

2 Material und Methoden

2.1 Grundlagen und allgemeine Methoden

2.1.1 Medien und Kultivierung

Als Komplexmedium wurde LB (5g Hefeextrakt; 10g Trypton; 5g NaCl) verwendet. Als definiertes Medium kam M9 (10fach konzentriert: 60 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 5 g NaCl; 1 g NH_4Cl ; ad 1 l mit Millipore-Wasser) mit Glucose oder Glycerin als C-Quelle zum Einsatz. Antibiotika wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Chloramphenicol (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Tetracyclin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Für Standardexperimente wurden entweder 60 ml Kultur in 300 ml Glaskolben oder 100 ml Kultur in 500 ml Glaskolben bei 300 rpm bei 37° C inkubiert. Zur Untersuchung von osmotischen Streß wurden Kulturen in M9 Medium mit 0,4% Glycerin bis zu $\text{OD}_{578} = 0.3$ gezüchtet und anschließend mit 300 mM NaCl (Endkonzentration) supplementiert. Säurestreß wurde untersucht, indem LB Kulturen bei $\text{OD}_{578} = 0.4$ mit 170 mM MES (Endkonzentration) supplementiert wurden, was den pH-Wert auf 5,0 absenkt.

2.1.2 Stammhaltung

Es wurden 5 ml LB Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37° C übernacht im Roller bebrütet. Von dieser Kultur wurde 1 ml als Suspension mit 7% DMSO in Stammhaltungsröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

2.1.3 Phänotypische Untersuchungen

2.1.3.1 Kongorot-Assay zum Nachweis von Curli

Von einer Einzelkolonie wurde ein flächiger Ausstrich auf eine Kongorotplatte (LB ohne NaCl; Kongorot 40 µg/ml; Coomassie Brilliantblau 20 µg/ml [Romling et al., 1998b]) angefertigt und die Platte für ca. 20 h bei 28° C inkubiert.

2.1.3.2 Sedimentationsassay

5 ml LB wurde in Reagenzröhrchen aus Glas mit einer Einzelkolonie beimpft und ca. 20 h in einem Rollinkubator kultiviert. Die Kulturen wurden dann aus dem Roller genommen, für 5 bis 10 min stehengelassen und schließlich das Sedimentationsverhalten beobachtet.

2.1.4 Plasmid-Transformation

Die Transformation von Plasmiden erfolgte nach dem TSS-Verfahren (Chung et al., 1989). Es wurden 200 µl Logphasenkultur mit 200 µl TSS-Medium (20 g PEG 6000/8000; 2,03 g MgCl₂ x 6 H₂O; 90 ml LB; 10 ml DMSO) und 1-2 µl Plasmid-DNA versetzt und dann zuerst 30 min auf Eis und anschließend 1 h bei 37° C inkubiert. Schließlich wurden die Ansätze auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und übernacht bei 37° C bebrütet.

2.1.5 Herstellung eines P1-Phagenlysates

Der Stamm von dem das Lysat hergestellt werden sollte, wurde in LB Medium bis zu ca. OD₅₇₈ 0,3 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur mit einem Tropfen 1 M CaCl₂ und 2 Tropfen *E. coli* MC4100 Wildtyplysate versetzt. Dann wurde die Kultur bis zur Lyse für ca. 3 bis 8 Stunden weiterinkubiert. Zur vollständigen Lyse wurden zum Rohlysate 5 bis 10 Tropfen Chloroform hinzupipettiert und anschließend nochmals für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde bei 4000g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand in neues Glasröhrchen überführt und mit 5 Tropfen Chloroform versetzt und das fertige Lysat bei 4° C gelagert.

2.1.6 P1-Phagentransduktion

Eine Übernachtskultur wurde abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Nach Hinzugabe von 2 Tropfen 1M CaCl₂ und mehreren Tropfen Phagenlysat wurde bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 2 Tropfen 1M Natriumcitrat und 500 µl LB hinzupipettiert und der Ansatz im Roller bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und übernacht bei 37° C bebrütet.

2.1.7 Elektronenmikroskopie

Kulturen von *E. coli* wurden in LB Medium bei 28° C bis zu einer OD = 4,0 inkubiert. Probenvorbereitung und elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Herrn Tischendorf nach dem Protokoll in (Weber et al., 2006) durchgeführt.

2.1.8 Detektion mit Phosphoimaging

Das radioaktiv markierte Gel wurde mit Saranfolie abgedeckt und auf Whatman-Papier für 2 h bei 80° C in einem Gelrockner (Biorad) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für ca. 24 h auf einer IP-Platte exponiert und die IP-Platte anschließend mit einem Phosphoimager FLA-2000G (Fuji) eingelesen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Imagequant = Image Reader/Image Gauge (Fuji).

2.2 DNA-Analytik

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook, 1989). Die Primer wurden von Metabion (München) synthetisiert. Als DNA Polymerase wurde Vent (NEB) eingesetzt. PCR-Produkte wurden mit Agarosegelelektrophorese (Sambrook, 1989) untersucht. Für präparative Zwecke wurden PCR-Produkte mit Gelextraction Kit (Qiagen) aus dem Agarosegel gereinigt.

