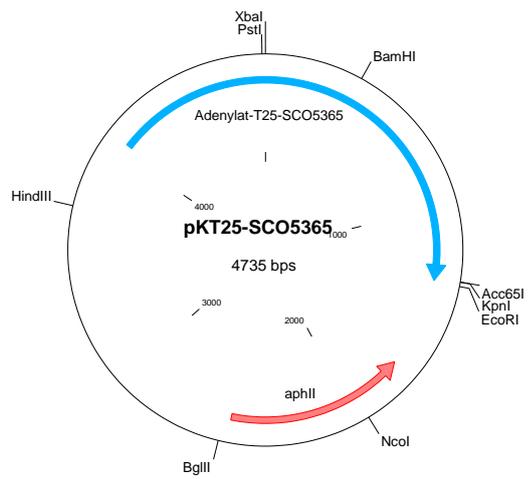


Abbildung 7-56. pKT25- SCO5365

7.1.4 Expressionsplasmide

7.1.4.1 Expressionsplasmide für *E. coli*

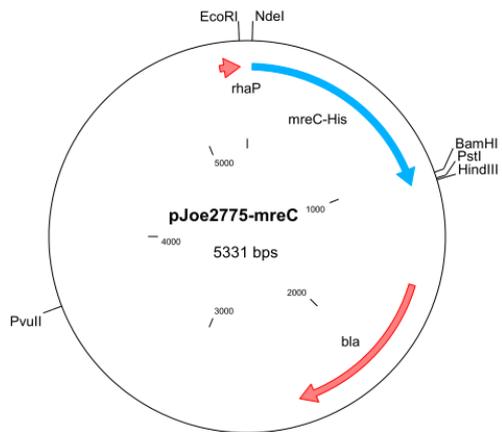


Abbildung 7-57. pYT1- mreC

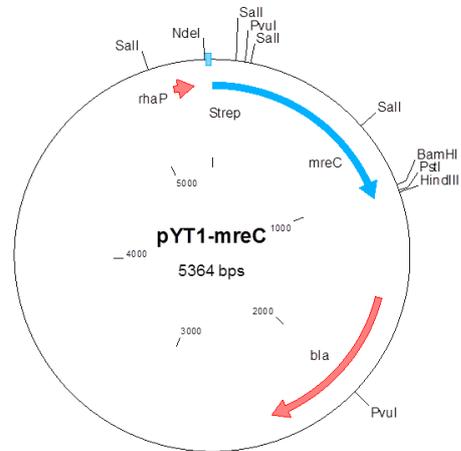


Abbildung 7-58. pJoe2775- mreC

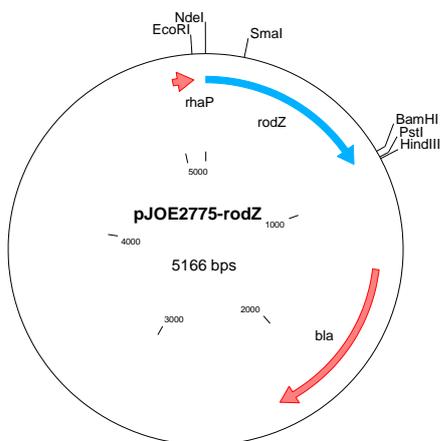


Abbildung 7-59. pJOE2775- rodZ

7.1.4.2 Expressionsplasmide für Streptomyceten

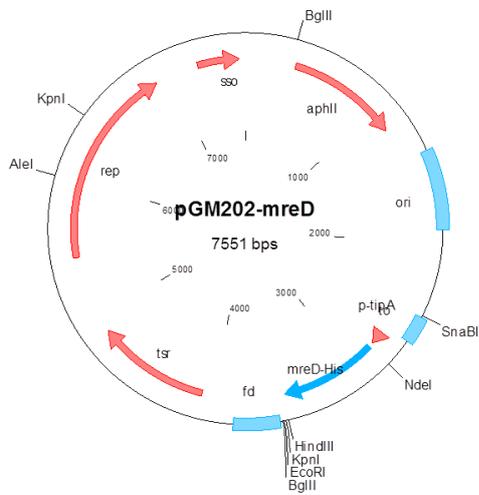


Abbildung 7-60. pGM202- mreD

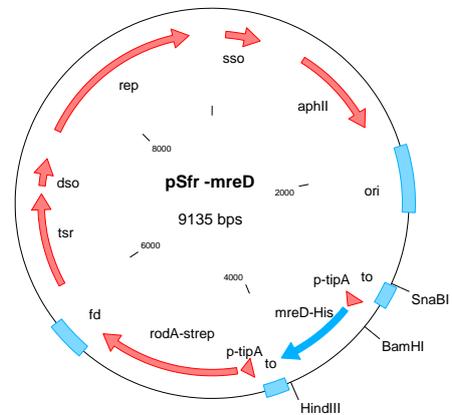


Abbildung 7-61. pSfr- mreD

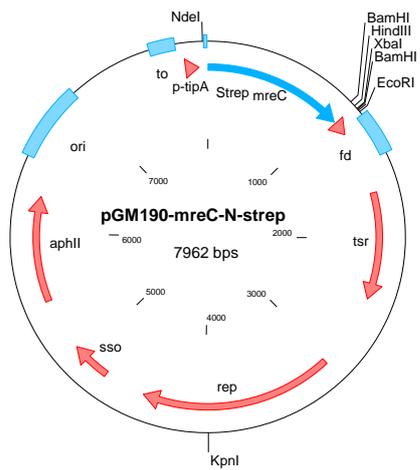


Abbildung 7-62. pGM190- mreC

7.1.5 **Supplementary information: The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis**

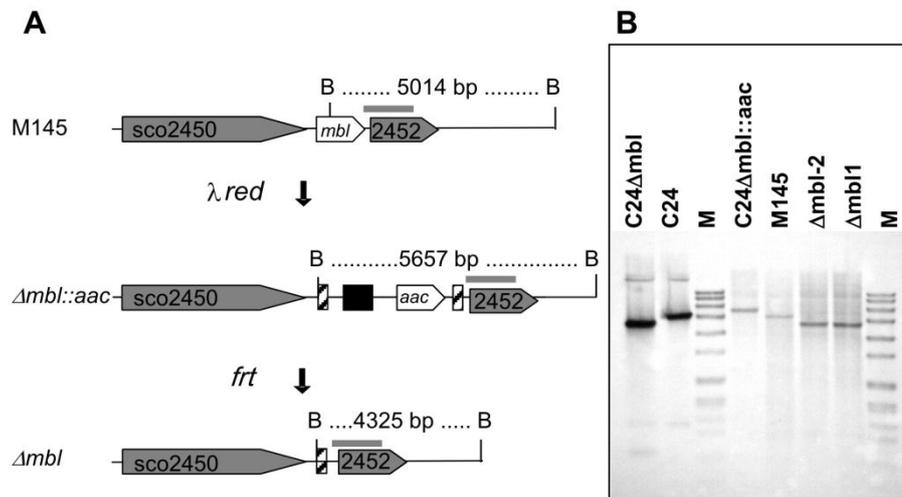


Fig. S1. Inactivation strategy of *mbl*. **A**, Schematic drawing. *mbl* was deleted by PCR targeting of cosmid C24 (Redenbach *et al.*, 1996) in a two step process, first replacing *mbl* by an *aac* cassette and subsequently deleting *aac* by FRT recombination, leaving a 81 bp scar sequence (hatched bar) in the chromosome. **B**, Mutant genotype was confirmed by Southern blotting of BamHI digested chromosomal DNA. DNA fragments used as probes are drawn as a grey line in **A**. M, Dig VII Molecular weight Standard, Roche (81, 359, 492, 710, 718, 992, 1164, 1482, 1515, 1882, 1953, 2799, 3639, 4899, 6106, 7427, and 8576 bp)

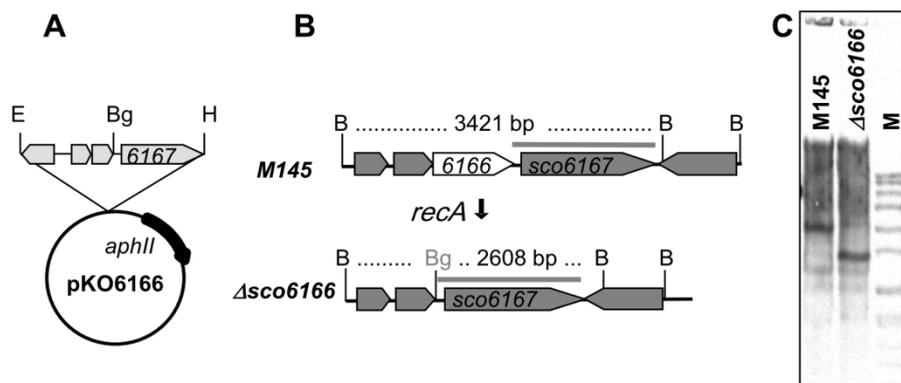


Fig. S2. Inactivation of *sco6166*. **A)** Schematic drawing of the knock out plasmid, carrying upstream and downstream regions. Relevant restriction sites are indicated. E: EcoRI, Bg: BgIII, H: HindIII. **B)** Schematic maps of the wildtype and the Δ *sco6166* mutant. A grey bar indicates the probe used in Southern blotting (**C**). The sizes of the hybridising fragments are given. Relevant BamHI sites (B) are indicated. **C)** Southern blot of BamHI digested total DNA of M145 and the Δ *sco6166* mutant. M, DigVII Standard, Roche.

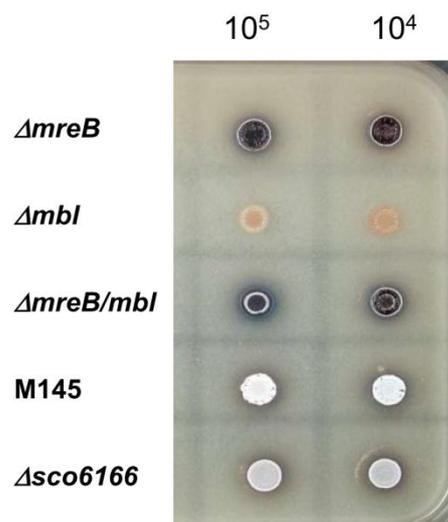


Fig. S3. Sporulation defect of *S. coelicolor* mutants defective in *mreB* homologues on MS agar + 10.3 % sucrose. Approximately 10⁵ or 10⁴ spores of M145, Δ *mreB*, Δ *mbl*, Δ *mreB/mbl* and Δ *sco6166* were spotted on MS agar containing 10.3 % sucrose and incubated for 5 days at 30°C before taking the photograph. Whereas the wildtype M145 and the Δ *sco6166* mutant were able to sporulate, Δ *mreB*, Δ *mbl*, and Δ *mreB/mbl* were affected in sporulation.

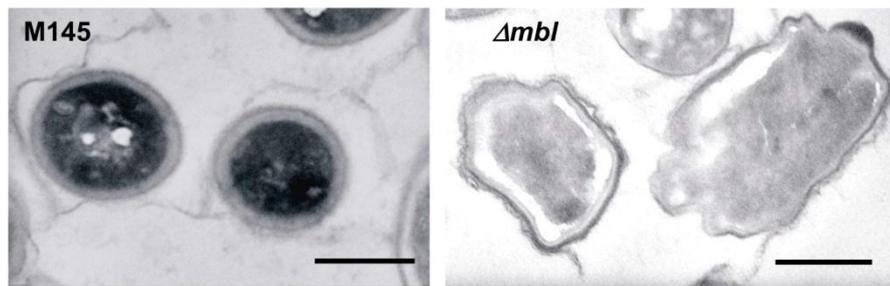


Fig. S4. Transmission electron micrographs of M145 and the ΔmbI mutant. Thin sections of spores of *S. coelicolor* M145 (A) and its *mbI* gene replacement mutant (B) were analysed at high resolution by transmission electron microscopy. Integrity of the ΔmbI spore walls is compromised, resulting in aberrant spores with a diffuse wall. Since the ΔmbI spores are more sensitive than the wildtype spores, we can not exclude that the appearance of the spore surface was affected by the fixation/staining process. Bar = 500 nm.

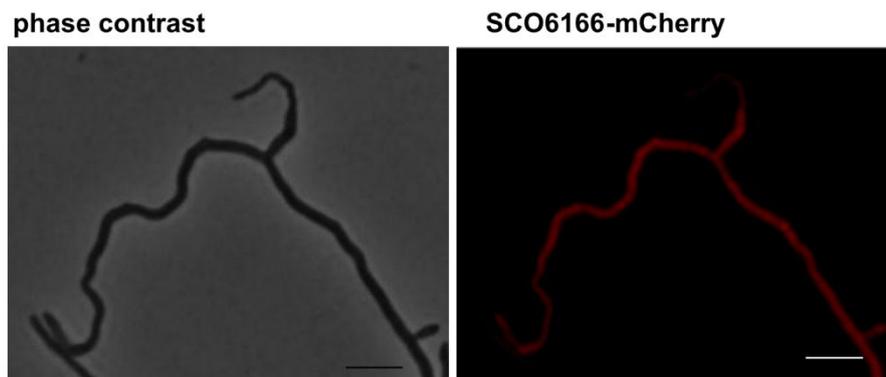


Fig. S5. Disperse fluorescence of SCO6166-mCherry in the substrate mycelium of *S. coelicolor* M145. A non-replicative plasmid carrying the *sco6166-mcherry* fusion gene was integrated into the chromosomal *sco6166* gene of M145 via homologous recombination. Culture was grown on LB agar for two days. Bar, 4 μm .

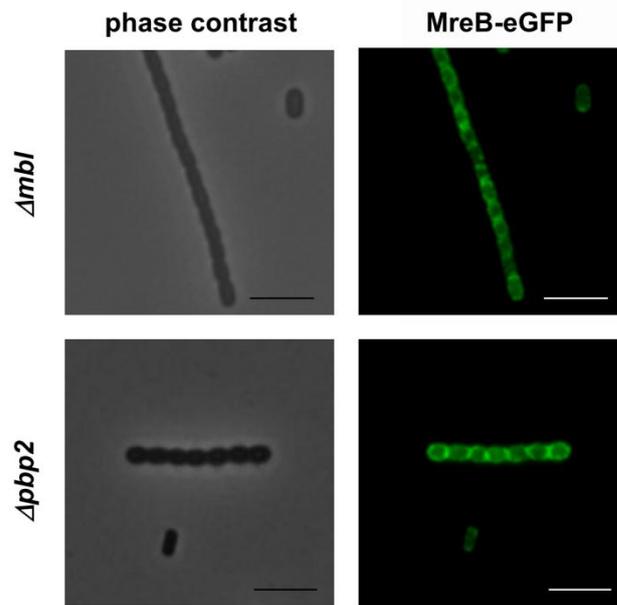


Fig. S6. Localization of MreB-eGFP to the spore periphery in mutants Δmbl and $\Delta pbb2$. Cultures were grown on MS agar for three days. Bar, 4 μm . MreB-eGFP localization underneath the spore membrane is not affected by the absence of Mbl or PBP2.

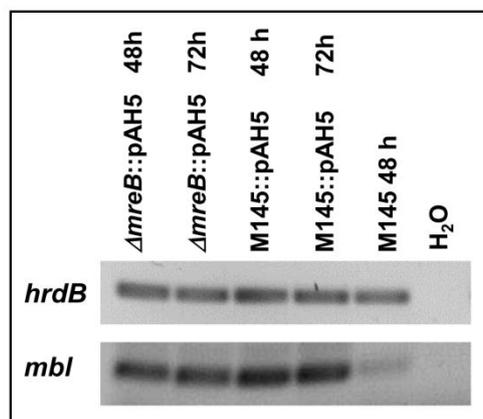


Fig. S7. Transcriptional analysis of the *mbl-mcherry* fusion gene in the $\Delta mreB$ deletion mutant. Cultures were grown on cellophane discs on MS agar at 30°C and harvested after 48 h or 72 h. The amounts of transcripts were compared by PCR. Expression of *mbl-mcherry* was detectable in the $\Delta mreB$ mutant in considerable amounts. Transcription of the housekeeping *hrdB* gene and transcription of *mbl* in M145 (48 h) were used as controls.

