

**Charakterisierung der MreB homologen Proteine
während der morphologischen Differenzierung
in *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
Andrea Heichlinger
aus Böblingen

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Qualifikation: 19.05.2011
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Götz

Meiner Familie

Das tiefste und erhabenste Gefühl, dessen wir fähig sind, ist das Erlebnis
des Mystischen. Aus ihm allein keimt wahre Wissenschaft.
Wem dieses Gefühl fremd ist, sich nicht mehr wundern und in Ehrfurcht
verlieren kann, der ist seelisch bereits tot.

Albert Einstein (1879-1955)

Zusammenfassung

Obwohl Streptomyceten durch apikales Spitzenwachstum ein verzweigtes Myzel ausbilden, besitzen sie ein *mre*-Gencluster, das bei stäbchenförmigen Bakterien für die laterale Zellwandsynthese verantwortlich ist und so die Ausbildung der Stäbchenform bewerkstelligt. Dabei wird der Zellwandsynthesekomplex durch Aktin-homologe Proteine (MreB, Mbl, MreBH) positioniert.

S. coelicolor kodiert für drei MreB homologe Proteine: MreB, Mbl und SCO6166. In RT-PCR Experimenten konnte gezeigt werden, dass die drei *mreB*-ähnlichen Gene unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen. *mreB* wird bereits im Substratmyzel exprimiert und während der Differenzierung hochreguliert. Das Gen *mbl* wird zunächst schwach exprimiert und die Expression steigt kontinuierlich mit Zunahme des Differenzierungsgrades an. *sco6166* zeigt eine gegenläufige Expression. Es wird stark im Substratmyzel exprimiert und nimmt im Laufe der Sporulation stark ab.

Die Deletion von *sco6166* führte zu keiner phänotypischen Veränderung im Vergleich zum Wildtyp. Das Fusionsprotein SCO6166-mCherry zeigte eine starke, allerdings unspezifische Fluoreszenz im Substratmyzel, es war jedoch keine Fluoreszenz im Luftmyzel oder in Sporen zu detektieren. Das Protein hat unter den getesteten Bedingungen keine Funktion während der Sporulation.

Phänotypische Untersuchungen der Deletionsmutanten verschiedener Gene des *mre*-Clusters (*mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr*) sowie von *mbl* ergaben Hinweise auf eine Beteiligung aller Gene an der Ausbildung einer resistenten Sporenwand. Alle Mutanten produzierten geschwollenen Sporen, die vorzeitig auskeimten und die für Streptomycetensporen charakteristische Resistenz gegen Hitzestress und osmotischen Stress weitgehend verloren hatten. Mit Hilfe von Lokalisationsstudien

durch Fluoreszenzmikroskopie von MreB-eGFP und Mbl-mCherry konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine eine Rolle während der Sporenwandbildung besitzen. Sowohl MreB als auch Mbl lokalisieren zunächst an den Septen des Luftmyzels und assemblieren anschließend unterhalb der Sporenwand. Auch eine Co-Lokalisation von MreB und Mbl an den Septen konnte gezeigt werden. Während MreB unabhängig von Mbl, MreC oder PBP2 an den Septen lokalisieren kann, ist die Lokalisation von Mbl abhängig von MreB.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass sowohl MreB als auch Mbl an der Bildung einer stressresistenten Sporenwand beteiligt sind. SCO6166 ist nicht an der Sporulation in *S. coelicolor* beteiligt, seine Funktion in Streptomyceten ist bislang noch unklar.

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die bakterielle Morphologie	1
1.2 Die bakterielle Zellwand	2
1.2.1 Aufbau der Zellwand	2
1.2.2 Zellwandsynthese	4
1.3 Aktin-ähnliche Zytoskelettproteine	7
1.3.1 MreB und seine homologen Proteine Mbl und MreBH	7
1.3.2 Das Protein MamK	10
1.3.3 Die Proteine ParM und Alfa	10
1.4 Morphologische Differenzierung in <i>S. coelicolor</i>	12
1.4.1 Wachstum des Substratmyzels	12
1.4.2 Bildung des Luftmyzels	14
1.4.3 Sporulation	16
2. ERGEBNISSE	18
2.1 Charakterisierung der drei Aktin-ähnlichen Gene <i>mreB</i> , <i>mbl</i> und <i>sco6166</i> von <i>S. coelicolor</i> A3(2)	18
2.1.1 Die Gene <i>mreB</i> und <i>mbl</i> weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf	18
2.1.2 SCO6166 fehlen die Untereinheiten IB und IIB	18
2.1.3 Die Deletion von <i>mbl</i> führt zu geschwollenen Sporen, während die Δ <i>sco6166</i> Mutante keinen Phänotyp aufweist	19
2.1.4 Die Sporen von der Δ <i>mbl</i> , Δ <i>mbl/mreB</i> Mutante sind sensitiv gegenüber osmotischem Stress oder Hitze	20
2.1.5 Die drei <i>mreB</i> -ähnlichen Gene zeigen unterschiedliche Expressionsprofile während der Sporulation	21
2.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten in Genen des <i>mreBCD</i> , <i>pbp2</i> , <i>sfr</i> Genclusters (<i>mre</i> -Gencluster)	22
2.2.1 Die <i>mre</i> -Mutanten haben unter hohem osmotischem Stress den gleichen Phänotyp wie Δ <i>mreB</i>	22
2.2.2 Die Sporen der <i>mre</i> -Mutanten sind stark vergrößert	23
2.3 Lokalisation der MreB homologen Proteine sowie PBP2 und Sfr während der morphologischen Differenzierung	24
2.3.1 Mbl-mCherry lokalisiert an den Septen des Luftmyzels und bildet eine Ringstruktur unterhalb der Sporenwand	24

2.3.2 MreB-eGFP und Mbl-mCherry co-lokalisieren während der Sporulation an den Septen des Luftmyzels	24
2.3.3 MreB-eGFP scheint eine helikale Struktur während der Sporulation zu besitzen	25
2.3.4 SCO6166-mCherry zeigt keine spezifische Lokalisation während der morphologischen Differenzierung	26
2.3.5 Für die exakte Lokalisation von Mbl-mCherry an den Septen des Luftmyzels ist MreB essentiell	26
2.3.6 Die Proteine PBP2-eGFP und Sfr-eGFP lokalisieren an den Septen des Luftmyzels	28
3. DISKUSSION	29
3.1 Die Mre Proteine in <i>S. coelicolor</i> werden nicht für das Wachstum des vegetativen Myzels benötigt, sie besitzen jedoch eine Funktion bei der morphologischen Differenzierung	29
3.2 Nur zwei der drei Aktin-ähnlichen Proteine sind an der Sporulation von <i>S. coelicolor</i> beteiligt	30
3.3 Die Sporenwandsynthese in <i>S. coelicolor</i> erfolgt nach einem ähnlichen Mechanismus wie die laterale Zellwandsynthese in Stäbchen-förmigen Bakterien	33
3.4 Die Positionierung des SSSC erfolgt durch das Zusammenspiel der Proteine MreB und Mbl	34
3.5 Modell der Sporenwandsynthese in <i>S. coelicolor</i>	36
4. LITERATURLISTE	38
5. PUBLIKATIONEN/MANUSKRIPTE	52
5.1 Proteins encoded by the <i>mre</i> gene cluster in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) cooperate in spore wall synthesis.	52
5.2 The MreB-Like Protein Mbl of <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) Depends on MreB for Proper Localization and Contributes to Spore Wall Synthesis.	75
6. EIGENANTEIL	92

1. Einleitung

1.1 Die bakterielle Morphologie

Bakterien können verschiedene Zellformen ausbilden. Diese reichen von runden, über Stäbchen-förmige bis hin zu länglichen, verzweigten und helikalen Strukturen (Abb.1). Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass kugelförmige Bakterien aus der Stäbchenform heraus entstanden sind, vermutlich durch den Verlust von Genen (Siefert *et al.*, 1998). Durch die Inaktivierung bestimmter Gene konnte bereits 1988 gezeigt werden, dass die Zellgestalt von *Escherichia coli* in eine kugelförmige verändert werden kann (Doi *et al.*, 1988).

Die Zellform der meisten Bakterien wird durch die Zellwand und die Peptidoglykanschicht bestimmt. Letzteres trifft nicht auf alle Bakterien zu, da es einige Bakterien gibt, die keine Peptidoglykanschicht besitzen, dennoch eine komplexe Zellmorphologie aufweisen (Miyata *et al.*, 2006; Trachtenberg 2004). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen des 2008 entdeckten Bakteriums *Haloplasma contractile* (Antunes *et al.*, 2008) konnte keine Peptidoglykanschicht detektiert werden. Dieses Bakterium besitzt einen kugelförmigen Körper mit Tentakelartigen Ausstülpungen, die unterschiedliche Formen annehmen können (Abb. 2).

Die komplexe Morphologie dieses Bakteriums zeigt, dass nicht allein die Peptidoglykanschicht formgebend ist. Es wird vielmehr klar, dass Zytoskelettelemente formbestimmend sind, während die Peptidoglykanschicht für die Stabilität und Fixierung der Zellform verantwortlich ist.

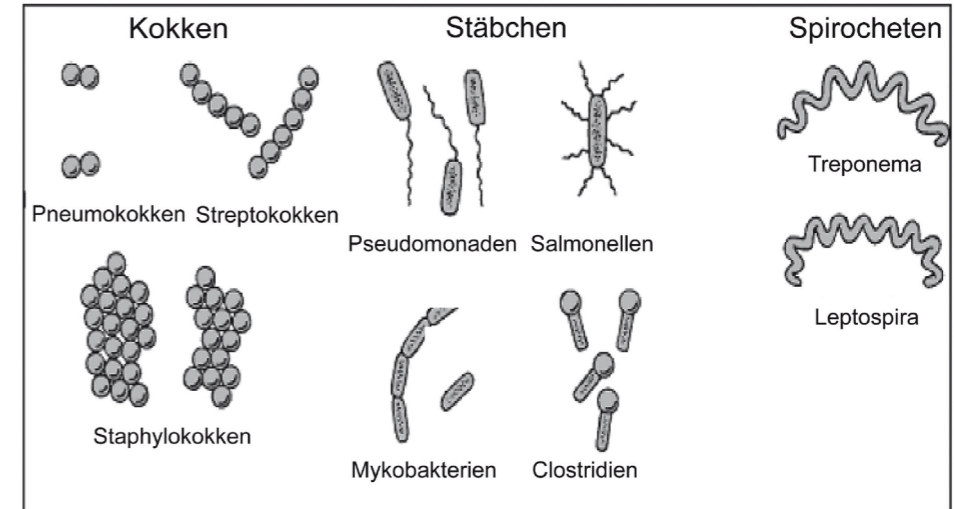


Abb.1: Darstellung der häufigsten bakteriellen Zellformen. Die meisten Bakterien können in die drei Hauptgruppen bezüglich ihrer Zellmorphologie eingeteilt werden. Sie können eine runde Form annehmen, wie beispielsweise verschiedene Kokken, zu denen Streptokokken oder Staphylokokken gezählt werden. Die zweite Hauptgruppe sind die Stäbchen-förmigen Bakterien. Zu ihnen gehören Pseudomonaden, Salmonellen, sowie auch Clostridien und Mykobakterien. Die dritte hier gezeigte Form sind die spiral bzw. helikal geformten Spirocheten zu denen beispielsweise Treponema und Leptospira gehören. aus www.merckmanuals.com/

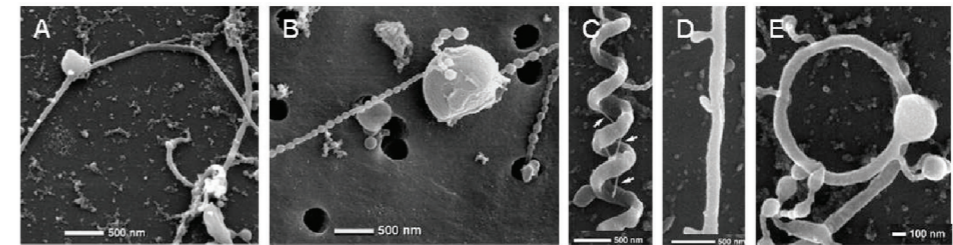


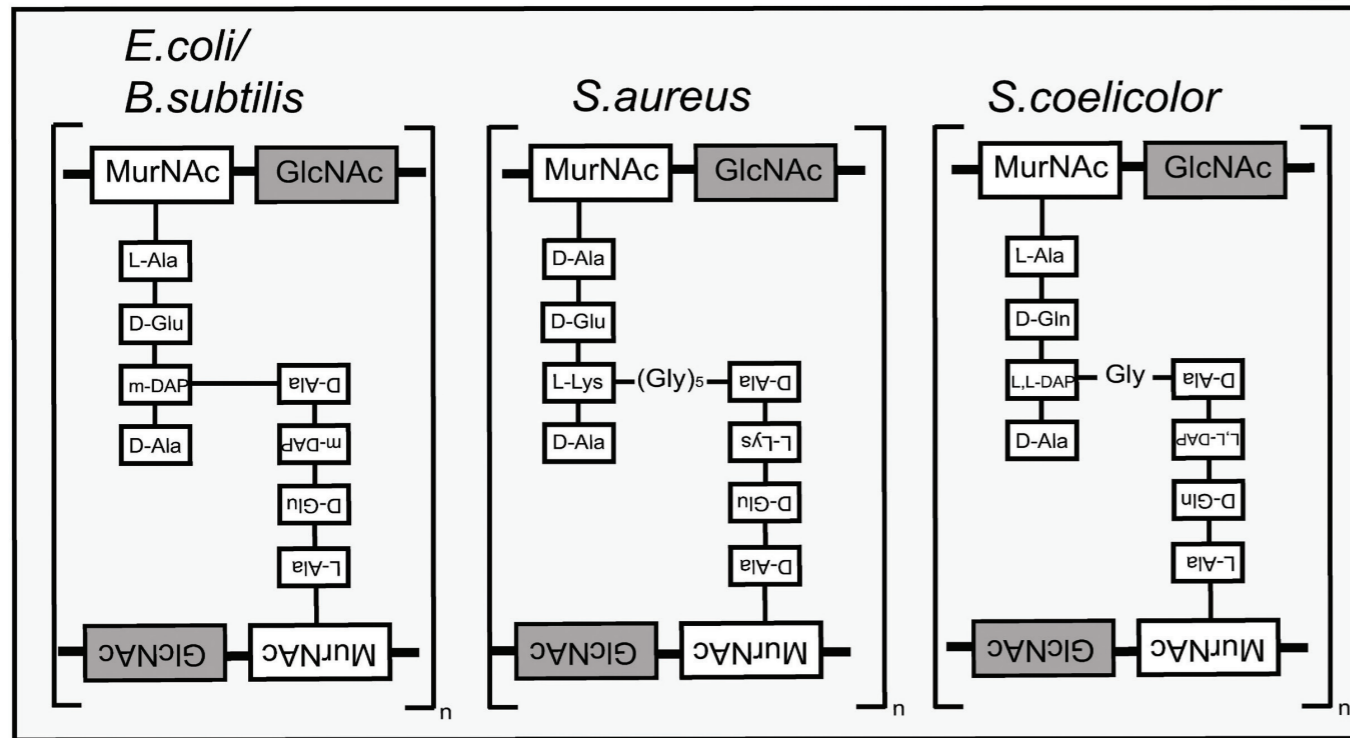
Abb.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Stammes SSD-17BT *Haloplasma contractile*. Diese Aufnahmen zeigen die morphologische Varianten des kugelförmigen Zentralkörpers und dessen Tentakel-artigen Ausstülpungen. In (A) ist der Zentralkörper mit zwei geraden Ausstülpungen (relaxierte Form) zu sehen. (B) zeigt ebenfalls den Zentralkörper, hier mit Ausstülpungen, die aneinander gereiht sind (sogenannte Microsphären). (C) bis (E) zeigt Detailaufnahmen mit einer helikal gewundenen (C), einer polypenartigen (D) und einer ringförmigen (E) Ausstülpung. Aus Antunes *et al.* 2008

1.2 Die bakterielle Zellwand

1.2.1 Aufbau der Zellwand

Die bakterielle Zellhülle muss einem meist sehr hohen Zellinnendruck entgegenhalten. Sie ist eine komplexe vielschichtige Struktur, die das Bakterium vor äußeren Einflüssen schützt. Die meisten Zellhüllen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen. Gramnegative Bakterien besitzen eine dünne, meist einschichtige Peptidoglykanschicht (1-7 nm), welche zusätzlich von einer Lipopolysaccharidhaltigen äußeren Membran umgeben ist. Grampositiven Bakterien fehlt eine äußere Membran, sie besitzen jedoch eine dickere vielschichtige Peptidoglykanschicht (30-100nm) als Gramnegative. Diese dickere Peptidoglykanschicht ist zudem von anionischen Polymeren, den Teichonsäuren, durchzogen. Das bakterielle Peptidoglykan setzt sich aus einem Disaccharid-Pentapeptid zusammen, welches aus zwei Aminozuckern besteht. Diese Aminozucker sind zum einen N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc), welche über eine $\beta(1-4)$ glykosidische Bindung verknüpft sind. An der Laktylgruppe des Zuckers MurNAc sind fünf Aminosäuren angehängt, welche das Pentapeptid bilden. Die Zusammensetzung des Pentapeptids sowie deren Verknüpfung variiert von Bakterium zu Bakterium. Die Vernetzung der Pentapeptide erfolgt in grampositiven Bakterien meist über ein oder mehrere Glyzine, während in gramnegativen oftmals eine direkte Verknüpfung der dritten mit der vierten Aminosäure des anderen Pentapeptids erfolgt (Vollmer *et al.*, 2008). In *Staphylococcus aureus* sind die Pentapeptide über fünf Glyzine miteinander verbunden (Vollmer *et al.*, 2008; Abb. 3). In *Streptomyces coelicolor* sind die Pentapeptide über ein einzelnes Glyzin vernetzt (Abb. 3; Schäberle *et al.*, in revision). *Bacillus subtilis* hingegen vernetzt seine Pentapeptide, wie auch *E. coli* direkt und nicht über Glyzine oder andere Aminosäuren (Abb. 3; Warth und Strominger 1971).

Abb. 3: Schematische Darstellung des Peptidoglykanaufbaus. In *E. coli* und *B. subtilis* sind die Aminosäuren D-Ala und m-DAP (Diaminopimelinsäure) direkt miteinander verknüpft. In *S. aureus* wird das endständige D-Ala über fünf Glyzine mit der Aminosäure L-Lysin verknüpft, während die Glyzinbrücke in *S. coelicolor* aus nur einem Glyzin besteht und zwischen den Aminosäuren D-Ala und L,L-DAP erfolgt.



Eine Besonderheit bezüglich der Zellwand besitzt die Gruppe der Mycobakterien. Zu ihnen zählen unter anderem die pathogenen Stämme *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae*. Die Peptidoglykanschicht enthält kovalent gebundenes Arabinogalaktan, welches wiederum kovalent an Mykolsäuren gebunden ist (Minnikin *et al.*, 1982). In 16S rRNA Sequenzvergleichen wurden sie zu den G+C reichen Grampositiven gezählt, haben jedoch auch einige Homologien zu Gramnegativen. In einer Genomanalyse, basierend auf konservierten Genen, wiesen sie eine höhere Homologie zu gramnegative Bakterien auf (Fu *et al.*, 2002). Beispielsweise sind die Gene der Energiegewinnung sehr ähnlich zu denen in *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Fu *et al.*, 2002).

1.2.2 Zellwandsynthese

In kugelförmigen Bakterien, wie beispielsweise *S. aureus*, wird neues Zellwandmaterial an der Zellteilungsebene eingebaut. Zellteilung und -wachstum erfolgen an der gleichen Stelle in der Mitte der Zelle (Abb. 4). Für die Lokalisation des Septums in der Mitte der Zelle ist das Tubulin-ähnliche Protein FtsZ essentiell (Pinho und Errington 2003). FtsZ bildet eine Ringstruktur an der Zellteilungsebene aus und ist wesentlich an der Zellteilung in Bakterien beteiligt (Dai und Lutkenhaus 1991). Das Penicillin-Bindeprotein PBP2 ist das einzige PBP in *S. aureus* welches eine Transglykosylase und Transpeptidase Domäne besitzt. In der Abwesenheit von FtsZ lokalisiert PBP2 an der gesamten Zelloberfläche und nicht mehr am Septum. Demnach erfolgt auch der Einbau neuen Peptidoglykans an der ganzen Zelloberfläche (Goffin und Ghysen 1998, Pinho *et al.*, 2001a).

Über die Regulation der Peptidoglykansynthese während der Zellteilung in stäbchenförmigen Bakterien ist wenig bekannt. Zwei unabhängige Forschergruppen

(Typas *et al.*, 2010, Paradies-Bleau *et al.*, 2010) fanden die Lipoproteine LpoA und LpoB in der äußeren Membran von *E. coli*. Diese Lipoproteine erkennen spezifisch ihr PBP, stimulieren die Transpeptidaseaktivität und regulieren so PBP1a und PBP1b in der inneren Zellwand.

In stäbchenförmigen Bakterien, wie *B. subtilis*, *E. coli* und Corynebakterien, kann zwischen Zellteilung und Zellwachstum unterschieden werden. Die Zellteilung erfolgt ähnlich wie in *S. aureus*. Die Bildung des Z-Rings in der Mitte der Zelle ist wichtig für die Initiation der Zellteilung. Für die Auswahl der Zellteilungsebene sind zwei Mechanismen bekannt. Zum einen gibt es die sogenannte nucleoid occlusion, welche die Ausbildung des Z-Rings über dem Chromosom verhindert (Mulder *et al.*, 1989; Woldringh *et al.*, 1990). Der andere Mechanismus ist das Min-System, welches das Ausbilden des Z-Rings an den Zellpolen verhindert (zusammengefasst in Margolin, 2001 und in Harry, 2001). Die gleichzeitige Inaktivierung beider Systeme ist letal und führt zur Ausbildung vieler FtsZ Strukturen, welche sich nicht mehr zu einem Ring zusammenlagern können (Wu und Errington 2004, Bernhardt und de Boer 2005).

Nucleoid occlusion wurde das erste Mal in Bakterienzellen beobachtet, deren DNA Replikation und/oder Segregation gestört war und diese Störung einen hemmenden Effekt auf die Zellteilung hatte (Mulder *et al.*, 1989). Bakterien haben einen bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus entwickelt, die Konzentration der DNA in der Mitte der Zelle zu messen. Ist die richtige DNA Konzentration vorhanden, können sich die FtsZ-Proteine zu einem Ring zusammenschließen (Harry 2001) und die Zellteilung kann erfolgen. Das besser verstandene System ist das Min-System. Es besteht im Wesentlichen aus drei Proteinen MinC, D und E (zusammengefasst in Margolin 2001, Harry 2001). MinCD oszillieren von einem Zellpol zum anderen in etwa 25s

(Hu *et al.*, 1999, Raskin *et al.*, 1999) und verhindern die Assemblierung des Z-Rings. MinE inhibiert die Lokalisation von MinCD in der Mitte der Zelle (de Boer *et al.*, 1989). Ein weiteres Protein steht im Zusammenhang mit dem Min-System, DivIVA. DivIVA beeinflusst die Zellteilung in *B. subtilis* indirekt durch das Min-System (Edwards und Errington 1997). Es lagert sich an die Zellteilungsproteine am Septum an und verbleibt an den neu gebildeten Zellpolen und dirigiert so MinCD (Marston und Errington 1999) an die Zellpole.

Um eine Stäbchenform zu erreichen, benötigen Bakterien ein Längenwachstum zwischen den Zellteilungsphasen. Es gibt zwei Möglichkeiten, neues Zellwandmaterial einzubauen. Zum einen wird neues Zellmaterial direkt nach der Zellteilung am Septum eingebaut, anschließend erfolgt der Einbau neuen Peptidoglykans entlang der ganzen Zellwand (de Pedro *et al.*, 1997, Daniel und Errington 2003; sowie Abb. 4). Für den Einbau neuen Peptidoglykans ist das Aktin-homologe Protein MreB essentiell, welches ein helikales Zytoskelett entlang der Zelle ausbildet (Carballido-Lopez 2006, Thanbichler und Shapiro 2008). Elongationswachstum kann auch an den Zellpolen erfolgen, wie es bei Corynebakterien (Umedo und Amako 1983, Daniel und Errington 2003, Abb.4) der Fall ist, oder an der Hyphenspitze wie bei Streptomyeten (Hempel *et al.*, 2008).

Corynebakterien besitzen kein MreB-homologes Protein (Letek *et al.*, 2008), während Streptomyeten zwar MreB besitzen, dieses jedoch nicht für das Wachstum an der Hyphenspitze verantwortlich ist (Mazza *et al.*, 2006). Für das MreB-unabhängige Spitzenwachstum in *S. coelicolor* ist das coiled-coil Protein DivIVA essentiell (Flärdh 2003). DivIVA ist an der Hyphenspitze lokalisiert und spielt eine Rolle beim Spitzenwachstum und der Verzweigung der Hyphen. Desweiteren ist es wichtig für die Zellform (Flärdh 2003).

