

# 4 Diskussion

## 4.1 Die Globalanalyse des $\sigma^S$ Regulons

### 4.1.1 Anzahl und Funktion $\sigma^S$ -abhängiger Gene in *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels globaler Transkriptionsanalyse eine Bestandsaufnahme aller  $\sigma^S$ -abhängigen Gene in *E. coli* vorgenommen. Es konnten insgesamt 481 Gene identifiziert werden, deren Transkription unter mindestens einer der drei untersuchten Wachstumsbedingungen direkt oder indirekt unter der Kontrolle von  $\sigma^S$  stehen. Die Mehrfachbestimmung des  $\sigma^S$ -Regulons unter drei verschiedenen  $\sigma^S$ -induzierenden Wachstumsbedingungen (Übergang in die stationäre Phase, osmotischer Streß und Säurestreß) ermöglichte die Definition eines robusten Kerns an Genen der generellen Streßantwort. Dieser Kern umfaßt 140 Gene, welche unabhängig von den getesteten Bedingungen  $\sigma^S$ -abhängig sind (Abschnitt 3.1.2). Diese Gene zeigten im allgemeinen auch die stärksten Unterschiede in ihren relativen Expressionsraten (Ratios) in der Menge aller  $\sigma^S$ -kontrollierten Gene, was ihre herausragende Stellung unterstreicht. Etwa ein Viertel dieser Gene war bereits zuvor von vielen verschiedenen Arbeitsgruppen als  $\sigma^S$ -abhängig publiziert. Die überwiegende Mehrzahl aber erscheint mit dieser Analyse zum ersten Mal im Kontext der von  $\sigma^S$  kontrollierten generellen Streßantwort und zeigt, daß trotz der vielen bisherigen Untersuchungen zu

diesem Thema, die Mechanismen der generellen Streßantwort in *E. coli* noch weitgehend unverstanden sind. Die  $\sigma^S$ -aktivierte Expression der Kerngene ist unabhängig von sehr unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und damit robust gegen weitere regulatorische Einflüsse auf Transkriptionsebene. Dies bietet eine Grundlage für künftige Untersuchungen sowohl zur internen Regulation des  $\sigma^S$ -Netzwerkes als auch zur Einbettung der generellen Streßantwort im regulatorischen Gesamtkontext der Zelle.

Die 341 Gene die nicht zur Kerngruppe gehörten, verteilten sich auf Untergruppen, die nur unter einer oder zwei Wachstumsbedingungen  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert wurden. Offensichtlich folgte die Expression dieser Gene nicht nur der  $\sigma^S$ -Aktivität, sondern benötigt zusätzliche aktivierende Einflüsse, die ihrerseits von den Wachstumsparametern kontrolliert werden. Allerdings sagen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nur bedingt etwas über das Expressionsniveau eines Genes aus, d.h. fehlende  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter bestimmten Bedingungen bedeutet keineswegs zwingend, daß diese Gene nicht exprimiert werden (zur Verdeutlichung: die Ergebnisse der vorliegenden Analyse sagen etwas über  $\sigma^S$ -Abhängigkeit aus, können aber nicht oder nur sehr bedingt zur Beurteilung der Stärke der Expression oder Induktion unter den betreffenden Bedingungen herangezogen werden). Möglicherweise benötigen Gene, die nur beim Übergang in die stationäre Phase in LB Medium unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen, zusätzliche Signale die durch Nährstofflimitation, Sauerstofflimitation oder erhöhte Zelldichte (Quorum Sensing), wie sie z.B. von Transkriptionsregulatoren wie z.B. CRP-cAMP oder ArcA oder anderen DNA-bindenden Proteinen wie Lrp oder H-NS vermittelt werden. Um in erster Näherung die Faktoren zu identifizieren, welche die Expression dieser Gene gemeinsam mit  $\sigma^S$  koregulieren, könnte etwa mit Microarrayexperimenten die Regulone von weiteren global wirkenden Transkriptionsregulatoren identifiziert und mit den Daten zum  $\sigma^S$ -Regulon abgeglichen werden. Gene die gleichzeitig im  $\sigma^S$ -Regulon und weiteren Regulonen erscheinen, wären Kandidaten für Koregulation und könnten dann im Detail untersucht werden. Prinzipiell wäre es auch möglich, die vorliegenden Daten mit der Literatur zu den vielen anderen globalen Transkriptionsanalysen in *E. coli* abzugleichen, um so Hypothesen über die Art der Koregulation dieser Gene aufzustellen. Allerdings ist die Vergleichbarkeit von Daten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gewonnen wurden, problematisch wie z.B. die Analyse von Logphasen-Kulturen einerseits und Kulturen aus der stationären Phase andererseits.