7.2 Wandteichonsäuren

7.2.1 **Supplementary information: Genetic analysis of *SCO2997* encoding a TagF homologue indicates a role for wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

7.2.1.1 Oligonukleotide zur Erzeugung der Mutanten und für die RT-PCR

Table S1: Oligonucleotides used for mutant constructions

Name	Sequence	Used for
uptagFfwE	AAGAATTCACGCAGAGCTCGA	construction of EMK2997
uptagFrevB	TTGGATCCCATCGCGGGGACTCCT	
lotagFfwB	AAGGATCCTCATGAGGACAGCCAC	
lotagFrevH	GGAAGCTTTGCCAGGTGATCTGGAG	
tagFkomE	CCGAATTCTGTGAGCACACCGTC	complementation of EMK2997
tagFkomB	AAGGATCCGTGGCTGTCCTCATG	
tagF2rev	TACATCTTGCTGGTGG	Southern blotting
up2584fE	CCGAATTCGCGCTGCGCCTGTG	construction of EMK2584
up2584rB	TTGGATCCACCCGCGTCAGCGC	
lo2584fB	TTGGATCCTGAGCTGCCCCCGGG	
lo2584rH	GGAAGCTTGGACGCCACTACCCG	
2584upNde	GGCATATGCGGCCGCGGGTGGC	complementation of EMK2584
2584loB	AAGGATCCGGGGCTGCGCGGGATC	
nKdel2584fw	CGAAGTACATCGTCAC	PCR analysis of EMK2584
nKdel2584r	TACGCCATGTAGATG	

Table S2: Oligonucleotide primers used for RT-PCR analyses

Primer	Sequence
2997fw	GTGTTCTCGGCGTACTGGA
2997rev	GTGGTGGGTCTGGAGGTG
2998fw	CACCGTCATCGTCTACAACG
2998rev	GCTGTCCAGGAACATCAGGT
2981fw	GGCGACTACCTGGTCTTCCT
2981rev	ACGGCGTGTCTCGTAGTAG
2982fw	CTCTCCCAGGCACTGGACT
2982rev	CTCGTGCTCGAAGTACAGGA
2988fw	CTTCGAGAAGCTCACGGAGT
2988rev	TGTCCTCGACGTCGTAATTG
2989fw	ACCACTACCTGACCGTCCTG
2989rev	CTCCAGTAGGCGGAGAACAG
2584fw	GGGTGTCGGACGAAGAGTT
2584rev	CGTCGAGTTCGGGATCAT
2590fw	ACAACGTGGAGCGCTATCTC
2590rev	CTTGGTGCTGTTGATGTGCT
2995fw	GTGCTGCAGTTCCTGTTCAA
2995rev	CTCGGCCTTCAGAAGTAGA
tagHfw	GAGAAGGGCGACTTCATCAC
tagHrev	CGCGGTGAACTTCTCGTACT
tagOfw	GGTGCCTGGACGACAAGTT
tagOrev	CAGATCCGGTAGGCGTACAT

7.2.1.2 Methoden zur Erzeugung der Mutanten und Methode der RT-PCR

Methods

Construction of the mutants. To delete *SCO2997*, 1610 bp upstream and 1620 bp downstream fragments including start and stop codons of *SCO2997* were amplified by PCR using primers *uptagFfwE/uptagFrevB* and *lotagFfwB/lotagFrevH*, respectively. *EcoRI/BamHI* and *BamHI/HindIII* digested fragments were cloned into pK18, generating the knockout plasmid pKO2997.

To delete *SCO2584*, 1521 bp upstream and 1539 bp downstream fragments including start and stop codons of *SCO2584* were amplified by PCR using primers *up2584fE/up2584rB* and *lo2584fB/lo2584rH*, respectively. *EcoRI/BamHI* and *BamHI/HindIII* digested fragments were cloned into pK18, generating the knockout plasmid pKO2584.

S. coelicolor A3(2) M145 was transformed with the knockout plasmids and kanamycin resistant transformants carrying the knockout plasmid integrated via a single cross over were selected. After a sporulation cycle the colonies were screened for kanamycin sensitive clones where the respective gene was deleted by a double cross over event. The genotypes of the mutants were confirmed by PCR analyses (Fig. S2) or Southern-blotting (Fig. S3).

Genetic complementation of the mutants. *EMK2997* was complemented by amplifying *SCO2997* with its promoter region with primers *tagFkomE* and *tagFkomB* and inserting the *EcoRI/BamHI* digested fragment into pSET152. The complementation plasmid was integrated into the chromosomal Φ C-31 attachment site of *EMK2997*.

To complement *EMK2584*, *SCO2584* was amplified without its stop codon using primers *2584upNde* and *2584loB* and fused to a His-tag encoding sequence by inserting the *NdeI/BamHI* digested fragment into the pGM190 derivative pGM1202 (G. Muth, unpublished). The resulting plasmid pGM2584 carries *SCO2584-his* under control of the thiostrepton inducible P_{tipA} promoter. *EMK2584* was complemented by introducing plasmid pGM2584 and inducing expression of *SCO2584-his* by thiostrepton 12.5 μ g/ml.

RT-PCR. Semiquantitative RT-PCR analysis was performed using the cDNAs described by Heichlinger et al., 2011 (1) and the primers listed in table S2.

7.2.1.3 Morphologie der Mutanten EMK2584 und EMK2997

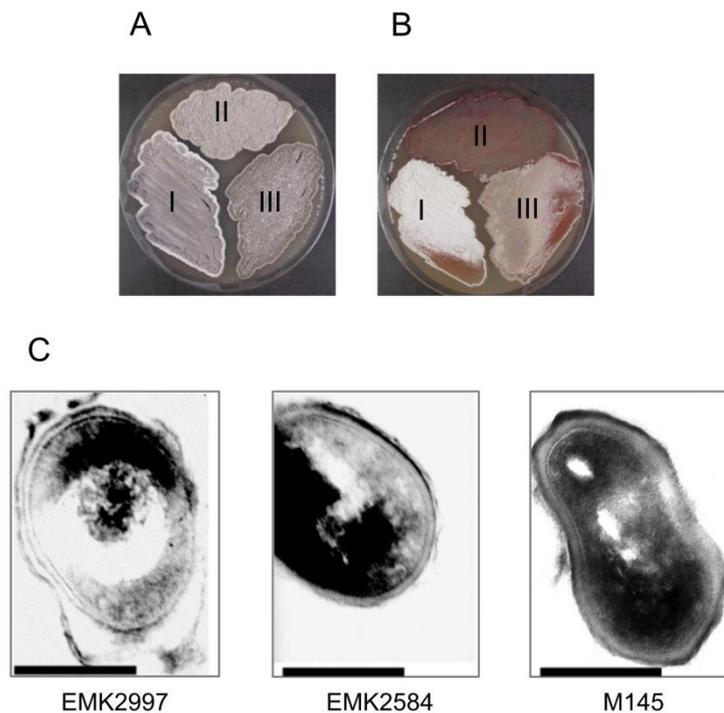


Figure S1: The morphology of mutants defective in *tagF* and *SCO2584*.

A. Growth and differentiation of the mutants on SM-agar is retarded compared to that of the wild type M145.

B. On SM agar containing 10.3% sucrose this effect is more distinct. The wild type produces already spores, while EMK2584 just produces aerial mycelium and EMK2997 only forms vegetative mycelium. I: EMK2584, II: EMK2997, III: M145.

C. Transmission electron microscopic pictures of spores. The mutant spores show an aberrant thinner spore wall compared to the wild type. Images were taken by a TEM Phillips Tecnai at 80kV. Samples were prepared as described in Kleinschnitz et al., 2011 (2). Bar 500nm.

7.2.1.4 Bestätigung der Genotypen der Mutanten durch PCR

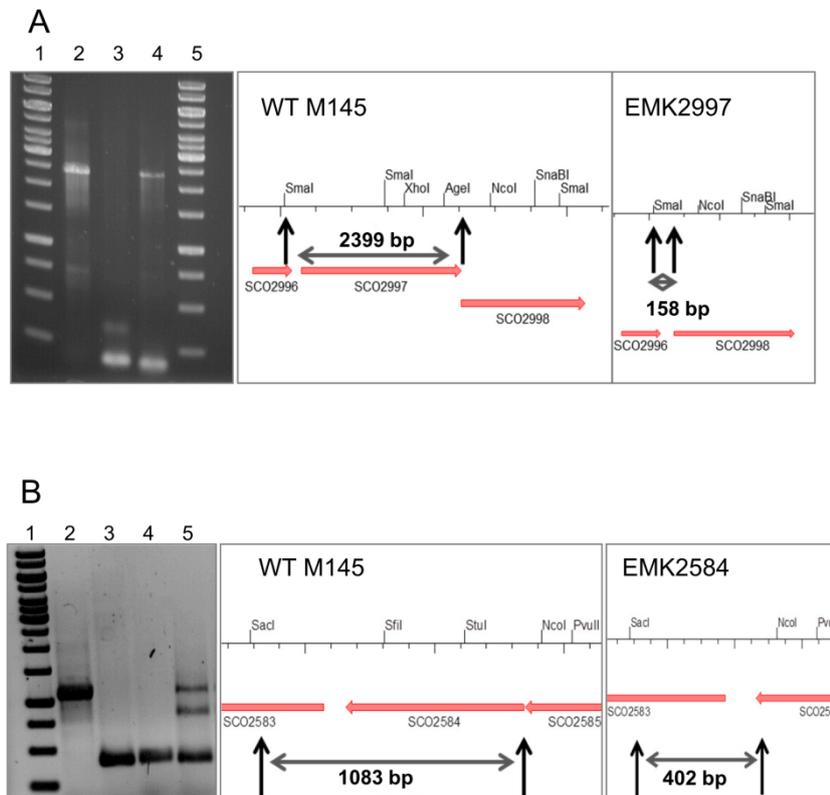


Figure S2: Confirmation of the mutant genotype by PCR analysis. Total DNA of the wild type M145 and the mutants was isolated and analysed by PCR. **A.** *tagF* mutant EMK2997. Lanes 1 and 5: 1 kb-marker, Fermentas; lane 2: M145; lane 3: EMK2997; lane 4: EMK2997::pSET2997. Expected band for the wild type 2399 bp, for the mutant 158 bp. Schematic drawings of the binding sites of the primers tagFkomB and tagFkomE (black arrows). The sizes of the expected PCR-fragments (grey arrows) are indicated.

B. Δ SCO2584 mutant EMK2584. Lane 1: 1 kb-marker, Fermentas; lane 2: M145; lane 3: pKO2584; lane 4: EMK2584; lane 5: M145::pKO2584, single cross over. Expected bands for the wild type: 1083 bp, for the mutant 402 bp. Schematic drawings of the binding sites of the primers nkdel2584fw and nkdel2584r (black arrows). The sizes of the expected PCR-fragments (grey arrows) are indicated.

7.2.1.5 Bestätigung des Genotyps von EMK2997 durch Southern Blot

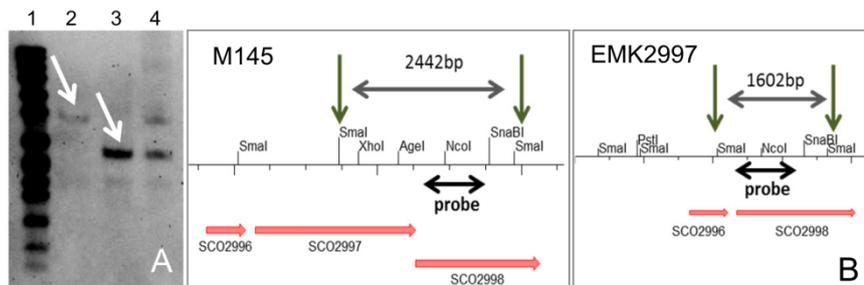


Figure S3: Southern blot of the *tagF* mutant EMK2997.

A. Southern-blot. Total DNA of M145 (lane 2), EMK2997 (lane 3) and M145 carrying pKO2997 integrated via single cross over (lane 4) was digested with *Sma*I, run on an agarose gel and transferred to a nylon membrane. The probe is indicated in the schematic drawings (B). The white arrows mark the hybridising bands for M145 and the *tagF* mutant EMK2997. Lane 1: Digoxigenin-labeled marker VII, Roche.

B. Schematic drawings. The binding sites of the probe is indicated in the maps of M145 and EMK2997 (primers for generating the probe: TagF2rev/lotagFfwB). Expected bands for the *Sma*I digest: M145, 2442 bp; EMK2997, 1602 bp.

References

1. Heichlinger, A., M. Ammelburg, E.-M. Kleinschnitz, A. Latus, I. Maldener, K. Flärdh, W. Wohlleben, and G. Muth. 2011. The MreB-Like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J. Bacteriol.* **193**:1533-1542.
2. Kleinschnitz, E.-M., A. Heichlinger, K. Schirner, J. Winkler, A. Latus, I. Maldener, W. Wohlleben, and G. Muth. 2011. Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Mol. Microbiol.* **79**:1367-1379.

7.2.2 Zur Erzeugung und Komplementation der *tagF*-Mutanten (EMK2997) konstruierte Plasmide

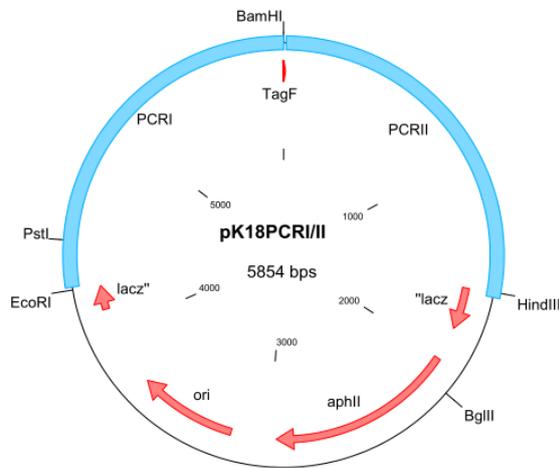


Abbildung 7-63. pK02997

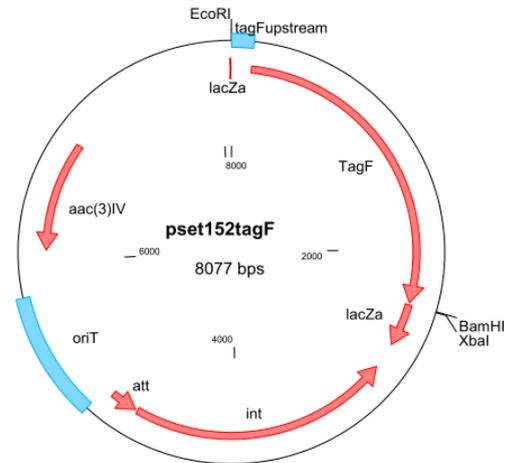


Abbildung 7-64. pSET2997

7.2.3 Die Phosphatgehalte der Wandteichonsäureaufreinigungen

Tabelle 7-16. Mittelwerte der Phosphatgehalte der Wandteichonsäureaufreinigungen nach Stamm und Aufreinigungsmethode geordnet.

Stamm	Aufreinigungsmethode	Hydrolyse mit	durchschnittlicher Phosphatgehalt [nmol/ml]
M145	Isolierung der Zellwand mit anschließender Hydrolyse	TCA	84237±35149
M145	nach Peschel	TCA	82982±32005
M145	nach Meredith	NaOH	35142±17805
M145	nach Meredith	TCA	27320
M145	nach Schirner	TCA	67600
EMK2997 (<i>tagF</i>)	Isolierung der Zellwand mit anschließender Hydrolyse	TCA	22600±10814
EMK2997 (<i>tagF</i>)	nach Peschel	TCA	12516±6061
EMK2997 (<i>tagF</i>)	nach Meredith	NaOH	28573±26009
EMK2997 (<i>tagF</i>)	nach Meredith	TCA	45540±35384
EMK2997 (<i>tagF</i>)	nach Schirner	TCA	68400
EMK2997::pSET2997	nach Meredith	NaOH	72400
$\Delta mreB$	nach Meredith	NaOH	50040±47857
$\Delta mreB$	Isolierung der Zellwand mit anschließender Hydrolyse	TCA	19325±7159
$\Delta SCO2097$	nach Meredith	NaOH	46820±21355
$\Delta SCO2097$	nach Schirner	TCA	62400
EMK2584	nach Meredith	NaOH	64720±46330
EMK2584	nach Meredith	TCA	82040
EMK2584	nach Schirner	TCA	162400

7.2.4 Die DNA- Verunreinigungen der Wandteichonsäureaufreinigungen

Messkurven einiger DNA- Konzentrationsbestimmungen mit dem Nanodrop.