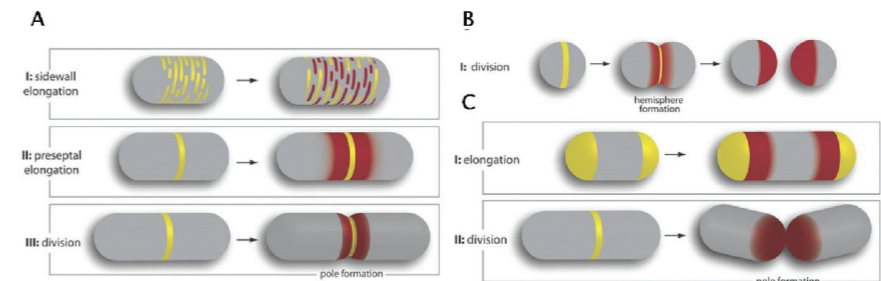


Abb.4: Schematische Darstellung des Einbaus von neuem Zellwandmaterial in Kokken (B) und Stäbchen (A,C). In Kokken (B) erfolgt der Einbau neuen Zellwandmaterials ausschließlich an der Zellteilungsebene. In den Stäbchen (A, C) erfolgt der Einbau für die Zellteilung ebenso am Septum. Unterschiede sind im Einbau neuen Peptidoglykans während des Elongationswachstums zu sehen. In den meisten Stäbchen (A), wie *E. coli* und *B. subtilis* erfolgt der Einbau entlang der gesamten Zelllänge. In seltenen Fällen, wie beispielsweise in *C. glutamicum* (C) findet der Einbau neuen Zellwandmaterials für das Elongationswachstum an den Zellpolen statt. Neue Zellwandsyntheseaktivität (gelb) und der Einbau neuen Zellwandmaterials (rot) sind farbig markiert. (aus Cabeen und Jacobs-Wagner 2007).

Timelaps Experimente mit DivIVA-eGFP haben gezeigt, dass DivIVA nicht nur an der Hyphenspitze, sondern auch an der Seite lokalisiert, an der sich weniger später die Hyphe verzweigt (Hempel *et al.*, 2008). Die Überexpression von DivIVA führt zur Assemblierung vieler Moleküle an die laterale Zellwand und somit zu multiplen Verzweigungen der Hyphen (Hempel *et al.*, 2008). Diese Daten zeigen, dass DivIVA als Orientierungshilfe für die Zellwandsyntheseproteine an der Hyphenspitze dient. In *Corynebacterium glutamicum* lokalisiert DivIVA erst am Septum, nachdem die Zellwandsynthese erfolgt ist, und verbleibt dann am neuen Zellpol. Es spielt somit keine Rolle bei der Zellteilung oder der Verteilung der Chromosomen (Letek *et al.*, 2008). In Corynebakterien ist DivIVA für das Elongationswachstum und somit die Stäbchenform verantwortlich. Depletionsexperimente haben gezeigt, dass die Zellen im Elongationswachstum gehemmt werden und eine kugelige Form annehmen (Letek *et al.*, 2008).

1.3 Aktin-ähnliche Zytoskelettproteine

1.3.1 MreB und seine homologen Proteine Mbl und MreBH

Das Protein MreB weist eine hohe Strukturhomologie zu eukaryotischem Aktin auf (van den Ent *et al.*, 2001). Für MreB kodierende Gene fehlen in Kokken, sind jedoch auf vielen Chromosomen anderer Bakterien zu finden (Daniel und Errington 2003), und in den meisten Fällen ist eine Deletion letal. Gramnegativen Organismen besitzen nur ein *mreB* Gen, welches in einem Operon mit *mreC* und *mreD* liegt. Die meisten grampositiven Bakterien haben neben *mreB* noch zwei weitere *mreB*-ähnlichen Gene *mbl* und *mreBH*. MreB von *Thermotoga maritima* konnte als erstes MreB Proteinerfolgreich aufgereinigt

und charakterisiert werden. Mit Hilfe von ATP oder GTP, jedoch ohne Zusatz von Magnesium, bildet es Filamente aus (van den Ent *et al.*, 2001). Es assembliert zudem über einen hohen Temperatur- (5°C- 65°C) sowie pH-Bereich (5.5-9.5), wobei die Geschwindigkeit der Polymerisation direkt mit steigender Temperatur korreliert (Bean und Amann 2008).

In *E. coli* und *B. subtilis* lokalisiert MreB unterhalb der Zytoplasmamembran in einer helikalen Struktur (Jones *et al.*, 2001; Defeu Soufo und Graumann 2004; Figge *et al.*, 2004). In *Rhodobacter spheroides* lokalisiert MreB als Ring-Struktur in der Mitte der Zelle (Slovak *et al.*, 2005). MreB formt flexible und dynamische Strukturen, welche mit der Zelle wachsen und sich während der Zellteilung separieren und anschließend erweitern und wieder komprimieren (Carballido-Lopez und Errington 2003; Defeu-Soufo und Graumann 2004; Formstone und Errington 2005; Vats und Rothfield 2007).

Durch Depletion von MreB in *E. coli* oder *B. subtilis* kommt es zunächst zum Anschwellen und anschließend zur Lyse der Zelle (Formstone und Errington 2005; Gitai *et al.*, 2005). Ähnliches konnte durch die Zugabe von A22 (verhindert die ATP-Bindung, Bean *et al.*, 2009) oder das kürzlich entdeckte YeeV (Tan *et al.*, 2011) beobachtet werden. Diese Substanzen verhindern die Polymerisation von MreB. Ein Grund für die Zelllyse könnte der nicht exakte Einbau von neuem Peptidoglykan während des Elongationswachstums sein.

Der Peptidoglykansynthesekomplex besteht aus den Proteinen MreC, MreD, RodA, PBP2, sowie RodZ. In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass MreB verantwortlich für die Positionierung von PBP2 ist (Kawai *et al.*, 2009). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Deletion von *mreB* zu einer gestörten

Peptidoglykansynthese führt, welche die Lyse der Zellen zur Folge hat. RodZ wurde erst kürzlich als Bestandteil des Synthesekomplexes identifiziert (Shiomi *et al.*, 2008; Alyahya *et al.*, 2009, Gerdes *et al.*, 2009). RodZ ist in der Lage, sowohl mit dem MreB-Monomer als auch dem polymerisierten MreB-Filament zu interagieren (van den Ent *et al.*, 2010). Desweiteren wurde eine fehlerhafte Chromosomensegregation in *B. subtilis* beobachtet, bevor ein Defekt auf die Zellwand zu sehen war (Soufo und Graumann 2003). Diese Auswirkung auf die Chromosomen-segregation ist jedoch sehr umstritten, in *E. coli* zeigte eine Inhibierung der MreB-Polymerisation keinen Effekt auf die Chromosomensegregation (Wang und Sherrat 2010). Durch die intensive Forschung in den letzten Jahren an MreB, ergeben sich weitere Funktionen für dieses Protein. So wird vermutet, dass MreB nicht nur für die Positionierung des Zellwandsynthesekomplexes verantwortlich ist, sondern auch für den Einbau von Zellwandvorstufen wichtig ist (Uehara und Park 2008) und eine aktive Rolle bei der Stabilisierung der Zellwand (Wang *et al.*, 2010) übernimmt. Neuere Versuche mit *Caulobacter crescentus* bestätigen die Vermutung, dass MreB die Transglykosylase Aktivität begünstigt (Takacs *et al.*, 2009).

In gramnegativen Stäbchen, ist meist nur ein MreB Homolog zu finden. Viele der grampositiven Stäbchen, wie beispielsweise *B. subtilis* besitzen drei MreB homologe Proteine MreB, Mbl und MreBH. Das Lokalisationsprofil der drei Proteine ist sehr ähnlich. Sie co-lokalisieren als helikale Struktur entlang der Zelle unterhalb der Zytoplasmamembran (Jones *et al.*, 2001; Abb. 5).

Ein Unterschied zeigt sich in den Mutanten. Die Deletion von *mbl* (*mreB-like*) führt zu deformierten, geschwollenen und gekrümmten Zellen, was für eine Rolle von Mbl bei der Bestimmung der Zelllänge spricht (Kawai *et al.*, 2009). Die *mreBH* (*mreB-homologue*) Mutantenzellen sind hingegen schmaler als die Wildtypzellen (CarballidoLópez *et al.*, 2006). Die Deletion von *mreB* und *mbl* ist letal, kann jedoch durch Zugabe von Sucrose oder

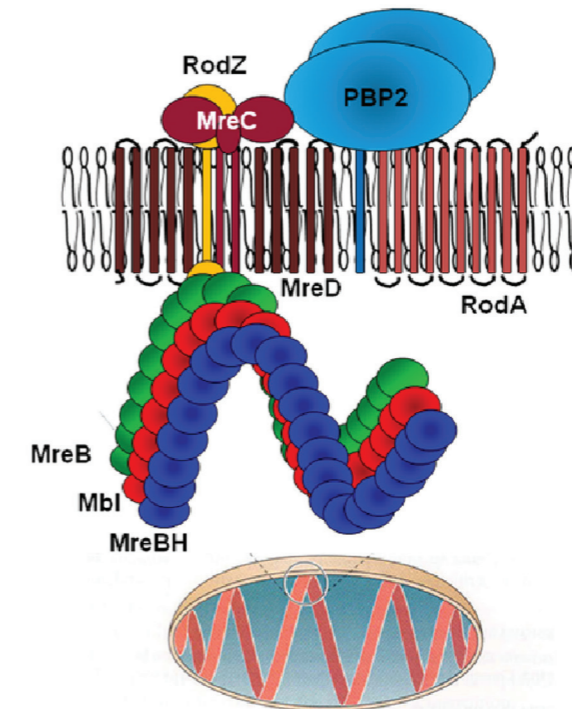


Abb. 5 Aktuelles Modell des Elongationskomplexes in stäbchenförmigen Bakterien. Der Elongationskomplex besteht aus ein bis drei MreB-homologen Proteinen (MreB, Mbl und MreBH), welche eine Helix unterhalb der Zytoplasmamembran bilden. MreB ist für die Lokalisation des Peptidoglykan-Synthese-Komplexes essentiell, welcher aus den Membranproteinen MreC, MreD, RodA und RodZ besteht (nach J. Errington, P. Graumann, K. Gerdes)

Magnesium Ionen (3 mM) supprimiert werden (Formstone und Errington 2005; Schirner und Errington 2009; Kawai *et al.*, 2009), während die *mreBH* Mutante nur 100 μ M Mg²⁺ benötigt (Carballido López *et al.*, 2006). In *E. coli* wurde gezeigt, dass die Überexpression von *ftsQAZ* den letalen Phänotyp einer *mreB* Mutante aufhebt (Kruse *et al.*, 2005). Vermutet wird, dass sich die geschwollen Zellen durch die erhöhte Anzahl von FtsZ Molekülen trotzdem teilen können (Kruse *et al.*, 2005).

1.3.2 Das Protein MamK

Auf dem Genom von *Magnetospirillum magneticum* ist neben MreB ein weiteres Aktin-ähnliches Protein kodiert, MamK. MamK wurde bisher nur in magnetotaktischen Bakterien entdeckt und gehört zu einer eigenen Familie (Komeili *et al.* 2006, Rioux *et al.*, 2010). EM Aufnahmen von aufgereinigtem MamK Protein zeigten, dass sich das Protein zu Filamentbündeln und helikalen Einzelfilamenten zusammen lagert (Taoka 2007). In einer *mamK* Mutante sind keine Filamente zu sehen, und die Magnetosomen liegen ungeordnet in der Zelle vor, was für eine Rolle von MamK in der Organisation der Magnetosomen spricht (Komeili *et al.* 2006).

1.3.3 Die Proteine ParM und AlfA

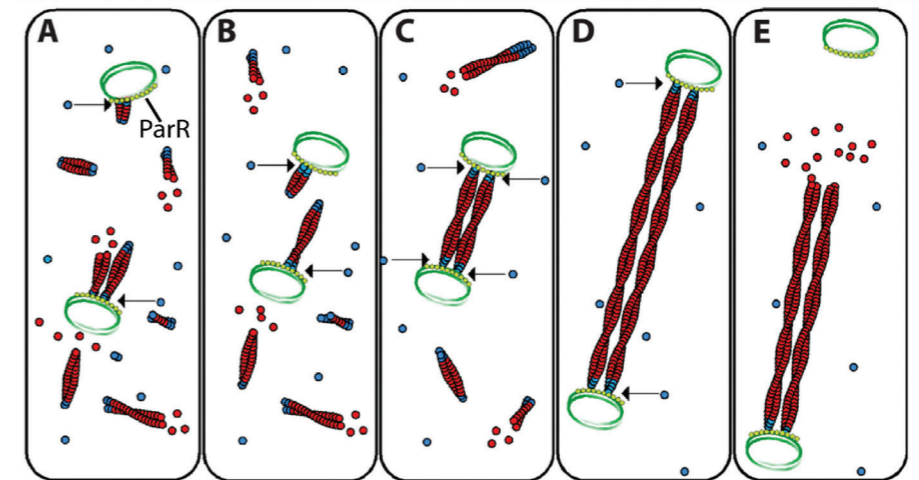
Neben den auf dem Chromosom kodierten Aktin homologen gibt es auch Aktin homologe welche auf Plasmiden kodiert sind. Zu ihnen gehört beispielsweise das an der Plasmid-Verteilung beteiligte ParM. Es ist Teil eines dreiteiligen Verteilungssystems aus einer *cis*-acting DNA-Sequenz *parC* (centromer), einem Repressor ParR und dem Motorprotein ParM (Ebersbach und Gerdes 2005). Es bildet, im Gegensatz zu F-Aktin, welches eine rechts-gewundene Helix bildet, eine links-gewundene Helix aus, die aus zwei Protofilamenten besteht (Galkin *et al.*, 2009, Orlova *et al.*, 2007, Popp *et al.*, 2008).

Seine Kristallstruktur ähnelt sehr stark dem des eukaryotischen F-Aktins (van den Ent *et al.* 2002). Es kann sowohl ATP als auch GTP umsetzen (Galkin *et al.*, 2009, Popp *et al.*, 2008). Die ATPase Aktivität wird in vitro durch die Bindung von ParR an *parC* verstärkt (Jensen und Gerdes 1997). Durch die Bindung von ParR-*parC* an die Enden der ParM Filamente wird auch die Deassemblierung des ParM Filaments verhindert (Abb. 6).

Das Filament wird stabilisiert und polymerisiert an beiden Enden durch den Einbau neuer ParM Moleküle. Die Plasmide werden durch die Polymerisation der ParM-Filamente an die Zellpole transportiert. Dort angelangt, dissoziiert eines der Plasmide von dem Filament ab und das Filament beginnt zu depolymerisieren (Garner *et al.*, 2007, Garner *et al.*, 2004, Campbell und Mullins 2007).

Ein weiteres Aktin-ähnliches und an der Segregation von Plasmiden beteiligtes Protein ist Alfa (actin-like filament) aus *B. subtilis* (Becker *et al.*, 2006). Alfa segregiert das Plasmid pLS32 in *B. subtilis* und es bildet dort dynamische gekrümmte Filamente entlang der Längsachse der Zelle aus. Die Struktur der Alfa Filamente sind wie ParM links-gewunden, jedoch nicht mit entgegengesetzter Polarität (Polka *et al.*, 2009). Der Mechanismus, sofern er bisher bekannt ist, ähnelt stark dem des ParMRC Modells (Becker *et al.*, 2006, Polka *et al.*, 2009). In BLAST Analysen, ausgehend von der Alfa Sequenz, wurden 35 Aktin-ähnliche Protein Familien (sogenannte Alps – actin-like protein) identifiziert, manche sind chromosomal kodiert, die Mehrheit jedoch befindet sich auf Plasmiden, Phagen, Genomen oder auf konjugativen Elementen (Derman *et al.*, 2009).

1.4 Morphologische Differenzierung in *S. coelicolor*



○ *parC* containing plasmid ● ParR ● ATP-ParM ● ADP-ParM

Abb. 6 Modell der Plasmidverteilung durch das R1-Par-Operon. (A) Filamente binden an das mit ParR beladene Plasmid. (B) Plasmide diffundieren innerhalb Zelle, bis sie nah genug aneinander sind. (C) Wenn zwei Plasmide sich räumlich nah sind, werden die Filamente an jedem Ende an ein Plasmid gebunden und bilden eine Spindel. Das verhindert die Depolymerisierung des Filaments. (D) Durch die Polymerisierung der stabilisierten Filamente werden die beiden Plasmide zu den gegenüber liegenden Zellpolen transportiert. (E) Erreicht ein Plasmid den Zellpol, dissoziiert das Plasmid von einem Ende des Filaments und dieses depolymerisiert (aus Campbell und Mullins 2007)

Der Lebenszyklus von Streptomyceten ist dem von filamentös wachsenden Pilzen sehr ähnlich. Trifft eine Streptomycetenspore auf nährstoffreichen Boden, beginnt sie anzuschwellen und bildet ein oder zwei Keimschläuche aus. Die Keimschläuche wachsen in den Boden hinein und beginnen sich dort zu verzweigen. Das entstandene Bodengeflecht wird als Substratmyzel bezeichnet. Verschiedene Signale, wie etwa ein geringes Nährstoffangebot, führen zur Bildung des Luftmyzels, welches in die Höhe wächst. Aus dem Luftmyzel werden schließlich Sporen gebildet, die dann über die Luft weitergetragen werden können, um andere Orte beispielsweise mit mehr Nährstoffen besiedeln zu können (Abb. 7). Mit der Initiation der Sporulation erfolgt meist auch die Produktion von Sekundärmetaboliten.

1.4.1 Wachstum des Substratmyzels

Streptomyceten wachsen durch apikales Wachstum des Substratmyzels und der Einbau neuen Peptidoglykans erfolgt an der Hyphenspitze (Flärdh 2003). Für das von *mreB*-unabhängige Elongationswachstum ist das coiled-coil Protein DivIVA wichtig (Flärdh 2003, sowie Abschnitt 1.2.2). An der Hyphenspitze erfolgt nicht nur der Einbau neuen Zellwandmaterials. Es wurde ein Zellulose-Synthase-ähnliches Protein (CslA) gefunden, welches mit DivIVA interagiert und für den Einbau von β -Glukan in die Zellwand verantwortlich ist (Xu *et al.*, 2008). Eine *cslA* Mutante zeigt verschiedene Effekte, beispielsweise eine verzögerte Bildung des Luftmyzels und eine veränderte Zellmorphologie, wie faltige Sporenwände (Xu *et al.*, 2008).

1.4.2 Bildung des Luftmyzels

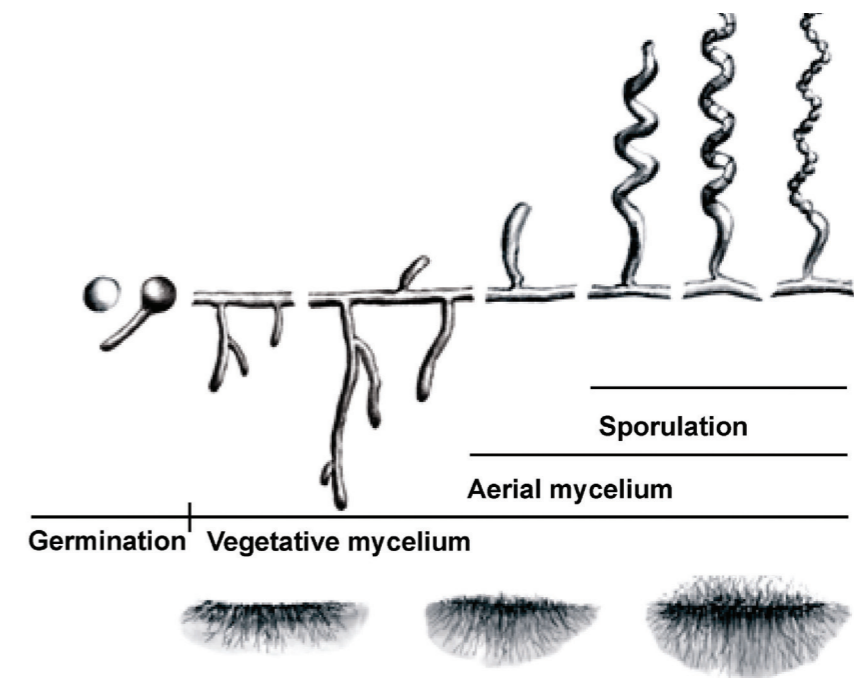


Abb. 7 Der Lebenszyklus von *Streptomyces coelicolor*. Der Lebenszyklus beginnt zunächst mit dem Anschwellen einer Spore, die anschließend zu Keimen beginnt (Germination). Dieser Keimschlauch wächst tief in den Boden, verzweigt sich und bildet das Substratmyzel (vegetative mycelium). Unter beispielsweise nährstoffarmen Bedingungen kommt es zur Bildung des Luftmyzels, welches aus einer unverzweigten Hyphe besteht, die in die Luft wächst (Aerial mycelium). Durch regelmäßige Septierung werden Vorsporen gebildet, die anschließend durch die Verdickung der Zellwand zu reifen Sporen (Sporulation) differenzieren (schematische Zeichnung von M. Hempel nach K. F. Chater; <http://www.cob.lu.se/microbiology/differentiation.html>).

Um die Oberflächenspannung des Mediums zu überwinden und in die Luft zu wachsen, produziert *S. coelicolor* eine hydrophobe Schicht um das Luftmyzel. Diese hydrophobe Schicht besteht aus sogenannten Chaplins und Rodlins sowie, auf nährstoffreichem Medium, SapB (Willey *et al.*, 1991; Elliot *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2003). SapB ist ein Lantibiotika-ähnliches Peptid, ausgehend von einer 42 Aminosäuresequenz, welche von RamC (ram-rapid aerial mycelium) post-translational modifiziert wird (Kodani *et al.*, 2004). SapB wird von *ramS* kodiert, welches Bestandteil des *ramCSAB* Operons ist. Dieses Operon steht unter der Kontrolle des Aktivators RamR (Kodani *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2002; O'Connor und Nodwell 2005; Keijser *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2002).

Auf nährstoffarmem Medium erfolgt die Bildung der hydrophoben Schicht über einen SapB-unabhängigen Weg. Diese Schicht wird von den ebenso stark hydrophoben Rodlins und Chaplins gebildet. Zu der Familie der Chaplins gehören acht Proteine ChpA-H, welche eine stark konservierte, 50 AS große, hydrophobe Domäne besitzen, die sogenannte Chaplindomäne (Elliot *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2003; Di Berardo *et al.* 2008). Die kurzen ChpD-H werden über das Sec-System, die drei längeren ChpA-C werden durch Sortase Enzyme sekretiert (Elliot *et al.*, 2003; Claessen *et al.*, 2003). Die Chaplins lagern sich selbstständig zu einer Amyloid-ähnlichen Struktur an der Oberfläche zusammen. Es wird vermutet, dass die kurzen Chaplins über die, in der Membran sitzenden, längeren Chaplins an der Zelloberfläche verankert werden (Claessen *et al.*, 2003). Die zweite, an der hydrophoben Schicht beteiligten Proteine sind die Rodlins A und B (Claessen *et al.*, 2002). Rodlins sind wichtig für die richtige Anordnung der Chaplins, da eine Deletion von *rdIA* und *rdIB* eine ungeordnete Chaplin-Struktur an der Zelloberfläche im Elektronenmikroskop zeigt (Claessen *et al.*, 2002, 2004).

Die Regulationskaskade von SapB oder den Chaplins ist bisher kaum verstanden.

Eine regulatorische Funktion scheinen einige der *bald*-Gene (*bald*- da ihre Deletion zu einem glatten Aussehen der Streptomyceten- Kolonien führt) zu besitzen. Die Expression von SapB oder den Chaplins auf nährstoffreichem Medium benötigt alle der bisher getesteten *bld* Gene (Willey *et al.*, 1991, Willey *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2002; Elliot *et al.*, 2003). Einige der bisher charakterisierten *bld* Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und scheinen eine eher indirekte Rolle zu spielen, beispielsweise durch Signalerkennung oder –weitergabe (Flärdh und Buttner 2009).

1.4.3 Sporulation

Die eigentliche Zellteilung und Segregation der Chromosomen von Streptomyceten findet während der Sporulation statt. Der Zellteilungsprozess erfolgt bei *S. coelicolor* während der Septierung des Luftmyzels. In Streptomyceten konnten bisher keine homologen Gene für Zellteilungsmechanismen wie das Min-System oder das Noc-System gefunden werden (Flärdh und Buttner 2009).

Das Luftmyzel besteht aus einer unverzweigten, nicht septierten, langen Hyphe, die bis zu 50 Kopien des Chromosoms enthält (Ruban-Osmialovska *et al.* 2006). Für das anschließende Umschalten vom Elongationswachstum zur Zellteilung werden die Gene *whiA* und *whiB* benötigt (Flärdh *et al.*, 1999). Für die Septierung des Luftmyzels verantwortlich ist, wie auch bei der Zellteilung in stäbchenförmigen Bakterien, das Protein FtsZ. Die FtsZ Proteine lagern sich auch hier zu einer Ringstruktur am Sporulationsseptum zusammen. FtsZ rekrutiert andere Zellteilungsproteine, wie FtsW, FtsI, FtsQ und andere, an die Zellteilungsebene (Schwedock *et al.*, 1997; McCormick *et al.*, 1994; Bentley *et al.*, 2002; McCormick und Losick 1996; Mistry *et al.*, 2008). Diese Proteine an der Zellteilungsebene gehören zu dem sogenannten Divisom. FtsZ

er *et al.* 2000 entdeckten, dass auch Streptomyceten ein *mre*-Cluster besitzen. Dieses Cluster weist die gleiche Operonstruktur auf, welche bereits in stäbchenförmigen Bakterien beschrieben wurde (Burger *et al.* 2000). Das Vorkommen eines *mre*-Clusters in Streptomyceten war überraschend. Streptomyceten besitzen kein Elongationswachstum wie stäbchenförmige Bakterien, sondern Wachsen an der Hyphenspitze. *Mre*-Gene wurden nicht in allen Actinomyceten gefunden, sondern nur in Actinomyceten, die über die Ausbildung eines Luftmyzels sporulieren (Mazza *et al.* 2006). In stäbchenförmigen Bakterien ist die Deletion von *mreB* letal. In *S. coelicolor* führt die Deletion von *mreB* zu geschwollenen Sporen, die sensitiver gegenüber äußeren Stressfaktoren (z.B. Hitze) sind (Mazza *et al.* 2006). Durch GFP Fusionen konnte gezeigt werden, dass MreB zunächst an den Sporulationssepten lokalisiert, anschließend an den Polender Vorsporen assembliert und letztlich eine Art Hülle unterhalb der Zytoplasmamembran der fertigen Sporen bildet (Mazza *et al.* 2006). Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten die Vermutung, dass MreB an der Verdickung der Sporenwand beteiligt ist und vermutlich den Peptidoglykan-synthesekomplex in Sporen lokalisiert (Mazza *et al.* 2006). Genomanalysen von *S. coelicolor* zeigten, dass zwei weitere *mreB*-ähnliche Gene auf dem Chromosom lokalisiert sind (*mbl* und *sco6166*).