Zum Zeitpunkt der vorliegenden Analysen, waren etwa 87 Gene in der Literatur als  $\sigma^S$ -abhängig beschrieben. Es konnten 54 von diesen Genen in der Microarrayanalyse identifiziert werden (davon gehörten 36 Gene zur Kerngruppe). Für die Differenz von 33 Genen, die in der vorliegenden Analyse nicht als  $\sigma^S$ -abhängig identifiziert wurden, gibt es möglicherweise folgende Ursachen: (i) die relative Expressionsrate in der Microarrayanalyse liegt bei vielen dieser Gene nur knapp unter der Signifikanzgrenze von 2,0. Bei Genen mit geringer  $\sigma^S$ -Abhängigkeit könnten unterschiedliche Nachweissysteme und veränderte Wachstumsparameter in verschiedenen Arbeitsgruppen zu einer unterschiedlichen Bewertung von  $\sigma^S$ -Abhängigkeit führen, (ii) manche dieser Gene stehen unter der Kontrolle von mehreren Promo-

toren, die nicht alle  $\sigma^S$ -abhängig sind, wie z.B. *glgS* (Hengge-Aronis et al., 1992), *proP* (McLeod et al., 2000) oder *ftsQAZ* (Flardh et al., 1997) und (iii) einige Gene werden von Promotoren exprimiert, die sowohl  $\sigma^{70}$  als auch von  $\sigma^S$  aktiviert werden können, wie *osmE* (Bordes et al., 2000) und *csiE* (Marschall et al., 1995), was zu relativen Expressionsraten unterhalb der Signifikanzgrenze für  $\sigma^S$ -Abhängigkeit führt.

Während der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit publizierten (Patten et al., 2004) die Ergebnisse einer Globalanalyse zum  $\sigma^S$ -Regulon. Die Autoren fanden etwa 180 Gene als  $\sigma^S$ -aktiviert bei Wachstum bis OD 1,5 in LB Medium, denen 252 Gene der vorliegenden Arbeit gegenüberstehen, wenn vergleichbare experimentelle Bedingungen als Maßstab angelegt werden. Die Ergebnisse bezüglich der Anzahl von  $\sigma^S$ -abhängigen Genen korreliert gut zwischen beiden Arbeiten, da bei der vorliegenden Arbeit bis OD 4,0 kultiviert wurde und unter diesen Bedingungen mehr Gene zu erwarten sind, die unter  $\sigma^S$ -Kontrolle exprimiert werden. Insgesamt stehen die von (Patten et al., 2004) gefundenen Gene in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und insbesondere bestätigt sich die Konservierung der Kerngene im  $\sigma^S$ -Regulon. Außerdem fanden (Patten et al., 2004), daß die Zahl der von  $\sigma^S$  negativ regulierten Gene die der Positiven übersteigt. Besonders auffällig hierbei war die Zahl der Gene, die mit Flagellenbiosynthese, Chemotaxis und Motilität bzw. dem Citratcyclus assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der nichtmotile Stamm MC4100 (*flhDC*) und seine Derivate untersucht, so daß hier prinzipiell keine Aussagen bezüglich der  $\sigma^S$ -Abhängigkeit von Motilitätsgenen getroffen werden können. Mit der positiven Kontrolle von *pdhR* (Repressor der Pyruvatdehydrogenase) und *poxB* (Pyruvatoxidase) sowie der negativen Kontrolle von *sdhCDAB* (Succinatdehydrogenase) war aber auch hier der inhibierende Einfluß von  $\sigma^S$  auf den Citratcyclus zu erkennen. Mit den Ausnahmen *sdhCDAB* und *tktA* wurden in der vorliegenden Arbeit negativ regulierte Gene nicht in die weitere Auswertung genommen, da diese fast durchweg nur mit Ratios knapp überhalb der Signifikanzgrenze auftraten (außerdem zeigte keines der negativ regulierten Gene  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter allen drei getesteten Bedingungen) und darüberhinaus keine weiteren gemeinsamen regulatorischen Zusammenhänge (z.B. Zugehörigkeit zu einem Operon) erkennen ließen. Negative Regulation von Genen durch  $\sigma^S$  kann als indirekter Effekt über die Aktivierung eines Repressors solcher Gene durch den Sigmafaktor erklärt werden. Außerdem ist es denkbar, daß die Kompetition von  $\sigma^S$  und  $\sigma^{70}$  um das RNAP-Kernenzym sich negativ auf die Expression von  $\sigma^{70}$ -abhängig exprimierten Genen auswirkt.