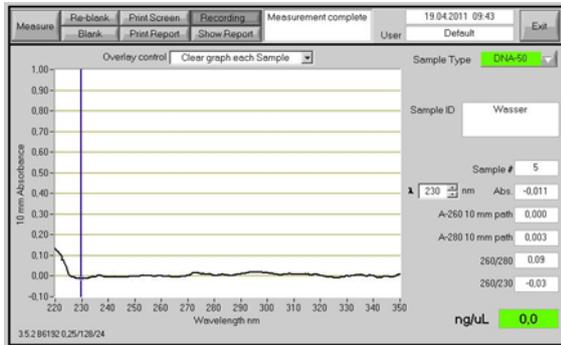


Abbildung 7-65. Nanodrop Wasser.

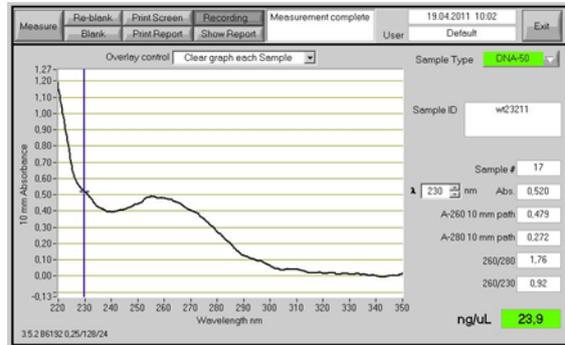


Abbildung 7-66. WT M145 (Meredith, NaOH).

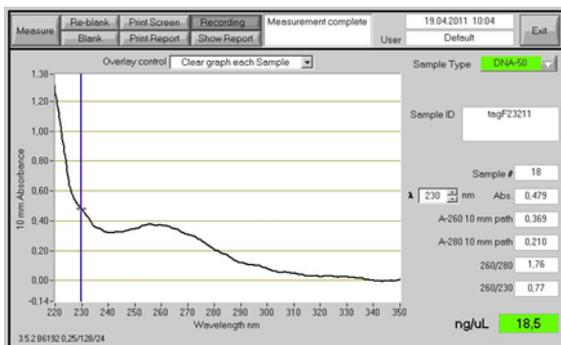


Abbildung 7-67. EMK2997 (Meredith, NaOH).

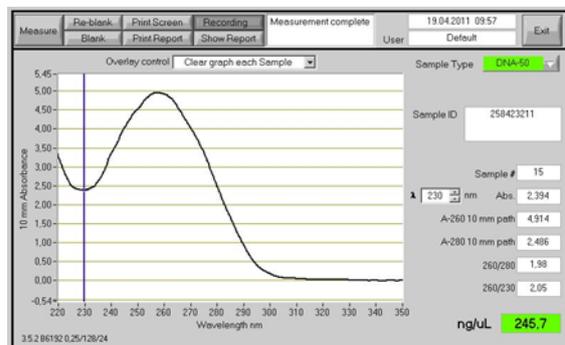


Abbildung 7-68. EMK2584 (Meredith, NaOH).

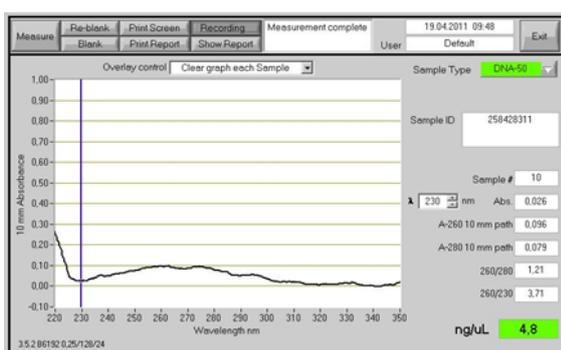


Abbildung 7-69. EMK2584 (Schirner, TCA).

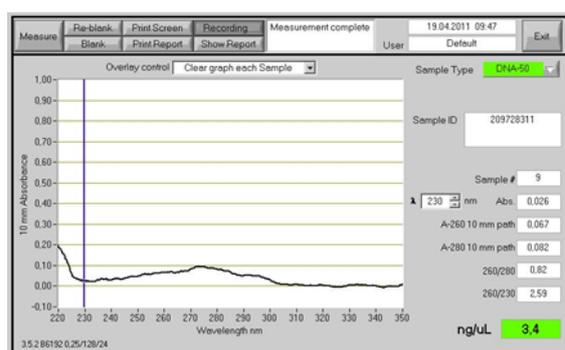


Abbildung 7-70. ΔSCO2097 (Schirner TCA).

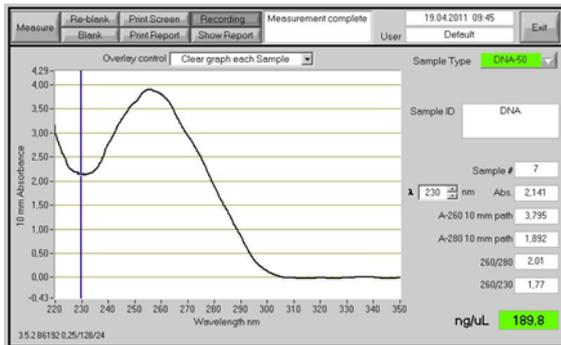


Abbildung 7-71. Genomische DNA.

Tabelle 7-17. DNA- Verunreinigungen von WTA- Proben gemessen mit dem Nanodrop.

Probe	Methode	[ng/μl]
M145 (19.01.11)	Meredith (NaOH)	1207,4
M145 (23.02.11)	Meredith (NaOH)	23,9
M145 (28.03.11)	Schirner (TCA)	2,5
Δ 2097 (19.01.11)	Meredith (NaOH)	150,4
Δ 2097 (28.03.11)	Schirner (TCA)	3,4
Δ mreB (19.01.11)	Meredith (NaOH)	1249,6
EMK2997 (19.01.11)	Meredith (NaOH)	142,9
EMK2997 (23.02.11)	Meredith (NaOH)	18,5
EMK2997 (28.03.11)	Schirner (TCA)	0,6
EMK2997::pSET2997 (19.01.11)	Meredith (NaOH)	1254,6
EMK2584 (23.02.11)	Meredith (NaOH)	245,7
EMK2584 (28.03.11)	Schirner (TCA)	4,8
genomische DNA		189,8

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7-18. Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BTH	Bacterial Two Hybrid
ca	circa
CDP	Citidindiphosphat
CIP	Calf Intestine Phosphatase
<i>cmd</i>	a <u>cluster of genes encoding m</u> embrane proteins for <u>d</u> ifferentiation
CSPD	Disodium 3- (methoxyspiro-[1,2- dioxetan- 3,2`- (5`chloro)- tricycle[3.3.1.1 ^{3,7}]- decan]- 4yl)- phenylphosphat
d	Tag
d. h.	dass heißt
<i>dcw</i>	division cell wall synthesis
DMSO	Di- Methyl- Sulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ERG	Eppendorf Reagenzgefäß
ESTPK	eukaryotic- type serin- /threoninproteinkinase
EtOH	Ethanol
<i>fts</i>	filamentation temperature- sensitive
GB	Genbank
GlcNAc-P	N- Acetyl- Glucosamin- Phosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HClO ₄	Perchlorsäure
HMW	high molecular weight
HTH	Helix- Turn- Helix
IPTG	Isopropyl- β- D- Thiogalactopyranosid
LCP	LytR- CpsA- Psr
LMW	low molecular weight
LPS	lipoteichoic acid / Lipoteichonsäure
Lsg	Lösung
LTA	lipoteichoic acid / Lipoteichonsäure
ManNAc	N- Acetyl- Mannosamin
MES	2- (4- morpholino)- ethan- sulfonsäure
min	Minute
<i>mre</i>	murein formation cluster E
Na- Acetat	Natrium- Acetat
NEB	new england biolabs
ONPG	2- Nitrophenyl- β- D- Galactopyranosid
PBP	Penicillin Binde Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline

Abkürzung	Bedeutung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
rpm	revolution per minute / Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SARP	<i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory protein
SDS	Natrium- Dodecylsulfat
SEDS	shape elongation division & sporulation
SSSC	<i>Streptomyces</i> Spore wall Synthesizing Complex
TA	teichoic acid / Teichonsäure
TCA	Tri- Chlor- Essigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	[N- [Tris (hydroxymethyl) methyl]- 2- aminosulfonic acid]
UDP	Uridindiphosphat
WTA	wall teichoic acid / Wandteichonsäure
X- Gal	5- Bromo- 4- chloro- 3- indoyl- β - D- galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Die PBPs von <i>S. coelicolor</i> zusammengestellt nach (Sauvage et al., 2008).	14
Tabelle 2-2. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von <i>C. crescentus</i> im Bacterial Two Hybrid System zusammengestellt nach (White et al., 2010).	25
Tabelle 2-3. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von <i>E. coli</i> zusammengestellt nach (Kruse et al., 2005, Mohammadi et al., 2007, Bendezú et al., 2009).	25
Tabelle 2-4. Protein- Interaktionen der Mre- Proteine von <i>B. subtilis</i> zusammengestellt nach (van den Ent et al., 2006, Formstone et al., 2008, Kawai et al., 2009, Kawai et al., 2011).	25
Tabelle 3-1. Bakterienstämme.	47
Tabelle 3-2. Nährmedien.....	48
Tabelle 3-3. Indikatormedien.....	49
Tabelle 3-4. Antibiotika.	50
Tabelle 3-5. Oligonukleotide für das BTH System.	51
Tabelle 3-6. Oligonukleotide für die Herstellung, Komplementierung und den Nachweis von Mutanten.....	52
Tabelle 3-7. Oligonukleotide für die Herstellung von Expressionsvektoren.	53
Tabelle 3-8. Oligonukleotide für das Testen der Diversität der Genbank.	53
Tabelle 3-9. <i>E. coli</i> Plasmide.	54
Tabelle 3-10. Streptomyceten Plasmide.	54
Tabelle 3-11. 50x TAE- Puffer für die DNA- Gelelektrophorese.	55
Tabelle 3-12. E- 1- F- Puffer für Eckardgele.....	55
Tabelle 3-13. Puffer für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen nach der CaCl ₂ - Methode.	55
Tabelle 3-14. P- Puffer zur Herstellung und T- Puffer zur Transformation von Protoplasten.....	56
Tabelle 3-15. Puffer für die Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse.	56
Tabelle 3-16. Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus Streptomyceten.	56
Tabelle 3-17. Lösungen für den Southern Blot.....	57
Tabelle 3-18. Hybridisierungslösungen für den Southern Blot.	57
Tabelle 3-19. Lösungen für die Nachweisreaktion des Southern Blots.....	57
Tabelle 3-20. Lösungen für β- Galactosidaseaktivitätsbestimmungen.	58
Tabelle 3-21. Lösungen für die Elektronenmikroskopie.....	58
Tabelle 3-22. Lösungen für die Peptidoglykanisolierung aus Streptomyceten.	58
Tabelle 3-23. Lösungen für die WTA- Isolierung aus Zellextrakten.....	59
Tabelle 3-24. Puffer für die WTA- Isolierung nach (Meredith et al., 2008).....	59
Tabelle 3-25. Puffer für die WTA- Isolierung (Protokoll Kathrin).	59
Tabelle 3-26. Lösungen für die Phosphatbestimmung zur Quantifizierung von Teichonsäuren.	60
Tabelle 3-27. WTA- PAGE Gel für Tris/Tricine Puffer.	60
Tabelle 3-28. WTA- PAGE- Gel für TBE- Puffer.	60
Tabelle 3-29. 10x TBE- Puffer.	61
Tabelle 3-30. Färbelösungen für die WTA- PAGE.....	61

Tabelle 3-31. Chemikalien und Materialien.	62
Tabelle 3-32. Kits.	64
Tabelle 3-33. Enzyme.	64
Tabelle 3-34. Größenmarker.	64
Tabelle 3-35. Die Kolonie- PCR Reaktionsansatz und Programm.	68
Tabelle 3-36. PCR- Pipettierschema und Programm.	72
Tabelle 3-37. Pipettierschema für den Restriktionsverdau.	73
Tabelle 3-38. Phenol- Chloroform- Extraktion.	74
Tabelle 3-39. Ligationsansatz.	74
Tabelle 3-40. Ligationsansatz nach der Phenol- Cloroform- Extraktion.	74
Tabelle 3-41. Der partielle Verdau der genomischen DNA.	79
Tabelle 3-42. Restriktionsverdau des Vektors für die Konstruktion der Genbank.	80
Tabelle 3-43. Ligationsansatz Genbank.	80
Tabelle 3-44. Die Labeling- PCR für den Southern Blot.	84
Tabelle 3-45. Der Restriktionsverdau für den Southern Blot.	85
Tabelle 3-46. WTA- PAGE Gelzusammensetzung (Tris/Tricin).	92
Tabelle 3-47. WTA- PAGE Gelzusammensetzung (TBE).	92
Tabelle 4-1. Die Eigenschaften der PBPs, die in den BTH- Studien auf Interaktionen getestet wurden.	107
Tabelle 4-2. Die Ergebnisse der β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen der PBPs mit den Mre- Proteinen und RodZ.	107
Tabelle 4-3. BTH Studien von Teichonsäuren synthetisierenden Proteinen und mit der Genbank gefundenen Interaktionspartner der Mre- Proteine. Farbentwicklung auf McConkey- Agar.	129
Tabelle 4-4. β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen von Interaktionen der Teichonsäuren synthetisierenden Proteine mit durch die Genbank gefundenen Interaktionspartnern der Mre- Proteine.	130
Tabelle 4-5. Die Mittelwerte der Phosphatkonzentrationsbestimmung aller WTA- Aufreinigungen.	131
Tabelle 7-1. Durch das Screening einer Genbank von <i>S. coelicolor</i> M145 identifizierte Interaktionspartner der Mre- Proteine.	151
Tabelle 7-2. Die Anzahl der mit der Genbank gefundenen und sequenzierten Klone.	154
Tabelle 7-3. BTH: Farbentwicklung auf McConkey. Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18c.	161
Tabelle 7-4. BTH: Farbentwicklung auf McConkey. Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18c.	162
Tabelle 7-5. BTH: Farbentwicklung auf McConkey: Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18.	162
Tabelle 7-6. BTH: Farbentwicklung auf McConkey: Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18.	163
Tabelle 7-7. Interpretation der Interaktionsstärke auf McConkey- Agar.	163
Tabelle 7-8. Interpretation der β - Galaktosidaseaktivität [units/mg].	163
Tabelle 7-9. BTH: β - Galaktosidasemessungen. Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18c. ..	164
Tabelle 7-10. BTH: β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen. Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18c. ...	164

Tabelle 7-11. BTH: β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen. Mre- Proteine, MreB Homologe, FtsZ und RodZ im pUT18.....	165
Tabelle 7-12. BTH: β -Galaktosidaseaktivitätsmessungen: Teichonsäuresynthesegene und PBPs im pUT18.	165
Tabelle 7-13. BTH: Interaktionen von mit der Genbank identifizierten Proteinen. Farbentwicklung auf McConkey- Agar.....	166
Tabelle 7-14. BTH: β - Galaktosidaseaktivitätsmessungen von mit der Genbank identifizierten Proteinen.	167
Tabelle 7-15. Für das BTH konstruierte Plasmide.	168
Tabelle 7-16. Mittelwerte der Phosphatgehalte der Wandteichonsäureaufreinigungen nach Stamm und Aufreinigungsmethode geordnet.....	190
Tabelle 7-17. DNA- Verunreinigungen von WTA- Proben gemessen mit dem Nanodrop.	192
Tabelle 7-18. Abkürzungen.	193