Bislang ist über beiden *mreB*-ähnlichen Gene *mbl* und *sco6166* wenig bekannt. Ebenso ist die Funktion der Gene des *mre*-Clusters (*mreC*, *mreD*, *pbp2* und *sfr*) während der Sporulation in *S. coelicolor* noch unklar. In der vorliegenden Dissertation sollten diese Gene durch phänotypische Analysen, während der morphologischen Differenzierung genauer charakterisiert werden. Desweiteren sollte die Expression von *mreB*, *mbl* und *sco6166* während der Sporulation genauer analysiert werden. Diese Expressionsstudien sollten zu einem besseren Verständnis

der Rolle der *mreB*-ähnlichen Gene bezüglich der Sporulation beitragen.

Bisher ist nur ein genaues Lokalisationsprofil von MreB-eGFP erstellt worden (Mazza *et al.* 2006). Unklar ist, welche Proteine mit MreB interagieren und einähnliches Lokalisationsprofil aufweisen. Es sollten deshalb ein Lokalisationsprofil von den MreB-ähnlichen Proteinen Mbl und SCO6166 sowie der anderen Proteine des Mre-Clusters erstellt werden. Ein weiterer Punkt ist die Analyse der Abhängigkeit der Lokalisation von MreB und Mbl voneinander und anderen Mre-Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

2.1 Charakterisierung der drei Aktin-ähnlichen Gene *mreB*, *mbl* und *sco6166* von *S. coelicolor* A3(2)

2.1.1 Die Gene *mreB* und *mbl* weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf

S. coelicolor enthält neben *mreB* (SCO2611) zwei weitere Gene, *mbl* und *sco6166*, die MreB-homologe Proteine kodieren. *mbl* (SCO2451) liegt zwischen einem Serin-Threonin-Kinase-Gen und einem Histidin-Kinase-Gen. Das Protein Mbl hat ein Molekulargewicht von 37,5 kDa und eine Aminosäuresequenzähnlichkeit zu MreB (36,5 kDa) von 42%. *sco6166* ist translational mit *sco6165* (ein Homolog zu DnaK Suppressor DksA von *E. coli*) gekoppelt. Das Protein ist mit nur 28,7 kDa deutlich kürzer als MreB oder Mbl. Es konnten in allen sequenzierten Streptomyceten MreB oder Mbl Homologe gefunden werden, *S. avermitilis* oder *S. viridochromogenes* besitzen jedoch kein SCO6166 Homolog, was für eine nicht essentielle Rolle des Proteins in Streptomyceten sprechen könnte.

2.1.2 SCO6166 fehlen die Untereinheiten IB und IIB

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu MreB von *Thermotoga maritima* (MreBTM) war es möglich, ein Strukturmodell aller MreB-ähnlichen Proteine von *S. coelicolor* anzufertigen. Das Modell basierte auf der bereits bekannten Kristallstruktur von MreBTM. Dieses besteht aus zwei Domänen I und II, welche in die Unterdomänen A und B aufgeteilt sind. Die beiden größeren IA und IIA, sowie die kleineren IB und IIB. Die Unter-einheiten IB und IIB sind innerhalb der Aktin ähnlichen Proteine oft verschieden und vermutlich spezifisch für die jeweilige Funktion des Proteins (van den Ent *et al.* 2001).

2. Ergebnisse

Das angefertigte Strukturmodell von MreB, Mbl und SCO6166 zeigte, dass größere Abschnitte in der Sequenz von SCO6166, die den Untereinheiten IB und IIB entsprechen, fehlen (Manuskript 5.2 Fig.1A und B). MreB und Mbl entsprachen zum Großteil der Struktur von MreBTM.

2.1.3 Die Deletion von *mbl* führt zu geschwollenen Sporen, während die Δ *sco6166* Mutante keinen Phänotyp aufweist

Über die Funktion der MreB homologen Proteine in *S. coelicolor* ist nichts bekannt. Um auf eine mögliche Funktion der Gene schließen zu können, wurden sowohl *mbl*, *sco6166* als auch gleichzeitig *mbl* und *mreB* deletiert. Anschließend wurden diese Mutanten auf Wachstumsdefizite während der morphologischen Differenzierung untersucht. Die Deletionen dieser Gene zeigten keinen Einfluss auf das vegetative Wachstum von *S. coelicolor*. Dies wurde auch schon für die Deletion von *mreB* in Mazza et al. 2006 beschrieben. Es konnte jedoch ein Unterschied während der Sporulation beobachtet werden. Während die Deletion von *mbl* und *mbl/mreB* einen sehr ähnlichen Phänotyp aufwiesen, war für die Δ *sco6166* Mutante kein Phänotyp sichtbar. Δ *mbl* und Δ *mbl/mreB* Mutanten hatten geschwollene und zum Teil lysierte Luftmyzelhyphen als auch bereits in der Sporenkette auskeimende Sporen (Manuskript 5.2 Fig.3 A). Desweiteren wurde die Länge und Weite der Δ *mreB*, Δ *mbl*, Δ *mbl/mreB* und Δ *sco6166* Mutantensporen ermittelt. Von den 4 Tage auf SM-Agar gewachsenen Kulturen wurde die Größe der Sporen mit Hilfe des Lichtmikroskops und der AnalySIS Software von Olympus (SIS, Soft Imaging System GmbH) bestimmt. Die Deletion von *mbl* hatte einen größeren Einfluss auf die Länge, als auf die Weite der Sporen. Die Sporen von Δ *mbl* oder Δ *mbl/mreB* waren etwas länger als die von Δ *mreB*. Die Weite der Sporen war in der Mutante Δ *mbl* geringer als bei Δ *mreB* oder der Doppelmutante Δ *mbl/mreB*. Die Sporengröße von Δ *sco6166* entsprach der des Wildtyps. Die genauere Untersuchung der Sporenwand erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie TEM. Elektro-

nenmikroskopische Bilder zeigten für Δmbl unförmige Sporen, deren Zellwand stark beeinträchtigt war (Manuskript 5.2 Fig. S4). Auch der Sporenhalt zeigte ein verändertes Erscheinungsbild. Es waren helle runde Bereiche im Inneren der Sporen zu sehen.

2.1.4 Die Sporen von der Δmbl , $\Delta mbl/mreB$ Mutante sind sensitiv gegenüber osmotischem Stress oder Hitze

Um Auswirkungen verschiedener Stressfaktoren, wie osmotischen Stress (6,5 % NaCl oder 10,3 % Sucrose) oder Hitze, auf die Mutanten zu testen, wurden diese auf verschiedenen Festmedien ausplattiert und auf Wachstumsdefekte untersucht. Auf SM-Agar keimten die Mutanten $\Delta mreB$, Δmbl und $\Delta mreB/mbl$ bereits in der Sporenkette aus, was für die $\Delta mreB$ Mutante in Mazza *et al.* 2006 bereits beschrieben wurde. Durch die Zugabe von 10,3 % Sucrose zum Medium wurde der osmotische Druck auf die Kulturen erhöht, und es war ein deutlicher Effekt zu sehen: Die Mutanten $\Delta mreB$, Δmbl und $\Delta mreB/mbl$ sporulierten kaum nach vier Tagen auf SM-Agar mit 10,3 % Sucrose. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten stark lysierte Luftmyzelhyphen sowie stark verformte, sporenähnliche Gebilde (Manuskript 5.2 Fig. 3B). Zudem wurde der Einfluss von hohen Salzkonzentrationen untersucht, indem die Lebendzahl nach 3 Tagen auf LB-Agar ohne und mit 6,5 % NaCl verglichen wurde (Manuskript 5.2 Fig.4). Getestet wurden die Mutanten $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta mreB/mbl$ und $\Delta sco6166$. Die Überlebensrate des Wildtyps wurde auf 100 % gesetzt. Die Sporen von $\Delta mreB$ und Δmbl zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber 6,5 % NaCl auf LB-Agar, nur 0,001 % für $\Delta mreB$ bzw. 0,003 % für Δmbl überlebten, die Überlebensrate der Doppelmutante $\Delta mreB/mbl$ lag bei 0,02 %. Im Gegensatz dazu hatte die Deletion von $sco6166$ keine Auswirkung auf die Überlebensrate, verglichen mit $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta mreB/mbl$. Die Sporen von $\Delta sco6166$ waren nahezu resistent gegenüber den hohen Salzkonzentrationen mit einer Überlebensrate von 89,4 %.

Für den Hitzetest wurden die Sporen von M145 sowie der Mutanten $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta mreB/mbl$ und $\Delta sco6166$ in H_2O bei $30^\circ C$ oder $60^\circ C$ für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf LB-Agar Platten aufgetropft. Die Sporen des Wildtyps und der $\Delta sco6166$ Mutante waren resistent und konnten auch nach der Hitzebehandlung auskeimen. Die Sporen der Mutanten $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta mreB/mbl$ waren sensitiv gegenüber der Hitzebehandlung und zeigten nach zwei Tagen Inkubation auf LB-Agar bei $30^\circ C$ kein Wachstum mehr (Manuskript 5.2 Fig.4 A).

2.1.5 Die drei *mreB*-ähnlichen Gene zeigen unterschiedliche Expressionsprofile während der Sporulation

Ziel war es ein Expressionsprofil von *mreB*, *mbl* sowie *sco6166* während der morphologischen Differenzierung zu erstellen. Dies wurde mittels RT-PCR gemacht. Für die RNA Isolierung wurden die M145 Sporen auf mit einer Zellophanscheibe überzogenen LB-Agar- und SM-Agar-Platten ausgestrichen und nach 48 h, 72 h und 96 h geerntet. Streptomyceten bilden auf LB-Agar nur Substratmyzel aus, während sie auf SM-Agar nach etwa 48 h beginnen Luftmyzel zu bilden und zu sporulieren. Um zwischen der Expression im Substratmyzel und im Luftmyzel und Sporen unterscheiden zu können, wurden die Kulturen auf den beiden oben genannten Medien ausplattiert. Anschließend erfolgte die RNA Isolierung wie im Manuskript 5.2 beschrieben.

Die Gene *mreB* und *mbl* werden während der Sporulation hoch reguliert (Manuskript 5.2 Fig. 2). Für *mbl* war im Substratmyzel (auf LB-Agar) nach 48 h und 72 h keine Expression zu sehen, während nach 48 h auf SM-Agar eine schwache Expression zu sehen war. Die Expression für *mbl* nahm im Laufe der morphologischen Differenzierung nach 72 h und 96 h zu. In Burger *et al.* 2000 wurden vor dem *mreB* Cluster drei Promotoren identifiziert, wobei einer davon während der Sporulation aktiv ist, die anderen beiden sind

konstitutiv aktiv. Dies konnte durch die RT-PCR Daten bestätigt werden, in denen eine Expression von *mreB* im Substratmyzel zu erkennen war und während der Sporulation die Expression zunahm. Ein anderes Expressionsprofil ergab sich für *sco6166*. *sco6166* wurde im Substratmyzel stark exprimiert und ein Transkript konnte nach 48 h auf SM-Agar nur noch schwach detektiert werden, und nach 72 h war keine Expression mehr zu erkennen. (Manuskript 5.2 Fig. 2).

2.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten in Genen des *mreBCD*, *pbp2*, *sfr* Genclusters (*mre*-Gencluster)

2.2.1 Die *mre*-Mutanten haben unter hohem osmotischem Stress den gleichen Phänotyp wie $\Delta mreB$

Um eine genauere Aussage über die an der Sporulation beteiligten Gene machen zu können, wurden alle Gene des *mre*-Clusters deletiert und die Mutanten auf Defekte während der morphologischen Differenzierung hin untersucht. Das Substratmyzel dieser Mutanten zeigte normales Wachstum während die Sporen eine vorzeitige Auskeimung sowie geschwollene Luftmyzelhyphen aufwiesen. Dieser Phänotyp konnte durch die Zugabe von 10,3 % Sucrose verstärkt werden. Nach drei bis vier Tagen auf SM-Agar + 10,3 % Sucrose war das Luftmyzel stark lysiert, während kaum Sporen zu erkennen waren und diese eine starke Deformation zeigten. Der Wildtyp wies normales Wachstum auf SM-Agar Platten auf und konnte auch unter Zugabe von 10,3 % Sucrose Sporen bilden (Manuskript 5.1 Fig. 2B). Dieser Phänotyp ist dem von Mazza *et al.* 2006 gezeigten Phänotyp von $\Delta mreB$ Mutantensporen ähnlich. Die Sporen der $\Delta mreB$ Mutante keimten ebenso auf SM-Agar in der Sporenkette aus und die Hyphen des Luftmyzels waren geschwollen oder lysierten. Desweiteren stellte sich mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) heraus, dass diese Mutanten eine unregelmäßige

Sporenzellwand besitzen (Manuskript 5.1 Fig. 2C). Die Sporen des Wildtyps hatten eine regelmäßige Sporenwand und eine ovale Form, während die Mutanten stark verformt waren.

2.2.2 Die Sporen der *mre*-Mutanten sind stark vergrößert

Es wurde die Länge und Weite der *mre*-Mutantensporen ermittelt. Die Sporen aller Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp stark vergrößert. Die Sporen von $\Delta mreC$ und $\Delta pbp2$ zeigten die stärkste Abweichung von der Länge der Wildtypsporen. Auch die Weite der Mutantensporen war vergrößert. Ein etwas geringerer Effekt zeigte sich bei $\Delta mreC$, $\Delta mreD::aac$ und $\Delta mreBCD$, während $\Delta sfr::aac$ und $\Delta pbp2$ deutlich geschwollen waren (Manuskript 5.1 Tab. 1). Auch für die von Mazza *et al.* beschriebene *mreB* Mutante konnten geschwollene Sporen gemessen werden. Die Sporengrößen der komplementierten Mutanten entsprachen der des Wildtyps (Manuskript 5.1 Tab.1). Mit Hilfe von Interaktionsstudien durch das Bacterial-two-hybrid-System (durchgeführt von E.-M. Kleinschnitz) konnte das Protein SCO2097 identifiziert werden, welches beispielsweise mit MreC, MreD, PBP2 und Sfr interagiert (Manuskript 5.2 Fig. 5 A). Das Gen *sco2097* oder dessen Homologe liegen in den meisten Actinomyceten neben dem oder nahe des *dcw* Clusters. Dieses Cluster hat eine Rolle bei der Zellteilung und der Zellwandumgestaltung (Mingorance *et al.*, 2004). Um die Rolle des *sco2097* Gens genauer zu untersuchen, wurde es deletiert (beschrieben in Fig. S 11) und der Phänotyp getestet. Es zeigte sich, dass der Phänotyp dem der *mre*-Mutanten sehr ähnlich war und die Sporen ebenfalls bereits in der Sporenkette auskeimten (Manuskript 5.1 Fig. 6 A). Die Bestimmung der Sporengröße ergab, dass die Sporen deutlich verlängert waren, die Weite der Sporen entsprach jedoch in etwa der des Wildtyps (Manuskript 5.1 Tab.1).

2.3 Lokalisation der MreB homologen Proteine sowie PBP2 und Sfr während der morphologischen Differenzierung

2.3.1 Mbl-mCherry lokalisiert an den Septen des Luftmyzels und bildet eine Ringstruktur unterhalb der Sporenwand

In Mazza *et al.*, 2006 konnte gezeigt werden, dass MreB-eGFP an den Septen des Luftmyzels lokalisiert, dann an den Sporenpolen assembliert und abschließend eine Ring-Struktur unterhalb der Sporenwand bildet. Über die Lokalisation von Mbl war bisher nichts bekannt. Aus diesem Grund wurde ein Fusionsprotein mit dem rot fluoreszierenden mCherry Protein hergestellt und in den Wildtypstamm M145 gebracht (siehe Methodenteil Manuskript 5.2, sowie Tab. 1). Anschließend wurde die Lokalisation während der morphologischen Differenzierung untersucht. Es stellte sich heraus, dass Mbl-mCherry ein ähnliches Lokalisationsmuster zeigt wie MreB-eGFP. Im Substratmyzel war keine Fluoreszenz zu erkennen. Erst nach zwei Tagen auf SM-Agar, wenn sich erste Luftmyzelhyphen bildeten, war eine Lokalisation an den Septen des Luftmyzels und an den Polen der jungen Sporen zu sehen. In den späteren Sporenketten konnte ebenfalls eine Ringstruktur, wie sie bereits für MreB-eGFP publiziert wurde, gesehen werden (Manuskript 5.2 Fig. 6 A).

2.3.2 MreB-eGFP und Mbl-mCherry co-lokalisieren während der Sporulation an den Septen des Luftmyzels

Aufgrund des ähnlichen Lokalisationsprofils von Mbl-mCherry und MreB-eGFP lag

die Vermutung nahe, dass diese beiden Proteine co-lokalisieren. Um dies genauer zu untersuchen, wurde der Vektor pMreBeGFP (pPM4), welcher das Gen für das Fusionsprotein MreB-eGFP enthielt, in den Stamm M145-Mbl-mCherry mittels Konjugation eingebracht (siehe Methoden Manuskript 5.2). Es war deutlich eine Co-Lokalisation von MreB-eGFP und Mbl-mCherry an den Septen des Luftmyzels zu erkennen (Manuskript 5.2 Fig.6 B).

2.3.3 MreB-eGFP scheint eine helikale Struktur während der Sporulation zu besitzen

Jones *et al.*, 2001 konnten für *Bacillus subtilis* zeigen, dass MreB-eGFP eine helikales Filament unterhalb der Zellmembran während des Elongationswachstums ausbildet. Mittels Dekonvolution Experimenten mit MreB-eGFP und Mbl-eGFP sollte herausgefunden werden, ob diese helikale Struktur auch in Streptomycceten zu sehen ist. Hierfür wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops sogenannte Z-Stacks durchgeführt. Um Z-Stacks zu erhalten geht man von oben nach unten durch das Objekt und macht in bestimmten definierten Abständen auf jeder Ebene ein Bild. Dadurch erhält man ein 3D-Bild der Zelle und des darin enthaltenen Fluoreszenzsignals und kann so die genaue Lage des Proteins in der Zelle bestimmen. Ein großes Problem dabei ist, dass das Fluoreszenzsignal eines Proteins aufgrund von Beugungserscheinungen an Blenden oder beispielsweise Einfluss der Sensorfläche oder der Apertur streut und somit kein klares Endbild entsteht (s. Abb. 8).

Um die Streuung der Fluoreszenz wieder auf ein einzelnes Protein zurückrechnen zu können, muss die sogenannte Punktspreizfunktion (point spread function) PSF berechnet werden. Mit Hilfe des berechneten PSF, kann die Software anschließend für das zu untersuchende Objekt den Ausgangspunkt des Fluoreszenzsignals berechnen und das Bild somit geschärft werden. Diese Berechnungen sind Bestandteil der Dekonvolutionsmikroskopie. Es waren teilweise helikale Strukturen für MreB-eGFP in den jungen Sporenketten

zu erkennen (Abb. 9).

Zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt der Differenzierung war keine Auswertung des Fluoreszenzsignals möglich. Die lange Belichtungsdauer durch das Erstellens der Z-Stacks führte zum Ausbleichen der Fluoreszenz. Dies war ein großes Problem bei der Durchführung der Experimente.

2.3.4 SCO6166-mCherry zeigt keine spezifische Lokalisation während der morphologischen Differenzierung

Um mehr über die Funktion von SCO6166 zu erfahren, wurde das Gen *sco6166* mit mCherry fusioniert (siehe Methoden Manuskript 5.2, sowie Tab. 1). In RT-PCR Analysen wurde, wie bereits in 2.1.4 beschrieben, *sco6166* im Substratmyzel stark exprimiert, wobei es während der Sporulation zu einer Verminderung der Transkriptmenge kam. Dies konnte auch mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden. Es war eine starke Expression von SCO6166-mCherry im Substratmyzel zu sehen (Manuskript 5.2 Fig. S. 5). Diese war jedoch im ganzen Zytoplasma verteilt, und es gab kein klares Lokalisationsprofil, wie es für Mbl oder MreB der Fall war. Diese starke Fluoreszenz war ausschließlich im Substratmyzel in Kulturen zu sehen, die auf LB-Agar gewachsen waren. In Kulturen auf SM-Agar war nach zwei bis drei Tagen weder im Substratmyzel noch im Luftmyzel oder in Sporen ein Fluoreszenzsignal zu erkennen (Abb. 10; siehe Manuskript 5.2 Fig. S. 5).

2.3.5 Für die exakte Lokalisation von Mbl-mCherry an den Septen des Luftmyzels ist MreB essentiell

Um die Abhängigkeit der Lokalisation von MreB-eGFP von anderen Mre Proteinen zu testen, wurde der Vektor pMreBeGFP, welcher das für das Fusionsprotein

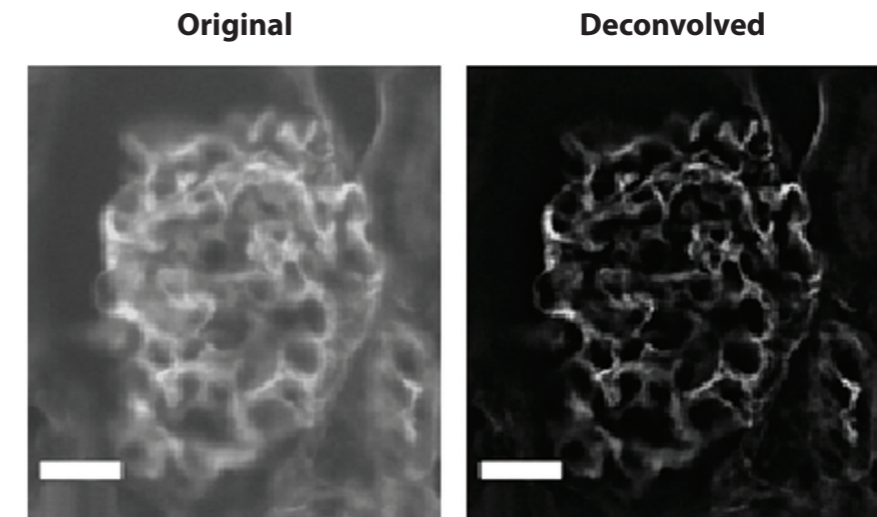


Abb. 8 Darstellung eines Beispielbildes einer erfolgreichen Bearbeitung durch Dekonvolution. Aufgrund des errechneten PSF kann man mit Hilfe einer Software das Streuungsmuster berechnen und dies auf das zu untersuchende Objekt (B) anwenden. Links ist das leicht verschwommene bzw. gestreute Originalbild zu sehen, rechts das Bild nach der Berechnung des optimalen PSF und der Rückrechnung der Lichtstreuung bzw. -beugung. Aus <http://darwin.winston.wfu.edu/microscopy/index.php/Main/InvertedScope>

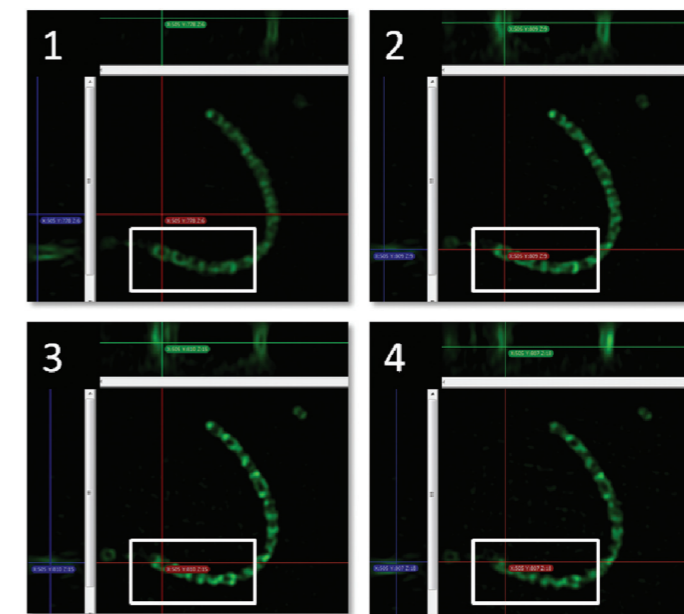


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer jungen Sporenkette in vier verschiedenen Ebenen (1-4). Es sind helikale Strukturen von MreB-eGFP zu erkennen, vor allem in dem weiß markierten Bereich ist dies deutlich.

MreB-eGFP kodierende Gen enthielt, mittels Konjugation in die Mutanten Δmbl , $\Delta mreC$, $\Delta pbp2$ und Δsfr eingebracht (siehe Methoden Manuskript 5.1 und 5.2) und die Fluoreszenz im Myzel untersucht. Die Lokalisation von MreB-eGFP war in keiner Mutante beeinträchtigt. In allen Mutanten lokalisierte MreB-eGFP an den Septen des Luftmyzels, assemblierte an den Zellpolen und bildete anschließend die bekannte Ringstruktur unterhalb der Sporenwand aus (Manuskript 5.1 Fig. 4, Fig. S 8 und Manuskript 5.2 Fig. 7 A).