Es war zu erwarten, daß die Gene der generellen Streßantwort in die Abwehr von schädlichen Einflüssen involviert sind, wie z.B. *dps* und *katE*, die oxidativem Streß oder *otsAB*, die osmotischem Streß entgegenwirken. In dieser Arbeit konnten weitere  $\sigma^S$ -abhängige Gene identifiziert werden, die direkt an der Abwehr von Streß beteiligt sind oder zuvor als Gene von Stimulonen spezifischer Streßantworten beschrieben waren. So zeigen z.B. die Gene des *sufABCDSE* Operons, welche an der Reparatur von oxidierten Fe-S-Clustern beteiligt sind (Djaman et al., 2004), deutliche  $\sigma^S$ -Abhängigkeit beim Übergang in die stationäre Phase und unter Säurestreß (siehe Anhang A.1). Zusätzlich stehen die Gene *dsbG* (periplasmatische

Disulfidisomerase), *hemH* (Ferrochelatase) und *yaiA* (hypothetisches Protein) unter  $\sigma^S$ -Kontrolle und sind gemeinsam mit den *suf* Genen Teil des 22 Gene umfassenden OxyR Regulons (Zheng et al., 2001), das durch Wasserstoffperoxid-Streß induziert wird. Weiterhin stehen viele Gene des pH-Stimulons (Tucker et al., 2002) unter Kontrolle von  $\sigma^S$ . Dabei ist *gadE* (Transkriptionsregulator der LuxR/FixJ-Familie) der zentrale Regulator der Säurestreßantwort (Ma et al., 2003b), besonders hervorzuheben (siehe auch unten).

Abgesehen von den Genen, die mit spezifischen Streßantworten assoziiert sind, lassen sich  $\sigma^S$ -abhängige Gene drei großen funktionellen Gruppen zuordnen: (i) Regulatoren (8%); (ii) Transporter und andere Membranproteine (14%) und (iii) Metabolismus (19%) (bzw. 14% Regulatoren, 25% Membranproteine und 33% Stoffwechsellzyme, bezogen auf alle Gene mit annotierter Funktion) (Abschnitt 3.1.4). Die Remodelierung der Membranprozesse ist damit ein wichtiger Bestandteil der generellen Streßantwort. Auf diese Weise könnten z.B. spezialisierte Transportsysteme welche bei Nährstoff-Limitation operieren zum Überleben der Zelle unter Hungerbedingungen beitragen und Effluxpumpen die Resistenz gegen toxische Stoffe erhöhen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, stehen die Gene der Effluxpumpe MdtEF unter  $\sigma^S$ -Kontrolle. Untersuchungen von (Kobayashi et al., 2006) ergaben, daß dieses System in der stationären Phase induziert wird und *E. coli* vor toxischen Stoffen schützt. Weiterhin hat  $\sigma^S$  einen größeren Einfluß auf den Energiestoffwechsel als bisher vermutet und steuert möglicherweise den Übergang vom Wachstums- zum Erhaltungsstoffwechsel in hungernden oder gestreßten Zellen (Abschnitt 3.1.5). So stehen Enzyme der Glykolyse, Fermentation, Atmungskette, Nitratatmung und des Pentosephosphatzyklus unter Kontrolle von  $\sigma^S$ . Diese Daten legen nahe, daß  $\sigma^S$  die Zelle auf einen Wechsel vom aeroben und oxidativen Energiestoffwechsel hin zur anoxischen Atmung und Fermentation vorbereitet. Für das Kerngen *narU* (Nitrattransporter) wurde gezeigt, daß seine Expression in der stationären Phase zunimmt und es *E. coli* einen selektiven Vorteil bei drastischer Nährstofflimitation und allgemein vermindertem Wachstum verschafft (Clegg et al., 2006). Die Untersuchungen von (Jung et al., 2005) bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß die Isoenzyme des Pentosephosphatzyklus TktA und TktB sowohl  $\sigma^S$ -abhängig als auch antagonistisch expriert werden. Bereits (Xu et al., 1995a) zeigten, daß die Gene der Succinatdehydrogenase (*sdhCDAB*) negativ von  $\sigma^S$  reguliert werden, wie in dieser Arbeit und auch von (Patten et al., 2004) bestätigt. Die präventive Umstellung auf anoxischen Stoffwechsel schützt die Zelle möglicherweise auch vor reaktiven Sauerstoffspezies der Atmungskette beim Eintritt in die stationäre Phase (Dukan et al., 1998).

## 4.1.2 Faktoren der Sigmaselektivität

### 4.1.2.1 Die $\sigma^S$ -Promotor Konsensussequenz

Unter den insgesamt 481 als  $\sigma^S$ -abhängig identifizierten Genen, gibt es eine Gruppe von 140 Genen (Kerngene), welche unter allen untersuchten Bedingungen  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigten. Für diese Gene war es plausibel anzunehmen, daß ihre Transkription direkt von  $\sigma^S$  aktiviert