7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1. Bakterienmorphologien.....	2
Abbildung 2-2. Modell der Zellwand.....	3
Abbildung 2-3. <i>Streptomyces coelicolor</i> M145.....	5
Abbildung 2-4. Der Lebenszyklus von <i>S. coelicolor</i> auf Festmedium.	7
Abbildung 2-5. Das Zellwandwachstum und die Zellteilung bei Streptomyceten.	8
Abbildung 2-6. Das Peptidoglykan von <i>S. coelicolor</i> A3(2) (A) und <i>E. coli</i> (B)	9
Abbildung 2-7. Schematische Zeichnung des Mureinsacculus (Höltje, 1998).....	10
Abbildung 2-8. Schematische Darstellung der Peptidoglykanvorstufensynthese von <i>B. subtilis</i>	11
Abbildung 2-9. Die Peptidoglykansynthese.....	12
Abbildung 2-10. Das „three- for- one“ Modell und der Multienzymkomplex bei der Peptidoglykansynthese (Höltje, 1998).	15
Abbildung 2-11. Modell des Einbaus von Peptidoglykanvorstufen bei gramnegativen Bakterien (Typas <i>et al.</i> , 2012).	16
Abbildung 2-12 Die Zellwandsynthese bei kugelförmigen Bakterien.	18
Abbildung 2-13. Die Zellwandsynthese und Zellteilung bei stäbchenförmigen Bakterien wie <i>B. subtilis</i> und <i>E.</i> <i>coli</i>	19
Abbildung 2-14. Die Zellwandsynthese bei den stäbchenförmigen Corynebakterien.	20
Abbildung 2-15. Das <i>dcw</i> - Gencluster von <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>M. tuberculosis</i> (Tamames <i>et al.</i> , 2001) sowie <i>S. coelicolor</i>	21
Abbildung 2-16. Schematische Abbildung des Divisoms erstellt aus der Lokalisierung von GFP- Fusionen und Immunofluoreszenzmikroskopie (den Blaauwen <i>et al.</i> , 2008).....	22
Abbildung 2-17. Vorkommen und Interaktionen der Mre- Proteine bei <i>E. coli</i> (Kruse <i>et al.</i> , 2005), <i>C. crescentus</i> (White <i>et al.</i> , 2010), <i>B. subtilis</i> (Carballido-López <i>et al.</i> , 2006, Leaver & Errington, 2005) und <i>S. coelicolor</i>	24
Abbildung 2-18. Modell der Lokalisierung von MreB und dem PG- Synthesekomplex basierend auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (White & Gober, 2011).	27
Abbildung 2-19. Modell der Lokalisation von MreB und dem PG- Synthesekomplex basierend auf Totalreflexionsmikroskopie (White & Gober, 2011).	28
Abbildung 2-20. Das <i>mre</i> - Gencluster sowie <i>mbi</i> und <i>SCO6166</i> von <i>S. coelicolor</i> A3(2).	30
Abbildung 2-21. Glycerolphosphat- Wandteichonsäure mit Modifikationen (Neuhaus & Baddiley, 2003).....	32
Abbildung 2-22. Die Verknüpfung von Peptidoglykan- und Wandteichonsäuresynthese.	33
Abbildung 2-23. Die Glycerolphosphat- Wandteichonsäuresynthese bei <i>B. subtilis</i> 168.	34
Abbildung 2-24. Aktin- und ParM- Filamente winden sich umeinander, wohingegen MreB parallele Filamente bildet (Graumann, 2007).	41
Abbildung 2-25. Tubulin und FtsZ (Graumann, 2007).	43
Abbildung 2-26. Schematische Abbildung von LaminA, einem humanen Intermediärfilament, sowie von Crescentin aus <i>C. crescentus</i> und SCO5396 aus <i>S. coelicolor</i> (Bagchi <i>et al.</i> , 2008).	44
Abbildung 2-27. Ein Modell des Peptidoglykansynthesekomplexes von stäbchenförmigen Bakterien..	46

Abbildung 2-28. Mögliche Interaktionspartner der Mre- Proteine.....	46
Abbildung 3-1. Das Prinzip des BTH.	75
Abbildung 3-2. Die multiple cloning sites und die Lage der Domänen der Adenylatzyklase in den Vektoren (pKT25, pUT18 und pUT18C) für das BTH (Karimova et al., 1998).	76
Abbildung 3-3. Die Suche nach Interaktionspartner mit dem BTH: 1. Co- Transformation. 2. Selektion. 3. Überprüfen der β - Galaktosidaseaktivität.....	77
Abbildung 3-4. Enzymverdünnungen für den partiellen Verdau.	79
Abbildung 3-5. Die Diversität und die Insertrate der Genbank mittels Restriktionsverdau überprüfen.	81
Abbildung 3-6. Die Diversität der Genbank mittels PCR überprüfen.	81
Abbildung 3-7. Die Diversität der Genbank mittels PCR überprüfen.	82
Abbildung 3-8. Das Screening der Genbank. 1. Elektroporation. 2. Waschen. 3. Selektion	82
Abbildung 3-9. Die Überprüfung der Ergebnisse des Genbankscreens.	83
Abbildung 4-1. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Sporen von $\Delta 2097$ sehr regelmäßig geformt sind.....	108
Abbildung 4-2. $\Delta 2097$ sporulierte früher als der Wildtyp.....	109
Abbildung 4-3. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der $\Delta 2097$ Sporen zeigten eine diffuse Zellhülle.....	109
Abbildung 4-4. Die Sporen von $\Delta SCO2097$ sind signifikant länger und breiter als die Sporen des WT M145.	110
Abbildung 4-5. $\Delta 2097$ ist sensitiv gegenüber Lysozym und Vancomycin.	110
Abbildung 4-6. $\Delta 2097$ ist im Gegensatz zu $\Delta mreB$ nicht sensitiv gegenüber osmotischem Stress.....	111
Abbildung 4-7. Die Überexpression von MreC führte zu verlängerten <i>E. coli</i> - Zellen.....	111
Abbildung 4-8. Die Überexpression von RodZ führte zu langen, filamentösen <i>E. coli</i> - Zellen.....	112
Abbildung 4-9. Die Überexpression von MreC ist nicht letal, sondern führt zu einem deutlich verzögerten Wachstum.	113
Abbildung 4-10. Die Thioestreptonresistenz ist intakt.....	113
Abbildung 4-11. Die Mittelwerte der Phosphat-konzentrationsbestimmung [nmol/ml] aller WTA- Aufreinigungen.....	131
Abbildung 4-12. WTA- PAGE.	132
Abbildung 5-1. Ein Modell des Peptidoglykansynthesekomplex während der Sporenbildung von <i>S. coelicolor</i> A3(2) basierend auf den Ergebnissen der Proteininteraktionsstudien des BTH.	133
Abbildung 5-2. Vergleich der Peptidoglykansynthesekomplexe von <i>C. crescentus</i> zusammengestellt aus (White et al., 2010) und von <i>S. coelicolor</i> (Daten aus den BTH- Experimenten).....	134
Abbildung 5-3. Die Interaktion von RodZ mit MreB (Salje et al., 2011).	137
Abbildung 5-4. Der <i>Streptomyces</i> Spore wall Synthesizing Complex.....	139
Abbildung 5-5. Die Umgebung von <i>SCO2097</i> (hellblau) scheint bei Actinomyceten konserviert zu sein (Quelle: http://www.microbesonline.org)..	140
Abbildung 5-6. Die putativen Teichonsäuresynthesecomplex von <i>S. coelicolor</i>	143
Abbildung 5-7. Das Proteinkinasegencluster von <i>S. coelicolor</i> (Urabe et al., 2008).	148

Abbildung 7-1. pUT18- mreB	Abbildung 7-2. pUT18c- mreB	168
Abbildung 7-3. pKT25- mreB	Abbildung 7-4. pUT18- mreC.....	169
Abbildung 7-5. pUT18c- mreC	Abbildung 7-6. pKT25- mreC	169
Abbildung 7-7. pUT18c- mreD	Abbildung 7-8. pKT25- mreD	169
Abbildung 7-9. pUT18c- PBP2	Abbildung 7-10. pKT25- PBP2	170
Abbildung 7-11. pUT18c- sfr	Abbildung 7-12. pKT25- sfr.....	170
Abbildung 7-13. pUT18c- SAM	Abbildung 7-14. pKT25- SAM.....	170
Abbildung 7-15. pUT18- mbl	Abbildung 7-16. pUT18c- mbl.....	171
Abbildung 7-17. pKT25- mbl	Abbildung 7-18. pUT18- SCO6166.....	171
Abbildung 7-19. pUT18c- SCO6166	Abbildung 7-20. pKT25- SCO6166	171
Abbildung 7-21. pUT18- ftsZ	Abbildung 7-22. pUT18c- ftsZ.....	172
Abbildung 7-23. pKT25- ftsZ	Abbildung 7-24. pUT18- rodZ	172
Abbildung 7-25. pUT18c- rodZ	Abbildung 7-26. pKT25- rodZ	172
Abbildung 7-27. pUT18- ftsI	Abbildung 7-28. pUT18c- ftsI	173
Abbildung 7-29. pKT25- ftsI	Abbildung 7-30. pUT18- SCO2897.....	173
Abbildung 7-31. pUT18c- SCO2897	Abbildung 7-32. pKT25- SCO2897	173
Abbildung 7-33. pUT18- SCO3580	Abbildung 7-34. pUT18c- SCO3580.....	174
Abbildung 7-35. pKT25- SCO3580	Abbildung 7-36. pUT18- SCO3901	174
Abbildung 7-37. pUT18c- SCO3901	Abbildung 7-38. pKT25- SCO3901.....	174
Abbildung 7-39. pUT18- SCO4132	Abbildung 7-40. pUT18c- SCO4132.....	175
Abbildung 7-41. pKT25- SCO4132	Abbildung 7-42. pUT18- SCO5039.....	175
Abbildung 7-43. pUT18c- SCO5039	Abbildung 7-44. pKT25- SCO5039	175
Abbildung 7-45. pUT18- SCO2980	Abbildung 7-46. pUT18c- SCO2980	176
Abbildung 7-47. pKT25- SCO2980	Abbildung 7-48. pUT18- SCO2996	176
Abbildung 7-49. pUT18c- SCO2996	Abbildung 7-50. pKT25- SCO2996.....	176
Abbildung 7-51. pUT18- SCO2997	Abbildung 7-52. pUT18c- SCO2997	177
Abbildung 7-53. pKT25- SCO2997	Abbildung 7-54. pUT18- SCO5365	177
Abbildung 7-55. pUT18c- SCO5365	Abbildung 7-56. pKT25- SCO5365	177
Abbildung 7-57. pYT1- mreC	Abbildung 7-58. pJoe2775- mreC.....	178
Abbildung 7-59. pJOE2775- rodZ		178
Abbildung 7-60. pGM202- mreD	Abbildung 7-61. pSfr- mreD.....	179
Abbildung 7-62. pGM190- mreC		179
Abbildung 7-63. pKO2997	Abbildung 7-64. pSET2997.....	190
Abbildung 7-65. Nanodrop Wasser.	Abbildung 7-66. WT M145 (Meredith, NaOH).....	191
Abbildung 7-67. EMK2997 (Meredith, NaOH).	Abbildung 7-68. EMK2584 (Meredith, NaOH).....	191
Abbildung 7-69. EMK2584 (Schirner, TCA).	Abbildung 7-70. Δ SCO2097 (Schirner TCA).	191
Abbildung 7-71. Genomische DNA.....		192

8 Literatur

- Abhayawardhane, Y. & G. C. Stewart, (1995) *Bacillus subtilis* possesses a second determinant with extensive sequence similarity to the *Escherichia coli mreB* morphogene. *Journal of Bacteriology* **177**: 765-773.
- Addinall, S. G. & J. Lutkenhaus, (1996) FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **22**: 231-237.
- Alaedini, A. & R. A. Day, (1999) Identification of two penicillin-binding multienzyme complexes in *Haemophilus influenzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**: 191-195.
- Allan, V., (1995) Membrane traffic motors. *FEBS Letters* **369**: 101-106.
- Alyahya, S. A., R. Alexander, T. Costa, A. O. Henriques, T. Emonet & C. Jacobs-Wagner, (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1239-1244.
- Anderson, A. J., R. S. Green, A. J. Sturman & A. R. Archibald, (1978) Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: location of wall material incorporated during pulsed release of phosphate limitation, its accessibility to bacteriophages and concanavalin A, and its susceptibility to turnover. *Journal of Bacteriology* **136**: 886-899.
- Anderson, R. G., H. Hussey & J. Baddiley, (1972) The mechanism of wall synthesis in bacteria. The organization of enzymes and isoprenoid phosphates in the membrane. *The Biochemical Journal* **127**: 11-25.
- Angert, E. R., (2005) Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 214-224.
- Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu & L. M. Iyer, (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 231-262.
- Archibald, A. R., J. J. Armstrong, J. Baddiley & J. B. Hay, (1961) Teichoic acids and the structure of bacterial walls. *Nature* **191**: 570-572.
- Atilano, M. L., P. M. Pereira, J. Yates, P. Reed, H. Veiga, M. G. Pinho & S. R. Filipe, (2010) Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18991-18996.
- Ausmees, N., J. R. Kuhn & C. Jacobs-Wagner, (2003) The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**: 705-713.
- Aylett, C. H., Q. Wang, K. A. Michie, L. A. Amos & J. Löwe, (2010) Filament structure of bacterial tubulin homologue TubZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19766-19771.
- Bagchi, S., H. Tomenius, L. M. Belova & N. Ausmees, (2008) Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology* **70**: 1037-1050.
- Barreteau, H., A. Kovac, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec & D. Blanot, (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 168-207.
- Baumann, P. & S. P. Jackson, (1996) An archaeobacterial homologue of the essential eubacterial cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6726-6730.
- Beall, B. & J. Lutkenhaus, (1991) FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation. *Genes & Development* **5**: 447-455.
- Beck, B. D., P. G. Arscott & A. Jacobson, (1978) Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1250-1254.
- Becker, E., N. C. Herrera, F. Q. Gunderson, A. I. Derman, A. L. Dance, J. Sims, R. A. Larsen & J. Pogliano, (2006) DNA segregation by the bacterial actin AlfA during *Bacillus subtilis* growth and development. *The EMBO Journal* **25**: 5919-5931.
- Beech, P. L., T. Nheu, T. Schultz, S. Herbert, T. Lithgow, P. R. Gilson & G. I. McFadden, (2000) Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* **287**: 1276-1279.

- Begg, K. J., A. Takasuga, D. H. Edwards, S. J. Dewar, B. G. Spratt, H. Adachi, T. Ohta, H. Matsuzawa & W. D. Donachie, (1990) The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *Journal of Bacteriology* **172**: 6697-6703.
- Bendezú, F. O., C. A. Hale, T. G. Bernhardt & P. A. J. de Boer, (2009) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The EMBO Journal* **28**: 193-204.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tárraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, P. J. & H. D. A., (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Benveniste, R. & J. Davies, (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 2276-2280.
- Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, E. Kulauzovic, C. Weidenmaier, A. Peschel & F. Götz, (2007) Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **189**: 280-283.
- Bérdy, J., (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* **58**: 1-26.
- Bernhardt, T. G. & P. A. J. de Boer, (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Molecular Cell* **18**: 555-564.
- Bhavsar, A. P. & E. D. Brown, (2006) Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Molecular Microbiology* **60**: 1077-1090.
- Bhavsar, A. P., M. A. D'Elia, T. D. Sahakian & E. D. Brown, (2007) The Amino terminus of *Bacillus subtilis* TagB possesses separable localization and functional properties. *Journal of Bacteriology* **189**: 6816-6823.
- Bhavsar, A. P., L. K. Erdman, J. W. Schertzer & E. D. Brown, (2004) Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid. *Journal of Bacteriology* **186**: 7865-7873.
- Bhavsar, A. P., R. Truant & E. D. Brown, (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. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 36691-36700.
- Bi, E. F. & J. Lutkenhaus, (1991) FtsZ ring structure associated with division in *E. coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao & B. E. Schoner, (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**: 43-49.
- Birnboim, H. C. & J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Boneca, I. G., Z. H. Huang, D. A. Gage & A. Tomasz, (2000) Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-acetylglucosaminidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 9910-9918.
- Bork, P., C. Sander & A. Valencia, (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7290-7294.
- Bouhss, A., A. E. Trunkfield, T. D. H. Bugg & D. Mengin-Lecreulx, (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 208-233.
- Boyle, D. S., M. M. Khatrar, S. G. Addinall, J. Lutkenhaus & W. D. Donachie, (1997) ftsW is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **24**: 1263-1273.
- Bramhill, D. & C. M. Thompson, (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5813-5817.