2.2.2 Mutagenese mit Zwei-Schritt-PCR

Bei der Mutagenese mit Zwei-Schritt-PCR wurden im ersten Schritt zwei PCR-Produkte mit komplementären Enden generiert und im zweiten Schritt beide PCR-Produkte als Matrizen eingesetzt, um schließlich ein einzelnes PCR-Produkt als Summe der beiden ersten zu erhalten. Zur Mutagenese durch Nukleotidsubstitution wurde ein Paar von komplementären Primern abgeleitet, welche ca. 34 Basen lang waren und im mittleren Bereich maximal 4 Basenaustausche bezüglich der Wildtypsequenz aufwiesen. Mit jeweils einem dieser Primer und einem weiteren Primer der dem entsprechenden Ende des gewünschten Produktes entspricht wurden zwei PCR-Produkte generiert. Für diesen PCR-Schritt wurde das Annealing bei ca. 54° C durchgeführt. Die beiden PCR-Produkte wurden mit Gelextraction

Kit aus dem Agarosegel gereinigt und zusammen als Matrizen für die zweite PCR eingesetzt. Hier wurden zuerst 8 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von ca. 45° C gefahren, dann folgten 28 Zyklen mit einer Annealingtemperatur bei ca. 54° C. Alle PCR-Reaktionen wurden mit Vent (NEB) Polymerase durchgeführt. Das fertige PCR-Produkt wurde aus dem Gel aufgereinigt und in den gewünschten Vektor kloniert (siehe).

2.2.3 Präparation von genomischer DNA und Plasmiden

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte mit Qiaamp DNA Mini Kit, die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Plasmid Mini Kit nach den Protokollen des Herstellers (Qiagen).

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Restriktionsverdau, Ligation

Restriktionsverdau erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firma NEB (USA) nach den Angaben des Herstellers. Zur Vermeidung von Religation wurden geschnittene Plasmide durch Zugabe von 1 µl Shrimp Alkalische Phosphatase () und Inkubation für 1 h bei 37° C dephosphoryliert. Zum Ligieren wurden 11,5 µl Insert-DNA, 1 µl Plasmid-DNA, 1,5 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T7-Ligase (NEB) zusammenpipettiert. Dann wurde in einer PCR-Maschine ligiert (10° C, 30 sec; 30° C, 30 sec; 140 Cyclen) und schließlich die Ligationsansätze bei -20° C gelagert.

2.2.4.2 Herstellung kompetenter Zellen, Elektroporation

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der Rezipientenstamm in LB bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde dann für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend bei 4° C abzentrifugiert und das Zellpellet zuerst mit 0,5 vol. eiskaltem Millipore-Wasser und dann mit 10 ml eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 1/50 Volumen (bezogen auf die ursprüngliche Kultur) 10%igem Glycerin resuspendiert und dann zu 40 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80° C eingefroren. Zur Elektroporation wurden zu einem Aliquot kompetenter Zellen 2 µl DNA hinzugegeben, gemischt und kurz auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und mit Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) elektroporiert (). Der Ansatz wurde mit 1 ml LB aufgefüllt, in Reagenzgläser überführt und zur phänotypischen Expression 1 h im Roller inkubiert. Schließlich wurde auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.4.3 Plasmidpräparation, Sequenzierung

Positive Klone wurden durch Vereinzlungsaustich auf Selektivmedium gereinigt. Von Einzelkolonien wurden dann Übernachtskulturen angeimpft und aus diesen die Plasmid-DNA isoliert und dann bei -20°C gelagert. Aliquote der Plasmid-DNA wurden zur Sequenzierung des Inserts an die Firma Agowa (Berlin) geschickt, um die Korrektheit des Klonierungsproduktes zu überprüfen.

2.3 RNA-Analytik

2.3.1 RNA-Präparation

2.3.1.1 Zellernte und Zellaufschluß

Zwischen 4 und 8 ml Bakterienkultur wurden mit 1/10 Vol. eiskalter Stopplösung (10% Phenol [Bernstein et al., 2002]) in Ethanol) versetzt, sofort in flüssigem N_2 eingefroren und übernacht bei -80°C gelagert. Die gefrorene Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut und anschließend bei 4°C für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 800 μl RLT-Puffer (Qiagen) mit 1 % Mercaptoethanol resuspendiert und in 2 ml-Röhrchen mit 1 g Glas-Zirkoniumkugeln (Roth) überführt. Anschließend wurden die Zellen mit einem BeadBeater (Biospec, USA) mechanisch aufgeschlossen (3 mal 45 sec, dazwischen 1 min Inkubation auf Eis). Nach dem Aufschluß wurden die Probe abzentrifugiert und das Rohlysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.3.1.2 RNA-Aufreinigung

Die RNA-Präparation aus dem Rohlysat erfolgte nach der RNeasy-Methode gemäß dem Protokoll des Herstellers (Qiagen). Nach der Elution der gereinigten RNA von den RNeasy-Säulen wurde diese mit 1/10 vol. DNase-Puffer (10fach konzentriert: 1 M Natriumacetat; 50 mM MgSO_4 ; pH 5,0) und 3 μl RNase-freier DNase (Roche) versetzt und für 20 min bei 37°C und anschließend für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenolextraktion mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend eine weitere Extraktion mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Anschließend wurde die gereinigte RNA mit 20 μl Natriumacetat pH 5,2 und 3 Vol. 96% Ethanol bei -20°C übernacht gefällt. Danach wurde die RNA bei 4°C und 14000 rpm für 30 min abzentrifugiert, das RNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wurde schließlich in 10 bis 20 μl RNase-freiem Wasser gelöst und die gelöste RNA bei -80°C gelagert.