wird und deshalb stromaufwärts vom codierenden Bereich die  $\sigma^S$ -Promotor Konsensussequenz konserviert sein sollte. Ausgehend von den 140 Kerngenen konnte mit den Motivsuch-Programmen MEME und BioProspector für diese Gene ein konserviertes DNA-Sequenzmotiv innerhalb der 200 Nukleotide stromaufwärts vom Startcodon gelegenen Region gefunden werden (Abschnitt 3.1.7). Das Konsensusmotiv lautet TCTATACTTAA (bzw. KCTAYRCTTAA unter Berücksichtigung des zweithäufig vorkommenden Nukleotids, wenn dieses in mehr als 30% aller Sequenzen auftrat). Diese Sequenz stellt eine erweiterte Version (Nukleotide -14 bis -4) der -10 Promotorregion von  $\sigma^S$ , wie sie in bisherigen Untersuchungen gefunden wurde. Dabei hat das in der vorliegenden Arbeit gefundene -10 Motiv alle Eigenschaften, die aufgrund von experimentellen Befunden als wichtig für die Promotorerkennung und -aktivierung durch  $\sigma^S$  erachtet werden (Becker et al., 2001; Espinosa-Urgel et al., 1996a; Hengge-Aronis et al., 2002; Lee et al., 2001). Dabei interagieren T (-14) und insbesondere C (-13) mit einer spezifischen Aminosäure (K173) in Region 3.0 (2.5) von  $\sigma^S$  (Becker et al., 2001). Die starke Konservierung von T (-12), A (-11) und T (-7) reflektiert die besondere Bedeutung dieser Nukleotide beim Schmelzen des Promotors durch  $\sigma^S$  (Lee et al., 2003; Lee et al., 2002; Lee et al., 2001). Das TAA Motiv (-6 bis -4) wurde in einer Arbeit zum *rssAB* Promotor als stimulierend für die  $\sigma^S$ -abhängige Transkription in der stationären Phase gefunden (Pruteanu et al., 2002). Von (Lacour et al., 2003) wurde C anstatt T in Position -12 als selektiv für  $E\sigma^S$  transkribierte Promotoren vorgeschlagen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber, daß C (-12) mit einem Vorkommen von 5% in der -10 Region von  $\sigma^S$ -abhängigen Promotoren deutlich unterrepräsentiert ist. C (-12) anstatt T (-12) wirkt sich ungünstig auf die Aktivierung der Transkription aus, wird aber von  $\sigma^S$  besser toleriert als von  $\sigma^{70}$ . Dennoch ist es kein charakteristisches Merkmal einer  $\sigma^S$ -typischen -10 Region. Bei vielen aber nicht allen 140 Kerngenen ist das erweiterte -10 Motiv mit bis zu zwei Abweichungen zu finden. Für das Fehlen dieses Motivs bei den übrigen Genen gibt es verschiedene Erklärungen: (i) der Promotor mancher Gene befindet sich stromaufwärts des hier untersuchten Bereichs von 200 Nukleotiden (das gilt z.B. für *osmY* [Lange et al., 1993]), (ii) einige Gene sind in einem Operon lokalisiert und der Promotor befindet sich somit weit außerhalb der hier untersuchten Region und (iii) andere Gene stehen möglicherweise unter der Kontrolle eines  $\sigma^S$ -abhängigen Aktivators, aber ihre Transkription wird von  $\sigma^{70}$  initiiert.

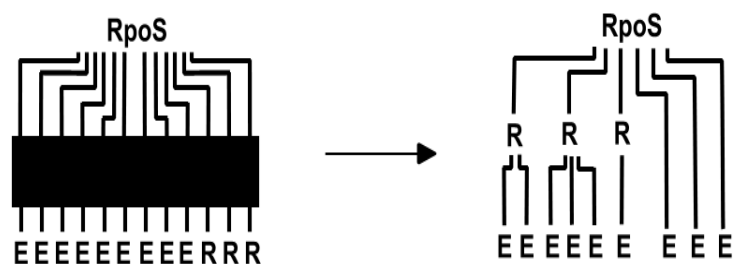
#### 4.1.2.2 Die Rolle von Lrp bei der Sigmaselektivität

Wie bereits in der Einleitung erläutert, erkennen  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^S$  identische Promotoren *in vitro*. Da beide Sigmafaktoren verschiedene, wenn auch überlappende Regulone kontrollieren, existieren Faktoren, welche für Sigmaselektivität an den Zielpromotoren *in vivo* sorgen. Wenn beide Sigmafaktoren die gleichen Zielgene unter verschiedenen Bedingungen aktivieren, sind *cis*-Elemente in der Promotorregion welche den einen oder den anderen Sigmafaktor begünstigen, nicht ausreichend für diese Art der differentiellen Regulation. Bei der Glutamat-abhängigen Säureresistenz ist dieses Problem dadurch gelöst, daß  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^S$