- Brooks, D., L. L. Mays, Y. Hatefi & F. E. Young, (1971) Glucosylation of teichoic acid: solubilization and partial characterization of the uridine diphosphoglucose: polyglycerolteichoic acid glucosyl transferase from membranes of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **107**: 223-229.
- Brown, S., Y.-H. Zhang & S. Walker, (2008) A revised pathway proposed for *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid biosynthesis based on *in vitro* reconstitution of the intracellular steps. *Chemistry & Biology* **15**: 12-21.
- Buchanan, R. E., (1917) Studies on the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the Schizomycetes. *Journal of Bacteriology* **2**: 155-164.
- Buddelmeijer, N. & J. Beckwith, (2004) A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Molecular Microbiology* **52**: 1315-1327.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez & M. J. Short, (1987) X-L1blue, a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Burge, R. E., R. Adams, H. H. Balyuzi & D. A. Reaveley, (1977a) Structure of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. *Journal of Molecular Biology* **117**: 955-974.
- Burge, R. E., A. G. Fowler & D. A. Reaveley, (1977b) Structure of the peptidoglycan of bacterial cell walls. I. *Journal of Molecular Biology* **117**: 927-953.
- Burger, A., K. Sichler, G. Kelemen, M. Buttner & W. Wohlleben, (2000) Identification and characterization of the *mre* gene region of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular & General Genetics* **263**: 1053-1060.
- Burman, L. G. & J. T. Park, (1984) Molecular model for elongation of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1844-1848.
- Burman, L. G., J. Raichler & J. T. Park, (1983) Evidence for diffuse growth of the cylindrical portion of the *Escherichia coli* murein sacculus. *Journal of Bacteriology* **155**: 983-988.
- Cabeen, M. T. & C. Jacobs-Wagner, (2005) Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 601-610.
- Cabeen, M. T. & C. Jacobs-Wagner, (2007) Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **179**: 381-387.
- Campbell, J., A. K. Singh, J. P. J. Santa Maria, Y. Kim, S. Brown, J. G. Swoboda, E. Mylonakis, B. J. Wilkinson & S. Walker, (2011) Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chemical Biology* **6**: 106-116.
- Capstick, D. S., J. M. Willey, M. J. Buttner & M. A. Elliot, (2007) SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* **64**: 602-613.
- Carballido-López, R., (2006) Orchestrating bacterial cell morphogenesis. *Molecular Microbiology* **60**: 815-819.
- Carballido-López, R. & J. Errington, (2003) The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Developmental Cell* **4**: 19-28.
- Carballido-López, R., A. Formstone, Y. Li, S. D. Ehrlich, P. Noirot & J. Errington, (2006) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Developmental Cell* **11**: 399-409.
- Carson, M. J., J. Barondess & J. Beckwith, (1991) The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *Journal of Bacteriology* **173**: 2187-2195.
- Cegelski, L., G. R. Marshall, G. R. Eldridge & S. J. Hultgren, (2008) The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews: Microbiology* **6**: 17-27.
- Cha, J.-H. & G. C. Stewart, (1997) The *divIVA* minicell locus of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **179**: 1671-1683.
- Chakraborty, R. & M. Bibb, (1997) The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology* **179**: 5854-5861.

- Champness, W. C., (1988) New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *Journal of Bacteriology* **170**: 1168-1174.
- Chater, K. F., (1972) A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* **72**: 9-28.
- Chater, K. F., (1990) The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing Streptomycetes. *Biotechnology (N Y)* **8**: 115-121.
- Chater, K. F., (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology* **47**: 685-713.
- Chater, K. F., (2001) Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 667-673.
- Chatterjee, A. N., (1969) Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **98**: 519-527.
- Chen, P. S., T. Y. Toribara & H. Warner, (1956) Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry* **28**: 1756-1758.
- Childs, W. C., D. J. Taron & F. C. Neuhaus, (1985) Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid by *Lactobacillus casei*: interchain transacylation of D-alanyl ester residues. *Journal of Bacteriology* **162**: 1191-1195.
- Claessen, D., R. Rink, W. de Jong, J. Siebring, P. de Vreugd, F. G. Boersma, L. Dijkhuizen & H. A. Wösten, (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development* **17**: 1714-1726.
- Claessen, D., I. Stokroos, H. J. Deelstra, N. A. Penninga, C. Bormann, J. A. Salas, L. Dijkhuizen & H. A. B. Wösten, (2004) The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Molecular Microbiology* **53**: 433-443.
- Claessen, D., H. A. Wösten, G. van Keulen, O. G. Faber, A. M. Alves, W. G. Meijer & L. Dijkhuizen, (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. *Molecular Microbiology* **44**: 1483-1492.
- Clarke-Sturman, A. J., A. R. Archibald, I. C. Hancock, C. R. Harwood, T. Merad & J. A. Hobot, (1989) Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: partial conservation of polar wall material and the effect of growth conditions on the pattern of incorporation of new material at the polar caps. *Journal of General Microbiology* **135**: 657-665.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang & L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Cole, R. M. & J. J. Hahn, (1962) Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science* **135**: 722-724.
- Coley, J., E. Tarelli, A. R. Archibald & J. Baddiley, (1978) The linkage between teichoic acid and peptidoglycan in bacterial cell walls. *FEBS Letters* **88**: 1-9.
- Collins, L. V., S. A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K. P. M. van Kessel, J. A. G. van Strijp, F. Götz, B. Neumeister & A. Peschel, (2002) *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *Journal of Infectious Diseases* **186**: 214-219.
- Cooper, S. & M. W. Denny, (1997) A conjecture on the relationship of bacterial shape to motility in rod-shaped bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **148**: 227-231.
- Crowe, J. H., L. M. Crowe & D. Chapman, (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**: 701-703.
- D'Elia, M. A., J. A. Henderson, T. J. Beveridge, D. E. Heinrichs & E. D. Brown, (2009a) The N-acetylmannosamine transferase catalyzes the first committed step of teichoic acid assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **191**: 4030-4034.
- D'Elia, M. A., K. E. Millar, T. J. Beveridge & E. D. Brown, (2006) Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 8313-8316.
- D'Elia, M. A., K. E. Millar, A. P. Bhavsar, A. M. Tomljenovic, B. Hutter, C. Schaab, G. Moreno-Hagelsieb & E. D. Brown, (2009b) Probing teichoic acid genetics with bioactive molecules reveals new

- interactions among diverse processes in bacterial cell wall biogenesis. *Chemistry & Biology* **16**: 548-556.
- Dai, K. & J. Lutkenhaus, (1991) *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**: 3500-3506.
- Daniel, R. A. & J. Errington, (1993) DNA sequence of the *murE-murD* region of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of General Microbiology* **139**: 361-370.
- Daniel, R. A. & J. Errington, (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767-776.
- Daniel, R. A., E. J. Harry & J. Errington, (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **35**: 299-311.
- de Boer, P. A., W. R. Cook & L. I. Rothfield, (1990) Bacterial cell division. *Annual Review of Genetics* **24**: 249-274.
- de Boer, P. A. J., R. E. Crossley & L. I. Rothfield, (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the *minicell* locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**: 641-649.
- de Chastellier, C., C. Frehel & A. Ryter, (1975) Cell wall growth of *Bacillus megaterium*: cytoplasmic radioactivity after pulse-labeling with tritiated diaminopimelic acid. *Journal of Bacteriology* **123**: 1197-1207.
- de Pedro, M. A., W. D. Donachie, J. V. Höltje & H. Schwarz, (2001) Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *Journal of Bacteriology* **183**: 4115-4126.
- de Pedro, M. A., J. C. Quintela, J.-V. Höltje & H. Schwarz, (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**: 2823-2834.
- Defeu Soufo, H. J. & P. L. Graumann, (2004) Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Reports* **5**: 789-794.
- Defeu Soufo, H. J. & P. L. Graumann, (2006) Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Molecular Microbiology* **62**: 1340-1356.
- Defeu Soufo, H. J., C. Reimold, U. Linne, T. Knust, J. Gescher & P. L. Graumann, (2010) Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3163-3168.
- Delmas, C., M. Gilleron, T. Brando, A. Vercellone, M. Gheorghui, M. Riviere & G. Puzo, (1997) Comparative structural study of the mannosylated-lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains: characterization and localization of succinates. *Glycobiology* **7**: 811-817.
- Demain, A. L., (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 455-463.
- den Blaauwen, T., M. E. Aarsman, N. O. Vischer & N. Nanninga, (2003) Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Molecular Microbiology* **47**: 539-547.
- den Blaauwen, T., M. A. de Pedro, M. Nguyen-Distèche & J. A. Ayala, (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 321-344.
- Denome, S. A., P. K. Elf, T. A. Henderson, D. E. Nelson & K. D. Young, (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *Journal of Bacteriology* **181**: 3981-3993.
- Derman, A. I., E. C. Becker, B. D. Truong, A. Fujioka, T. M. Tucey, M. L. Erb, P. C. Patterson & J. Pogliano, (2009) Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Molecular Microbiology* **73**: 534-552.
- Desai, A. & T. J. Mitchison, (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 83-117.

- Di Berardino, M., A. Dijkstra, D. Stüber, W. Keck & M. Gubler, (1996) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Letters* **392**: 184-188.
- Divakaruni, A. V., C. Baida, C. L. White & J. W. Gober, (2007) The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Molecular Microbiology* **66**: 174-188.
- Divakaruni, A. V., R. R. Ogorzalek Loo, Y. Xie, J. A. Loo & J. W. Gober, (2005) The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18602-18607.
- Doi, M., M. Wachi, F. Ishino, S. Tomioka, M. Ito, Y. Sakagami, A. Suzuki & M. Matsushashi, (1988) Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology* **170**: 4619-4624.
- Domínguez-Escobar, J., A. Chastanet, A. H. Crevenna, V. Fromion, R. Wedlich-Söldner & R. Carballido-López, (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**: 225-228.
- Dominguez, R. & K. C. Holmes, (2011) Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics* **40**: 169-186.
- Donachie, W. D., (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology* **47**: 199-230.
- Donachie, W. D., K. J. Begg & M. Vicente, (1976) Cell length, cell growth and cell division. *Nature* **264**: 328-333.
- Duckworth, M., A. R. Archibald & J. Baddiley, (1975) Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in *Staphylococcus aureus* H. *FEBS Letters* **53**: 176-179.
- Dusenbery, D. B., (1998) Fitness landscapes for effects of shape on chemotaxis and other behaviors of bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**: 5978-5983.
- Eckhardt, T., (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Edwards, D. H. & J. Errington, (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Molecular Microbiology* **24**: 905-915.
- Edwards, D. H., H. B. Thomaides & J. Errington, (2000) Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *The EMBO Journal* **19**: 2719-2727.
- Ehlert, K. & J.-V. Höltje, (1996) Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **178**: 6766-6771.
- El Ghachi, M., A. Derbise, A. Bouhss & D. Mengin-Lecreulx, (2005) Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 18689-18695.
- Elliot, M. A., N. Karoonuthaisiri, J. Huang, M. J. Bibb, S. N. Cohen, C. M. Kao & M. J. Buttner, (2003) The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes & Development* **17**: 1727-1740.
- Ellwood, D. C., (1970) The wall content and composition of *Bacillus subtilis* var. *niger* grown in a chemostat. *The Biochemical Journal* **118**: 367-373.
- Ellwood, D. C. & D. W. Tempest, (1967) Teichoic acid or teichuronic acid in the walls of *Bacillus subtilis* var. *niger*, grown in a chemostat. *The Biochemical Journal* **104**: 69P.
- Elowitz, M. B., M. G. Surette, P.-E. Wolf, J. B. Stock & S. Leibler, (1999) Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 197-203.
- Ensign, J. C., (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology* **32**: 185-219.
- Erickson, H. P., (1998) Atomic structures of tubulin and FtsZ. *Trends in Cell Biology* **8**: 133-137.
- Erickson, H. P., (2001) Cytoskeleton. Evolution in bacteria. *Nature* **413**: 30.
- Errington, J., R. A. Daniel & D. J. Scheffers, (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 52-65.

- Esue, O., D. Wirtz & Y. Tseng, (2006) GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *Journal of Bacteriology* **188**: 968-976.
- Fabretti, F., C. Theilacker, L. Baldassarri, Z. Kaczynski, A. Kropec, O. Holst & J. Huebner, (2006) Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity* **74**: 4164-4171.
- Fan, D. P., B. E. Beckman & H. L. Gardner-Eckstrom, (1975) Mode of cell wall synthesis in gram-positive bacilli. *Journal of Bacteriology* **123**: 1157-1162.
- Fang, X., K. Tiyanont, Y. Zhang, J. Wanner, D. Boger & S. Walker, (2006) The mechanism of action of ramoplanin and enduracidin. *Molecular BioSystems* **2**: 69-76.
- Fedtke, I., D. Mader, T. Kohler, H. Moll, G. Nicholson, R. Biswas, K. Henseler, F. Götz, U. Zähringer & A. Peschel, (2007) A *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Molecular Microbiology* **65**: 1078-1091.
- Figge, R. M., A. V. Divakaruni & J. W. Gober, (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology* **51**: 1321-1332.
- Fischer, W., T. Behr, R. Hartmann, J. Peter-Katalinić & H. Egge, (1993) Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *European Journal of Biochemistry* **215**: 851-857.
- Flaherty, K. M., C. DeLuca-Flaherty & D. B. McKay, (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**: 623-628.
- Flärdh, K., (2003a) Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **49**: 1523-1536.
- Flärdh, K., (2003b) Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 564-571.
- Flärdh, K. & M. J. Buttner, (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 36-49.
- Flärdh, K., E. Leibovitz, M. J. Buttner & K. F. Chater, (2000) Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter. *Molecular Microbiology* **38**: 737-749.
- Fletcher, D. A. & R. D. Mullins, (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**: 485-492.
- Formstone, A., R. Carballido-López, P. Noirot, J. Errington & D. J. Scheffers, (2008) Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **190**: 1812-1821.
- Formstone, A. & J. Errington, (2005) A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of MreB in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **55**: 1646-1657.
- Frère, J.-M., (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology* **16**: 385-395.
- Fu, X., Y. L. Shih, Y. Zhang & L. I. Rothfield, (2001) The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 980-985.
- Fuchs, E. & K. Weber, (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review of Biochemistry* **63**: 345-382.
- Furano, A. V., (1975) Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 4780-4784.
- Gan, L., S. Chen & G. J. Jensen, (2008) Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18953-18957.
- Ganfield, M.-C. W. & R. A. Pieringer, (1980) The biosynthesis of nascent membrane lipoteichoic acid of *Streptococcus faecium* (*S. faecalis* ATCC 9790) from phosphatidylkojibiosyl diacylglycerol and phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* **255**: 5164-5169.

- Garner, E. C., R. Bernard, W. Wang, X. Zhuang, D. Z. Rudner & T. Mitchison, (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**: 222-225.
- Garner, E. C., C. S. Campbell & R. D. Mullins, (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* **306**: 1021-1025.
- Garton, N. J., M. Gilleron, T. Brando, H.-H. Dan, S. Giguère, G. Puzo, J. F. Prescott & I. C. Sutcliffe, (2002) A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production *Journal of Biological Chemistry* **277**: 31722-31733.
- Gerdes, K., (2009) RodZ, a new player in bacterial cell morphogenesis. *The EMBO Journal* **28**: 171-172.
- Ghosh, A. S. & K. D. Young, (2003) Sequences near the active site in chimeric penicillin binding proteins 5 and 6 affect uniform morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**: 2178-2186.
- Ghuysen, J.-M., (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology* **45**: 37-67.
- Gitai, Z., (2005) The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* **120**: 577-586.
- Glauert, A. M. & D. A. Hopwood, (1961) The fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (*S. coelicolor*). III. The walls of the mycelium and spores. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **10**: 505-516.
- Glauner, B. & J.-V. Höltje, (1990) Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 18988-18996.
- Glauner, B., J.-V. Höltje & U. Schwarz, (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 10088-10095.
- Goehring, N. W. & J. Beckwith, (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Current Biology* **15**: R514-R526.
- Goffin, C., C. Fraipont, J. A. Ayala, M. Terrak, M. Nguyen-Distèche & J.-M. Ghuysen, (1996) The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *Journal of Bacteriology* **178**: 5402-5409.
- Goffin, C. & J.-M. Ghuysen, (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1079-1093.
- Goodell, E. W., (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **163**: 305-310.
- Goodfellow, M. & S. T. Williams, (1983) Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **37**: 189-216.
- Graham, L. L. & T. J. Beveridge, (1994) Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *Journal of Bacteriology* **176**: 1413-1421.
- Grant, W. D., (1979) Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **137**: 35-43.
- Grantcharova, N., U. Lustig & K. Flärdh, (2005) Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **187**: 3227-3237.
- Grantcharova, N., W. Ubhayasekera, S. L. Mowbray, J. R. McCormick & K. Flärdh, (2003) A missense mutation in *ftsZ* differentially affects vegetative and developmentally controlled cell division in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **47**: 645-656.
- Graumann, P. L., (2004) Cytoskeletal elements in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 565-571.
- Graumann, P. L., (2007) Cytoskeletal elements in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **61**: 589-618.
- Gray, D. I., G. W. Gooday & J. I. Prosser, (1990) Apical hyphal extension in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* **136**: 1077-1084.