Desweiteren wurde untersucht, ob Mbl-mCherry andere morphogene Proteine zur korrekten Lokalisation benötigt. Hierzu wurde pMbl-mCherry (pAH5) in $\Delta mreB$, Δsfr und $\Delta pbp2$ eingeführt (siehe auch Tab. 1). Zusätzlich wurde die Mutante $\Delta sco2097$ getestet, um zu sehen, ob dieses vermutlich auch an der Sporulation beteiligte Gen einen Einfluss auf die Lokalisation von Mbl hat (Tab. 1). Die Lokalisation von Mbl-mCherry in den Δsfr , $\Delta pbp2$ und $\Delta sco2097$ Mutanten war nicht beeinträchtigt, und Mbl-mCherry lokalisierte wie im Wildtyp M145 (Abb. 11, sowie Manuskript 5.2 Fig. 7 B). Die Deletion von *mreB* führte jedoch dazu, dass Mbl-mCherry weder an den Septen des Luftmyzels noch unterhalb der Sporenwand lokalisieren konnte (Manuskript 5.2 Fig. 7 B).

Um eine regulatorische Funktion von MreB auf die Expression von Mbl auszuschließen, wurde RNA von $\Delta mreB::Mbl$ -mCherry und M145::Mbl-mCherry isoliert, cDNA synthetisiert und mit Primern spezifisch für *mbl* eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Methode siehe supplementary Material Manuskript 5.2 Fig. S 7). Als Kontrolle diente das housekeeping Gen *hrdB*. Es konnte sowohl nach 48 h als auch nach 72 h auf SM-Agar ein Transkript für *mbl* nachgewiesen werden (Manuskript 5.2 Fig. S 7). Die Deletion von *mreB* hatte also keinen regulatorischen Einfluss auf die

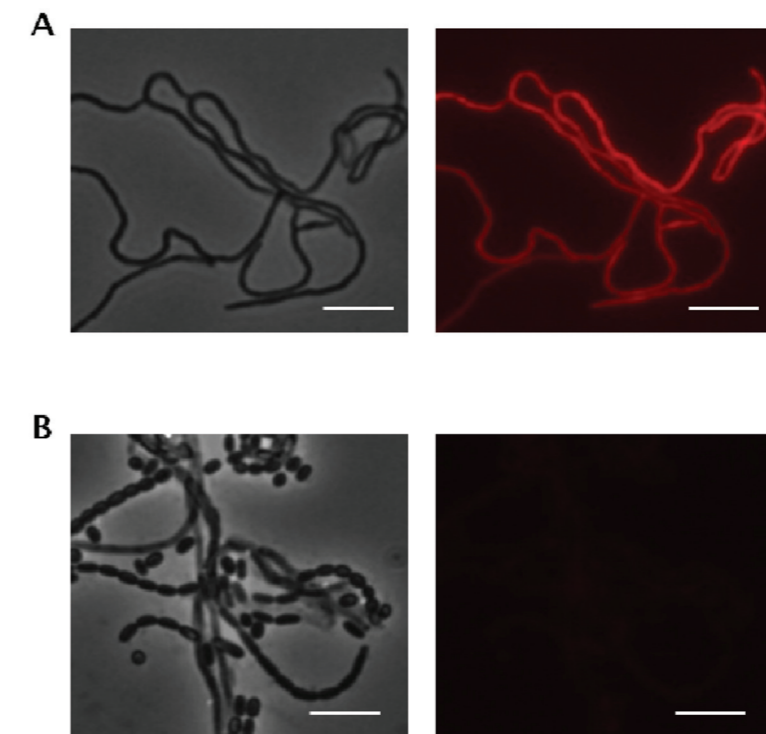


Abb. 10: Vergleich der Lokalisation von SC06166-mCherry auf LB-Agar (A) und SM-Agar (B). SC06166-mCherry zeigt nach zwei Tagen auf LB-Agar eine starke Expression (A), während nur eine sehr schwache Fluoreszenz nach zwei Tagen im Substratmyzel auf SM-Agar zusehen ist (-). Größenbalken = 5 µm

2.3.6 Die Proteine PBP2-eGFP und Sfr-eGFP lokalisieren an den Septen des Luftmyzels

Um mehr über die Lokalisation der anderen *mre*-Gene herauszufinden, wurden in vorherigen Arbeiten *pbp2* bzw. *sfr* mit *egfp* fusioniert. Die entstandenen Genfusionen wurden anschließend als single copy ins Chromosom integriert. Die Expression war jedoch nicht ausreichend oder das Fusionsprotein nicht aktiv, denn es konnte keine klare Fluoreszenz detektiert werden. Um eine stärkere Expression auf Grund einer höheren Kopienzahl zu erreichen, wurde *pbp2-egfp* und *sfr-egfp* in den multi-copy Expressionsvektor pGM190 kloniert (Tab. 1). Sowohl *pbp2-egfp* als auch *sfr-egfp* konnten unter der Kontrolle des *tipA* Promotors exprimiert werden. PBP2-eGFP und Sfr-eGFP lokalisierten unter diesen Bedingungen an den Septen des Luftmyzels, wie auch für MreB und Mbl gezeigt. In diesen Experimenten kann allerdings ein Einfluss der Überexpression auf die korrekte Lokalisation von PBP2-eGFP oder Sfr-GFP nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist jedoch aufgrund der ähnlichen Lokalisation wie MreB und Mbl eher unwahrscheinlich.

3.1 Die Mre Proteine in *S. coelicolor* werden nicht für das Wachstum des vegetativen Myzels benötigt, sie besitzen jedoch eine Funktion bei der morphologischen Differenzierung

Die Deletion von beispielsweise *mreB* oder *mbl* führt im stäbchenförmigen Bakterium *B. subtilis* zum Verlust der Zellform und anschließend zur Zellyse. Diese Zellyse ist auf den fehlerhaften Einbau neuen Peptidoglykans während der Elongation zurückzuführen (Formstone und Errington 2005; Gitai *et al.* 2005). Stäbchen-förmige Actinomyceten wie Corynebakterien oder Mycobakterien oder filamentöse Streptomyceten bilden die Zellgestalt nach einem anderen Mechanismus aus, der kein laterales Zellwandwachstum

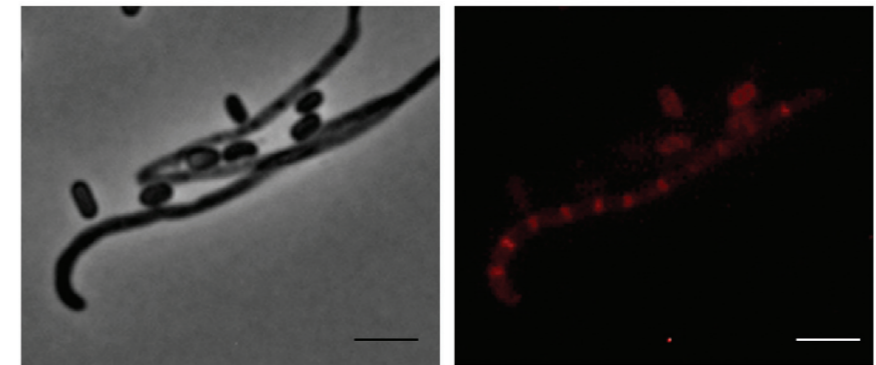


Abb. 11: Lokalisation von Mbl-mCherry in der Δ sco2097 Mutante.

Die Lokalisation von Mbl-mCherry ist nicht in Δ sco2097 beeinträchtigt. Mbl-mCherry lokalisiert wie auch im Wildtyp an den Septen des Luftmyzels. Es konnte jedoch keine genaue Aussage über die Lokalisation in den Sporen getroffen werden. (Balken entspricht 2 μ m).

beinhaltet. Bei Actinomyceten erfolgt der Einbau neuen Zellwandmaterials überwiegend an den Zellpolen (Daniel und Errington 2003, Letek *et al.* 2008, Mazza *et al.* 2006). Dieses apikale Spitzenwachstum beruht auf dem DivIVA Protein (Letek *et al.* 2008, Hempel *et al.* 2008) ohne Beteiligung von Mre-Proteinen. Daher kommen in den meisten Actinomyceten auch keine *mre*-Gene vor (Mazza *et al.* 2006). Überraschenderweise wurde aber in *S. coelicolor* ein vollständiges *mre*-Gencluster identifiziert (Burger *et al.* 2000), sowie auch zwei weitere *mreB*-ähnliche Gene *mbl* und *sco6166* (Manuskript 5.2). Aufgrund des ähnlichen Aufbaus des *mre*-Genclusters, wie das am Elongationswachstum in Stäbchen beteiligte, wurde ebenso eine Funktion der entsprechenden Proteine im Wachstum bzw. in der Peptidoglykansynthese in *S. coelicolor* vermutet. Diese Hypothese wurde allerdings durch den Phänotyp der Δmbl sowie der *mre*-Mutanten ($\Delta mreC$, $\Delta mreD$, $\Delta pbp2$ und Δsfr), der weitestgehend dem des bereits in Mazza *et al.* 2006 beschriebenen $\Delta mreB$ -Phänotyps entsprach, nicht bestätigt. Da kein auffälliger Phänotyp bezüglich des vegetativen

zu lokalisierendes Protein	Stamm	Lokalisation
MreB	M145 MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	Δmbl MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	$\Delta mreC$ MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	$\Delta mreD$ MreB-eGFP	nicht getestet, keine Transformanten
	$\Delta pbp2$ MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	Δsfr MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	$\Delta mreB$ MreB-eGFP	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
Mbl	M145 Mbl-mCherry	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	$\Delta mreB$ Mbl-mCherry	Keine Lokalisation an Septen
	$\Delta mreC$ Mbl-mCherry	nicht getestet, keine Transformanten
	$\Delta mreD$ Mbl-mCherry	nicht getestet, keine Transformanten
	$\Delta pbp2$ Mbl-mCherry	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
	$\Delta 2097$ Mbl-mCherry	an Septen des Luftmyzels
	Δsfr Mbl-mCherry	an Septen des Luftmyzels, ringförmig in Sporen
SCO6166	M145 SCO6166-mCherry	in Substratmyzel, unspezifisch
Sfr	M145 pGM190-Sfr-eGFP	an Septen des Luftmyzels
PBP2	M145 pGM190-PBP2-eGFP	an Septen des Luftmyzels
MreC	M145 MreC-eGFP	keine Fluoreszenz sichtbar
MreD	M145 MreD-eGFP	Klonierung fehlgeschlagen

Tab. 1 Übersicht der zu lokalisierenden Proteine, den Vektor tragenden Stämmen sowie der Lokalisation der entstandenen Fusionsproteine.

3. Diskussion

Wachstums beobachtet wurde (Manuskripte 5.1 und 5.2) ist auszuschließen, dass diese Gene eine essentielle Funktion in der Zellwandsynthese bei dem apikalen Spitzenwachstum besitzen.

Der beobachtete Defekt bei der Sporulation, vorzeitige Keimung der Sporen, Sensitivität gegen Hitze, Detergentien, Lysozym, Vancomycin und hohe Osmolarität, könnte aber durch eine fehlerhafte Peptidoglycansynthese in der Sporenwand erklärt werden. Diese Vermutung konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. In TEM Bildern der Δmbl und der Δmre -Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Zellwand der Sporen geschädigt war. Die Mutantensporen waren im Vergleich zu den regelmäßig geformten Sporen des Wildtyps, unförmiger und wiesen eine diffuse Zellwand auf (Manuskripte 5.1 und 5.2). Auch für die Sporen der $\Delta mreB$ Mutante konnte dies bereits gezeigt werden (Mazza *et al.* 2006). Desweiteren wurden häufig größere helle Bereiche innerhalb der Mutantensporen gesehen. Vermutlich ist dies jedoch ein Artefakt des Fixierungs- bzw. Färbeprozesses aufgrund der beeinträchtigten Sporenwand.

3.2 Nur zwei der drei Aktin-ähnlichen Proteine sind an der Sporulation von *S. coelicolor* beteiligt

Eine genauere Untersuchung der drei Aktin-ähnlichen Gene *mreB*, *mbI* und *sco6166* bezüglich ihrer zeitlichen Expression erfolgte mit Hilfe von Transkriptionsanalysen. Mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass sowohl *mreB* als auch *mbI* während der morphologischen Differenzierung hoch reguliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit S1-Mapping Experimenten von Burger *et al.* 2000. In diesen S1-Mapping Experimenten wurden drei Promotoren für das *mreBCD* Operon identifiziert, wobei zwei konstitutiv exprimiert wurden und einer davon während der Sporulation induziert wurde (Burger *et al.* 2000). Die -35 und die -10 Region des P1 Promotors von

mreBCD (GGAAC-N17-CGTCCTC) entsprechen dem der SigE-abhängigen Promotoren (GCAAC-N17-CGTCTTC) (Hong *et al.* 2002). *sigE* kodiert für einen RNA Polymerase Sigma, welcher zu der ECF (extracytoplasmic function) Unterfamilie gehört (Paget *et al.* 1999). SigE ist Teil eines Signaltransduktionssystems, welches Veränderungen in der Zellwand reguliert (Hutchings *et al.* 2006). Zudem reguliert SigE das *cwg* Operon, welches an der Synthese von Zuckern der Zellwand beteiligt ist (Hong *et al.* 2002). Der Phänotyp einer *sigE* Mutante resultiert unter anderem in einer höheren Sensitivität gegenüber Zellwand lysierenden Reagenzien (Paget *et al.* 1999). Dieser Phänotyp konnte auch für die $\Delta mreB$ Mutante beobachtet werden (Manuskript 5.2). Dies lässt vermuten, dass die Transkription des P1 Promotors von SigE abhängig ist und somit *mreB* während Zellwandstress induziert wird.

mbl wies in allen Studien eine deutliche geringere Expressionshöhe als *mreB* auf. Besonders deutliche Unterschiede wurden bezüglich der Expression im Substratmyzel beobachtet. Während eine starke Expression von *mreB* in früheren Wachstumsphasen nachgewiesen wurde, konnte für *mbl* kein Transkript detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass Mbl eine untergeordnetere Rolle als Gerüstprotein spielt.

Das dritte *mreB*-ähnliche Gen, *sco6166* zeigte eine starke Expression im Substratmyzel, sobald jedoch die Sporulation einsetzte wurde es herunter reguliert. Nach drei Tagen auf SM-Agar war keine Expression für *sco6166* mehr sichtbar. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Hier konnte nur im Substratmyzel auf LB-Agar ein Signal für SCO6166-mCherry detektiert werden, nicht jedoch auf Sporulationsmedium. Dies lässt vermuten, dass Regulatorgene, welche während der Sporulation aktiv werden, eine Abschaltung des Gens *sco6166* bewirken. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der drei MreB-ähnlichen Proteine war es möglich

(Moritz Ammelburg, Tübingen), basierend auf der Kristallstruktur von MreB aus *T. maritima* ein Homologie Modell anzufertigen. Während MreB und Mbl eine hohe Strukturähnlichkeit besitzen zeigt SCO6166 eine hohe Homologie nur in den Untereinheiten IA und IIA, es fehlten jedoch die beiden Untereinheiten IB und IIB (Manuskript 5.2). Auch von anderen Aktin-ähnlichen Proteinen ist die hohe Variabilität der B Untereinheiten bekannt. StbA (plasmid stability protein), welches auch zu der Aktin-Superfamilie gehört, fehlt die Untereinheit IIB (Tabuchi *et al.* 1988; Bork *et al.* 1992) und ParM fehlen Teile der Untereinheit IB (Salje *et al.* 2010). Für das Zellteilungsprotein FtsA, welches mit FtsZ interagiert, vermutet man ebenso, dass es Filamente bildet obwohl diese bisher nicht bestätigt werden konnten. FtsA unterscheidet sich von den anderen Aktin-ähnlichen Proteinen durch die Lokalisation der IB-Untereinheit auf der Seite von IA (van den Ent und Löwe 2000). Die Untereinheiten IB und IIB variieren stark innerhalb der Aktin-Superfamilie und sind vermutlich spezifisch für Funktion des Proteins. Auf Grund des Fehlens der IB Untereinheit ist es wahrscheinlich, dass SCO6166 eine andere Rolle während des Lebenszyklus in Streptomyceten erfüllt als MreB und Mbl.

Das genetische Umfeld von *sco6166*, translationale Kopplung mit *sco6165*, lässt eine Spekulation auf die Rolle von SCO6166 zu. SCO6165 ist ein Homolog von DksA (DnaK suppressor A). Dies lässt auf eine Rolle von *sco6165/6166* im Falle eines Hitzeschocks oder als Stressantwort schließen. DksA wurde ebenso als Suppressor von MukB in *E. coli* beschrieben (Bass *et al.* 1996). Das Protein MukB wird für die Verteilung des Chromosoms benötigt, was auch für eine Funktion von *sco6165/6166* während der Chromosomenverteilung sprechen könnte.

sco6165/6166 besitzt jedoch keine essentielle Funktion, da einige Streptomyceten wie z.B. *S. avermitilis* oder *S. viridochromogenes* kein *sco6165/6166* Paar enthalten. Daher ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass die Δ *sco6166* Mutante keinen Phänotyp aufwies

(Manuskript 5.2).

3.3 Die Sporenwandsynthese in *S. coelicolor* erfolgt nach einem ähnlichen Mechanismus wie die laterale Zellwandsynthese in Stäbchen-förmigen Bakterien

In stäbchenförmigen Bakterien interagieren die vom *mre*-cluster kodierten Proteine (MreC, MreD, PBP2 und RodA) und bilden den lateralen Peptidoglykansynthesekomplex für das Elongationswachstum (Daniel und Errington 2003). Der ähnliche Phänotyp von $\Delta mreB$, Δmbl und den anderen *mre*-Mutanten von *S. coelicolor* lässt auf ein Zusammenwirken der Mre-Proteine bei der Synthese einer verdickten Sporenwand schließen. PBP2 ist ein monofunktionelles Penicillinbindeprotein, das Transpeptidaseaktivität aber keine Transglycosylaseaktivität aufweist. Transpeptidasen sind für die Quervernetzung des Peptidoglykans verantwortlich (Vollmer und Höltje 2001). Entfällt die korrekte Lokalisierung von PBP2 und dessen Transpeptidaseaktivität, führt das vermutlich zu einer beeinträchtigten, weniger quervernetzten Sporenwand, welche sensitiver gegenüber äußeren Stressfaktoren ist. In stäbchenförmigen Bakterien konnte durch den Einsatz von Fluoreszenz-markiertem Vancomycin gezeigt werden, dass die Lokalisation von MreB und der Einbau von neuem Peptidoglykan an den gleichen Stellen erfolgen. Daher wurde vermutet, dass MreB für die Positionierung des Peptidoglykansynthesekomplexes im Zuge des Elongationswachstums verantwortlich ist (Daniel and Errington, 2003; Tiyanont *et al.*, 2006; Divakaruni *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2009). Postuliert man für die Mre-Proteine von *S. coelicolor* eine ähnliche Funktion, sollten diese für die Positionierung des Peptidoglykansynthesekomplexes der Sporenhülle bedeutsam sein. In Bacterial-two-Hybrid Studien (Manuskript 5.1) k

onnte bestätigt werden, dass die Mre-Proteine sowohl miteinander als auch mit anderen Proteinen der Zellwandsynthese (z.B. FtsI und weiteren Penicillinbindete-proteinen) interagieren und so den sogenannten Streptomyces spore wall synthesizing complex SSSC bilden. Das beobachtete Interaktionsmuster entsprach dabei weitgehend den in stäbchenförmigen Bakterienbeschriebenen Interaktionen des lateralen Zellwandsynthesekomplexes (Manuskript 5.1, Kawai *et al.*, 2009 Kruse *et al.*, 2005; White *et al.*, 2010).

3.4 Die Positionierung des SSSC erfolgt durch das Zusammenspiel der Proteine MreB und Mbl

Für einige der SSSC Proteine war es möglich ein aktives GFP-Fusionsprotein zu erstellen und dessen Lokalisation während der morphologischen Differenzierung zu beobachten. Diese Lokalisation im lebenden Myzel bestätigt die Existenz des SSSC. MreB, Mbl, PBP2 und Sfr lokalisierten in der frühen Sporulationsphase an den Septen des Luftmyzels, später dann unterhalb der Sporenwand. In früheren Arbeiten (Mazza *et al.* 2006) konnte bereits gezeigt werden, dass die Lokalisation von MreB-eGFP und die Peptidoglykansynthese während der Sporulation an den gleichen Stellen erfolgen. Die Proteine MreB-eGFP und Mbl-mCherry zeigen eine klare Co-Lokalisation an den Septen des Luftmyzels. Die Gruppe um Jones *et al.* 2001 konnten ebenfalls zeigen, dass die Aktin-ähnlichen Proteine MreB, Mbl und MreBH in *B. subtilis* als helikale Struktur unterhalb der Zellwand co-lokalisieren. Diese helikalen Filamente bewegen sich entlang der Zelllänge (Jones *et al.*, 2001; Carballido-Lopez und Errington, 2003). Diese Strukturen konnten auch in anderen Bakterien, wie *E. coli* (Shih *et al.*, 2003), *C. crescentus* (Figge *et al.*, 2004, Gitai *et al.*, 2004) und *Rhodobacter sphaeroides* (Slovak *et al.* 2005) beobachtet werden. In Streptomyceten war bisher nicht bekannt, ob MreB und Mbl eine Spiralen-ähnliche Struktur bilden. Mittels

Dekonvolution-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch in jungen Sporenketten von *S. coelicolor* eine helikale Struktur von MreB ausgebildet wird (2.3.3 Abb. 9). Aufgrund des schwachen Fluoreszenzsignals und des schnellen Ausbleichens während der langen Belichtungszeit waren die Spiralstrukturen jedoch nur in wenigen Fällen eindeutig. Um eine klare Aussage bezüglich der helikalen Struktur von MreB machen zu können sind weitere Untersuchungen zu früheren und späteren Differenzierungsstadien notwendig. Sowohl Mbl-eGFP, als auch Mbl-mCherry zeigten ein zu schwaches Fluoreszenzsignal um Dekonvolution Experimente durchzuführen. Um den Einfluss anderer am SSSC beteiligten Proteine auf die MreB- und Mbl-Lokalisation zu untersuchen, wurden Lokalisationsstudien von MreB und Mbl in verschiedenen Mutanten durchgeführt. Die Lokalisation von MreB und Mbl war in keiner der getesteten Mutanten ($\Delta mreC$, $\Delta pbp2$, Δsfr , $\Delta sco2097$) beeinträchtigt. Selbst in einer Δmbl Mutante, konnte MreB an den Septen des Luftmyzels und unterhalb der Sporenwand lokalisieren. In anderen Organismen kann hingegen die Lokalisation von MreB durch das Fehlen anderer Mre Proteine beeinflusst sein. Während MreB in *C. crescentus* unabhängig von MreC lokalisiert (Dye *et al.*, 2005), ist die Lokalisation von MreB in *E. coli* bei Abwesenheit von MreC, MreD oder RodA gestört (Kruse *et al.*, 2005).

Interessanterweise benötigt aber die Lokalisation von Mbl die Anwesenheit von MreB in *S. coelicolor*. In $\Delta mreB$ Zellen kam es zu keiner klaren Lokalisation von Mbl-mCherry an den Septen oder an der Sporenperipherie. MreB ist folglich essentiell für die richtige Positionierung von Mbl. Soufo und Graumann 2010 konnten zeigen, dass die Aktin-ähnlichen Proteine MreB, Mbl und MreBH sich gegenseitig stabilisieren. Sowohl MreB, Mbl als auch MreBH haben eine unterschiedliche Anordnung der Filamente, wenn diese in einem heterologen System exprimiert werden. Die Formen unterscheiden sich von ihrer eigentlichen helikalen Struktur in *B. subtilis* Zellen, indem sie sowohl gerade Filamente als auch Helices oder Ringstrukturen ausbilden

Soufo und Graumann 2010). In *S. coelicolor* hat Mbl vermutlich eine stabilisierende Wirkung auf die MreB Filamente, während MreB für die Lokalisation von Mbl essentiell ist.

In Abb.12 ist schematisch die morphologische Differenzierung ausgehend von Luftmyzelhyphen dargestellt. Das Protein DivIVA (hier orange) assembliert an der Hyphen- spitze und es kommt zum apikalen Spitzenwachstum des Luftmyzels. Erreicht das Luftmyzel eine bestimmte Länge, assembliert FtsZ (hier rosa) zunächst als helikales Filament entlang der Hyphe. Anschließend erfolgt die Umstrukturierung zu Z-Ringen in regelmäßigem Abstand zueinander. Diese Z-Ringe definieren die zukünftige Zellteilungs- ebene und rekrutieren andere Zellteilungsproteine an die späteren Sporulationssepten. Nach erfolgreicher Septierung des Luftmyzels erfolgt die Verdickung der Sporenwand, an deren Prozess die Mre-Proteine beteiligt sind. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es jetzt möglich ein detaillierteres Modell der Sporulation zu erstellen. Das Protein MreB (hier grün) assembliert zunächst an den Sporulationssepten, gefolgt von dem etwas später und schwächer exprimierten Mbl (hier rot). MreB übernimmt hierbei die „Führungs- position“, da Mbl ohne MreB nicht an den Septen lokalisieren kann (Manuskript 5.2). Nach erfolgreicher Lokalisierung und Rekrutierung der anderen Mre-Proteine (bspw. PBP2 und Sfr) assemblieren MreB und Mbl als helikales Filament beginnend an den Polen der Vorsporen. Später erstreckt sich dieses Filament über die ganze Spore und dirigiert so den Einbau neuen Peptidoglykans. Ist die Sporenwandsynthese abgeschlossen, werden die Mre-Proteine abgebaut, da in den späteren freigesetzten Sporen keine Fluoreszenz von MreB-eGFP oder Mbl-mCherry mehr zu detektieren war. SCO6166 (hier blau) scheint an der Sporulation nicht beteiligt zu sein und besitzt eine andere, noch unbekannt Funktion in *S. coelicolor*. Durch die Erzeugung von spezifischen Mutanten, Charakterisierung ihres Phänotyps, das Erstellen eines Homologie Modells, Elektronenmikroskopische Unter- suchungen, Expressionsanalysen, sowie Lokalisationsstudien mit Fusionsproteinen

konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mbl und die Mre Proteine zusammenarbeiten, um eine verdickte Sporenwand, die für die Resistenz gegen schädliche Umweltbedingungen benötigt wird, auszubilden. Dadurch wurde deutlich, dass der Einbau von Peptidoglykan in vielen Bakterien zwar nach einem ähnlichen Prinzip erfolgt, die Auswirkungen allerdings unterschiedlich sein können. Während die Mre-Proteine in Stäbchen-förmigen Bakterien das Elongationswachstum durchführen und somit für die Ausbildung der Zellgestalt verantwortlich sind, bilden sie in Streptomyeten (und vermutlich anderen sporulierenden Actinomyceten) den Streptomyces spore wall synthesizing complex SSSC.