zwei verschiedene Signalwege aktivieren, welche beide auf den zentralen Regulator GadE hin konvergieren. Es kann aber auch der gleiche Promotor von beiden Sigmafaktoren unter verschiedenen Bedingungen genutzt werden. So wird die *dps* Transkription einerseits von  $\sigma^{70}$  unter Wasserstoffperoxid-Stress in der Logphase und andererseits von  $\sigma^S$  beim Übergang in die stationäre Phase und unter anderen Stressbedingungen vom gleichen Promotor aktiviert. Dabei ist der Transkriptionsfaktor OxyR essentiell für die  $\sigma^{70}$  abhängige Expression von *dps* in der Logphase aber nicht für die  $\sigma^S$ -abhängige Transkription (Altuvia et al., 1994). Für *osmY* wurde gezeigt, daß die Transkription sowohl von  $\sigma^{70}$  als auch von  $\sigma^S$  initiiert werden kann, aber Lrp, CRP-cAMP und IHF in der Promotorregion binden und sowohl *in vivo* wie *in vitro* die  $\sigma^S$ -abhängige Transkription begünstigen (Colland et al., 2000). Auch für *osmC* und *aidB* wurde Lrp als den Einfluß der beiden Sigmafaktoren regulierenden Faktor diskutiert (Bouvier et al., 1998; Landini et al., 1996). Vor dem Hintergrund, daß mehr als die Hälfte der 140  $\sigma^S$ -abhängigen Kerngene von Lrp reprimiert sind (Tani et al., 2002), wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Lrp als Faktor der Sigmaselektivität im globalen Maßstab untersucht. Es wurden 28 Gene identifiziert, welche mehr als zweifach gestiegene  $\sigma^S$ -Abhängigkeit in der *lrp* Mutante zeigten (Abschnitt 3.1.8). Davon sind die Hälfte durch Lrp reprimiert (Tani et al., 2002). Bei 13 Genen war verminderte oder gänzlich fehlende  $\sigma^S$ -Abhängigkeit im *lrp* negativen Hintergrund zu beobachten. Hierbei war insbesondere das *csiD-ygaF-gabDTP* Operon auffällig, welches in der *lrp* Mutante die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit verliert und bei dem Lrp schon als positiver Modulator des *csiD* Promotors beschrieben wurde (Germer et al., 2001). Die Mechanismen welcher der Lrp vermittelten Sigmaselektivität zugrunde liegen, könnten zum einen indirekte Effekte über veränderte DNA-Topologie sein, zum anderen direkte Interaktionen in der Promotorregion. Durch Bindung von mehreren Lrp-Molekülen an benachbarten Stellen kommt es zur starken Krümmung der DNA und Bildung von Nukleoproteinkomplexen höherer Ordnung (Wang et al., 1993a; Wang et al., 1993b). Solche DNA Superstrukturen könnten die Genexpression negativ kontrollieren in einer Weise welche von  $\sigma^{70}$  schlechter als von  $\sigma^S$  toleriert wird. Möglicherweise beeinflusst Lrp auch die topologische Positionierung der -35 und -10 Region relativ zueinander. Es ist bekannt, daß  $\sigma^S$  Abweichungen von einer optimalen Spacerregion zwischen -35 und -10 besser toleriert als  $\sigma^{70}$  (Typas et al., 2006). Von (Shultzaberger et al., 2006) wurde aufgrund von Untersuchungen an  $\sigma^{70}$  Promotoren vorgeschlagen, daß Lrp aktivierend wirkt, indem es stromaufwärts und in Nähe der -10 Region bindet und dadurch die Interaktion zwischen der  $\alpha$ -CTD (carboxyterminale Domäne) der RNAP und CRP stabilisiert, aber reprimierend wirkt, wenn es direkt in der -10 Region bindet. Eventuell werden auf diese Weise bei  $\sigma^S$ -abhängigen Genen mit zwei Promotoren der  $\sigma^{70}$  Promotor reprimiert oder aktiviert, so daß sich insgesamt die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit verändert, wenn beide Promotoren zur selben Zeit aktiv sein können.