- Gross, M., S. E. Cramton, F. Götz & A. Peschel, (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity* **69**: 3423-3426.
- Gründling, A. & O. Schneewind, (2007) Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8478-8483.
- Gueiros-Filho, F. J. & R. Losick, (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & Development* **16**: 2544-2556.
- Gunetileke, K. G. & R. A. Anwar, (1968) Biosynthesis of uridine diphospho-N-acetylmuramic acid. II. Purification and properties of pyruvate-uridine diphospho-N-acetylglucosamine transferase and characterization of uridine diphospho-N-acetylenopyruvylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* **243**: 5770-5778.
- Güssow, D. & T. Clackson, (1989) Direct clone characterization from plagues and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **17**: 4000.
- Guzman, L.-M., J. J. Barondess & J. Beckwith, (1992) FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**: 7716-7728.
- Haas, R., H. U. Koch & W. Fischer, (1984) Alanyl turnover from lipoteichoic acid to teichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **21**: 27-31.
- Hale, C. A. & P. A. J. de Boer, (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**: 175-185.
- Hale, C. A., H. Meinhardt & P. A. J. de Boer, (2001) Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **20**: 1563-1572.
- Hamoen, L. W. & J. Errington, (2003) Polar targeting of DivIVA in *Bacillus subtilis* is not directly dependent on FtsZ or PBP 2B. *Journal of Bacteriology* **185**: 693-697.
- Hara, H. & H. Suzuki, (1984) A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **168**: 155-160.
- Hara, H., S. Yasuda, K. Horiuchi & J. T. Park, (1997) A promoter for the first nine genes of the *Escherichia coli mra* cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including *ftsI* and *ftsW*. *Journal of Bacteriology* **179**: 5802-5811.
- Harold, F. M., (2007) Bacterial morphogenesis: learning how cells make cells. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 591-595.
- Hartman, B. J. & A. Tomasz, (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **158**: 513-516.
- Harz, H., K. Burgdorf & J.-V. Höltje, (1990) Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **190**: 120-128.
- Hayashi, K., (1975) A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. *Analytical Biochemistry* **67**: 503-506.
- Hegermann, J., R. Herrmann & F. Mayer, (2002) Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Naturwissenschaften* **89**: 453-458.
- Heichlinger, A., (2011) Charakterisierung der MreB homologen Proteine während der morphologischen Differenzierung in *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: Mikrobiologie/Biotechnologie. Tübingen: Eberhard Karls Universität pp. 101.
- Helms, M. K. & D. M. Jameson, (1995) Polymerization of an *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **321**: 303-310.
- Helmstetter, C. E. & A. C. Leonard, (1990) Involvement of cell shape in the replication and segregation of chromosomes in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* **141**: 30-39.
- Hempel, A. M., S. B. Wang, M. Letek, J. A. Gil & K. Flärdh, (2008) Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **190**: 7579-7583.
- Henning, U., K. Rehn, V. Braun & B. Höhn, (1972) Cell envelope and shape of *Escherichia coli* K12. Properties of a temperature-sensitive rod mutant. *European Journal of Biochemistry* **26**: 570-586.

- Henriques, A. O., P. Glaser, P. J. Piggot & C. P. J. Moran, (1998) Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *B. subtilis*. *Molecular Microbiology* **28**: 235-247.
- Heptinstall, S., A. R. Archibald & J. Baddiley, (1970) Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* **225**: 519-521.
- Herrmann, H. & U. Aebi, (2004) Intermediate Filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annual Review of Biochemistry* **73**: 749-789.
- Herrmann, H., S. V. Strelkov, P. Burkhard & U. Aebi, (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *Journal of Clinical Investigation* **119**: 1772-1783.
- Higashi, Y., J. L. Strominger & C. C. Sweeley, (1967) Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C₅₅ isoprenoid alcohol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**: 1878-1884.
- Hirsch, C. F. & J. C. Ensign, (1978) Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *Journal of Bacteriology* **134**: 1056-1063.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard & W. Kabsch, (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44-49.
- Höltje, J.-V., (1996) Molecular interplay of murein synthases and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance* **2**: 99-103.
- Höltje, J.-V., (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 181-203.
- Höltje, J.-V., (2001) The alternative to penicillins. *Nature Medicine* **7**: 1100-1101.
- Höltje, J.-V. & C. Heidrich, (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**: 103-108.
- Honeyman, A. L. & G. C. Stewart, (1989) The nucleotide sequence of the *rodC* operon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **3**: 1257-1268.
- Hong, H.-J., M. I. Hutchings, J. M. Neu, G. D. Wright, M. S. B. Paget & M. J. Buttner, (2004) Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. *Molecular Microbiology* **52**: 1107-1121.
- Hood, D. W., R. Heidstra, U. K. Swoboda & D. A. Hodgson, (1992) Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism - a review. *Gene* **115**: 5-12.
- Hopwood, D. A., (1959) Linkage and the mechanism of recombination in *Streptomyces coelicolor*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **81**: 887-898.
- Hopwood, D. A., (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* **145**: 2183-2202.
- Hu, Z. & J. Lutkenhaus, (1999) Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Molecular Microbiology* **34**: 82-90.
- Hübscher, J., L. Lüthy, B. Berger-Bächi & P. Stutzmann Meier, (2008) Phylogenetic distribution and membrane topology of the LytR-CpsA-Psr protein family. *BMC Genomics* **9**: 617.
- Hübscher, J., N. McCallum, C. D. Sifri, P. A. Majcherczyk, J. M. Entenza, R. Heusser, B. Berger-Bächi & P. Stutzmann Meier, (2009) MsrR contributes to cell surface characteristics and virulence in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **295**: 251-260.
- Hudson, M. E., D. Zhang & J. R. Nodwell, (2002) Membrane association and kinase-like motifs of the RamC protein of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **184**: 4920-4924.
- Hughes, R. C. & P. F. Thurman, (1970) Some structural features of the teichuronic acid of *Bacillus licheniformis* N.C.T.C 6346 cell walls. *The Biochemical Journal* **117**: 441-449.
- Hurley, J. H., R. H. Faber, D. Worthylake, N. D. Meadow, S. Roseman, D. W. Pettigrew & S. J. Remington, (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III^{Glc} with glycerol kinase. *Science* **259**: 673-677.

- Ikeda, M., M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino & M. Matsushashi, (1991) The *Escherichia coli mraY* gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide: undecaprenyl-phosphate phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase. *Journal of Bacteriology* **173**: 1021-1026.
- Ishino, F., W. Park, S. Tomioka, S. Tamaki, I. Takase, K. Kunugita, H. Matsuzawa, S. Asoh, T. Ohta, B. G. Spratt & M. Matsushashi, (1986) Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 704-731.
- Ito, E. & J. L. Strominger, (1962a) Enzymatic synthesis of the peptide in bacterial uridine nucleotides. I. Enzymatic addition of L-alanine, D-glutamic acid, and L-lysine. *Journal of Biological Chemistry* **237**: 2689-2693.
- Ito, E. & J. L. Strominger, (1962b) Enzymatic synthesis of the peptide in bacterial uridine nucleotides. II. Enzymatic synthesis and addition of D-alanyl-D-alanine. *Journal of Biological Chemistry* **237**: 2696-2703.
- Iwasaki, H., A. Shimada & E. Ito, (1986) Comparative studies of lipoteichoic acids from several *Bacillus* strains. *Journal of Bacteriology* **167**: 508-516.
- James, G. A., D. R. Korber, D. E. Caldwell & J. W. Costerton, (1995) Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. . *Journal of Bacteriology* **177**: 907-915.
- Jiang, H. & S. Sun, (2010) Morphology, growth, and size limit of bacterial cells. *Physical Review Letters* **105**.
- Jones, L. J. F., R. Carballido-López & J. Errington, (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Jordan, M. A. & L. Wilson, (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* **4**: 253-265.
- Kabsch, W. & K. C. Holmes, (1995) The actin fold. *FASEB Journal* **9**: 167-174.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant, (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.
- Kawai, Y., R. A. Daniel & J. Errington, (2009) Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Molecular Microbiology* **71**: 1131-1144.
- Kawai, Y., J. Marles-Wright, R. M. Cleverley, R. Emmins, S. Ishikawa, M. Kuwano, N. Heinz, N. K. Bui, C. N. Hoyland, N. Ogasawara, R. J. Lewis, W. Vollmer, R. A. Daniel & J. Errington, (2011) A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *The EMBO Journal* **30**: 4931-4941.
- Kawai, Y. & N. Ogasawara, (2006) *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology* **152**: 1129-1141.
- Kelemen, G. H. & M. J. Buttner, (1998) Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 656-662.
- Kendrick, K. E. & J. C. Ensign, (1983) Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *Journal of Bacteriology* **155**: 357-366.
- Kieser, H. M., T. Kieser & D. A. Hopwood, (1992) A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Journal of Bacteriology* **174**: 5496-5507.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater & D. A. Hopwood, (2000) *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich.
- Kieser, T., D. A. Hopwood, H. M. Wright & C. J. Thompson, (1982) pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Molecular & General Genetics* **185**: 223-238.
- Kim, S. Y., Z. Gitai, A. Kinkhabwala, L. Shapiro & W. E. Moerner, (2006) Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10929-10934.
- Kinoshita, K., I. Arnal, A. Desai, D. N. Drechsel & A. A. Hyman, (2001) Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* **294**: 1340-1343.
- Kleinschnitz, E.-M., A. Heichlinger, K. Schirner, J. Winkler, A. Latus, I. Maldener, W. Wohlleben & G. Muth, (2011a) Proteins encoded by the *mre* gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Molecular Microbiology* **79**: 1367-1379.

- Kleinschnitz, E.-M., A. Latus, S. Sigle, I. Maldener, W. Wohlleben & G. Muth, (2011b) Genetic analysis of *SCO2997*, encoding a TagF homologue, indicates a role of wall teichoic acids in sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **193**.
- Koch, A., (2000) Length distribution of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of Theoretical Biology* **204**: 533-541.
- Koch, A. L., (1982) On the growth and form of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **128**: 2527-2539.
- Koch, A. L., (1985) Bacterial wall growth and division or life without actin. *Trends in Biochemical Sciences* **10**: 11-14.
- Koch, A. L., (1988) Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric. *Microbiological Reviews* **52**: 337-353.
- Koch, A. L., (1990) The surface stress theory for the case of *Escherichia coli*: the paradoxes of gram-negative growth. *Research in Microbiology* **141**: 119-130.
- Koch, A. L. & R. J. Doyle, (1985) Inside-to-outside growth and turnover of the wall of gram-positive rods. *Journal of Theoretical Biology* **117**: 137-157.
- Koch, A. L., M. L. Higgins & R. J. Doyle, (1982) The role of the surface stress in the morphology of microbes. *Journal of General Microbiology* **128**: 927-945.
- Koch, A. L. & S. Woeste, (1992) Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**: 4811-4819.
- Kodani, S., (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11448-11453.
- Kohler, T., C. Weidenmaier & A. Peschel, (2009) Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin. *Journal of Bacteriology* **191**: 4482-4484.
- Korn, E. D., M.-F. Carlier & D. Pantaloni, (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**: 638-644.
- Kovács, M., A. Halfmann, I. Fedtke, M. Heintz, A. Peschel, W. Vollmer, R. Hakenbeck & R. Brückner, (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **188**: 5797-5805.
- Kristian, S. A., X. Lauth, V. Nizet, F. Götz, B. Neumeister, A. Peschel & R. Landmann, (2003) Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *Journal of Infectious Diseases* **188**: 414-423.
- Kron, S. J., D. G. Drubin, D. Botstein & J. A. Spudich, (1992) Yeast actin filaments display ATP-dependent sliding movement over surfaces coated with rabbit muscle myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4466-4470.
- Kruse, T., J. Bork-Jensen & K. Gerdes, (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Molecular Microbiology* **55**: 78-89.
- Kruse, T., J. Møller-Jensen, A. Løbner-Olesen & K. Gerdes, (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **22**: 5283-5292.
- Kürner, J., A. S. Frangakis & W. Baumeister, (2005) Cryo-Electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* **307**: 436-438.
- Lahooti, M. & C. R. Harwood, (1999) Transcriptional analysis of the *Bacillus subtilis* teichuronic acid operon. *Microbiology* **145**: 3409-3417.
- Lahey, J. H., E. J. Lea, B. A. Rudd, H. M. Wright & D. A. Hopwood, (1983) A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *Journal of General Microbiology* **129**: 3565-3573.
- Lambert, P. A., I. C. Hancock & J. Baddiley, (1977) Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **472**: 1-12.
- Lang, W. K., K. Glassey & A. R. Archibald, (1982) Influence of phosphate supply on teichoic acid and teichuronic acid content of *Bacillus subtilis* cell walls. *Journal of Bacteriology* **151**: 367-375.
- Lapidot, A. & C. S. Irving, (1979) Comparative in vivo nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of the cell wall components of five Gram-positive bacteria. *Biochemistry* **18**: 704-714.

- Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance & O. Massida, (2005) Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Molecular Microbiology* **55**: 699-711.
- Larsen, R. A., C. Cusumano, A. Fujioka, G. Lim-Fong, P. Patterson & J. Pogliano, (2007) Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes & Development* **21**: 1340-1352.
- Lazarevic, V., F.-X. Abellan, S. B. Möller, D. Karamata & C. Mauël, (2002) Comparison of ribitol and glycerol teichoic acid genes in *Bacillus subtilis* W23 and 168: identical function, similar divergent organization, but different regulation. *Microbiology* **148**: 815-824.
- Lazarevic, V. & D. Karamata, (1995) the *tagGH* operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. *Molecular Microbiology* **16**: 345-355.
- Leaver, M. & J. Errington, (2005) Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **57**: 1196-1209.
- Lechevalier, H. A. & M. P. Lechevalier, (1967) Biology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **21**: 71-100.
- Letek, M., E. Ordonez, J. Vaquera, W. Margolin, K. Flardh, L. M. Mateos & J. A. Gil, (2008) DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped Actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* **190**: 3283-3292.
- Levin, P. A., I. G. Kurtser & A. D. Grossman, (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9642-9647.
- Levin, P. A., P. S. Margolis, P. Setlow, R. Losick & D. Sun, (1992) Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *Journal of Bacteriology* **174**: 6717-6728.
- Levy, S. B. & B. Marshall, (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* **10**: S122-S129.
- Leyh-Bouille, M., R. Bonaly, J.-M. Ghuyssen, R. Tinelli & D. J. Tipper, (1970) LL-Diaminopimelic acid containing peptidoglycans in walls of *Streptomyces* sp. and of *Clostridium perfringens* (Type A). *Biochemistry* **9**: 2944-2952.
- Li, Z., M. J. Trimble, Y. V. Brun & G. J. Jensen, (2007) The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. *The EMBO Journal* **26**: 4694-4708.
- Liu, G., G. C. Draper & W. D. Donachie, (1998) FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **29**: 893-903.
- Lleo, M. M., P. Canepari & G. Satta, (1990) Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *Journal of Bacteriology* **172**: 3758-3771.
- Löwe, J. & L. A. Amos, (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Löwe, J. & L. A. Amos, (1999) Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺-induced FtsZ sheets. *The EMBO journal* **18**: 2364-2371.
- Löwe, J., F. van den Ent & L. A. Amos, (2004) Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **33**: 177-198.
- Lu, C., M. Reedy & H. P. Erickson, (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *Journal of Bacteriology* **182**: 164-170.
- Lu, C., J. Stricker & H. P. Erickson, (1998) FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima* - quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **40**: 71-86.
- Lucas-Lenard, J. & F. Lipmann, (1971) Protein biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* **40**: 409-448.
- Lutkenhaus, J., (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annual Review of Biochemistry* **76**: 539-562.
- Lutkenhaus, J. & S. G. Addinall, (1997) Bacterial cell division and the Z ring. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 93-116.