Alyahya SA, Alexander R, Costa T, Henriques AO, Emonet T, Jacobs-Wagner C. (2009). RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**:1239-44.

Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Pätzold J, Nobre MF, da Costa MS, Huber R. (2008). A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol*. **190**:3580-7.

Bass S, Gu Q, Christen A. (1996). Multicopy suppressors of *prc* mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA. *J Bacteriol*. **178**:1154-61.

Bean GJ, Flickinger ST, Westler WM, McCully ME, Sept D, Weibel DB, Amann KJ. (2009). A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry*. **48**:4852-7.

Bean GJ, Amann KJ. (2008). Polymerization properties of the *Thermotoga maritima* actin MreB: roles of temperature, nucleotides, and ions. *Biochemistry*. **47**:826-35.

Becker E, Herrera NC, Gunderson FQ, Derman AI, Dance AL, Sims J, Larsen RA, Pogliano J. (2006). DNA segregation by the bacterial actin AlfA during *Bacillus subtilis* growth and development. *EMBO J*. **25**:5919-31.

Bernhardt TG, de Boer PA (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for block-

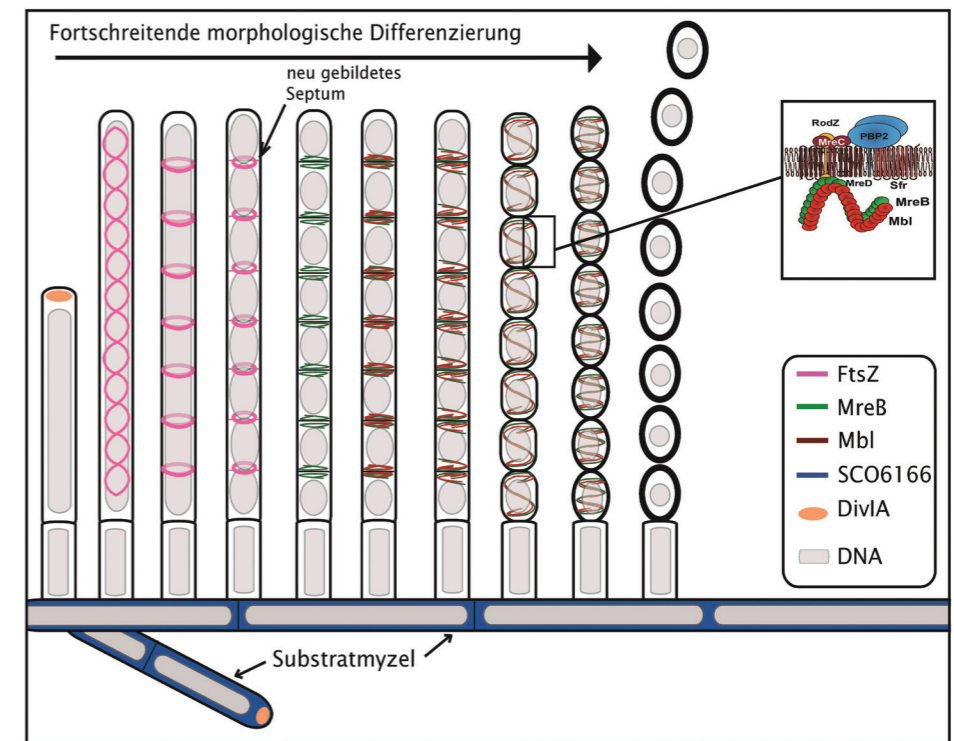


Abb. 12: Schematische Darstellung der morphologischen Differenzierung in *S. coelicolor*. Gezeigt ist die fortschreitende morphologische Differenzierung, ausgehend vom Luftmyzel bis zu den fertig gebildeten Sporen. Genauere Erklärung siehe Text. Daten von FtsZ und DivIA basieren auf Grantcharova et al. 2005, Flärdh 2003 und Hempel et al. 2008

ing septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell*. **18**:555-64.

Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell-cycle proteins, sugar kinases, actin, and Hsp70 heat-shock proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**: 7290-7294.

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

Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. (2007). Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell mor-

4. Literatur

phogenesis. *J Cell Biol.* **179**:381-7.

Campbell CS, Mullins RD. (2007). In vivo visualization of type II plasmid segregation: bacterial actin filaments pushing plasmids. *J Cell Biol.* **179**:1059-66.

Carballido-López R, Errington J. (2003). The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell.* **4**:19-28.

Carballido-López R. (2006). The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**:888-909.

Carballido-Lopez, R., A. Formstone, Y. Li, S. D. Ehrlich, P. Noirot, and J. Errington. (2006). Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev. Cell* **11**:399–409.

Claessen D, Wösten HA, van Keulen G, Faber OG, Alves AM, Meijer WG, Dijkhuizen L. (2002). Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol Microbiol.* **44**:1483-92.

Claessen D, Rink R, de Jong W, Siebring J, de Vreugd P, Boersma FG, Dijkhuizen L, Wosten HA. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* **17**:1714-26.

Claessen D, Stokroos I, Deelstra HJ, Penninga NA, Bormann C, Salas JA, Dijkhuizen L, Wösten HA. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol.* **53**:433-43.

Dai K, Lutkenhaus J. (1991). *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173**:3500-6.

Daniel RA, Errington J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell.* **113**:767-76.

De Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI. (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**:641-9.

De Pedro MA, Quintela JC, Höltje JV, Schwarz H. (1997). Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**:2823-34.

Defeu Soufo HJ, Graumann PL. (2004). Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep.* **5**:789-94.

Del Sol R, Pitman A, Herron P, Dyson P. (2003). The product of a developmental gene, *crgA*, that coordinates reproductive growth in *Streptomyces* belongs to a novel family of small actinomycete-specific proteins. *J Bacteriol.* **185**:6678-85.

Del Sol R, Mullins JG, Grantcharova N, Flärdh K, Dyson P. (2006). Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **188**:1540-50.

Derman AI, Becker EC, Truong BD, Fujioka A, Tucey TM, Erb ML, Patterson PC, Pogliano J. (2009). Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Mol Microbiol.* **73**:534-52.

Di Berardo C, Capstick DS, Bibb MJ, Findlay KC, Buttner MJ, Elliot MA. (2008). Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **190**:5879-89.

Divakaruni AV, Baida C, White CL, Gober JW . (2007). The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol.* **66**:174-88

Doi M, Wachi M, Ishino F, Tomioka S, Ito M, Sakagami Y, Suzuki A, Matsushashi M. (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. *J Bacteriol.* **170**:4619-24.

Dye NA, Pincus Z, Theriot JA, Shapiro L, Gitai Z. (2005). Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:18608-13.

Ebersbach G, Gerdes K. (2005). Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet.* **39**:453-79. Review.

Edwards DH, Errington J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol.* **24**:905-15.

Elliot MA, Karoonuthaisiri N, Huang J, Bibb MJ, Cohen SN, Kao CM, Buttner MJ. (2003). The chaplins:

a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* **17**:1727-40.

Figge RM, Divakaruni AV, Gober JW (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* **51**:1321-32.

Flärdh K, Findlay KC, Chater KF. (1999). Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* **145**: 2229-43.

Flärdh K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* **6**:564-71. Review.

Flärdh, K. (2003). Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **49**: 1523–1536.

Flärdh K, Buttner MJ. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* **7**:36-49.

Flärdh, K., Leibovitz, E., Buttner, M. J. & Chater, K. F. (2000). Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter. *Mol. Microbiol.* **38**: 737–749.

Formstone A, Errington J. (2005). A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **55**:1646-57.

Fu LM, Fu-Liu CS. (2002). Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis (Edinb).* **82**:85-90.

Galkin VE, Orlova A, Rivera C, Mullins RD, Egelman EH. (2009). Structural polymorphism of the ParM filament and dynamic instability. *Structure.* **17**:1253-64.

Garner EC, Campbell CS, Mullins RD. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science.* **306**:1021-5.

Garner EC, Campbell CS, Weibel DB, Mullins RD. (2007). Reconstitution of DNA segregation driven by as-

sembly of a prokaryotic actin homolog. *Science*. **315**:1270-4.

Gerdes K. (2009). RodZ, a new player in bacterial cell morphogenesis. *EMBO J*. **28**:171-2.

Gitai Z, Dye N, Shapiro L. (2004). An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**:8510-1.

Gitai Z, Dye NA, Reisenauer A, Wachi M, Shapiro L. (2005). MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*. **120**:329-41.

Goffin C, Ghuysen JM. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**:1079-93.

Grantcharova N, Lustig U, Flärdh K. (2005). Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*. **187**:3227-37.

Grantcharova, N., Ubhayasekera, W., Mowbray, S. L., McCormick, J. R. & Flärdh, K. (2003). A missense mutation in *ftsZ* differentially affects vegetative and developmentally controlled cell division in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol*. **47**: 645–656.

Harry EJ. (2001). Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol*. **40**:795-803. Review.

Hempel AM, Wang SB, Letek M, Gil JA, Flärdh 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**:7579-83.

Hong HJ, Paget MS, Buttner MJ. (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.

Hu Z, Lutkenhaus J. (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. *Mol Microbiol*. **34**:82-90.

Hutchings MI, Hong HJ, Leibovitz E, Sutcliffe IC, Buttner MJ. (2006). The sigma(E) cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *J Bacteriol*. **188**:7222-9.

Jensen RB, Gerdes K. Partitioning of plasmid R1. (1997). The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-*parC* complex. *J Mol Biol.* **269**:505-13.

Jones LJ, Carballido-López R, Errington J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **104**:913-22.

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, Daniel RA, Errington J. (2009). Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol Microbiol.* **71**:1131-44.

Keijser BJ, van Wezel GP, Canters GW, Vijgenboom E. (2002). Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J Bacteriol.* **184**:4420-9.

Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR, Willey JM. (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**:11448-53

Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ. (2006). Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science.* **311**:242-5.

Kruse T, Bork-Jensen J, Gerdes K. (2005). The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol.* **55**:78-89.

Kruse T, Blagoev B, Løbner-Olesen A, Wachi M, Sasaki K, Iwai N, Mann M, Gerdes K (2006). Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **20**:113-24.

Margolin W. (2001). Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**:647-52.

Marston AL, Errington J. (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol.* **33**:84-96.

- Mazza P, Noens EE, Schirner K, Grantcharova N, Mommaas AM, Koerten HK, Muth G, Flärdh K, van Wezel GP, Wohlleben W. (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**:838-52.
- McCormick JR, Su EP, Driks A, Losick R. (1994). Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol Microbiol.* **14**:243-54.
- McCormick JR, Losick R. (1996). Cell division gene *ftsQ* is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **178**:5295-301.
- McPherson DC, Popham DL. (2003). Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **185**:1423-31.
- Mingorance, J., Tamames, J., and Vicente, M. (2004). Genomic channeling in bacterial cell division. *J Mol Recognit* **17**:481–487.
- Minnikin DE, Minnikin SM, Goodfellow M, Stanford JL. (1982). The mycolic acids of *Mycobacterium chelonae*. *J Gen Microbiol.* **128**:817-22.
- Mistry BV, Del Sol R, Wright C, Findlay K, Dyson P. (2008). FtsW is a dispensable cell division protein required for Z-ring stabilization during sporulation septation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **190**:5555-66.
- Miyata M, Ogaki H. (2006). Cytoskeleton of mollicutes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **11**:256-64.
- Molle, V., Palframan, W. J., Findlay, K. C. & Buttner, M. J. (2000). WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **182**: 1286–1295.
- Mulder E, Woldringh CL. (1989). Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J Bacteriol.* **171**:4303-14.
- Nguyen KT, Willey JM, Nguyen LD, Nguyen LT, Viollier PH, Thompson CJ. (2002). A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* **46**:1223-38.
- O'Connor TJ, Kanellis P, Nodwell JR. (2002). The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Strepto-*

myces coelicolor and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol Microbiol.* **45**:45-57.

O'Connor TJ, Nodwell JR. (2005). Pivotal roles for the receiver domain in the mechanism of action of the response regulator RamR of *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol.* **351**:1030-47.

Orlova A, Garner EC, Galkin VE, Heuser J, Mullins RD, Egelman EH. (2007). The structure of bacterial ParM filaments. *Nat Struct Mol Biol.* **14**:921-6.

Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* **181**:204-11.

Paradis-Bleau C, Markovski M, Uehara T, Lupoli TJ, Walker S, Kahne DE, Bernhardt TG. (2010). Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell.* **143**:1110-20.

Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. (2001). An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:10886-91.

Pinho MG, Errington J. (2003). Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol Microbiol.* **50**:871-81.

Polka JK, Kollman JM, Agard DA, Mullins RD (2009). The structure and assembly dynamics of plasmid actin AlfA imply a novel mechanism of DNA segregation. *J Bacteriol.* **191**:6219-30.

Popp D, Narita A, Oda T, Fujisawa T, Matsuo H, Nitani Y, Iwasa M, Maeda K, Onishi H, Maéda Y. (2008). Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J.* **27**:570-9.

Potúcková L, Kelemen GH, Findlay KC, Lonetto MA, Buttner MJ, Kormanec J. (1995). A new RNA polymerase sigma factor, sigma F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces spp.* *Mol Microbiol.* **17**:37-48.

Raskin DM, de Boer PA. (1999). MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in

Escherichia coli. *J Bacteriol.* **181**:6419-24.

Rioux JB, Philippe N, Pereira S, Pignol D, Wu LF, Ginet N. (2010). A second actin-like MamK protein in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 encoded outside the genomic magnetosome island. *PLoS One.* **5**:e9151.

Ruban-Ośmiałowska B, Jakimowicz D, Smulczyk-Krawczyszyn A, Chater KF, Zakrzewska-Czerwińska J. (2006). Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **188**:7311-6.

Salje J, Gayathri P, Löwe J. (2010). The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. *Nat Rev Microbiol.* **8**:683-92.

Scheffers DJ, Jones LJ, Errington J. (2004). Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **51**:749-64.

Schirner K, Errington J. (2009). The cell wall regulator σ^I specifically suppresses the lethal phenotype of mbl mutants in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **191**:1404-13.

Schwedock J, McCormick JR, Angert ER, Nodwell JR, Losick R. (1997). Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* **25**:847-58.

Shih YL, Le T, Rothfield L. (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 USA.* **100**:7865-70.

Shiomi D, Mori H, Niki H. (2009). Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Commun Integr Biol.* **2**:219-20.

Siefert JL, Fox GE. (1998). Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology*; **144**:2803-8.

Slovak PM, Wadhams GH, Armitage JP. (2005). Localization of MreB in *Rhodobacter sphaeroides* under conditions causing changes in cell shape and membrane structure. *J Bacteriol.* **187**:54-64.

Soufo HJ, Graumann PL. (2003). Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol.* **13**:1916-20.

- Tabuchi A, Min YN, Kim CK, Fan YL, Womble DD, Rownd RH. (1988) Genetic organization and nucleotide sequence of the stability locus of IncFII plasmid NR1. *J Mol Biol.* **202**:511-25.
- Takacs CN, Poggio S, Charbon G, Pucheault M, Vollmer W, Jacobs-Wagner C. (2010). MreB drives de novo rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall. *J Bacteriol.* **192**:1671-84.
- Tan Q, Awano N, Inouye M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol Microbiol.* **79**:109-18.
- Taoka A, Asada R, Wu LF, Fukumori Y. (2007). Polymerization of the actin-like protein MamK, which is associated with magnetosomes. *J Bacteriol.* **189**:8737-40.
- Thanbichler M, Shapiro L. (2008). Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol.* **6**:28-40.
- Tiyanont K, Doan T, Lazarus MB, Fang X, Rudner DZ, Walker S. (2006). Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:11033-8.
- Trachtenberg S. Shaping and moving a spiroplasma. (2004). *J Mol Microbiol Biotechnol.* **7**:78-87.
- Typas A, Banzhaf M, van den Berg van Saparoea B, Verheul J, Biboy J, Nichols RJ, Zietek M, Beilharz K, Kannenberg K, von Rechenberg M, Breukink E, den Blaauwen T, Gross CA, Vollmer W. (2010). Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell.* **143**:1097-109.
- Uehara T, Park JT. (2008). Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *J Bacteriol.* **190**:3914-22.
- Umeda A, Amako K. (1983). Growth of the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol Immunol.* **27**:663-71.
- Van den Ent, F. Löwe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* **19**: 5300-5307.
- Van den Ent F, Amos LA, Löwe J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature.* 413:39-44.
- Van den Ent F, Møller-Jensen J, Amos LA, Gerdes K, Löwe J. (2002). F-actin-like filaments formed by plas-

mid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**:6935-43.

Van den Ent F, Johnson CM, Persons L, de Boer P, Löwe J. (2010). Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *EMBO J.* **29**:1081-90.

Vats P, Rothfield L. (2007). Duplication and segregation of the actin (MreB) cytoskeleton during the prokaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:17795-800.

Vollmer W, Höltje JV. (2001). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* **4**:625-33.

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:259-86.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:149-67.

Wang S, Arellano-Santoyo H, Combs PA, Shaevitz JW. (2010). Actin-like cytoskeleton filaments contribute to cell mechanics in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:9182-5.

Wang X, Sherratt DJ. (2010). Independent segregation of the two arms of the *Escherichia coli* ori region requires neither RNA synthesis nor MreB dynamics. *J Bacteriol.* **192**:6143-53.

Warth, AD, and Strominger, JL. (1971). Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **10**:4349-4358.

White CL, Kitich A, Gober JW. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol.* **76**:616-33.

Wildermuth H, Hopwood DA. (1970). Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol.* **60**:51-9.

Willey J, Santamaria R, Guijarro J, Geistlich M, Losick R. (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell.* **65**:641-50.

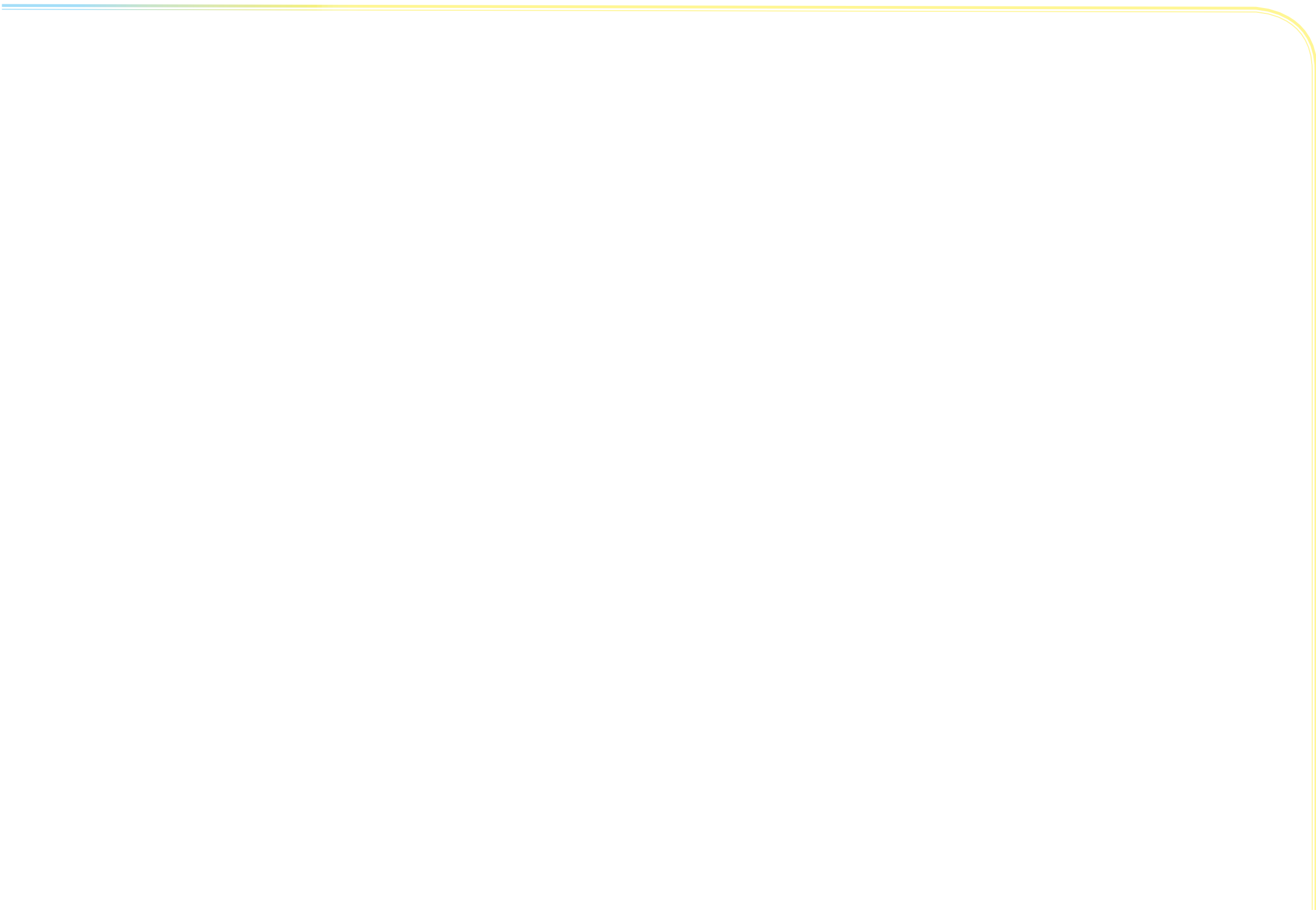
Willey J, Schwedock J, Losick R. (1993). Multiple extracellular signals govern the production of a morpho-

genetic protein involved in aerialycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* **7**:895-903.

Woldringh CL, Mulder E, Valkenburg JA, Wientjes FB, Zaritsky A, Nanninga N. (1990). Role of the nucleoid in the toporegulation of division. *Res Microbiol.* **141**:39-49.

Wu LJ, Errington J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **117**:915-25.

Xu H, Chater KF, Deng Z, Tao M. (2008). A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* **190**:4971-8.