2.3.1.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und -Qualitätskontrolle

Die Konzentration und Reinheit von RNA-Proben wurde durch photometrische Messung bei 260 nm und 280 nm bestimmt (Sambrook, 1989). Weiterhin wurde die Qualität der Proben in Hinsicht auf RNA-Degradation und DNA-Kontamination mit denaturierender Agarosegelelektrophorese untersucht. Dazu wurden 1 µg RNA mit 1 vol. RNA-Probenpuffer (6,5 ml Formamid; 1,2 ml Formaldehyd; 2 ml 10x MOPS; 0,4 ml 50% Saccharose; 20 mg Bromphenolblau; 20 mg Xylencyanol) gemischt und bei 65° C für zehn Minuten denaturiert. Die Proben wurden in einem denaturierenden Agarosegel (3 g Agarose; 146 ml A. dest; 2 ml 10x MOPS; 34 ml Formaldehyd) getrennt und schließlich mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.3.2 Microarray-Technik

Die Microarrayanalysen zur Bestimmung aller RpoS-abhängigen Gene erfolgte nach den Angaben in (Weber et al., 2005). Die dabei verwendeten Microarrays waren mit PCR-Produkten (dsDNA) der kompletten offenen Leseraster aller *E. coli* Gene gespottet. Alle anderen Microarrayanalysen wurden mit Microarrays mit 50mer-Oligonukleotidsonden (ssDNA) wie folgt durchgeführt.

2.3.2.1 Reverse Transkription mit fluoreszierenden Nukleotiden („Labeling“)

Die reverse Transkription der gereinigten RNA wurde als direkte Markierung mit Cy-3/5-dCTP (Amersham) nach dem Protokoll für bakterielle Microarrays der Firma MWG durchgeführt. Zu 50 µg RNA wurden 3 µl Random Hexamere (3 µg/µl; Invitrogen) gegeben, der Ansatz zuerst für 10 min bei 65° C und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden zu diesem Ansatz 4 µl 5x RT Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mastermix (dATP, dGTP, dTTP jeweils 5 mM; dCTP 2 mM), 2 µl Cy-3-dCTP oder Cy-5-dCTP, 2 µl DTT und 1 µl Superscript II (alle Komponenten von Invitrogen, außer den Cy-Nukleotiden) hinzugegeben, gemischt und für 2 h bei 42° C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 5 µl 1 M NaOH versetzt und für 10 min bei 65° C inkubiert. Nach der Neutralisierung mit 5 ml 1 M HCl und 200 µl TE-Puffer pH 7,5 erfolgte die Aufreinigung der cDNA mit PCR Purification Kit (Qiagen). Entsprechende Cy-3- und Cy-5-markierte Ansätze wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 10 µl eingengt und schließlich auf Eis (für maximal 2 h) oder bei -20° C gelagert.

2.3.2.2 Hybridisierung, Detektion und Auswertung

Die cDNA wurde gegen *Escherichia coli* K-12 Microarrays V2 (MWG) hybridisiert. Diese Microarrays sind mit 4288 genspezifischen 50mer Oligonukleotiden gespottet und decken damit alle offenen Leseraster des Genomes ab. Hybridisierung, Waschen und Trocknen der Microarrays erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Die Fluoreszenz-Detektion der Microarrays bei 532 nm (Cy-3) und 635 nm (Cy-5) erfolgte mit einem Genepix 4100 A (Axon) Laserscanner und der Software Genepix 4.1 (Axon). Für ein einzelnes Microarrayexperiment

wurden Gene nur dann in die weitere Auswertung aufgenommen, wenn die detektierten Signale eine Mindestqualität aufwiesen. Dazu musste das Signal-zu-Rausch-Verhältnis („signal to noise“) in mindestens einem Kanal > 3 und die Summe der Intensitätsmediane („sum of medians“) > 200 betragen. Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, mit insgesamt zwei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen durchgeführt. Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet, wenn in beiden Analysen die Unterschiede der relativen RNA-Mengen („ratio of medians“) > 2 oder $< 0,5$ war. Die Angabe der relativen Expressionsrate (Ratio) im Text beruht auf den Durchschnittswerten der beiden Analysen.

2.3.3 Transkriptionsstartanalyse mit Primer Extension

2.3.3.1 Reverse Transkription mit genspezifischem Primer

Die Bestimmung eines Transkriptionsstartpunktes (Primer Extension) erfolgte nach einem Protokoll von (Metzner et al., 2004). Es wurden 20-50 μg RNA mit 5x RT Reaktionspuffer und 0,5-5 pmol genspezifischem Primer (*gadE*: ATCTTTCAACTGCCAAAAGCCCTGT; *csgD*: GAAGCACCAGAAGTACTGACAGATG) in einem Gesamtvolumen von 20 μl aufgenommen und langsam (etwa 30 min) von 70° C auf 42° C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Markierung durch Zugabe von 2,5 μl Markierungsmix (dCTP, dGTP, dATP, jeweils 1,25 mM), 2 μl γ -[³⁵S]-dATP und 2 μl Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) und Inkubation bei 42° C für 30 min. Die Markierung wurde mit einer Chasereaktion für 30 Minuten durch Zugabe von dNTPs im Überschuß (8 mM jeweils) beendet. Das radioaktive Transkript wurde folgendermaßen gereinigt und aufkonzentriert: Es wurden 175 μl TES (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 50 mM NaCl) und 200 μl CPI (Phenol pH 7,5; Chloroform; Isoamylalkohol; 25:24:1) hinzugefügt, gemischt und abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die cDNA durch Zugabe von 600 μl eiskaltem Ethanol und Inkubation für eine Stunde bei -80° C gefällt. Schließlich wurde die cDNA bei 4° C abzentrifugiert, bei Raumtemperatur getrocknet, in 4 μl Stopplösung (Sequenase 2.0, USB) aufgenommen und bei -20° C gelagert.