### 4.1.3 Regulatorische Module innerhalb des $\sigma^S$ -Netzwerks von *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 481 Gene als  $\sigma^S$ -abhängig identifiziert, davon 140 Gene welche unter allen getesteten Bedingungen  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigten und deshalb als Kerngene der generellen Streßantwort bezeichnet werden. Es stellte sich die Frage, wie die Regulation dieser Gene im Detail erfolgt. Im simpelsten Fall steht die Transkription eines Genes unter direkter Kontrolle eines  $\sigma^S$ -spezifischen Promotors und folgt einfach der  $\sigma^S$ -Aktivität. Bakterielle Genexpression ist u.a. von multipler Signalintegration und verzweigten, mehrstufigen und redundanten Aktivierungswegen gekennzeichnet (Shen-Orr et al., 2002) und eindimensionale Signalkaskaden vom Stimulus über den Sigmafaktor zum Targetpromotor eher die Ausnahme als die Regel sind.  $\sigma^S$  ist der zentrale Regulator, der die Expression von sowohl Effektorgenen als auch weiteren Regulatoren kontrolliert. Zwischen  $\sigma^S$  und seinen Targetgenen befindet sich bildlich gesprochen eine „Blackbox“, eine Zone unbekannter regulatorischer Vorgänge, welche die Kommunikation zwischen  $\sigma^S$  und den Zielgenen vermittelt. Diese Blackbox stellt die Binnenstruktur, die interne Verschaltung des  $\sigma^S$ -Netzwerkes, dar. Um in einer ersten Näherung die regulatorischen Vorgänge innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes zu beleuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit insbesondere der Einfluß von mehreren  $\sigma^S$ -abhängigen Faktoren mit regulatorischer Funktion untersucht. Potenziell kontrollieren  $\sigma^S$ -abhängige Regulatoren eine Untermenge von  $\sigma^S$ -abhängigen Genen und eine solche Untermenge stellt gemeinsam mit ihrem Regulator ein regulatorisches Modul innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes dar (Abbildung 51). Um die Targetgene eines  $\sigma^S$ -abhängigen Regulators zu identifizieren, sollte die globale Genexpression zwischen Wildtypstamm und Regulatormutante beim Übergang in die stationäre Phase mittels Microarrayanalyse miteinander verglichen werden. Diesem Ansatz folgend wurden verschiedene Regulatoren aus der Menge der 140 Kerngene untersucht: (i) die GGDEF/EAL-Proteine YdaM und YciR (ii) die Transkriptionsfaktoren GadE, GadX und YiaG (putativ), (iii) die putative Serinkinase YeaG sowie (iv) die putative mRNA-spezifische Endonuklease YjgH.



**Abbildung 51:** Auflösung des RpoS Netzwerkes in regulatorische Module.  $\sigma^S$  kontrolliert die Expression einer Vielzahl von Effektor (E) - und Regulatorgenen (R), wobei die regulatorischen Details (direkte oder indirekte Kontrolle) unbekannt sind (RpoS - schwarzer Kasten - E/R). Microarrayanalysen mit  $\sigma^S$ -abhängigen Regulatoren identifizieren deren Targetgene.  $\sigma^S$ -abhängige Targetgene und deren  $\sigma^S$ -abhängige Regulatoren bilden ein regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk ( $\sigma^S$  - R - E), andere Gene stehen unter direkter Kontrolle von RpoS ( $\sigma^S$  - E).

In der Tat sind die GGDEF/EAL-Faktoren YdaM und YciR Teile eines komplexen regulatorischen Moduls (Abschnitt 3.2) innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes, wie weiter unten ausführlich diskutiert. Mit dieser Arbeit wurde auch zum erstenmal gezeigt, daß c-di-GMP eine Komponente in der Regulation  $\sigma^S$ -abhängiger Gene ist. Auch die  $\sigma^S$ -abhängigen Regulatoren GadE und GadX konnten gemeinsam mit ihren Targetgenen als regulatorisches Modul in das  $\sigma^S$ -Netzwerk eingeordnet werden (Abschnitt 3.4). GadE und GadX kontrollieren die Gene der Glutamat-abhängigen Säurestressantwort und andere Gene des pH-Stimulons. Gleichzeitig stehen die Säurestressgene auch unter RpoS-unabhängigen Regulation, die durch EvgAS/YdeO vermittelt wird (Masuda et al., 2003). Ähnliche Verhältnisse bieten sich auch bei den Genen des OxyR Regulons (Zheng et al., 2001), welches durch Wasserstoffperoxid-Stress stimuliert wird. Wie an anderer Stelle erläutert, stehen 10 dieser insgesamt 22 Gene unter  $\sigma^S$ -Kontrolle und werden beim Übergang in die stationäre Phase unabhängig von OxyR exprimiert. Die Regulation der Säureresistenzgene und der Gene des OxyR-Regulons deutet auf ein allgemeines regulatorisches Motiv der generellen Stressantwort hin. In beiden Fällen können Effektoren spezifischer Stressantworten über einen alternativen,  $\sigma^S$ -abhängigen Signalweg aktiviert werden. Anstatt, beispielsweise durch Genduplikation, Paraloge unter die Kontrolle verschiedener Signalwege zu stellen, nutzt die Zelle ihr regulatorisches 'Potential' um die gleichen Effektorsysteme in verschiedenen Kontexten, der spezifischen und der generellen Stressantwort, wiederzuverwenden. In der Tat folgt die Zelle auch hier einem modularen Ansatz, bei dem komplette Untergruppen von Effektoren durch verschiedene übergeordnete Regulatoren kontrolliert werden.