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‡} Julliane 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; Tiyanont *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-

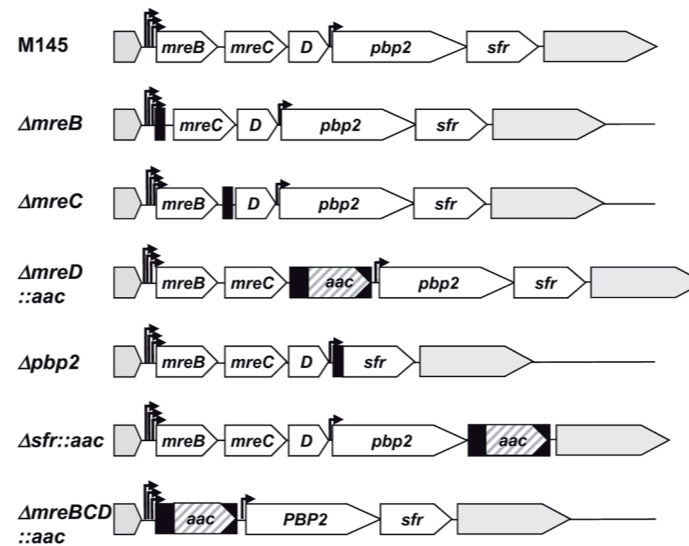


Fig. 1. *S. coelicolor* *mre* mutants. Mutants were generated by Redirect technology leaving a 81 bp scar sequence (black bar) in $\Delta mreB$ (Mazza *et al.*, 2006), $\Delta mreC$, $\Delta pbp2$. The mutants $\Delta mreD::aac$, $\Delta sfr::aac$ and $\Delta mreBCD::aac$ still carry the *aac(3)IV* cassette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

fore, the *aac(3)/V* 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)/V* 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

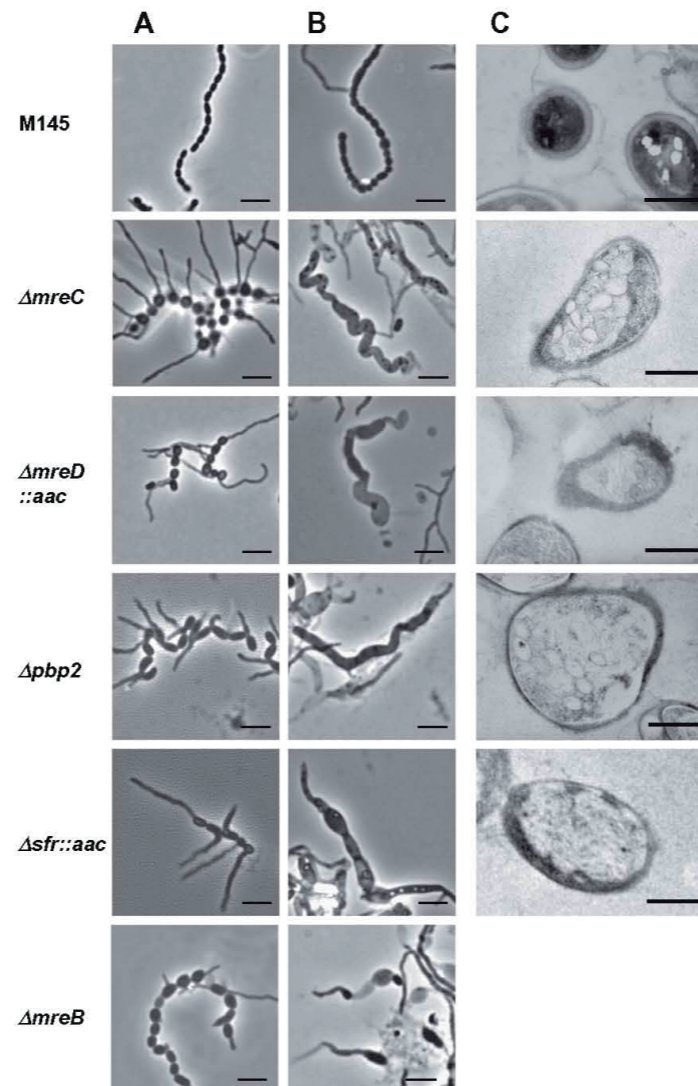


Fig. 2. Phenotype of mutants defective in one of the *mre* genes. A. Whereas the vegetative mycelium was not affected, all mutants formed swollen spores (size given in Table 1) that frequently germinated prematurely. B. On MS agar containing 10.3% sucrose large areas of the aerial mycelium lysed and 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

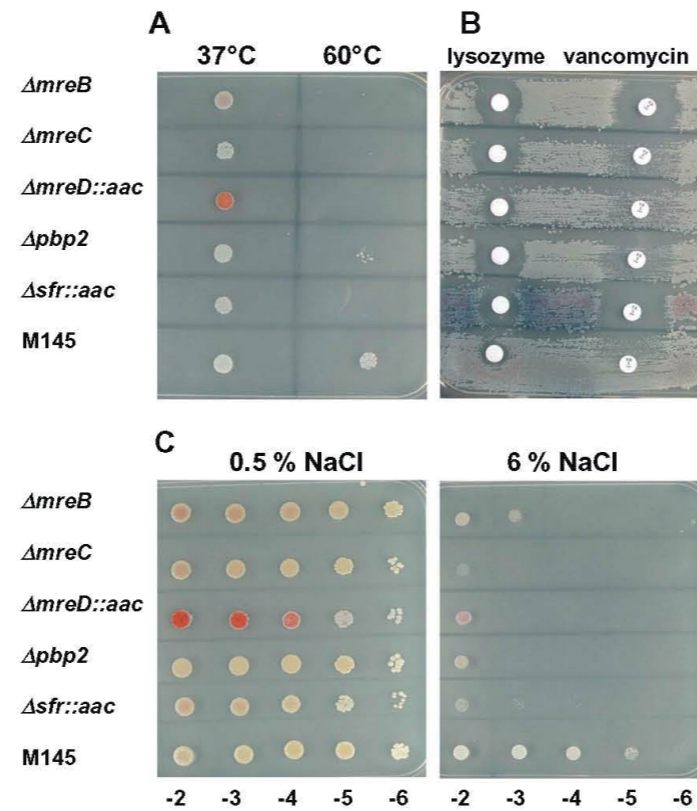


Fig. 3. Sensitivity of mutant spores to moderate heat, cell wall damaging agents and salt stress.

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

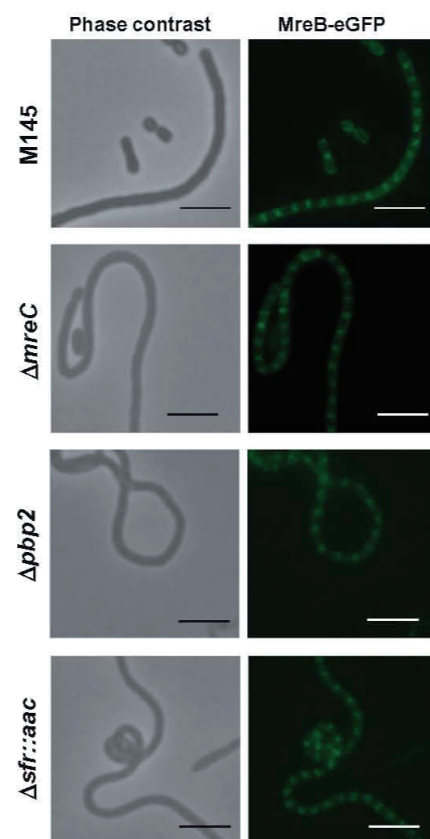


Fig. 4. Localization of MreB-eGFP in $\Delta mreC$, $\Delta pbp2$ and $\Delta sfr::aac$ backgrounds. Cultures were grown on MS agar for three days. MreB-eGFP localized to the sporulation septa of the aerial mycelium even in the absence of MreC, PBP2 or Sfr proteins. Bar = 4 μ m.

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

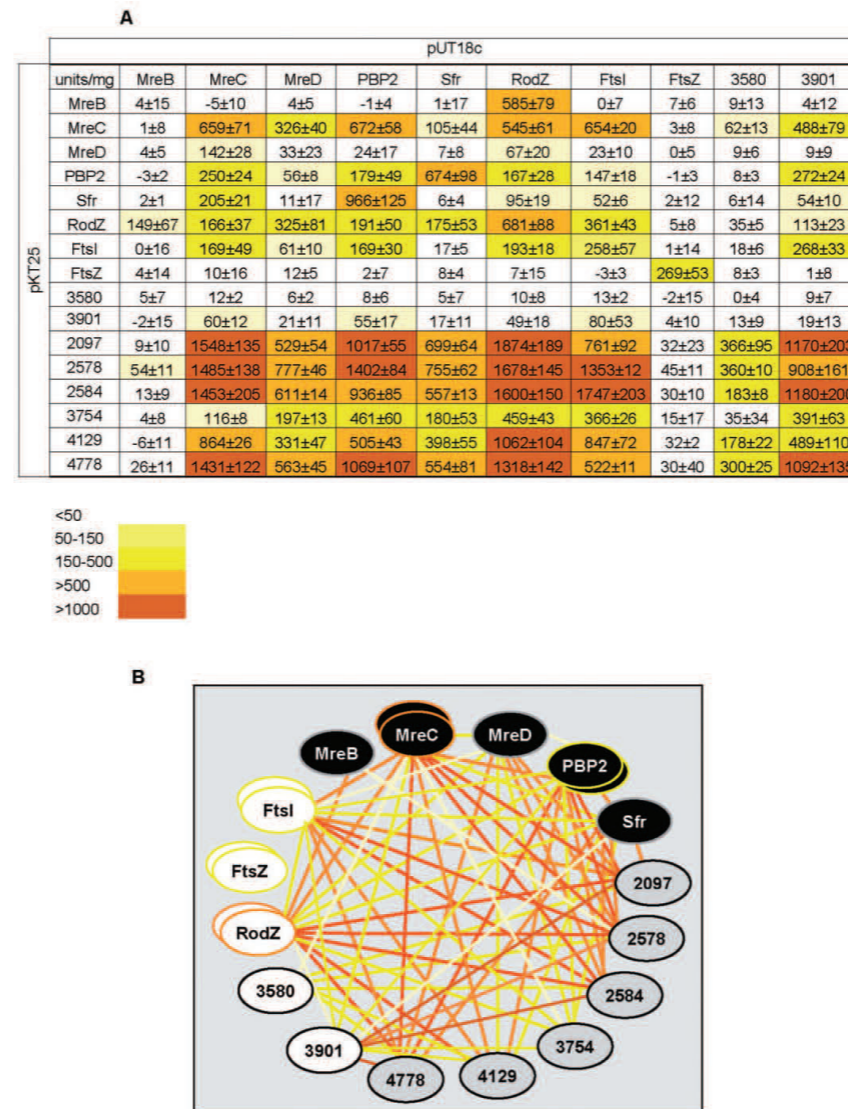


Fig. 5. Bacterial two-hybrid interaction assays of Mre proteins and other morphogenic proteins of *S. coelicolor*.
 A. BTH101 was co-transformed with plasmids encoding the indicated T25 and T18 *cya* fusions and β -galactosidase activity of the co-transformants was determined. Numbers indicate units 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-*

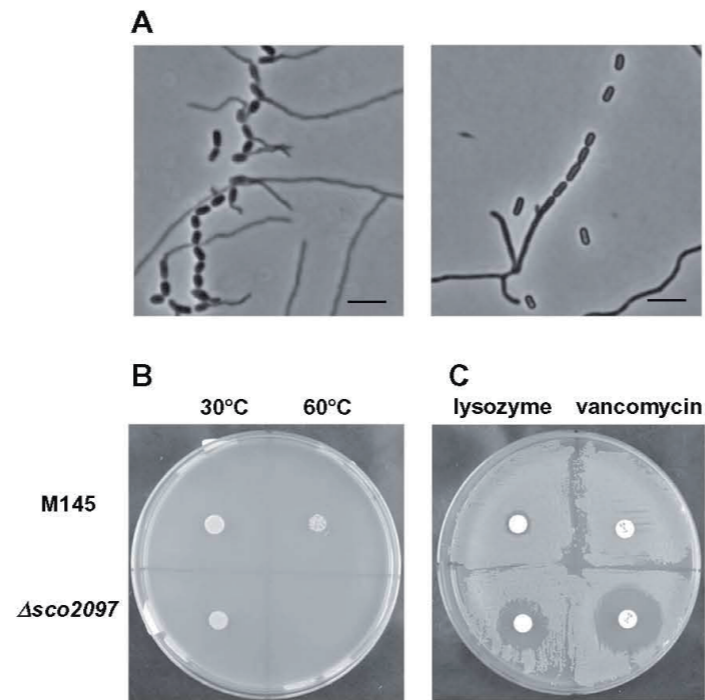


Fig. 6. Effect of *sco2097* inactivation on the morphology and resistance of spores to heat and cell wall damaging agents.

A. Phase microscopy of *Δsco2097* grown on MS agar revealed elongated rod-shaped spores that often germinated prematurely. Bar = 4 μ m.

B. Spores of *Δsco2097* 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 *Δsco2097* 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 *Δsco2097* 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 Pkal (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	TCCCGAATTCGACGAGGAAGGCACGGCCGCGCACGTGATTGGGATCCGTCGACC
RedmreClow	AGCAGGATCCGGTTGACGCGCATGGGGTGATGGCTCCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RedmreDup	AGAACGAGCAGCCGAGCCGTAGGAGCCATCACCCATGATTGGGATCCGTCGACC
RedmreDlow	TCACGAAAGTGTGCGCTGCTGGAATGCTGCCGCGTCGTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RedPBPup	CAGCAGCGCACACTTCTGTAGGGGGAGCCAGAACCAGTATTGGGATCCGTCGACC
RedPBPlow	CGGGGCCGTACCCGGAGACGTGGAAGCTGTTGCCGGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
RedSfrup	CGGGCCGCAAGGGAAGACCCGAGGGCAGCGTATGACCACTAGTATTGGGATCCGTCGACC
RedSfrow	CCCCCGGGCCGCGTACCGCTGCCGCCCCGGGTGCCGTACTAAGTATTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
2097upfwE	AAGAATTCAGGTGCTGCCCGAGAT
2097uprevB	AAGGATCCACGGAGTCCCTCCTCA
2097lowfwB	AAGGATCCTAGCACCGTCCGAGCA
2097lowrevH	GGAAAGCTTACTGGTACGCGCAGGA
Kd-2097up	GTAAAGCCGCTGATCAG
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

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

Name	Sequence ^a
MreBXbal	ACTCTAGAGGGGAACCTCAATGTCG
MreBKpnI	T CGGTACCAGTCTACGGGGCGAGGC
MreCXbal	ACTCTAGAGAGGGACACGAAAGAG
MreCKpnI	AAGGTACCACGGCTCGGGCTGCTC
MreDXbal	ACTCTAGAGCGCGTCAACCCGGATC
MreDKpnI	AAGGTACCACAGCCGCTTGACCCC
PBP2Xbal	ACTCTAGAGACCAACATCCCCGAG
PBP2KpnI	AAGGTACCATACCGCGTGCCCTCC
SfrXbal	ACTCTAGAGACCGCAACAGCTTC
SfrKpnI	AAGGTACCACGCGCATCGGTCT
FtsIXbal	ACTCTAGAGACGGAAAGTGTCCGAC
FtsIMunI	CCCAATTGCAGGGTTTGAAGGTG
FtsZXbal	ACTCTAGAGGCGACCCGACGAAAC
FtsZKpnI	AAGGTACCCTTCAGGAAGTCCGGC
RodZXbal	ACTCTAGAGTCCAAACGGCAAATCC
RodZKpnI	TTGGTACCACATCCGACCTGCGGGT
SCO3901Xbal	ACTCTAGAGTTCCTCGGCTGCCTG
SCO3901MunI	CTCAATTGTAGCCGTTCTGCCCCAG
SCO3580Xbal	ACTCTAGAGCCAAAGAACGCGCTCG
SCO3580MunI	CTCAATTGCAGCGTCTCCGCCGGG

a. Restriction sites underlined.

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 4. Strains and plasmids used in this study.

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> X11 blue	F ⁺ :Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ⁺ <i>supE44</i> Δ <i>lacZM15</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁺ <i>cya-99</i> <i>araD139</i> <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL1</i> (Str ^r) <i>hsdR2</i> <i>mcrA1</i> <i>mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> (1998)
<i>E. coli</i> BW 25113/pJ790	Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-4</i>) <i>lacIp-4000</i> (<i>lacI</i>) λ ⁻¹ <i>rpoS369</i> (Am) <i>rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsd514</i> ; pJ790[<i>oriR101</i>] [<i>repA101</i> (ts)] <i>araBp-gam-beta-exo</i>	Gust <i>et al.</i> (2003)
<i>E. coli</i> NovaXG	F ⁺ <i>mcrA</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) <i>endA1</i> <i>recA1</i> Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ ⁻ <i>tonA</i>	Novagen
<i>S. coelicolor</i> M145	prototrophic, SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	Kieser <i>et al.</i> (2000)
<i>S. lividans</i> TK64	<i>pro</i> , <i>str-6</i>	Kieser <i>et al.</i> (2000)
Δ <i>mreB</i> [<i>mreB-IFD</i>]	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>)	Mazza <i>et al.</i> (2006)
Δ <i>mreC</i>	<i>mreC</i> replacement mutant of M145	Present study
Δ <i>mreD::aac</i>	<i>mreD</i> replacement mutant of M145, <i>aac</i>	Present study
Δ <i>bbp2</i>	<i>bbp2</i> replacement mutant of M145	Present study
Δ <i>sfr::aac</i>	<i>sfr</i> replacement mutant of M145, <i>aac</i>	Present study
Δ <i>mreBCD</i>	<i>mreB-mreC-mreD</i> replacement mutant of M145, <i>aac</i>	Mazza <i>et al.</i> (2006)
Δ 2097	<i>sco2097</i> replacement mutant of M145	Present study
Δ <i>mreB::pPM6</i> [<i>mreB-IFDc</i>]	<i>mreB</i> replacement mutant of M145 (<i>mreB-IFD</i>) complemented by the integration of pPM6, <i>aac</i>	Mazza <i>et al.</i> (2006)
pTST101	<i>bla</i> , <i>male-egfp</i> fusion	J. Altenbuchner, pers. comm.
pPM4	pSET152 derivative, <i>mreB-egfp</i> fusion	Mazza <i>et al.</i> (2006)
pJW6	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a PBP2-eGFP fusion protein	Present study
pJW4	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a Sfr-eGFP fusion protein	Present study
pUZ8002	<i>aphII</i> , RP4 transfer region	Kieser <i>et al.</i> (2000)
pJ773	<i>bla</i> , <i>aac</i> , <i>oriT</i>	Gust <i>et al.</i> (2003)
pK18	<i>aphII</i> , <i>lacZα</i>	Pridmore (1987)
pMreB	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a MreB	Present study
pMreC	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a MreC-His ₆ fusion protein	Present study
pMreD	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a MreD-His ₆ fusion protein	Present study
pMre _{total}	pSET152 derivative encoding the complete <i>mre</i> cluster, <i>aac</i>	Present study
pSfr	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a Sfr-His ₆ fusion protein	Present study
p2097	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ipA} , encoding a SCO2097-His ₆ fusion protein	Present study
pKT25	<i>aph</i> , <i>cya-T25</i>	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18	<i>bla</i> , <i>cya-T18</i>	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18c	<i>bla</i> , <i>cya-T18</i>	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 μ l toluol and 35 μ l 0.1% SDS at 37°C. 500 μ l aliquots was added to 500 μ l of P2 buffer containing β -mercaptoethanol and incubated at 30°C for 5 min. 250 μ l of 0.4% ONPG in P2-buffer was added and incubated at room temperature. The reaction was stopped after 4–6 min with 500 μ l 1 M Na₂CO₃ solution and the optical density was determined at 420 nm. Enzymatic activities were calculated as follows: $200 \times [(OD_{420} - OD_{420\text{control}}) / \text{incubation time}] \times \text{dilution}$. The dry weight of bacteria was calculated from the OD₆₀₀ as 1 ml of culture of OD₆₀₀ = 1 corresponds to 300 μ g 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 μ l 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 μ l 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*, *mbl* 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., Kustus, 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.
- Flårdh, K. (2003) Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 564–571.
- Flårdh, 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., Noirot, 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., Flårdh, 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 Flårdh, 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 Recognit* **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., Denapaite, 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 Matsuhashi, 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) *cmdABCDEF*, 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.

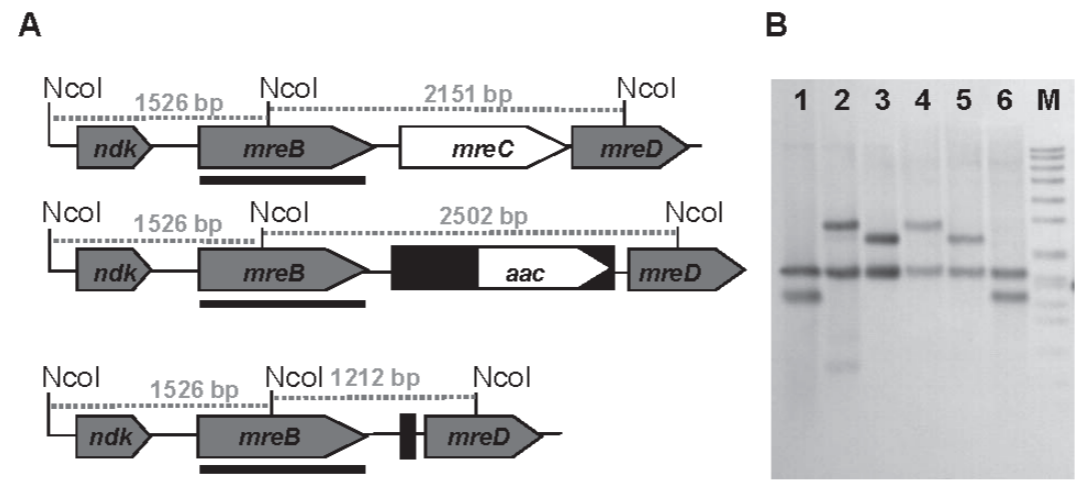


Fig. S1. Confirmation of the $\Delta mreC$ mutant genotype by Southern blotting. **A)** schematic drawing, **B)** Southern-blot. *Nco*I digested DNA was hybridized with an *mreB* probe (black line). The sizes of the hybridising fragments (grey dotted lines) are indicated. 1, SC88Δ*mreC*; 2, SC88Δ*mreC*::*aac*; 3, SC88; 4, Δ*mreC*::*aac*; 5, M145; 6, Δ*mreC*; M, DigVII Standard, Roche

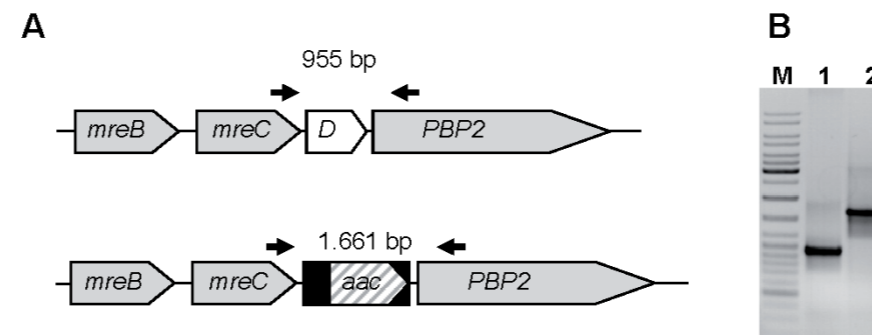


Fig. S2. Confirmation of the $\Delta mreD::aac$ mutant genotype by PCR. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. **B)** PCR-Analysis. M, 1 kb ladder, Fermentas, 1, M145, 2, $\Delta mreD$ -*aac*

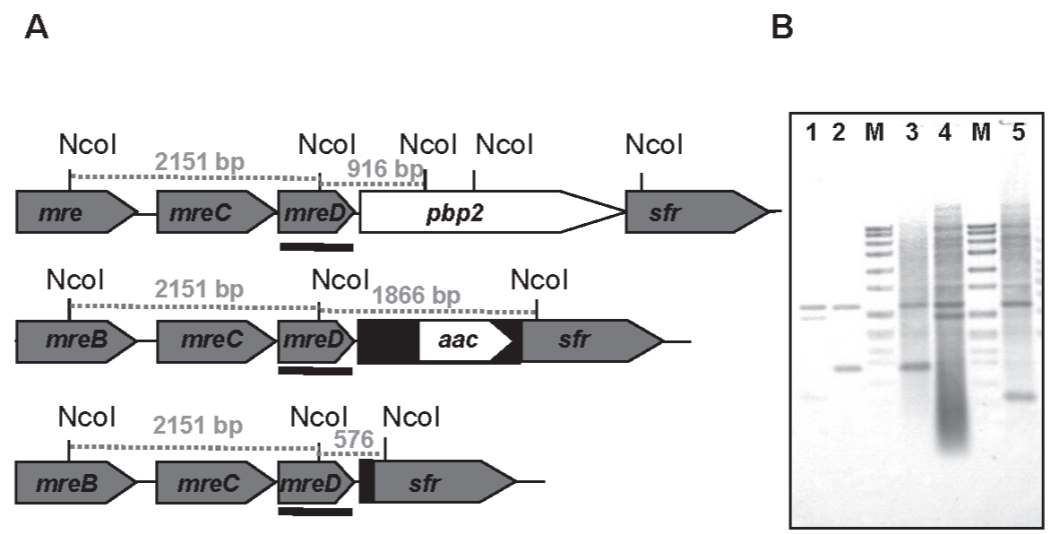


Fig. S3. Confirmation of the $\Delta pbp2$ mutant genotype by Southern blotting. **A)** schematic drawing, **B)** Southern-blot. *NcoI* digested DNA was hybridized with an *mreD* probe (black line). The sizes of the hybridising fragments (grey dotted lines) are indicated. 1, SC88 $\Delta pbp2$; 2, SC88;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

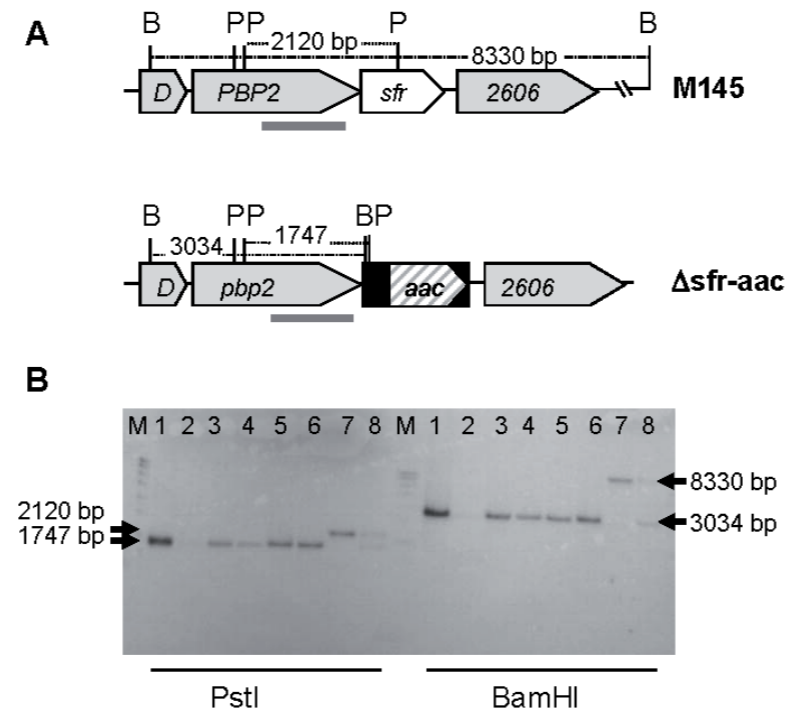


Fig. S4. Confirmation of the $\Delta sfr\text{:}aac$ mutant genotype by Southern-blotting. A) schematic drawing, Relevant restriction sites are given. B, BamHI; P, PstI. **B)** Southern-blot. PstI (left) and BamHI (right) digested DNA was hybridized with a *pbp2* probe (grey line). The sizes of the hybridising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