2.3.3.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Sequenase 2.0 (USB). Dazu wurden 3-5 μg Plasmid (mit dem zu sequenzierenden Insert) mit 0,1 vol. 2 M NaOH/2 mM EDTA denaturiert, 10-30 min bei 37° C inkubiert und 0,1 vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 sowie 2,5 vol. eiskaltes 96% Ethanol hinzugegeben. Die DNA wurde 15 min bei -80° C gefällt, 10 min bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert, mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und schließlich in 10 μl Wasser aufgenommen. Zur gereinigten Plasmid-DNA wurde der Primer (2 μl , 1 pmol) sowie 4 μl Annealing-Puffer (200 mM Tris-Cl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl) hinzugefügt und der Reaktionsansatz von 65° C langsam (15-30 min) auf 37° C abgekühlt und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden 3 μl verdünnter Labelingmix (dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 1,5

μM), 1 μl γ -[^{35}S]-dATP (Amersham) sowie 2 μl verdünnte T7-Polymerase (1,5 μl Polymerase + 6 μl Dilutionbuffer) hinzugefügt und der Ansatz bei Raumtemperatur für 2-5 min inkubiert. Je 3,5 μl der Probe wurden in je ein vorgewärmtes Reaktionsgefäß mit 2,5 μl G-, A-, T- und C-Terminationsmix gegeben und bei 37° C für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 4 μl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Proben bei -20° C eingefroren.

2.3.3.3 Denaturierendes Sequenziergel

Die Auftrennung der Proben aus der reversen Transkription und der DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem denaturierenden Polyacrylamidgel (42 g Harnstoff; 15 ml Rotiphorese Gel 40; 10 ml 10x TBE; 50 μl TEMED; 500 μl APS 10%; ad 100 ml mit A. dest). Das Sequenziergel wurde in einer entsprechenden Vorrichtung gegossen und polymerisierte mindestens für 2 Stunden. Anschließend erfolgte ein Vorlauf bei 65W für eine Stunde, bei dem das Gel vollständig auspolymerisieren und sich gleichmäßig erwärmen konnte. Alle Proben wurden für 2 min bei 70° C denaturiert und dann aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 65W für ca. 2 Stunden.

2.3.4 Northern Analyse zur Bestimmung der mRNA

Northern Analysen (inklusive Kultivierung und RNA-Präparation) wurden nach den Angaben in (Weber et al., 2006) von Alexandra Possling durchgeführt.

2.4 Protein-Analytik

2.4.1 Immunoblot-Analyse (Westernblot)

2.4.1.1 Proteinprobenpräparation

Um die Proteinkonzentration von Proben aus unterschiedlichen Wachstumsphasen auf etwa 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu standardisieren, wurde das Probenvolumen so gewählt, daß der Gesamtprotein-gehalt etwa 40 μg betrug. Die Proben wurden abzentrifugiert, in 10% Trichloressigsäure resuspendiert und die Proteine 20 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde abzentrifugiert und das Präzipitat mit 1 ml Aceton gewaschen. Nach Trocknung für 10 min bei Raumtemperatur wurde die Proteinpräparation in 40 μl SDS-Probenpuffer (0,06 M Tris [pH 6,8]; 2% SDS; 10% Glycerin; 3% β -Mercaptoethanol; 0,005% Bromphenolblau) resuspendiert.

2.4.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE erfolgte nach Standardmethoden (Laemmli et al., 1970; Sambrook, 1989) in einer Mini-ProteanII-Apparatur (Biorad). Dazu wurde ein 12%iges Trenngel (2,5 ml LT [36,34 g Tris; 0,8 g SDS; 200 ml A. dest; pH 8,8]; 1,25 ml Gelstock [30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid]; 3,45 ml A. dest; 5 μl TEMED; 50 μl 10% APS) mit einem 4%igen Sammelgel (1,25 ml LT [6,06 g Tris; 0,8 g SDS; 100 ml A. dest; pH 6,8]) überschichtet. Proteinproben in

SDS-Probenpuffer wurden 5 min bei 100° C erhitzt und nach kurzem Abzentrifugieren aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA pro Gel in SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 0,19M Glycin; 0,1% SDS).

2.4.1.3 Blotten des Proteingels und Immunodetektion

Nach der Auftrennung mit SDS-PAGE wurden Proteine in einer Mini-ProteanII-Apparatur (Biorad) auf eine Roti-PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran in Methanol, Wasser und Transblotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol) äquilibriert und gemeinsam mit dem Proteingel und Whatmanpapieren (Schleicher & Schuell) in einer entsprechenden Vorrichtung assembliert. Das Blotten erfolgte in eiskaltem Transblotpuffer für 1 h bei 100 V. Nach dem Blotten wurde die Membran übernacht in TBSTM (5% Magermilchpulver in TBST [20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Twen-20]) inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Danach wurde für 2 h mit dem primären Antikörper (Kaninchen-Anti-CsgD, 1:20000 in TBSTM) inkubiert. Nach drei Waschschrritten zu je 10 min in TBST wurde für 2 h das Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma; 1:5000 in TBSTM) hinzugegeben. Danach wurde die Membran mit TBST und AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) gewaschen. Entwickelt wurde durch Zugabe von 33 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid) und 66 µl NBT-Lösung (50 mg/ml in 70% Dimethylformaamid) in 10 ml AP-Puffer. Die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde gestoppt durch mehrmaliges Waschen in A. dest. und schließlich wurden die Westernblots auf Filterpapier im Dunkeln getrocknet.