- Lutkenhaus, J. F., H. Wolf-Watz & W. D. Donachie, (1980) Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *Journal of Bacteriology* **142**: 615-620.
- MacNeil, D. J., K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons & T. MacNeil, (1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**: 61-68.
- Marquardt, J. L., D. A. Siegele, R. Kolter & C. T. Walsh, (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *Journal of Bacteriology* **174**: 5748-5752.
- Marrec-Fairley, M., A. Piette, X. Gallet, R. Bresseur, H. Hara, C. Fraipont, J. M. Ghuysen & M. Nguyen-Distèche, (2000) Differential functionalities of amphiphilic peptide segments of the cell-septation penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **37**: 1019-1031.
- Marston, A. L. & J. Errington, (1999) Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Molecular Microbiology* **33**: 84-96.
- Marston, A. L., H. B. Thomaidis, D. H. Edwards, M. E. Sharpe & J. Errington, (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes & Development* **12**: 3419-3430.
- Martínez-Costa, O. H., P. Arias, N. M. Romero, V. Parro, R. P. Mellado & F. Malpartida, (1996) A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 10627-10634.
- Massova, I. & S. Mobashery, (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 1-17.
- Matias, V. R. F. & T. J. Beveridge, (2005) Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Molecular Microbiology* **56**: 240-251.
- Matsuzawa, H., S. Asoh, K. Kunai, K. Muraiso, A. Takasuga & T. Ohta, (1989) Nucleotide sequence of the *rodA* gene, responsible for the rod shape of *Escherichia coli*: *rodA* and the *pbpA* gene, encoding penicillin-binding protein 2, constitute the *rodA* operon. *Journal of Bacteriology* **171**: 558-560.
- Matteï, P.-J., D. Neves & A. Dessen, (2010) Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 749-755.
- Mauck, J. & L. Glaser, (1972) On the mode of *in vivo* assembly of the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **247**: 1180-1187.
- Mauël, C., A. Bauduret, C. Chervet, S. Beggah & D. Karamata, (1995) In *Bacillus subtilis* 168, teichoic acid of the cross-wall may be different from that of the cylinder: a hypothesis based on transcription analysis of *tag* genes. *Microbiology* **141**: 2379-2389.
- Mauël, C., M. Young & D. Karamata, (1991) Genes concerned with synthesis of poly(glycerol phosphate), the essential teichoic acid in *Bacillus subtilis* strain 168, are organized in two divergent transcription units. *Journal of General Microbiology* **137**: 929-941.
- Mayer, F., (2006) Cytoskeletal elements in bacteria *Mycoplasma pneumoniae*, *Thermoanaerobacterium* sp., and *Escherichia coli* as revealed by electron microscopy. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **11**: 228-243.
- Mayer, F. & G. Gottschalk, (2003) The bacterial cytoskeleton and its putative role in membrane vesicle formation observed in a Gram-positive bacterium producing starch-degrading enzymes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **6**: 127-132.
- Mazza, P., (2005) Characterization of the Mre proteins in *Streptomyces coelicolor* M145 differentiation. In: Mikrobiologie/Biotechnologie. Tübingen: Eberhard Karls Universität, pp. 70.
- Mazza, P., E. E. Noens, K. Schirner, N. Grantcharova, A. M. Mommaas, H. K. Koerten, G. Muth, K. Flärdh, G. P. van Wezel & W. Wohlleben, (2006) MreB of *Streptomyces coelicolor* is not

- essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Molecular Microbiology* **60**: 838-852.
- McBride, M. J. & J. C. Ensign, (1987) Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology* **169**: 4995-5001.
- McCarthy, A. J. & S. T. Williams, (1992) Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* **115**: 189-192.
- McCormick, J. R., (2009) Cell division is dispensable but not irrelevant in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 689-698.
- McCormick, J. R. & R. Losick, (1996) Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **178**: 5295-5301.
- McCormick, J. R., E. P. Su, A. Driks & R. Losick, (1994) Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Molecular Microbiology* **14**: 243-254.
- McPherson, D. C. & D. L. Popham, (2003) Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1423-1431.
- Meberg, B. M., A. L. Paulson, R. Priyadarshini & K. D. Young, (2004) Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**: 8326-8336.
- Mercer, K. L. N. & D. S. Weiss, (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *Journal of Bacteriology* **184**: 904-912.
- Meredith, T. C., J. G. Swoboda & S. Walker, (2008) Late-stage polyribitol phosphate wall teichoic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **190**: 3046-3056.
- Merrick, M. J., (1976) A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* **96**: 299-315.
- Miguélez, E. M., C. Martín, M.-B. Manzanal & C. Hardisson, (1992) Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* **79**: 351-359.
- Mirelman, D., B. D. Beck & D. R. D. Shaw, (1970) The location of the D-alanyl ester in the ribitol teichoic acid of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **39**: 712-717.
- Mistry, B. V., R. Del Sol, C. Wright, K. Findlay & P. Dyson, (2008) FtsW is a dispensable cell division protein required for Z-ring stabilization during sporulation septation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5555-5566.
- Miyata, M. & H. Ogaki, (2006) Cytoskeleton of Mollicutes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **11**: 256-264.
- Mobley, H. L. T., A. L. Koch, R. J. Doyle & U. N. Streips, (1984) Insertion and fate of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **158**: 169-179.
- Mohammadi, T., A. Karczarek, M. Crouvoisier, A. Bouhss, D. Mengin-Lecreux & T. den Blaauwen, (2007) The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **65**: 1106-1121.
- Mohammadi, T., V. van Dam, R. Sijbrandi, T. Vernet, A. Zapun, A. Bouhss, M. Diepeveen-de Bruin, M. Nguyen-Distèche, B. de Kruijff & E. Breukink, (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal* **30**: 1425-1432.
- Møller-Jensen, J., R. B. Jensen, J. Löwe & K. Gerdes, (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *The EMBO Journal* **21**: 3119-3127.
- Møller-Jensen, J. & J. Löwe, (2005) Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 75-81.
- Morath, S., S. von Aulock & T. Hartung, (2005) Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *Journal of Endotoxin Research* **11**: 348-356.
- Muchová, K., E. Kutejová, D. J. Scott, J. A. Brannigan, R. J. Lewis, A. J. Wilkinson & I. Barák, (2002) Oligomerization of the *Bacillus subtilis* division protein DivIVA. *Microbiology* **148**: 807-813.
- Mukherjee, A. & J. Lutkenhaus, (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *Journal of Bacteriology* **176**: 2754-2758.

- Mukherjee, A. & J. Lutkenhaus, (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *The EMBO Journal* **17**: 462-469.
- Mulder, E. & C. L. Woldringh, (1989) Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *Journal of Bacteriology* **171**: 4303-4314.
- Müller, P., C. Ewers, U. Bertsche, M. Anstett, T. Kallis, E. Breukink, C. Fraipont, M. Terrak, M. Nguyen-Distèche & W. Vollmer, (2007) The essential cell division protein FtsN interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 36394-36402.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, H. G. & E. H., (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51**: 263-273.
- Nanninga, N., (1991) Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**: 791-795.
- Naumova, I. B., V. D. Kuznetsov, K. S. Kudrina & A. P. Bezzubenkova, (1980) The occurrence of teichoic acids in streptomycetes. *Archives of Microbiology* **126**: 71-75.
- Navarre, W. W. & O. Schneewind, (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 174-229.
- Nelson, D. E. & K. D. Young, (2000) Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**: 1714-1721.
- Neuhaus, F. C. & J. Baddiley, (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 686-723.
- Nguyen-Distèche, M., C. Fraipont, N. Buddelmeijer & N. Nanninga, (1998) The structure and function of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**: 309-316.
- Nguyen, L., N. Scherr, J. Gatfield, A. Walburger, J. Pieters & C. J. Thompson, (2007) Antigen 84, an effector of pleiomorphism in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* **189**: 7896-7910.
- Ni, L., W. Xu, M. Kumaraswami & M. A. Schumacher, (2010) Plasmid protein TubR uses a distinct mode of HTH-DNA binding and recruits the prokaryotic tubulin homolog TubZ to effect DNA partition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11763-11768.
- Nicolella, C., R. Di Felice & M. Rovatti, (1996) An experimental model of biofilm detachment in liquid fluidized bed biological reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **51**: 713-719.
- Nouaille, S., J. Commissaire, J. J. Gratadoux, P. Ravn, A. Bolotin, A. Gruss, Y. Le Loir & P. Langella, (2004) Influence of lipoteichoic acid D-alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* as revealed by random mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1600-1607.
- O'Connor, T. J., P. Kanellis & J. R. Nodwell, (2002) The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Molecular Microbiology* **45**: 45-57.
- Ogawara, H., N. Aoyagi, M. Watanabe & H. Urabe, (1999) Sequences and evolutionary analyses of eukaryotic-type protein kinases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145**: 3343-3352.
- Oh, E. A., W.-J. Chi, M.-S. Kim, S. S. Kang, J. Chun & S.-K. Hong, (2011) Characterization of the autophosphorylating kinase, PkaF, in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M130. *Archives of Microbiology* **193**: 845-856.
- Okanishi, M., K. Suzuki & H. Umezawa, (1974) Formation and reversion of Streptomyces protoplasts: cultural condition and morphological study. *Journal of General Microbiology* **80**: 389-400.
- Oku, Y., K. Kurokawa, M. Matsuo, S. Yamada, B. L. Lee & K. Sekimizu, (2009) Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. *Journal of Bacteriology* **191**: 141-151.

- Osawa, M., D. E. Anderson & H. P. Erickson, (2009) Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes. *The EMBO Journal* **28**: 3476-3484.
- Osteryoung, K. W. & E. Vierling, (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**: 473-474.
- Over, B., R. Heusser, N. McCallum, B. Schulthess, P. Kupferschmied, J. M. Gaiani, C. D. Sifri, B. Berger-Bächi & P. Stutzmann Meier, (2011) LytR-CpsA-Psr proteins in *Staphylococcus aureus* display partial functional redundancy and the deletion of all three severely impairs septum placement and cell separation. *FEMS Microbiology Letters* **320**: 142-151.
- Paradis-Bleau, C., M. Markovski, T. Uehara, T. J. Lupoli, S. Walker, D. E. Kahne & T. G. Bernhardt, (2010) Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* **143**: 1110-1120.
- Park, J. T. & J. L. Strominger, (1957) Mode of action of penicillin. *Science* **125**: 99-101.
- Park, J. T. & T. Uehara, (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**: 211-227.
- Park, Y. S., T. D. Sweitzer, J. E. Dixon & C. Kent, (1993) Expression, purification, and characterization of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 16648-16654.
- Perego, M., P. Glaser, A. Minutello, M. A. Strauch, K. Leopold & W. Fischer, (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 15598-15606.
- Peschel, A., (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* **10**: 179-186.
- Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung & F. Götz, (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 8405-8410.
- Peschel, A., C. Vuong, M. Otto & F. Götz, (2000) The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 2845-2847.
- Petríková, K. & M. Petříček, (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* **149**: 1609-1621.
- Pinho, M. G., H. de Lencastre & A. Tomasz, (2000) Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**: 1074-1079.
- Pinho, M. G. & J. Errington, (2003) Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Molecular Microbiology* **50**: 871-881.
- Pitzurra, M. & W. Szybalski, (1959) Formation and multiplication of spheroplasts of *Escherichia coli* in the presence of lithium chloride. *Journal of Bacteriology* **77**: 614-620.
- Pogliano, J., (2002) Dynamic cellular location of bacterial plasmids. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 586-590.
- Pollack, J. H. & F. C. Neuhaus, (1994) Changes of wall teichoic acid during the rod-sphere transition of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology* **176**: 7252-7259.
- Pooley, H. M., F.-X. Abellan & D. Karamata, (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. *Journal of General Microbiology* **137**: 921-928.
- Pooley, H. M., F.-X. Abellan & D. Karamata, (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*). *Journal of Bacteriology* **174**: 646-649.
- Pope, M. K., B. D. Green & J. Westpheling, (1996) The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Molecular Microbiology* **19**: 747-756.
- Popham, D. & K. D. Young, (2003) Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 594-599.
- Poralla, K., G. Muth & T. Härtner, (2000) Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters* **189**: 93-95.

- Potekhina, N. V., E. M. Tul'skaya, I. B. Naumova, A. S. Shashkov & L. I. Evtushenko, (1993) Erythritolteichoic acid in the cell wall of *Glycomyces tenuis* VKM Ac-1250. *European Journal of Biochemistry* **218**: 371-375.
- Powell, D. A., M. Duckworth & J. Baddiley, (1975) A membrane-associated lipomannan in micrococci. *The Biochemical Journal* **151**: 387-397.
- Pridmore, R. D., (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**: 309-312.
- Pucci, M. J., L. F. Discotto & T. J. Dougherty, (1992) Cloning and identification of the *Escherichia coli* *murB* DNA sequence, which encodes UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase. *Journal of Bacteriology* **174**: 1690-1693.
- Rahman, O., S. P. Cummings & I. C. Sutcliffe, (2009) Phenotypic variation in *Streptomyces* sp. DSM 40537, a lipoteichoic acid producing actinomycete. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 226-229.
- Ramos, A., M. P. Honrubia, N. Valbuena, J. Vaquera, L. M. Mateos & J. A. Gil, (2003) Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology* **149**: 3531-3542.
- Raskin, D. M. & P. A. J. de Boer, (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4971-4976.
- Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi & D. A. Hopwood, (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* **21**: 77-96.
- Romberg, L. & P. A. Levin, (2003) Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: Poised at the edge of stability. *Annual Review of Microbiology* **57**: 125-154.
- Romeis, T. & J.-V. Höltje, (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 21603-21607.
- Rothfield, L., S. Justice & J. García-Lara, (1999) Bacterial cell division. *Annual Review of Genetics* **33**: 423-448.
- Rudd, B. A. & D. A. Hopwood, (1980) A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. *Journal of General Microbiology* **119**: 333-340.
- Rueda, B., E. M. Miguélez, C. Hardisson & M.-B. Manzanal, (2001) Changes in glycogen and trehalose content of *Streptomyces brasiliensis* hyphae during growth in liquid cultures under sporulating and non-sporulating conditions. *FEMS Microbiology Letters* **194**: 181-185.
- Salje, J., F. van den Ent, P. de Boer & J. Löwe, (2011) Direct membrane binding by bacterial actin MreB. *Molecular Cell* **43**: 478-487.
- Salmond, G. P. C., J. F. Lutkenhaus & W. D. Donachie, (1980) Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell envelope gene *murG*. *Journal of Bacteriology* **144**: 438-440.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, N. Y.
- Sasaki, Y., Y. Araki & E. Ito, (1983) Structure of teichoic-acid-glycopeptide complexes from cell walls of *Bacillus cereus* AHU 1030. *European Journal of Biochemistry* **132**: 207-213.
- Satta, G., P. Canepari, G. Botta & R. Fontana, (1980) Control of cell septation by lateral wall extension in a pH-conditional morphology mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **142**: 43-51.
- Sauvage, E., C. Duez, R. Herman, F. Kerff, S. Petrella, J. W. Anderson, S. A. Adediran, R. F. Pratt, J.-M. Frère & P. Charlier, (2007) Crystal structure of the *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 4a, and its complex with a peptidoglycan mimetic peptide. *Journal of Molecular Biology* **371**: 528-539.
- Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala & P. Charlier, (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 234-258.
- Schäberle, T. F., W. Vollmer, H. J. Frasch, S. Hüttel, A. Kulik, M. Röttgen, A. K. von Thaler, W. Wohlleben & E. Stegmann, (2011) Self-resistance and cell wall composition in the

- glycopeptide producer *Amycolatopsis balhimycina*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 4283-4289.
- Scheffers, D. J. & M. G. Pinho, (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**: 585-607.
- Schertzer, J. W. & E. D. Brown, (2003) Purified, recombinant TagF protein from *Bacillus subtilis* 168 catalyzes the polymerization of glycerol phosphate onto a membrane acceptor *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 18002-18007.
- Schiffer, G. & J.-V. Höltje, (1999) Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 32031-32039.
- Schilstra, M. J., J. W. Slot, P. H. van der Meide, G. Posthuma, A. F. M. Cremers & L. Bosch, (1984) Immunocytochemical localization of the elongation factor Tu in *E. coli* cells. *FEBS Letters* **165**: 175-179.
- Schindler, M., D. Mirelman & U. Schwarz, (1976) Quantitative determination of N-acetylglucosamine residues at the non-reducing ends of peptidoglycan chains by enzymatic attachment of [¹⁴C]-D-galactose. *European Journal of Biochemistry* **71**: 131-134.
- Schirner, K., J. Marles-Wright, R. J. Lewis & J. Errington, (2009) Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal* **28**: 830-842.
- Schirner, K., L. K. Stone & S. Walker, (2011) ABC transporters required for export of wall teichoic acids do not discriminate between different main chain polymers. *ACS Chemical Biology* **6**: 407-412.
- Schlag, M., R. Biswas, B. Krismer, T. Kohler, S. Zoll, W. Yu, H. Schwarz, A. Peschel & F. Götz, (2010) Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. *Molecular Microbiology* **75**: 864-873.
- Schleifer, K.-H. & O. Kandler, (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews* **36**: 407-477.
- Schmidt, A. & M. N. Hall, (1998) Signalling to the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**: 305-338.
- Schmidt, K. L., N. D. Peterson, R. J. Kustus, M. C. Wissel, B. Graham, G. J. Phillips & D. S. Weiss, (2004) A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**: 785-793.
- Schulz, H. N. & B. B. Jørgensen, (2001) Big bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 105-137.
- Schwarz, U. & W. Leutgeb, (1971) Morphogenetic aspects of murein structure and biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **106**: 588-595.
- Schwedock, J., J. R. McCormick, E. R. Angert, J. R. Nodwell & R. Losick, (1997) Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* **25**: 847-858.
- Shapiro, J. A. & C. Hsu, (1989) *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. *Journal of Bacteriology* **171**: 5963-5974.
- Shapiro, L. & R. Losick, (2000) Dynamic spatial regulation in the bacterial cell. *Cell* **100**: 89-98.
- Shashkov, A. S., G. M. Streshinskaya, S. N. Senchenkova, Y. I. Kozlova, I. V. Alferova, L. P. Terekhova & L. I. Evtushenko, (2006) Cell wall teichoic acids of streptomycetes of the phenetic cluster '*Streptomyces fulvissimus*'. *Carbohydrate Research* **341**: 796-802.
- Sheldrick, G. M., P. G. Jones, O. Kennard, D. H. Williams & G. A. Smith, (1978) Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature* **271**: 223-225.
- Shih, Y.-L., T. Le & L. Rothfield, (2003) Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7865-7870.
- Shiomi, D., H. Mori & H. Niki, (2009) Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative and Integrative Biology* **2**: 219-220.
- Shiomi, D., M. Sakai & H. Niki, (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *The EMBO Journal* **27**: 3081-3091.