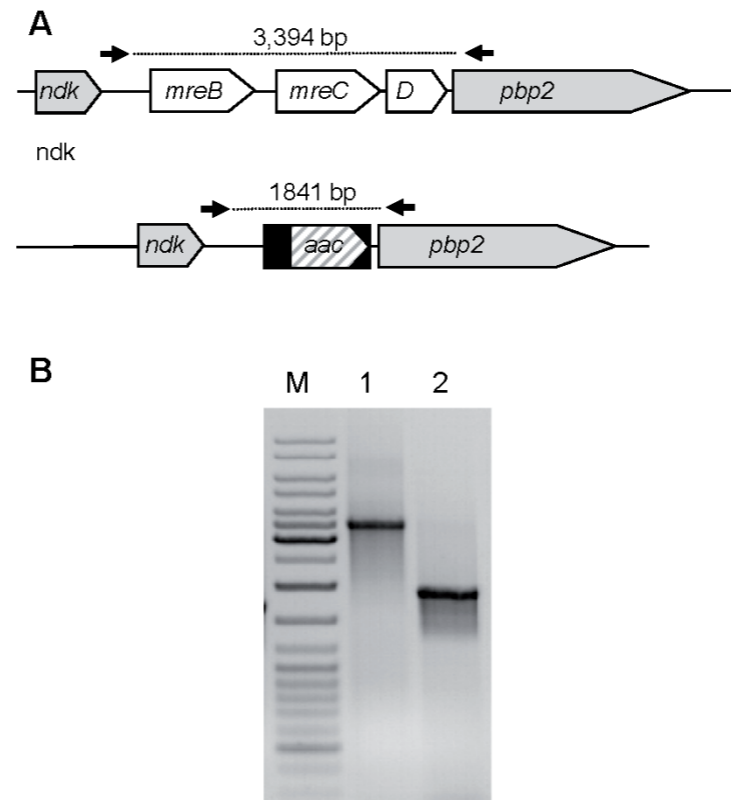
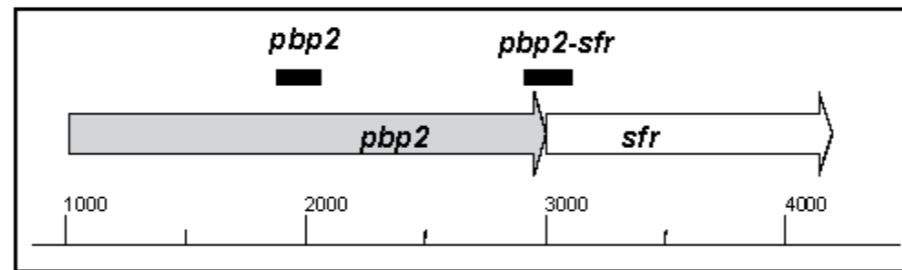
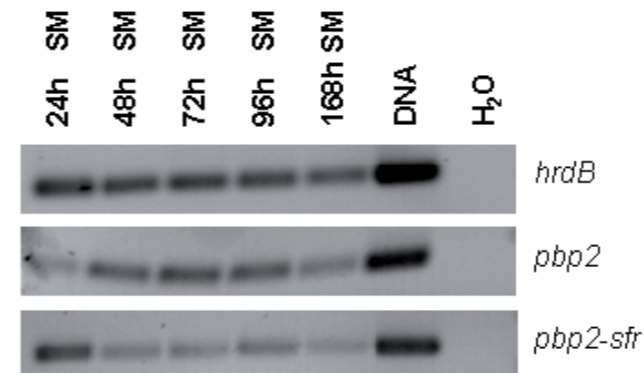


Fig. S5. Confirmation of the $\Delta mreBCD::aac$ mutant genotype by PCR analysis. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. **B)** PCR-analysis. M, 1 kbp ladder; 2, M145; 3, $\Delta mreBCD::aac$

A**B**

primer	sequence
RT-pbpf	CACCAGGAGTGGAAAGAAGGA
RT-pbpr	TTGTTGGCCTCCCAGTAGTC
pbpfw1	ACCACCCCAACCAGAAC
sfrrev1	CAGTATCGGCCAGTCGAG

C**Fig. S6. Operon analysis of *pbp2* and *sfr* by RT-PCR analysis.**

(A) Schematic drawing of the *pbp2-sfr* region. Black bars represent the amplified fragments using primers given in (B). (C) Cultures of *S.coelicolor* M145 were grown on cellophane discs on MS agar at 30°C and harvest after 24, 48, 72, 96 and 168 h. Following RNA isolation and cDNA synthesis the amounts of transcripts were compared by PCR. Expression of *hrdB* served as an internal control. Detection of the *pbp2-sfr* fragment demonstrates that *pbp2* and *sfr* form an operon.

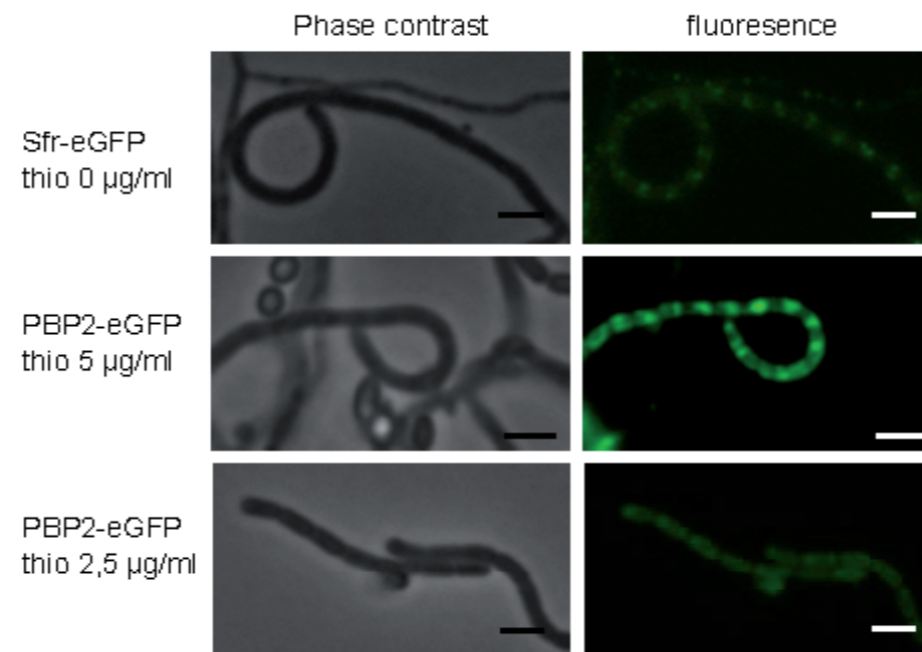


Fig. S7 Localization of Sfr-eGFP and PBP2-eGFP during morphological differentiation. *sfr-egfp* and *pbp2-egfp* fusion genes are encoded by the multiple copy plasmid pGM190 under the control of the thiostrepton inducible P_{tipA} promoter. Therefore the localization pattern of Sfr-eGFP (putative sporulation septa) and PBP2-eGFP (putative sporulation septa, spore periphery) could be affected by over expression of the fusion proteins. Integration of the *pbp2-egfp* and *sfr-egfp* fusion genes into the chromosome did not result in a specific fluorescence. Bar 2 μm .

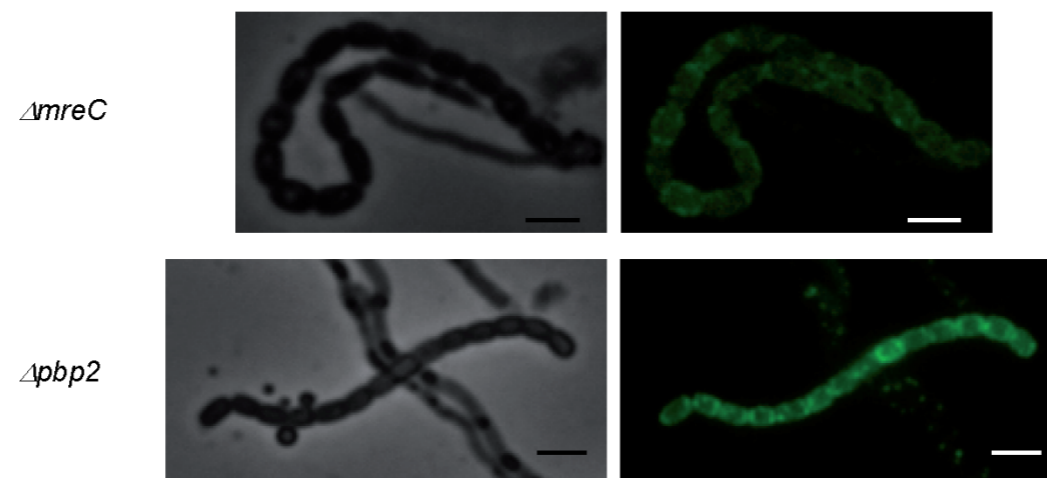


Fig. S8. Localization of MreB-eGFP to the spore periphery in *ΔmreC* and *Δpbp2* mutants. Plasmid pPM4 (Mazza et al., 2006) was integrated into the Φ C31 *attB* sites of *ΔmreC* and *Δpbp2*. After 5 days of growth on MS agar, MreB-eGFP was localized underneath the spore membrane, demonstrating that localization does not depend on the presence of MreC or PBP2. Note that the swollen and irregular morphology of the mutant spores might influence clarity of the fluorescence signal. Bar 2 μ m.

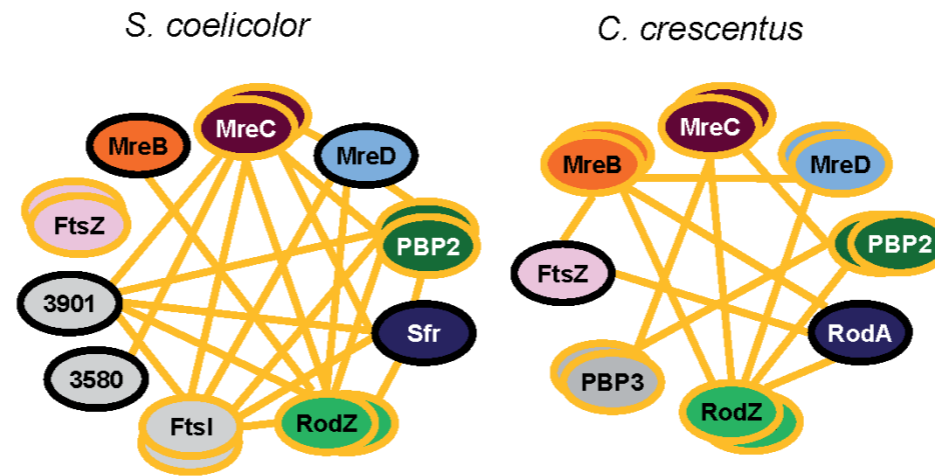


Fig. S9. Comparison of the *S. coelicolor* spore wall synthesizing complex SSSC and the lateral wall synthesizing complex of *Caulobacter crescentus*. Lines indicate protein-protein interactions identified by bacterial two-hybrid analyses. The data for the SSSC are from Fig. 5, those for the lateral wall synthesizing complex are taken from White et al., 2010). Double ellipses mark proteins that showed self-interaction. 3901, 3580 and FtsI are penicillin binding proteins (PBP).

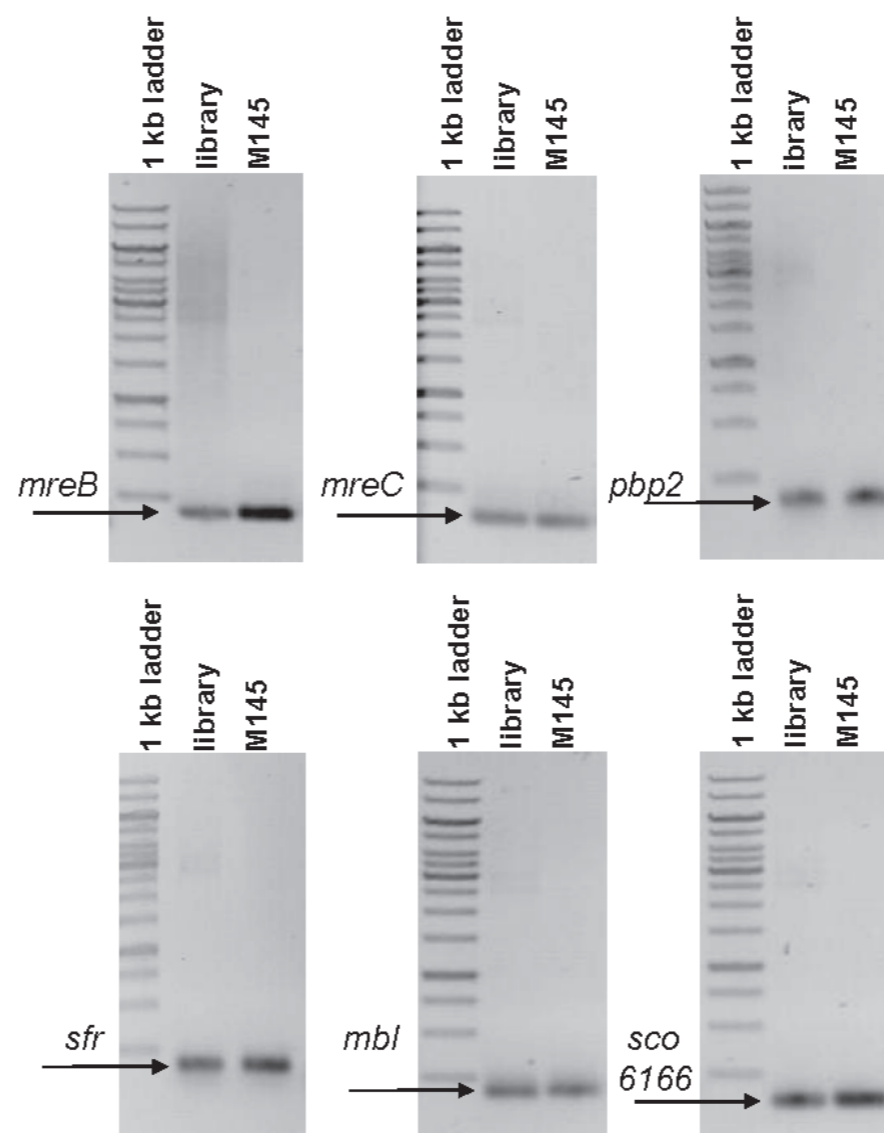


Fig. S10. Diversity of the *S. coelicolor* genomic library. Transformants were pooled, plasmid DNA was isolated from all pooled transformants and analysed by PCR with primer pairs, designed to amplify fragments of *mreB*, *mreC*, *pbp2*, *sfr*, *mbl*, and *sco6166*. All fragments could be amplified from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

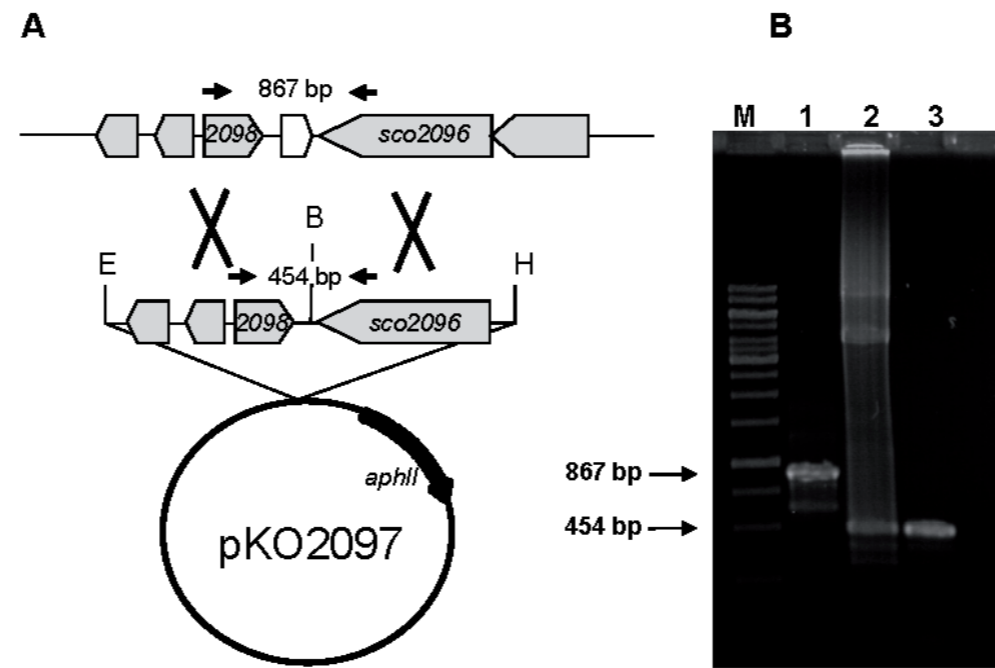


Fig. S11. Confirmation of the Δ *sco2097* mutant genotype by PCR analysis. A) schematic drawing. Primer binding sites are indicated by arrows. Molecular size of the respective PCR fragment is given. **B)** PCR-analysis. M, 1 Kbp ladder, Fermentas; 1, M145; 2, pKO2097; 3, Δ *sco2097*

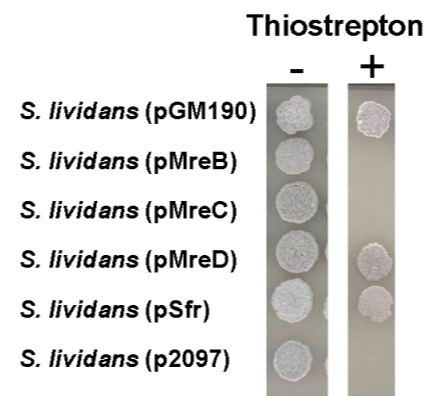


Fig. S12. Effect of over-expression of *sco2097* and *mre* genes on viability. All genes were cloned under control of the thiostrepton inducible *tipA* promoter on derivatives of the high copy number vector pGM190. Transformants were spotted on MS agar (-) and MS agar containing 25 μ g/ml thiostrepton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

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 Wohlleben,¹ and Günther Muth^{1*}

Interfakultäres 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; Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen IMIT, Organismische Interaktionen, Eberhard Karls Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany³; and Department 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, *scob166* 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. $\Delta scob166$ 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://jfb.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> ^s <i>supE44</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gvrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	5
<i>E. coli</i> ET 12567	GM2929 <i>zjj-202</i> , mutant <i>hsdM</i> , mutant <i>hsdR</i>	36
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁻ <i>cya-99</i> <i>araD139</i> <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL1</i> (Str ^r) <i>hsdR2</i> <i>mcrA1</i> <i>mcrB1</i>	26
<i>E. coli</i> BW 25113/pIJ790	Δ(<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-4</i>) <i>lacIp-4000</i> (<i>lacI</i> ^s) λ ⁻¹ <i>rpoS369</i> (<i>Am</i>) <i>rph-1</i> Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsd514</i> ; pIJ790[<i>oriR101</i>] [<i>repA101</i> (<i>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>)	37
Δ <i>mreB</i> ::pPM6 [<i>mreB-IFDc</i>]	<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	Kleinschmitt 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- <i>mcherry</i>	<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</i> (<i>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- <i>Mbl</i>	pGM190 derivative, <i>aphII</i> , <i>tsr</i> , P _{ripA} , 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	GGGAACTCAATGTCGTTCA	174
RT-mreBr	CCGATCATCTTCTTCGCTTC	
RT-mblleft4	CATGCTGCGTCATCTGCT	172
RT-mblright4	GATGAGCGTTCGACGAGT	
RT-6166f	ATCTCACGGAGGTGGTGCT	140
RT-6166r	AGCATCGAGGTCGTCATGT	

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

To delete *sco6166*, a 1.6-kb upstream fragment (primer pair Ecoupfw/uprchBcBc), including the start codon of *sco6166*, and a 1.6-kb downstream fragment (primer pair loupchBcBc/Hlorev), including the *sco6166* stop codon, were amplified by PCR and cloned into pK18, yielding pKO1666. After the transformation of M145 and the integration of the deletion vector pKO1666 by a single crossover (kanamycin resistant), an *sco6166* 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 loupchBcBc/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 *sco6166* 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 *sco6166* 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 Φ 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 *hrdB* (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 *hrdB* 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 fu-

TABLE 3. Oligonucleotides used for cloning experiments

Primer	Sequence ^a (5'→3')
Ecoupfw	AAGAATTCTGATCTCCTGCGCCTG
uprchBcBc	T CATGATCAGATCTCACGGTCATCGTCCG
loupchBcBc	GTGAGATCTGATCATGATCCGGTACCGGG
Hlorev	GGAAGCTTGACAGCGTGAGAGAC
mblupNde	GGCATATGACCGCCAGTACTG
mblloBg-gfp	GGAGATCTGTCGGAGTCGGCGTG
6166upNde	GGCATATGACCGTGTCCGG
6166loBg	CCAGATCTGTGCGGGTGGGTGTC
mblredup	GGCCCCGACCGGTCCGCGCTCTCGGGAG GATTTCGCCATG GATATCATTCCGGGGA TCCGTCGACC
mblredrev	TGCGTCAGGTTCCCGGTGCGCCCGCGG CGCGGATCA GATATCTGTAGGCTGGA GCTGCTTC
loupchBcBc	GTGAGATCTGATCATGATCCGGTACCGGG
Hlorev	GGAAGCTTGACAGCGTGAGAGAC
CHSTeup2	AGGATTCGCCATGGAATCCACGCCGACT CCGACTG
HKHrev2	CCAAGCTTGCGGGTCCGGTGCAGG
mreBXba	AATCTAGA GAACGACATTGAGTTC
mreBK	TCGGTACCGATCTACGGGGCGAGGC
mblXba	AATCTAGATATTGGCAGTACTG
mblK	CTGGTACCCAGTCGGAGTCGGCGTG
6166Xba	ACTCTAGAGACCGTGTCCGGCGG
6166K	AAGGTACCCAGTCGGGGTGGGTGTC
rodZXba	ACTCTAGAGTCCAACGGCAAATCC
rodZK	TTGGTACCCATCCGACCTGCGGGT
mreCXba	ACTCTAGAGAGGGACACGAAAGAG
mreCK	AAGGTACCCAGGCTCGGGTGTCT
mreDXba	ACTCTAGAGCGCGTCAACCGGATC
mreDK	AAGGTACCACAGCCGCTGACCCC
pbp2Xba	ACTCTAGAGACCAACATCCCCGAG
pbp2K	AAGGTACCATACGGGGTGCCTCC
sfrXba	ACTCTAGAGACCGGCAACAGCTTC
sfrK	AAGGTACCACGCCGACATCGGTCT

^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 Velocity 3DM software (Im-provision).

Spore size measurements. The wild-type M145 and the mutants Δmbl , $\Delta mreB$, Δmbl , and $\Delta sco6166$ 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 , $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta sco6166$, 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 (10^8 /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 *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (3h1q) had the highest score.

Homology models of the three MreB-like proteins of *S. coelicolor* were generated by Modeler (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*, *pbp2*, 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_ACEZ000000000), 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

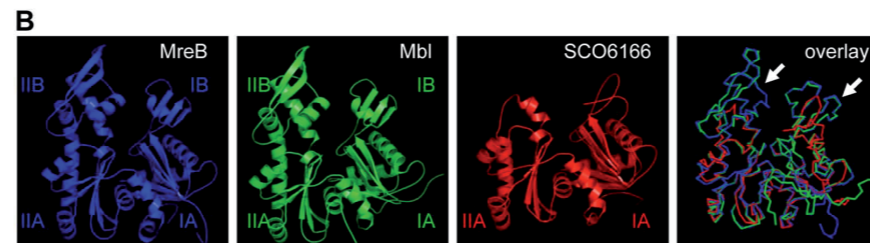
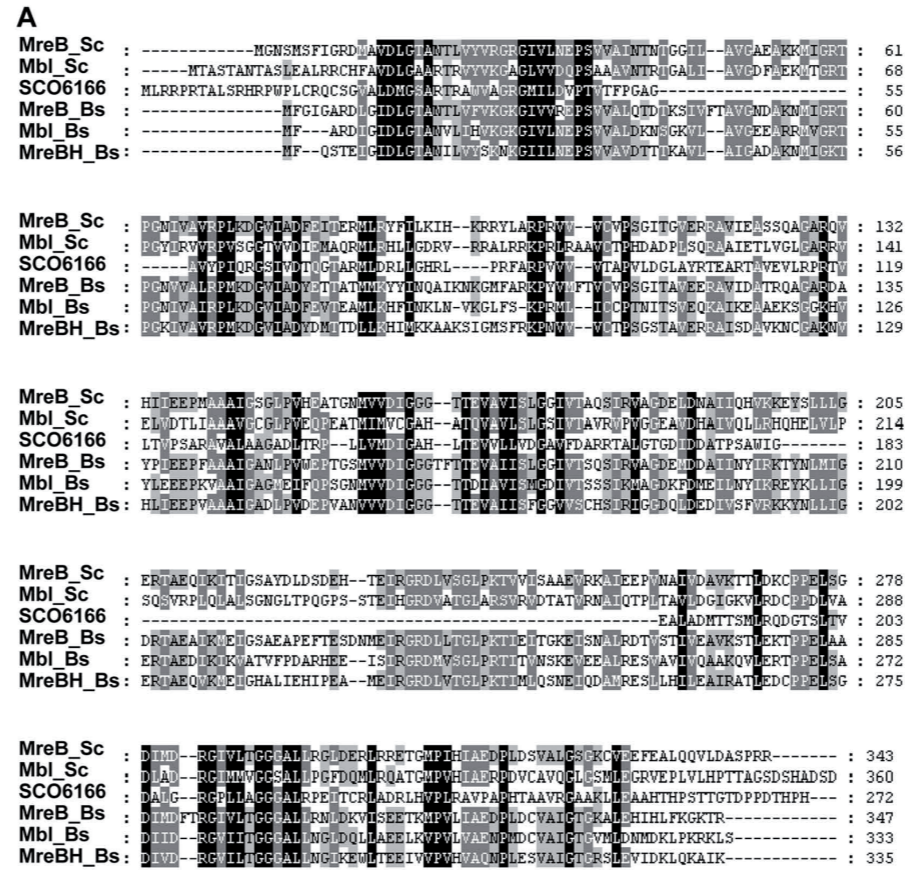


FIG. 1. Similarity of the three *S. coelicolor* MreB homologues. The MreB homologues of *S. coelicolor* and *B. subtilis* were compared by ClustalW sequence alignment (A) and homology modeling (B) using MreB of *Thermotoga maritima* as a template. MreB and Mbl are highly similar to the *B. subtilis* 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.