2.4.2 Bestimmung der Proteinestabilität von CsgD

Die Bestimmung der Proteinestabilität von CsgD *in vivo* (Wachstum in LB Medium bei 28° C) erfolgte in einem nichtradioaktiven Immunoblot-Ansatz. Dazu wurde CsgD ektopisch von einem Arabinose-induzierbaren Promotor exprimiert (0,05% Arabinose bei OD 3,5 für 20 min) und anschließend die Proteinbiosynthese mit 1,5 mg/ml (Endkonzentration) Spectinomycin gestoppt. Die weitere Analyse erfolgte nach den Angaben in Abschnitt 2.4.1 unter Verwendung eines Kaninchen-Anti-CsgD-Antikörpers.

2.4.3 Gelretardations-Assay

Gelretardations-Assays wurden nach den Angaben von (Mika et al., 2005) durchgeführt. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 50 ng DNA und unterschiedliche Mengen gereinigtes Protein in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 5% Glycerin; 10 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) (Lynch und Lin 1996b). Die Reaktionsansätze wurden 20 min bei 28° C inkubiert und danach auf ein 4%iges Polyacrylamidgel (1 ml 5x TBE; 1 ml Acrylamidstock [40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid]; 8 ml A. dest; 66 µl APS; 16 µl TEMED) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5 x TBE (10x TBE: 108 g Tris 55 g Borsäure, 40 ml 0,5M EDTA pH 8,0) bei konstant 70 V. Das Gel wurde schließlich mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.4.4 Proteinüberexpression und Proteinaufreinigung

Für die Proteinüberexpression von MlrA, CsgD, YdaM und YciR wurden PCR-Produkte (siehe Primerliste am Ende des Kapitels) der vollständigen offenen Leseraster in den Überexpressionsvektor für C-terminales Hexahistidin-Tagging pQE60 (Qiagen) kloniert. Folgende Restriktionsschnittstellen wurden genutzt: NcoI, BglII für *mlrA*; NcoI, BglII für *csgD*; NcoI, BglII für *ydaM*; NcoI, BamHI für *yciR*. MC4100 mit pQE60::*mlrA* oder pQE60::*csgD* wurde in LB bei 37°C bis zu einer OD von 0,8 kultiviert, die Überexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und die Kultur für 4 Stunden bei 28° C weiterinkubiert. MC4100 mit pQE60::*ydaM* oder pQE60::*yciR* wurde in M9 Minimalmedium (0,5% Glukose) bei 30°C bis zu einer OD von 0,6 inkubiert, die Überexpression mit 0,04 mM IPTG induziert und die Kultur übernacht bei 19°C weiterinkubiert. Für MlrA, YdaM und YciR erfolgte der Zellaufschluß und die native Aufreinigung mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie nach Standardprotokollen (QiaExpress, Qiagen). Für die Präparation von CsgD wurden die Einschlußkörper (inclusion bodies) angereichert (Protokoll von Regine Hengge). Dazu wurde das Zellpellet in TE-Puffer pH 7,5 gewaschen, in TE-Puffer resuspendiert und in flüssigem N₂ eingefroren. Die gefrorene Suspension wurde im Wasserbad bei 20° C aufgetaut und anschließend mit 250 µg/ml Lysozym versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach mehrmaligen Invertieren wurde die Suspension bei 4000g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet mit den Einschlußkörpern wurde in 8M Harnstoff resuspendiert und die weitere Aufreinigung erfolgte nach Standardprotokollen für die denaturierende Aufreinigung mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Qiaexpress, Qiagen). Eluierte Fraktionen wurden mit SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert, Fraktionen mit ausreichender Proteinmenge und Reinheit vereinigt und schließlich übernacht bei 4° C dialysiert. Für YdaM und YciR erfolgte die Dialyse gegen 250 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 M MgCl₂ und 5 mM β-Mercaptoethanol (Cyclasepuffer; Christen et al., 2006 und Ralf Paul, persönliche Mitteilung). MlrA und CsgD wurden gegen 300mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,8 dialysiert. Die Überexpression von PleD* erfolgte von pRP89 (Paul et al., 2004) im Stamm BL21(DE3) pLysS (Stratagene) durch Kultivierung in LB Medium bei 30° C und Induktion mit 0,4 mM IPTG für 3 h. Aufschluß, Aufreinigung und Dialyse erfolgte wie für YdaM und YciR beschrieben.

2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Coomassie Plus (Pierce) nach den Angaben des Herstellers.

2.5 Genetische Methoden

2.5.1 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Deletion chromosomaler Gene („one-step inactivation“) und gegebenenfalls Entfernung der Antibiotika Resistenz-Kassette wurde nach der Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko et al., 2000) durchgeführt. Die genspezifischen Primer zur Generierung der PCR-Produkte für die Deletionen sind am Ende dieses Kapitels gelistet.

2.5.2 Konstruktion von chromosomalen *lacZ*-Reporterfusionen

Translationale Fusionen wurden durch Klonierung von PCR-Produkten in den Fusionsvektor pJL28 generiert (Lucht et al., 1994). In der Regel wurden nur ein kurzer Abschnitt des 5'-Endes des offenen Leserasters des Zielgenes mit *lacZ* fusioniert. Solche kurzen translationalen Fusionen reflektieren eher die transkriptionelle Regulation, sind aber aufgrund höherer Signalstärke besser zu messen als transkriptionelle Fusionen. Für die Inserts wurden Primer mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen abgeleitet (siehe Primertabelle am Ende des Kapitels) und in der PCR mit chromosomaler DNA von MC4100 als Matrize eingesetzt (für Details siehe den Abschnitt „Klonierung“). Translationale Fusionen wurden in transkriptionale Fusionen umgewandelt unter Verwendung der HindIII/ClaI-Schnittstellen von pFS1 (Mika et al., 2005). Die plasmidcodierten Fusionen wurden in den Phagen lambdaRS45 gekreuzt und mit diesem MC4100 lysogenisiert (Simons et al., 1987). Auf Einzellysogenität wurde mit PCR nach (Powell et al., 1994) getestet.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung der β -galaktosidase Aktivität

Die β -galaktosidase Aktivität wurde nach (Miller, 1972) mit *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) als Substrat bestimmt und in Micromol *o*-Nitrophenol pro Minute pro Milligramm Protein angegeben.