- Shockman, G. D., L. Daneo-Moore, R. Kariyama & O. Massidda, (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial Drug Resistance* **2**: 95-98.
- Siefert, J. L. & G. E. Fox, (1998) Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology* **144**: 2803-2808.
- Silhavy, T. J., D. Kahne & S. Walker, (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a000414.
- Singer, S. J. & G. L. Nicolson, (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Slovak, P. M., G. H. Wadhams & J. P. Armitage, (2005) Localization of MreB in *Rhodobacter sphaeroides* under conditions causing changes in cell shape and membrane structure. *Journal of Bacteriology* **187**: 54-64.
- Smillie, L. B., (1979) Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. *Trends in Biochemical Sciences* **4**: 151-155.
- Smith, L. G., (2001) Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 33-39.
- Smith, T. J., S. A. Blackman & S. J. Foster, (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249-262.
- Soldo, B., V. Lazarevic & D. Karamata, (2002) *tagO* is involved in the synthesis of all anionic cell-wall polymers in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **148**: 2079-2087.
- Soldo, B., V. Lazarevic, M. Pagni & D. Karamata, (1999) Teichuronic acid operon of *Bacillus subtilis* 168. *Molecular Microbiology* **31**: 795-805.
- Soufo, H. J. D. & P. L. Graumann, (2003) Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Current Biology* **13**: 1916-1920.
- Southern, E. M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- Spratt, B. G., (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2999-3002.
- Spratt, B. G. & A. B. Pardee, (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* **254**: 516-517.
- Spratt, B. G. & J. L. Strominger, (1976) Identification of the major penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase IA. *Journal of Bacteriology* **127**: 660-663.
- Spratt, B. G., J. Zhou, M. Taylor & M. J. Merrick, (1996) Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylases. *Molecular Microbiology* **19**: 639-640.
- Steinert, P. M., A. C. Steven & D. R. Roop, (1985) The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* **42**: 411-419.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113-130.
- Suarez, J. E. & K. F. Chater, (1980) Polyethylene glycol-assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts. *Journal of Bacteriology* **142**: 8-14.
- Sun, H. Q., K. Kwiatkowska & H. L. Yin, (1995) Actin monomer binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **7**: 102-110.
- Sutcliffe, I. C. & N. Shaw, (1991) Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **173**: 7065-7069.
- Swoboda, J. G., J. Campbell, T. C. Meredith & S. Walker, (2010) Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBioChem* **11**: 35-45.
- Swulius, M. T., S. Chen, H. Jane Ding, Z. Li, A. Briegel, M. Pilhofer, E. I. Tocheva, S. R. Lybarger, T. L. Johnson, M. Sandkvist & G. J. Jensen, (2011) Long helical filaments are not seen encircling cells in electron cryotomograms of rod-shaped bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **407**: 650-655.
- Takeuchi, S., W. R. DiLuzio, D. B. Weibel & G. M. Whitesides, (2005) Controlling the shape of filamentous cells of *Escherichia coli*. *Nano Letters* **5**: 1819-1823.

- Tamaki, S., H. Matsuzawa & M. Matsushashi, (1980) Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **141**: 52-57.
- Tamames, J., M. González-Moreno, J. Mingorance, A. Valencia & M. Vicente, (2001) Bringing gene order into bacterial shape. *Trends in Genetics* **17**: 124-126.
- Tatar, L. D., C. L. Marolda, A. N. Polischuk, D. van Leeuwen & M. A. Valvano, (2007) An *Escherichia coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology* **153**: 2518-2529.
- Tatituri, R. V. V., P. A. Illarionov, L. G. Dover, J. Nigou, M. Gilleron, P. Hitchen, K. Krumbach, H. R. Morris, N. Spencer, A. Dell, L. Eggeling & G. S. Besra, (2006) Inactivation of *Corynebacterium glutamicum* NCgl0452 and the role of MgtA in the biosynthesis of a novel mannosylated glycolipid involved in lipomannan biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 4561-4572.
- Tayeh, M. A., G. D. Dotson, J. C. Clemens & R. W. Woodard, (1995) Overproduction and one-step purification of *Escherichia coli* UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl reductase. *Protein Expression and Purification* **6**: 757-762.
- Thomaides, H. B., M. Freeman, M. El Karoui & J. Errington, (2001) Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes & Development* **15**: 1662-1673.
- Thompson, C. J., T. Kieser, J. M. Ward & D. A. Hopwood, (1982a) Physical analysis of antibiotic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene* **20**: 51-62.
- Thompson, C. J., J. M. Ward & D. A. Hopwood, (1982b) Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *Journal of Bacteriology* **151**: 668-677.
- Tiffert, Y., (2005) Intramyzelialer Transfer des *Streptomyces venezuelae* Plasmids pSVH1: das integrale Membranprotein SpdB2 interagiert mit anderen Plasmid-codierten Transfer-Proteinen. In: Mikrobiologie/Biotechnologie Tübingen: Eberhard Karls Universität, pp. 136.
- Tillotson, R. D., H. A. Wösten, M. Richter & J. M. Willey, (1998) A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a *bald* mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Molecular Microbiology* **30**: 595-602.
- Tipper, D. J. & J. L. Strominger, (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 1133-1141.
- Tiyanont, K., T. Doan, M. B. Lazarus, X. Fang, D. Z. Rudner & S. Walker, (2006) Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11033-11038.
- Tomasz, A., M. McDonnell, M. Westphal & E. Zanati, (1975) Coordinate incorporation of nascent peptidoglycan and teichoic acid into pneumococcal cell walls and conservation of peptidoglycan during growth. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 337-341.
- Townsend, R., D. B. Archer & K. A. Plaskitt, (1980) Purification and preliminary characterization of Spiroplasma fibrils. *Journal of Bacteriology* **142**: 694-700.
- Trachtenberg, S., (1998) Mollicutes - wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *Journal of Structural Biology* **124**: 244-256.
- Trachtenberg, S., (2004) Shaping and moving a spiroplasma. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**: 78-87.
- Trachtenberg, S., S. B. Andrews & R. D. Leapman, (2003) Mass distribution and spatial organization of the linear bacterial motor of *Spiroplasma citri* R8A2. *Journal of Bacteriology* **185**: 1987-1994.
- Trachtenberg, S. & R. Gilad, (2001) A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3. *Molecular Microbiology* **41**: 827-848.
- Typas, A., M. Banzhaf, C. A. Gross & W. Vollmer, (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 123-136.
- Typas, A., M. Banzhaf, B. van den Berg van Saparoea, J. Verheul, J. Biboy, R. J. Nichols, M. Zietek, K. Beilharz, K. Kannenberg, M. von Rechenberg, E. Breukink, T. den Blaauwen, C. A. Gross & W.

- Vollmer, (2010) Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* **143**: 1097-1109.
- Umeyama, T., P. C. Lee & S. Horinouchi, (2002) Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 419-425.
- Urabe, H., N. Aoyagi, H. Ogawara & K. Motojima, (2008) Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**: 778-785.
- Vale, R. D., T. S. Reese & M. P. Sheetz, (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**: 39-50.
- van Dam, V., N. Orlachs & E. Breukink, (2009) Specific labeling of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. *ChemBioChem* **10**: 617-624.
- van Dam, V., R. Sijbrandi, M. Kol, E. Swiezewska, B. de Kruijff & E. Breukink, (2007) Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Molecular Microbiology* **64**: 1105-1114.
- van den Ent, F., L. A. Amos & J. Löwe, (2001a) Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 634-638.
- van den Ent, F., L. A. Amos & J. Löwe, (2001b) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- van den Ent, F., C. M. Johnson, L. Persons, P. de Boer & J. Löwe, (2010) Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *The EMBO Journal* **29**: 1081-1090.
- van den Ent, F., M. Leaver, F. Bendezu, J. Errington, P. de Boer & J. Löwe, (2006) Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Molecular Microbiology* **62**: 1631-1642.
- van den Ent, F. & J. Löwe, (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *The EMBO Journal* **19**: 5300-5307.
- van den Ent, F., J. Møller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes & J. Löwe, (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *The EMBO Journal* **21**: 6935-6943.
- van Heijenoort, J., (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**: 25R-36R.
- van Loosdrecht, M. C. M., W. Norde & A. J. B. Zehnder, (1990) Physical chemical description of bacterial adhesion. *Journal of Biomaterials Applications* **5**: 91-106.
- van Teeffelen, S., S. Wang, L. Furchtgott, K. C. Huang, N. S. Wingreen, J. W. Shaevitz & Z. Gitai, (2011) The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15822-15827.
- Varley, A. W. & G. C. Stewart, (1992) The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. *Journal of Bacteriology* **174**: 6729-6742.
- Vaughan, S., B. Wickstead, K. Gull & S. G. Addinall, (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *Journal of Molecular Evolution* **58**: 19-29.
- Vergara-Irigaray, M., T. Maira-Litrán, N. Merino, G. B. Pier, J. R. Penadés & I. Lasa, (2008) Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology* **154**: 865-877.
- Verwer, R. W. H., N. Nanninga, W. Keck & U. Schwarz, (1978) Arrangement of glycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **136**: 723-729.
- Vitha, S., R. S. McAndrew & K. W. Osteryoung, (2001) FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *Journal of Cell Biology* **153**: 111-120.
- Volff, J.-N., C. Eichenseer, P. Viell, W. Piendl & J. Altenbuchner, (1996) Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Molecular Microbiology* **21**: 1037-1047.
- Vollmer, W. & U. Bertsche, (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**: 1714-1734.

- Vollmer, W. & J. V. Höltje, (2004) The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *Journal of Bacteriology* **186**: 5978-5987.
- Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier & S. Foster, (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 259-286.
- Vollmer, W., M. von Rechenberg & J.-V. Höltje, (1999) Demonstration of molecular interactions between murein polymerase PBP1, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 6726-6734.
- von Rechenberg, M., A. Ursinus & J.-V. Höltje, (1996) Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. *Microbial Drug Resistance* **2**: 155-157.
- Wachi, M., M. Doi, S. Tamaki, W. Park, S. Nakajima-Iijima & M. Matsushashi, (1987) Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**: 4935-4940.
- Wachi, M. & M. Matsushashi, (1989) Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology* **171**: 3123-3127.
- Wagner, P. M. & G. C. Stewart, (1991) Role and expression of the *Bacillus subtilis* *rodC* operon. *Journal of Bacteriology* **173**: 4341-4346.
- Walker, J. R., A. Kovarik, J. S. Allen & R. A. Gustafson, (1975) Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are defective in septum formation. *Journal of Bacteriology* **123**: 693-703.
- Walker, S., L. Chen, Y. Hu, Y. Rew, D. Shin & D. L. Boger, (2005) Chemistry and biology of ramoplanin: a lipoglycopeptide with potent antibiotic activity. *Chemical Reviews* **105**: 449-476.
- Wang, S., H. Arellano-Santoyo, P. A. Combs & J. W. Shaevitz, (2010) Actin-like cytoskeletal filaments contribute to cell mechanics in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9182-9185.
- Wang, X. & J. Lutkenhaus, (1996) Characterization of the *ftsZ* gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall. *Journal of Bacteriology* **178**: 2314-2319.
- Wang, X. & D. J. Sherratt, (2010) Independent segregation of the two arms of the *Escherichia coli* *ori* region requires neither RNA synthesis nor MreB dynamics. *Journal of Bacteriology* **192**: 6143-6153.
- Ward, J. B., (1981) Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. *Microbiological Reviews* **45**: 211-243.
- Ward, J. B., (1984) Biosynthesis of peptidoglycan: points of attack by wall inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **25**: 327-369.
- Ward, J. M. & J. E. Hodgson, (1993) The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a `super-cluster` in three *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* **110**: 239-242.
- Wei, Y., T. Havasy, D. C. McPherson & D. L. Popham, (2003) Rod shape determination by the *Bacillus subtilis* class B penicillin-binding proteins encoded by *pbpA* and *pbpH*. *Journal of Bacteriology* **185**: 4717-4726.
- Weibull, C., (1953) The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *Journal of Bacteriology* **66**: 688-695.
- Weidel, W., H. Frank & H. H. Martin, (1960) The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain B. *Journal of General Microbiology* **22**: 158-166.
- Weidenmaier, C., J. F. Kokai-Kun, S. A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J. J. Mond & A. Peschel, (2004) Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine* **10**: 243-245.
- Weidenmaier, C. & A. Peschel, (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 276-287.
- Weijland, A. & A. Parmeggiani, (1993) Toward a model for the interaction between elongation factor Tu and the ribosome. *Science* **259**: 1311-1314.
- White, C. L. & J. W. Gober, (2011) MreB: pilot or passenger of cell wall synthesis? *Trends in Microbiology* **20**: 74-79.

- White, C. L., A. Kitich & J. W. Gober, (2010) Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Molecular Microbiology* **76**: 616-633.
- Wickstead, B. & K. Gull, (2011) The evolution of the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* **194**: 513-525.
- Wientjes, F. B. & N. Nanninga, (1989) Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in *Escherichia coli*: concept of a leading edge. *Journal of Bacteriology* **171**: 3412-3419.
- Wildermuth, H., (1970) Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* **60**: 43-50.
- Willey, J., R. Santamaria, J. Guijarro, M. Geistlich & R. Losick, (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell* **65**: 641-650.
- Willey, J., J. Schwedock & R. Losick, (1993) Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes & Development* **7**: 895-903.
- Williams, S. T., R. M. Bradshaw, J. W. Costerton & A. Forge, (1972) Fine structure of the spore sheath of some *Streptomyces* species. *Journal of General Microbiology* **72**: 249-258.
- Williamson, D. L., J. Renaudin & J. M. Bové, (1991) Nucleotide sequence of the *Spiroplasma citri* fibril protein gene. *Journal of Bacteriology* **173**: 4353-4362.
- Winsor, B. & E. Schiebel, (1997) Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* **13**: 399-434.
- Woese, C. R., (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- Wright, F. & M. J. Bibb, (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.
- Wright, L. F. & D. A. Hopwood, (1976a) Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* **96**: 289-297.
- Wright, L. F. & D. A. Hopwood, (1976b) Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology* **95**: 96-106.
- Wu, L. J. & J. Errington, (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **49**: 1463-1475.
- Wu, L. J. & J. Errington, (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**: 915-925.
- Xia, G. & A. Peschel, (2008) Toward the pathway of *S. aureus* WTA biosynthesis. *Chemistry & Biology* **15**: 95-96.
- Yamamoto, H., Y. Miyake, M. Hisaoka, S. Kurosawa & J. Sekiguchi, (2008) The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative DL-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **70**: 297-310.
- Yao, X., M. Jericho, D. Pink & T. Beveridge, (1999) Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* **181**: 6865-6875.
- Yokoyama, K., H. Mizuguchi, Y. Araki, S. Kaya & E. Ito, (1989) Biosynthesis of linkage units for teichoic acids in gram-positive bacteria: distribution of related enzymes and their specificities for UDP-sugars and lipid-linked intermediates. *Journal of Bacteriology* **171**: 940-946.
- Young, K. D., (2003) Bacterial shape. *Molecular Microbiology* **49**: 571-580.
- Young, K. D., (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 660-703.
- Young, K. D., (2010) Bacterial shape: two-dimensional questions and possibilities. *Annual Review of Microbiology* **64**: 223-240.
- Yu, X. C., E. K. Weihe & W. Margolin, (1998) Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Journal of Bacteriology* **180**: 6424-6428.