Die Identifikation regulatorischer Module durch Analyse von  $\sigma^S$ -abhängigen Regulatoren verläuft nicht zwangsläufig so erfolgreich wie in den vorhergehenden Beispielen diskutiert. Die Analysen zu den RpoS-abhängigen Regulatoren *yiaG*, *yeaG* und *yjgH* führte in keinem Fall zu einem klaren Ergebnis (Abschnitt 3.5). In allen drei Fällen ergab die Microarrayanalyse keinen Hinweis darauf, daß diese Faktoren  $\sigma^S$ -abhängige Gene kontrollieren und ein regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk kontrollieren. Mehrere Erklärungen sind denkbar. Zunächst ist für alle diese Gene die Funktion nur aufgrund der Gensequenz vorhergesagt, aber in keinem Fall wurde eine solche *in vivo* oder *in vitro* gezeigt und das bedeutet, daß diese Faktoren eventuell keine regulatorische Funktion haben. Für YeaG (putative Serinkinase) und YjgH (putative mRNA-spezifische Endonuklease) ist möglicherweise die globale Transkriptionsanalyse nicht die geeignete Methode um Targets zu finden, da für beide eine Funktion auf posttranskriptioneller Ebene vorhergesagt ist. YjgH sollte aber auch Effekte auf das Transkriptom zeigen, wenn es den Abbau bestimmter mRNAs katalysiert. Auch die Proteomanalyse von YeaG und YjgH brachte keine eindeutigen Ergebnisse, wobei zu berücksichtigen ist, daß diese Methode nicht die Expression aller Gene erfaßt. YeaG reguliert möglicherweise die Aktivität eines Stoffwechsellenzym und der Nachweis eines solchen Effektes entzieht sich den in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Überraschenderweise zeigte die Microarrayanalyse für den putativen Transkriptionsregulator YiaG keine differentiell regulierten Gene. Wahrscheinlich ist alleine die Expression



dieses Regulators nicht ausreichend, um auf die Targetgene zu wirken, sondern es wird ein weiterer Faktor benötigt. Leider existieren keine weiteren Hinweise auf die mögliche Natur (ein kleines Molekül, Temperatur, etc.) eines solchen putativen Faktors. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die Expression von *yiaG* zusätzlich auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird. So könnte die Stabilität der mRNA oder die Proteinstabilität von YiaG durch Temperatur kontrolliert sein, wie z.B. für  $\sigma^{32}$  gezeigt (Nagai et al., 1991; Straus et al., 1987).

## 4.2 C-di-GMP vermittelte Regulation im $\sigma^S$ -Netzwerk

### 4.2.1 GGDEF/EAL Proteine im $\sigma^S$ -Netzwerk

Die Globalanalyse des  $\sigma^S$ -Regulons ergab, daß 7 der insgesamt 28 GGDEF/EAL Gene in *E. coli* MC4100 (im Gegensatz zum Referenzstamm MG1655 fehlt diesem Stamm das Gen *yahA*)  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden. Es waren  $\sigma^S$ -abhängig (i) *ydaM* (GGDEF) und *yciR* (GGDEF/EAL) unter allen 3 getesteten Bedingungen; (ii) *yddV* (GGDEF) und *yedQ* (GGDEF) beim Übergang in die stationäre Phase und osmotischen Streß; (iii) *ycgG* (EAL) und *yeal* (GGDEF) nur bei osmotischen Streß und (iv) *ydiV* (EAL) nur bei Säurestreß. Die Expression der Gene *ydaM*, *yciR*, *yddV* und *yedQ* wurde mittels *lacZ*-Reporterfusionen im Detail weiter untersucht und dabei ihre  $\sigma^S$ -Abhängigkeit bestätigt (Diplomarbeit von Christina Pesavento). Unter Berücksichtigung, daß einerseits ca. 10% aller Gene in *E. coli*  $\sigma^S$ -abhängig sind, andererseits 25% aller GGDEF/EAL Gene unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen, sind die GGDEF/EAL Gene im  $\sigma^S$ -Regulon überrepräsentiert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere GGDEF/EAL Gene  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden, allerdings nur unter spezifischen Wachstumsbedingungen wie z.B. auch für *csgB* gezeigt (Olsen et al., 1993b). Insgesamt legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, daß c-di-GMP eine wichtige Rolle im  $\sigma^S$ -Netzwerk spielt und Prozesse der generellen Streßantwort koordiniert und bildeten somit den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß YdaM (GGDEF) und YciR (GGDEF/EAL) die Expression von aggregativen Fimbrien (Curli) in *E. coli* beeinflussen (Abschnitt 3.2.2). Diese Faktoren regulieren antagonistisch die Curlysynthese, indem YdaM die *csgD* Transkription stimuliert und YciR diese inhibiert (Abschnitt 3.2.5). In *S. typhimurium* inhibierte die Überexpression von STM1703 (entspricht YciR in *E. coli*) die Cellulosesynthese und in einer Mutante von STM1703 war die Celluloseproduktion erhöht (Garcia et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen mit diesen Beobachtungen in voller Übereinstimmung, auch wenn die Autoren die Wirkung von STM1701 auf die *csgD* Expression und Curlysynthese nicht untersucht haben. In *S. typhimurium* wurde gefunden, daß die *csgD*-Expression von den GGDEF/EAL Proteinen STM2123 und STM3388 kontrolliert wird (Kader et al., 2006). Interessanterweise sind STM2123 und STM3388 beides Membranproteine und ihren funktionellen Verwandten aus *E. coli*, den im Cytoplasma lokalisierten YdaM und YciR, nicht weiter ähnlich. Umgekehrt gibt es in *S. typhimurium* kein