2.6.2 Nachweis der Diguanylatcyclase-Aktivität

Der Nachweis von Diguanylatcyclase-Aktivität erfolgte nach (Christen et al., 2005). 19 μ l gereinigtes YdaM oder YciR in Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -Mercaptoethanol) wurden mit 1 μ l [α -³²P]-GTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham) versetzt und bei 30° C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden dem Ansatz eine Probe von 5 μ l entnommen und zum Abstoppen der Reaktion mit 5 μ l EDTA (0,5 M, pH 8,0) versetzt. Die Proben wurden auf eine Dünnschichtchromatographie-Folie (Polygram CEL 300 PEI, Macherey und Nagel) aufgetragen und in gesättigtem NH₄SO₄ und 1,5 M KH₂PO₄ (1 : 1,5 v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Phosphoimaging.

2.6.3 Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität

Für den Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität (Christen et al., 2005) von YciR wurde radioaktives c-di-GMP hergestellt. Dazu wurden 19 µl PleD* (17 µM) mit 1 µl [α - 32 P]-GTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham) für 60 min bei 30° C inkubiert (zur Aufreinigung von PleD* siehe Abschnitt „Proteinüberexpression und Proteinaufreinigung“, sowie [Paul et al., 2004]). Anschließend erfolgte die Hitzepräzipitation des Proteins für 5 min bei 95° und nach der Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm wurde der Überstand mit dem radioaktiv markierten c-di-GMP abgenommen. Die dünnschichtchromatographische Analyse der c-di-GMP-Präparation zeigte, daß GTP vollständig zu c-di-GMP umgesetzt wurde. Aus 2 mol GTP entsteht 1 mol c-di-GMP, so daß bei quantitativer Umsetzung des Substrates und unter Berücksichtigung der 1:20 Verdünnung im Reaktionsansatz die Konzentration der [32 P]-c-di-GMP Präparation etwa 0,082 µM betrug (bei einer Ausgangskonzentration von 3,3 µM [α - 32 P]-GTP). Es wurden 19 µl gereinigtes YciR mit 1 µl c-di-GMP (0,082 µM) bei 30° C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zu 5 µl entnommen und die Reaktion mit 5 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) abgestoppt. Schließlich erfolgte die Analyse der Proben mittels Dünnschichtchromatographie, wie zuvor beschrieben.

2.6.4 UV-Crosslinking

Es wurden 11 µl Protein und 1 µl von ca. 16 nM [32 P]-c-di-GMP (für die Herstellung von c-di-GMP siehe vorherigen Abschnitt) gemischt, für 5 min bei 30° C inkubiert und dann als Tropfen auf den Boden einer Petrischale pipettiert. Die Petrischale wurde auf ein Gefäß mit Eiswasser gesetzt und dann in einem Crosslinker BLX 365 (Peqlab) mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365nm und voller Intensität bestrahlt. Es wurde je nach Experiment unterschiedlich lange bestrahlt, die genauen Zeiten sind im Ergebnisteil angegeben. Anschließend wurden die Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt, die Detektion erfolgte mit Phosphoimaging.

2.6.5 Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse erfolgte mit Equilibrium DispoBiodialyzer (The Nest Group). In die eine der beiden Kammern der Dialysevorrichtung wurden 30 µl Cyclasepuffer (250 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl [pH 8,0], 10 M MgCl₂ und 5 mM β -Mercaptoethanol) mit ca. 0,5 nM (Endkonzentration) [32 P]-c-di-GMP (siehe oben für die Herstellung von c-di-GMP) und in die andere Kammer 30 µl Proteinlösung gegeben. Anschließend wurden die Proben für mindestens 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben aus den Dialysekammern abgenommen, in Microtiterplatten überführt, mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet und die Radioaktivität in einem Chamäleon Multilabel Reader (Hidex) bestimmt. Gemessen wurde gegen 30 µl Cyclasepuffer als Leerwert.

2.7 Bioinformatische Analysen

2.7.1 Genannotationen und Gensequenzen

Angaben von Gennamen, b-Nummern und Genprodukten beruhen auf den Angaben von GenProteEC (Serres et al., 2004). Die Einteilung von Genen in funktionelle Kategorien erfolgte auf der Basis von MultiFun (Serres et al., 2000). Gensequenzen von *E. coli* stammen aus der Genbank-Datei NC_000913.fna (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder von Colibri (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>).

2.7.2 Analyse der Promotorregionen der 140 Kerngene

Von den 140 Kerngenen wurden die absoluten Koordinaten auf dem Chromosom aus der Genbank-Datei NC_000913.ppt ermittelt. Anhand dieser Daten wurden für jedes Gen die 200 Nukleotide stromaufwärts vom Startcodon liegende Nukleotidsequenz aus der Genbank-Datei NC_000913.fna bestimmt. Der komplette Satz von 140 Sequenzen wurde mit MEME (Bailey et al., 1994) und Bioprosector (Liu et al., 2001a) unter Verwendung der Standardparameter untersucht. Diese Programme finden konservierte Sequenzmotive in Sätzen von nicht-alignierten Sequenzen. Die grafische Darstellung des -10 Erkennungsmotivs erfolgte mit Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>; Vacic et al., 2006) und den Ergebnissen der Bioprosector-Analyse.