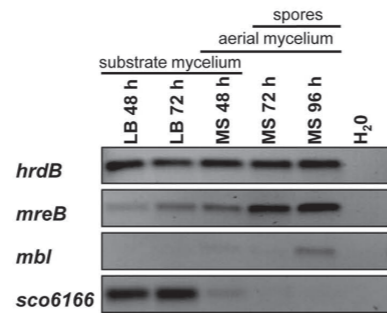


FIG. 2. Transcriptional analysis of the *mreB*-like genes of *S. coelicolor* by semiquantitative RT-PCR. Cultures of *S. coelicolor* M145 were grown on cellophane discs on LB agar or MS agar for different time periods. The stage of morphological differentiation is indicated for the different time points. 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*, *pbp2*, 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-

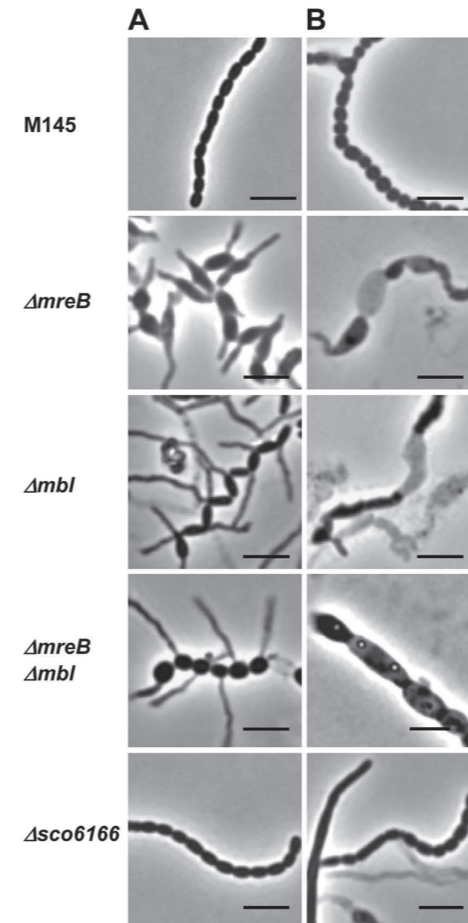


FIG. 3. Aberrant spore phenotype of *S. coelicolor* mutants defective in *mreB*-like genes. Phase-contrast microscopy of spore chains from strains grown for 4 days on MS agar (A) and MS agar plus 10.3% sucrose (B), respectively. Whereas the vegetative mycelium was not affected, Δ *mreB*, Δ *mbl*, and 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 ± 0.20	0.71 ± 0.07
M145 (pGM190)	1.20 ± 0.15	0.64 ± 0.06
$\Delta mreB$ [<i>mreB</i> -IFD] ^b	1.64 ± 0.24	1.16 ± 0.21
$\Delta mreB$::pPM6 [IFDc] ^b	1.23 ± 0.27	0.84 ± 0.14
Δmbl	1.72 ± 0.38	0.95 ± 0.16
Δmbl (pGM202-Mbl)	1.31 ± 0.18	0.67 ± 0.08
$\Delta mreB \Delta mbl$	1.70 ± 0.33	1.15 ± 0.11
$\Delta sco6166$	1.31 ± 0.25	0.78 ± 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 $\Delta mreB$ or Δmbl background. Mutant $\Delta pbp2$ (30a) was used as a control, since it showed the same morphological defects, swollen and prematurely germinating spores, as the $\Delta mreB$ or Δmbl mutant. In Δmbl ::pPM4, $\Delta mreB$::pPM4, and $\Delta pbp2$::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 $\Delta pbp2$::pAH5 strain, no clear Mbl-mCherry foci were observed in the $\Delta mreB$ mutant (Fig. 7B). RT-PCR analyses demonstrated that the transcription of *mbl-mcherry* was not affected in the $\Delta mreB$ 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-

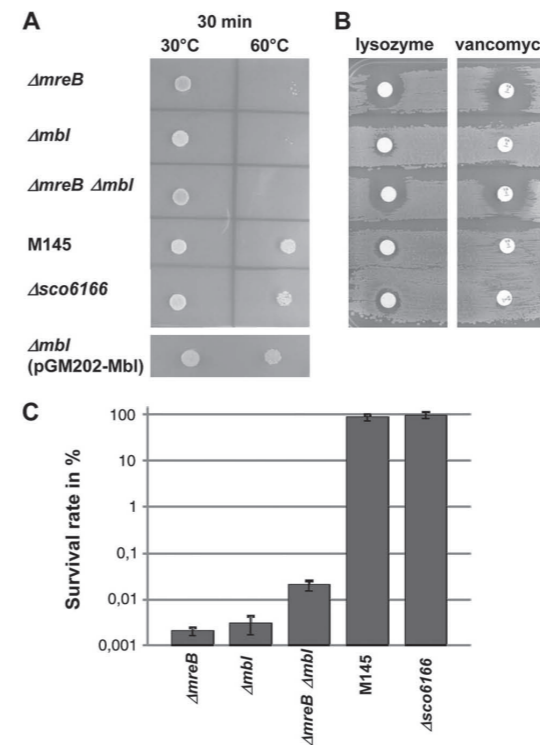


FIG. 4. Sensitivity of mutant spores to moderate heat, cell wall-lytic agents, and salt stress. (A) To assess resistance to moderate heat, spores of M145, $\Delta mreB$, Δmbl , $\Delta mreB \Delta mbl$, $\Delta sco6166$, and Δmbl (pGM202-Mbl) were incubated for 30 min at 30 or at 60°C, spotted onto LB 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 $\Delta sco6166$ is only slightly affected, while $\Delta mreB$ and $\Delta mreB \Delta mbl$ show large inhibition zones. (C) Survival rates of mutant strains exposed to salt stress. Spore dilutions (in H₂O) 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 $\Delta sco6166$, the spores of $\Delta mreB$, Δmbl , and $\Delta mreB \Delta mbl$ were impaired in germination and colony formation under high salt concentrations.

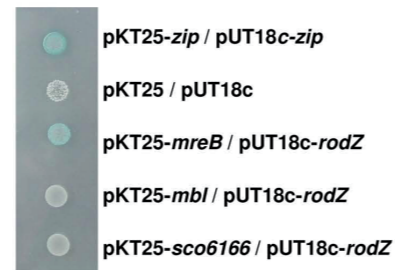


FIG. 5. Bacterial two-hybrid analysis demonstrating the interaction of MreB with the scaffold protein RodZ (SCO5751). *mreB*, *mbl*, *sco6166*, and further morphogenic genes (see Material and Methods for details) of *S. coelicolor* were fused to the functional *cya* domains T25 (pKT25) and T18 (pUT18c) 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-CGTCCTC) of the *mreB* P1

promoter (6) closely resemble σ^E -dependent promoters (GCAAC-N₁₇-CGTCCTC) (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

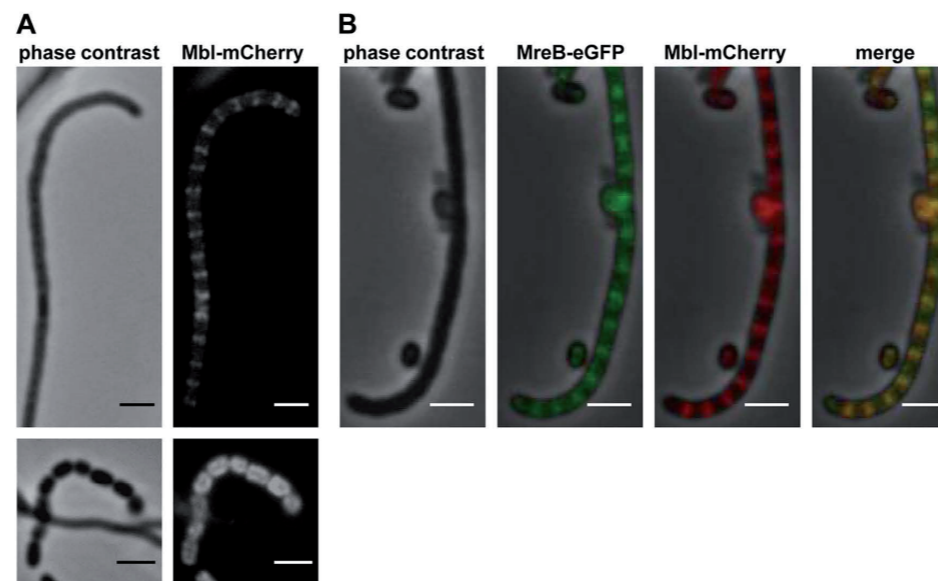


FIG. 6. Colocalization of Mbl and MreB to putative sporulation septa. (A) Plasmid pAH5 was integrated into the chromosomal *mbl* gene of *S. coelicolor* M145 via homologous recombination. The Mbl-mCherry fusion protein forms a ladder-like structure at putative sporulation septa and localizes around the 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.

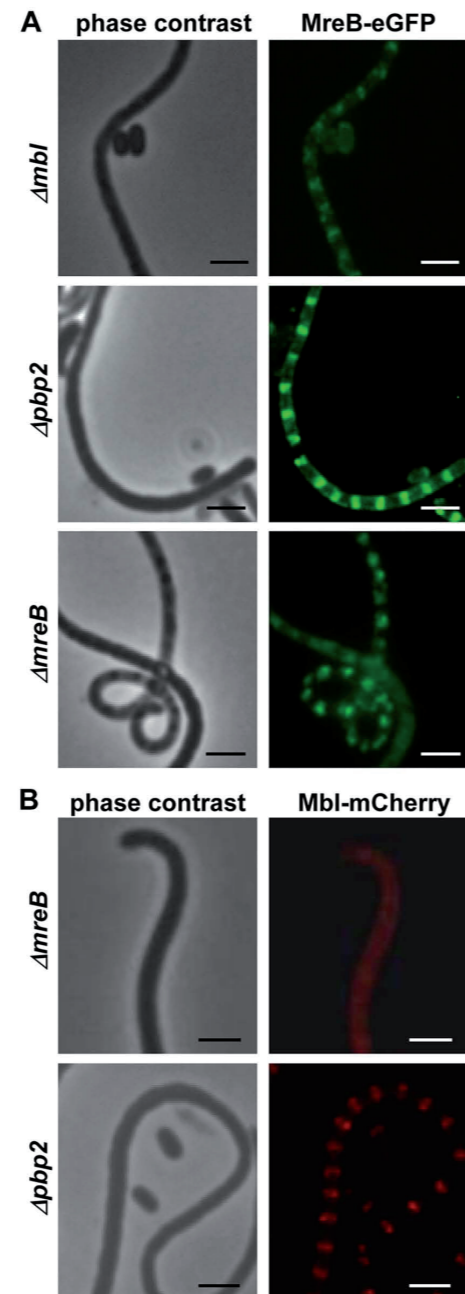


FIG. 7. Mbl-mCherry dependence on MreB for proper localization. The localization of MreB-eGFP and Mbl-mCherry was studied in $\Delta mreB$, $\Delta pbp2$, and Δmbl mutants, which have similar morphological defects. (A) MreB-eGFP localizes to the sporulation septa even in the absence of Mbl or PBP2. (B) 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 *ftsI* or *ftsW*. *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. Siehler, 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-Pdb-Viewer: 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 treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:10929–10934.
- Kleinschmitt, E.-M., A. Heichlinger, K. Schirner, J. Winlder, 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.
- Schirner, 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.

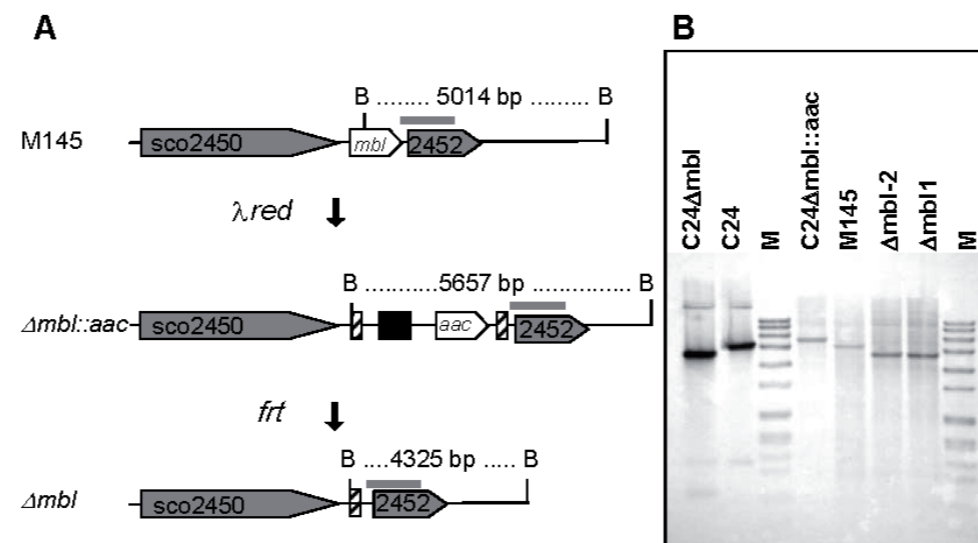


Fig. S1. Inactivation strategy of *mbl*. **A**, Schematic drawing. *mbl* was deleted by PCR targeting of cosmid C24 (Redenbach *et al.*, 1996) in a two step process, first replacing *mbl* by an *aac* cassette and subsequently deleting *aac* by FRT recombination, leaving a 81 bp scar sequence (hatched 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)

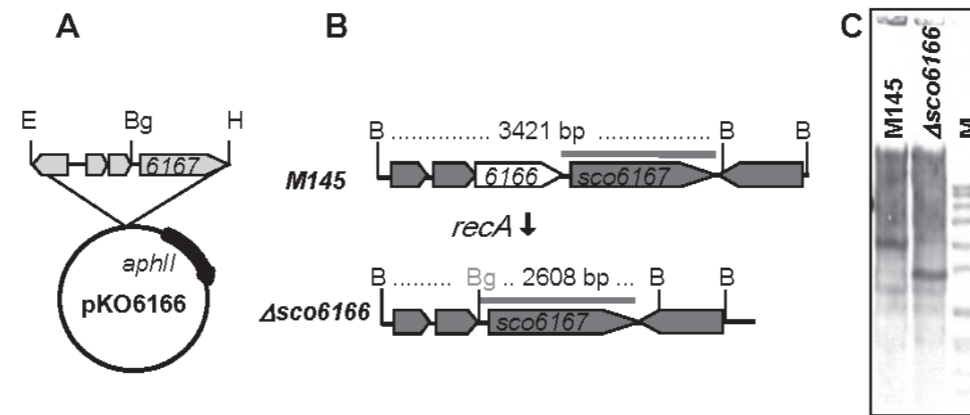


Fig. S2. Inactivation of *sco6166*. **A)** Schematic drawing of the knock out plasmid, carrying upstream and downstream regions. Relevant restriction sites are indicated. E: EcoRI, Bg: BgIII, H: HindIII. **B)** Schematic maps of the wildtype and the Δ *sco6166* mutant. A grey bar indicates the probe 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.

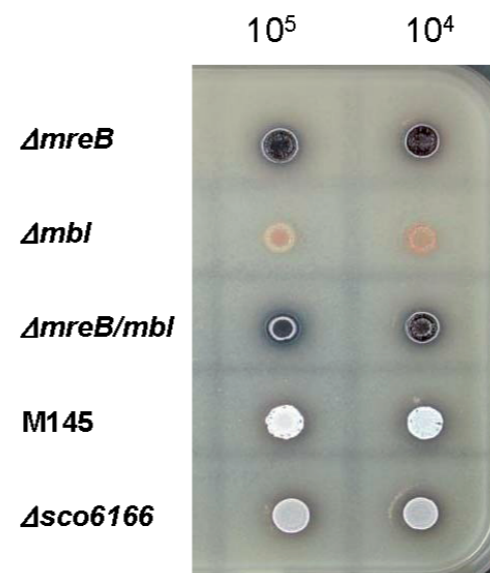


Fig. S3. Sporulation defect of *S. coelicolor* mutants defective in *mreB* homologues on MS agar + 10.3 % sucrose. Approximately 10⁵ or 10⁴ spores of M145, *ΔmreB*, *Δmbi*, *ΔmreB/mbi* and *Δsco6166* were spotted on MS agar containing 10.3 % sucrose and incubated for 5 days at 30°C before taking the photograph. Whereas the wildtype M145 and the *Δsco6166* mutant were able to sporulate, *ΔmreB*, *Δmbi*, and *ΔmreB/mbi* were affected in sporulation.

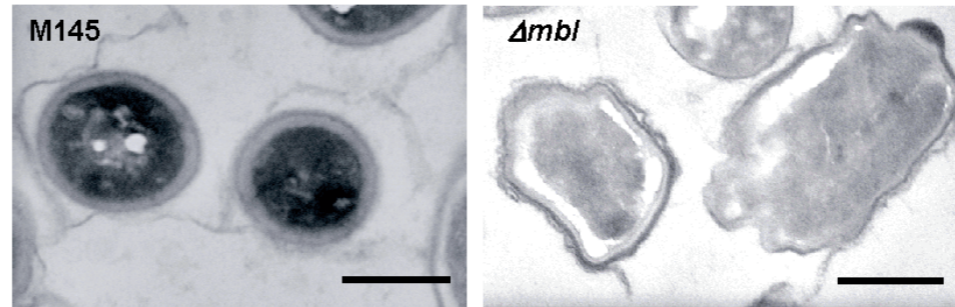


Fig. S4. Transmission electron micrographs of M145 and the $\Delta mb1$ mutant. Thin sections of spores of *S. coelicolor* M145 (A) and its *mb1* gene replacement mutant (B) were analysed at high resolution by transmission electron microscopy. Integrity of the $\Delta mb1$ spore walls is compromised, resulting in aberrant spores with a diffuse wall. Since the $\Delta mb1$ 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.

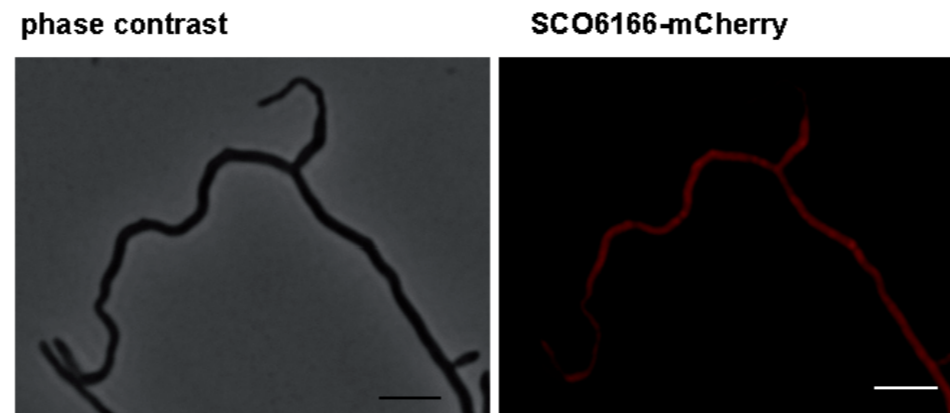


Fig. S5. Disperse fluorescence of SCO6166-mCherry in the substrate mycelium of *S. coelicolor* M145. A non-replicative plasmid carrying the *sco6166-mcherry* fusion gene was integrated into the chromosomal *sco6166* gene of M145 via homologous recombination. Culture was grown on LB agar for two days.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

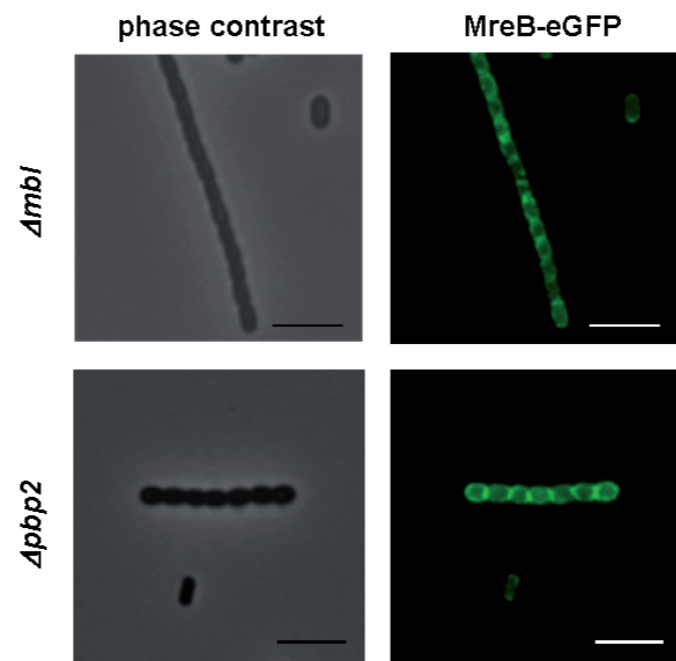


Fig. S6. Localization of MreB-eGFP to the spore periphery in mutants Δmbl and $\Delta pbp2$. Cultures were grown on MS agar for three days. Bar, 4 μm . MreB-eGFP localization underneath the spore membrane is not affected by the absence of Mbl or PBP2.

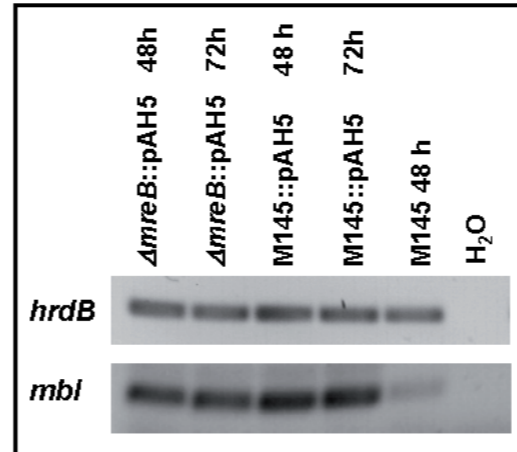


Fig. S7. Transcriptional analysis of the *mbl-mcherry* fusion gene in the $\Delta mreB$ deletion mutant. Cultures were grown on cellophane discs on MS agar at 30°C and harvested after 48 h or 72 h. The amounts of transcripts were compared by PCR. Expression of *mbl-mcherry* was detectable in the $\Delta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

6. Eigenanteil

An 5.1


Zur Publikation **“Proteins encoded by the mre gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2) cooperate in spore wall synthesis”** habe ich wesentliche Teile beigetragen. Die darin enthaltenen Arbeiten bezüglich der phänotypischen Charakterisierung der Mutanten, Lichtmikroskopischen Aufnahmen, Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und TEM Bilder wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die Präparation der Proben für die TEM Aufnahmen erfolgte durch C. Menzel (Gruppe Prof. Forchhammer/Maldener). Die in der Publikation enthaltenen Ergebnisse bezüglich des Bacterial-Two-Hybrid-Systems basieren auf den Arbeiten von E.-M. Kleinschnitz. Die Konstruktion einiger Mutanten beruht auf den Arbeiten von Annette Latus, K. Schirner und J. Winkler.

An 5.2

Die Publikation **„The MreB-Like Protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Depends on MreB for Proper Localization and Contributes to Spore Wall Synthesis”** wurde von mir verfasst. Die darin enthaltenen Ergebnisse beruhen im Wesentlichen auf eigenen experimentellen Arbeiten. Die Erstellung des Homologie-Modells der Aktin-ähnlichen Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Zweitautor M. Ammelburg. Die Bacterial-Two-Hybrid Analysen wurden von E.-M. Kleinschnitz gemacht. A. Latus half unterstützend bei der Konstruktion der Mutanten und der Vancomycin/Lysozym-Tests.

Ein riesen Dankeschön geht an...

- ...Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben für das spannende Projekt, welches mir sehr ans Herz gewachsen ist.
- ...Prof. Dr. Friedrich Götz für das Interesse an meiner Arbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens
- ...Prof. Dr. Klaus Hantke und Prof. Dr. Volkmar Braun für die Zeit und Bereitschaft mich zu prüfen.
- ...Dr. Günther Muth für die beste Betreuung die man sich wünschen kann, für seine Ideen und Zeit. Ich werde die schönen A23-Grillabende in deiner grünen Gartenoase vermissen.
- ...Iris Maldener, Claudia Menzel und Klas Flärdh für die erfolgreiche Kooperationsarbeit und vorallem an die Schwedentruppe für die großartige Hilfe. Ich hab mich gleich wie zu Hause gefühlt.
- ...der A23-Truppe, den restlichen WoWos für die tolle Zeit. Vorallem Ewa, Ha-Jö, Jamil und Chrissi, ihr habt mir immer wieder ein Lächeln auf die Lippen gezaubert, gerade dann, wenn die Versuche mal nicht so gut liefen.
- ...Annette und Thomas für die großartige Hilfe (nicht nur im Labor), wahnsinnig viel Spaß, immer ein offenes Ohr und die Annahme meines Asylantrages Ich werde euch so unendlich vermissen!
- ...Jutta und Yvonne T. für die unvergesslichen, chaotischen Tagungen, die schönen und traurigen Momente, die tollen Konzertbesuche und schönen Abende. Mädels, jetzt hab ich es auch geschafft!
- ...meinen Freunden, die meine Launen und Jammereien in den letzten Wochen ertragen haben. Das ist wahre Freundschaft!
- ...Barbara Sika, für das Erstellen des Layouts meiner Doktorarbeit. „Das ist der absolute Waaaahnsinn!“
- ...meiner Familie, besonders meinen beiden Eltern und meinem Bruder für die unendliche Unterstützung während meines gesamten Studiums. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ich lieb euch so sehr!



Im Selbstverlag herausgegeben von:

Andrea Heichlinger
Burgunderstraße 8
71065 Sindelfingen