2.7.3 Verteilung RpoS-abhängiger Gene auf dem Chromosom

Zur Bestimmung der Verteilung RpoS-abhängiger Kerngene auf dem Chromosom wurden die absoluten Koordinaten dieser Gene aus der Genbank-Datei NC_000913.ppt ermittelt. Anschließend wurde die Anzahl RpoS-abhängiger Gene gegen fortlaufende chromosomale Segmenten zu je 25000 Basenpaaren aufgetragen.

2.8 Materialliste

2.8.1 Chemikalien, Apparaturen und sonstiges Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der für die molekularbiologische Forschung angemessenen Qualität bei den einschlägigen Herstellern bezogen. Angaben zu Materialien, die nicht nachfolgend gelistet sind, finden sich in dem entstreichenden Abschnitten im Methodenteil.

<u>Substanz</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Hersteller</u>
[α - ³² P]-GTP	PB10201	Amersham
[γ - ³⁵ S]-dATP	AG1000	Amersham
c-di-GMP	C057-001	Biolog
Cy3- dCTP	PA53201	Amersham
Cy5-dCTP	PA55021	Amersham

IPTG	2316.4	Roth
MES	M2933	Sigma
Nukleotide für Microarrays	10297-018	Invitrogen
Nukleotidmix für PCR	NTPMX250	Qbiogene
ONPG	30710	Serva
Random Primers	48190-011	Invitrogen
Restriktionsenzyme	diverse	New England Biolabs
Sequenase 2.0 DNA Sequencing Kit	70770	USB
Shrimp Alkalische Phosphatase	70092Y	USB
Superscript II Reverse Transkriptase	18064-014	Invitrogen
T4 DNA Ligase	M0202L	New England Biolabs
Vent DNA Polymerase	M0254L	New England Biolabs

2.8.2 Stämme, Plasmide, Primer

2.8.2.1 Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100	<i>F araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 deoC1 ptsF25 rbsR flbB5301</i>	Casadaban et al., 1976
RH90	MC4100 <i>rpoS359::Tn10</i>	Lange et al., 1991a
ZK1000	W3110 <i>ΔlacU169 tna-2 rpoS::kan</i>	Bohannon et al., 1991
BE1	W3110 <i>lrp-201::Tn10</i>	Ernsting et al., 1992
FB22176	MG1655 <i>yddV::Tn5</i>	Kang et al., 2004
FB22868	MG1655 <i>yiaG::Tn5</i>	Kang et al., 2004
JK86	MC4100 <i>gadA::lacZ</i>	Johanna Heuveling
JK87	MC4100 <i>gadB::lacZ</i>	Johanna Heuveling
JH19	MC4100 <i>gadE::kan</i>	Johanna Heuveling
FS110	MC4100 <i>arcA::lacZ</i>	Mika et al., 2005
BL21(DE3) pLysS	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(rB-mB-)</i> (DE3) gal lambda[pLysS CAM ^r]	Stratagene
HW102	MC4100 <i>yeaG::kan</i>	diese Arbeit
HW103	MC4100 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW104	MC4100 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW105	MC4100 <i>yjgH::cat</i>	diese Arbeit
HW106	MC4100 <i>lrp-201::Tn10 rpoS::kan</i>	diese Arbeit
HW107	MC4100 <i>yddV::Tn5</i>	diese Arbeit
HW111	MC4100 <i>yiaG::Tn5</i>	diese Arbeit
HW115	MC4100 <i>gadX::cat</i>	diese Arbeit
HW125	MC4100 <i>yddU::cat</i>	diese Arbeit
HW128	MC4100 <i>mlrA::kan</i>	diese Arbeit
HW129	MC4100 [RS45: <i>mlrA(-199,+91)::lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
HW136	HW131 <i>yddV::kan</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
HW137	HW129 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
HW142	MC4100 [RS45: <i>csgB</i> (-190,+43):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
HW143	HW129 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW144	HW129 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW145	HW128 <i>mlrA::null</i>	diese Arbeit
HW146	MC4100 <i>flu::cat</i>	diese Arbeit
HW147	HW146 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW148	HW145 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW149	HW128 <i>flu::cat</i>	diese Arbeit
HW150	HW148 <i>flu::cat</i>	diese Arbeit
HW152	HW142 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW154	HW142 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW159	MC4100 <i>ycaT::cat</i>	diese Arbeit
HW178	HW142 <i>csgD::null</i>	diese Arbeit
HW179	HW178 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW180	HW178 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW183	MC4100 [RS45: <i>csgD</i> (-756, +85):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
HW184	HW183 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW185	HW183 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW199	MC4100 [RS45: <i>csgD</i> (-754, +549):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
HW205	HW199 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
HW207	HW199 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
HW209	JK86 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
HW210	JK87 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit

2.8.2.2 Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pJL28		Lucht et al., 1994
pFS1		Mika et al., 2005
pQE60		Qiagen
pBAD18		Guzman et al., 1995
pKD3		Datsenko et al., 2000
pKD4		Datsenko et al., 2000
pKD46		Datsenko et al., 2000
pCP20		Datsenko et al., 2000
pRP89		Paul et al., 2004
pAP5	pBAD18:: <i>csgD</i> (-149, stop)	Alexandra Possling
pHW2	pJL28 [<i>gadE</i> (-463, +60):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
pHW3	pJL28 [<i>gadE</i> (-463, +60)- <i>lacZ</i> (oper)]	diese Arbeit
pHW4	pQE60:: <i>mlrA</i>	diese Arbeit
pHW5	pJL28 [<i>mlrA</i> (-199, +91):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
pHW7	pJL28 [<i>csgD</i> (-756, +85):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
pHW11	pJL28 [<i>csgB</i> (-190,+43):: <i>lacZ</i> (hybr)]	diese Arbeit
pHW15	pQE60:: <i>csgD</i>	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pHW16	pQE60:: <i>ydaM</i>	diese Arbeit
pHW17	pJL28:: <i>[csgD(-756, +85)::lacZ(hybr)]</i>	diese Arbeit
pHW19	pBAD33:: <i>mlrA</i>	diese Arbeit
pHW20	pQE60:: <i>yciR</i>	diese Arbeit
pHW22	pJL28:: <i>[csgD(-756, +549)::lacZ(hybr)]</i>	diese Arbeit

2.8.2.3 Primer

Genotyp	Forward (5'-> 3')	Reverse (5'-> 3')
<i>yeaG::kan</i>	CTTCCGGGAGCCTCTACTATTCATATGAA CGGCTCTTAACCTGTGGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC	CGGTTGCTGCTGCTTGTAGGCCCGGTAAC ATGTGTACCGGGCCAGCATATGAATATCC TCCTTAG
<i>ydaM::cat</i>	AATGATTACGCACAACCTCAATACCCTGG ACTTACTACCAGTCTGTCTGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	CCGCGGCTTATGCCGCCAGCACGCGGTTG CGTCCATCATTTTTTCGCCCACATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>yciR::kan</i>	GCGGACTCCGCTGTTAACCGGAGGATATG CATCATGAAAACCGTTAGGGAGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	GCTTCAGATAGCGTTTTATACCAGCGTTC GAAGGCGACGGCGGGCATCGGTCATATGA ATATCCTTAG
<i>yjgH::cat</i>	ATGTCTGGGTTTTGTTTACTCACGTCGTC CGCTAAAAGCGGCTCCCGGTAGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	GCTTCAGATAGCGTTTTATACCAGCGTTCG AAGGCGACGGCGGGCATCGGTCATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>gadX::cat</i>	GCGTGCTACATTAATAAACAGTAATATGT TTATGTAATATTAAGTCAACTGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	ATGTCTGAGTAAACTCTATAATCTTATT CCTTCCGCAGAACGGTCAGTGCATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>yddU::cat</i>	TTGAACTCTGAAAAGCCAGTCTTTAGATG CGCCAGGATGCAGAGGTAATCGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	GACAGTGTACGTTAAATGAAAACCCGCG AGTGCGGGCGAGAGGAATTTGCATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>mlrA::kan</i>	CAAACTGCGTCTAAAGTTAAACCGGGAC CTCGGAGCAAGGGTGAGACGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	CTTTATGTTAACGAAAGGATTGTACAGTA AAGCGCATTTGTTAACGAATCCATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>flu::cat</i>	CGTTTGTGGGTACCGGCTTTTTTATTAC CCTCAATCTAAGGAAAAGCTGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	GTCCGGTCCCAGTGCATGATGACCGGGAC CACAGAGAGCGGATGGTTCTGCATATGAA TATCCTCCTTAG
<i>gadE(-463,+60)::lacZ</i>	TTGAATTCGCATAAATATCCGTGTCTCCA GACG	ATCTATAAGCTTTATCTTTCAACTGCCAA AAGCCCTG
<i>mlrA(-199,+91)::lacZ</i>	CGCGGATCCTAAAACGCGTAACATACATT GCCTGC	ATCTATAAGCTTTAGCAATCCGTAACGC CTCTGCCAC
<i>csgD(-756, +85)::lacZ</i>	CGGAATTCATGTTGTACCCTGGACCTGG TCG	AAACTGCAGTGCTGCAAGAGAGCTGTCCG CTG
<i>csgD(-756, +549)::lacZ</i>	CGGAATTCATGTTGTACCCTGGACCTGG TCG	GACGGATCCCCTCGCCTGAGGTTATCGTT TGCCCAGG
<i>csgD(-149, stop)</i>	TCTAGCTAGCTCAGATGTAATCCATTAGT TTTATATTTTACC	TGTGCATGCTTTATCGCCTGAGGTTATCG TTTGC
<i>csgB(-190,+43)::lacZ</i>	CGGAATTCATTTACGTGGGTTTTAATAC TTTGG	ATCTATAAGCTTCACCCAGTATTGTTAAC ATCATAA
<i>mlrA</i> (für pQE60)	TTCATGCCATGGCGCTTTACACAATTGGT GAAG	AATGGAAGATCTAATGCCGAGTGGGAAAA TATCATGG

Genotyp	Forward (5'-> 3')	Reverse (5'-> 3')
<i>csgD</i> (für pQE60)	TTCATGCCATGGTTAATGAAGTCCATAGT ATTCATGGTC	AATGGAAGATCTTCGCCTGAGGTTATCGT TTGCCAGGAAACC
<i>ydaM</i> (für pQE60)	TTCATGCCATGGCGTGGCTTTTTTTCGAT CGGATAGC	ATTAGATCTTGCCGCCAGCACGCGGTTGC GTCCATC
<i>yciR</i> (für pQE60)	CATGCCATGGAAACCGTTAGGGAGTCCAC AACG	CGCGGATCCTGCGCGCTTCAGATAGCGTT TATACC