Protein, welches dem YdaM in *E. coli* entspricht. Ohnehin unterscheiden sich die Sätze an GGDEF/EAL Proteinen in den beiden nahverwandten Species überraschend deutlich: den insgesamt 29 GGDEF/EAL Proteinen in *E. coli* K12 stehen nur 19 in *S. typhimurium* gegenüber und im Gegensatz zu *E. coli* sind bei *S. typhimurium* diese Proteine überwiegend in der inneren Membran verankert (Romling et al., 2005b). In einem kürzlich vorab publizierten Manuskript (Simm et al., 2007) wurde die Rolle aller Proteine mit EAL-Domäne in *S. typhimurium* untersucht. Dabei beobachteten die Autoren einen deutlich negativen Effekt von STM1703 (*ycaR*) auf die *csgD* Expression und Biofilmbildung und bestätigten damit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Weiterhin konnten mit STM1827 (*yoaD*), STM3611 (*yhjH*) und STM4264 (*yjcC*) weitere EAL-Proteine mit Effekten auf die Expression von *csgD* identifiziert werden. Insgesamt sind damit bei *S. typhimurium* sechs verschiedene GGDEF/EAL-Proteine mit Effekten auf die Curliexpression beschrieben. Künftige Untersuchungen werden zeigen, inwiefern sich diese Ergebnisse auch bei *E. coli* wiederfinden. Dabei müssen aber unterschiedliche genetische Hintergründe (*E. coli* MC4100 ist nicht motil und bildet keine Cellulose) und verschiedene experimentelle Bedingungen (Flüssigkultur oder Biofilm auf Platte) berücksichtigt werden. Offensichtlich ist mit c-di-GMP ein generelles Prinzip der Curliregulation in zwei sich genetisch sehr ähnlichen Species konserviert, aber die Details der Regulation sind unterschiedlich und Forschungsergebnisse deshalb nur bedingt übertragbar.

Die anderen 5  $\sigma^S$ -abhängigen GGDEF/EAL Gene *yddV*, *yedQ*, *ycgG*, *yeaI* und *ydiV* zeigten keinen Phänotyp auf Kongorotplatten oder im Sedimentationsassay (Abschnitt 3.2.2) und ihre Funktion bleibt weiterhin unklar. Wahrscheinlich haben YeaI und YdiV keine Guanylatcyclase- bzw. Phosphodiesteraseaktivität, da die Aminosäuresequenz im Bereich des katalytischen Zentrums vom Konsensus abweicht (EGEEG anstatt GGDEF bei YeaI und ELI anstatt EAL bei YdiV), was ihre funktionelle Einordnung weiter erschwert. In der Arbeit von (Mendez-Ortiz et al., 2006) führte Überexpression von YddV in der frühen Logphase zu einem erhöhtem zellulären c-di-GMP Spiegel und differentieller Expression von etwa 50 Genen. Die Effekte auf die Genexpression sind mit großer Wahrscheinlichkeit allgemein auf die c-di-GMP Induktion zurückzuführen und keineswegs spezifisch für YddV. Auch die Betrachtung der 50 differentiell regulierten Gene als das c-di-GMP Stimulon ist kritisch, da die Überexpression von regulatorischen Genen leicht pleiotrope Effekte auslösen kann. Das Gen *yddU* welches für ein GGDEF/EAL Protein codiert, bildet mit *yddV* ein Operon (Mendez-Ortiz et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde *yddU* nicht als  $\sigma^S$ -abhängiges Gen identifiziert, da bereits *yddV* nur sehr schwache  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigte und die relativen Expressionlevel des im Operon dahinterliegende *yddU* unterhalb der Signifikanzgrenze lagen. YddU (Dos) ist ein Sauerstoff-bindendes Hämprotein (Delgado-Nixon et al., 2000), welches *in vivo* unter aeroben Bedingungen den cytoplasmatischen c-di-GMP Spiegel kontrolliert (Yoshimura-Suzuki et al., 2005). Darüber hinaus zeigt eine YddU Mutante Defekte bei der Zellteilung (Mendez-Ortiz et al., 2006), veränderte Zellmorphologie und vermindertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp (Yoshimura-Suzuki et al., 2005). Alle diese

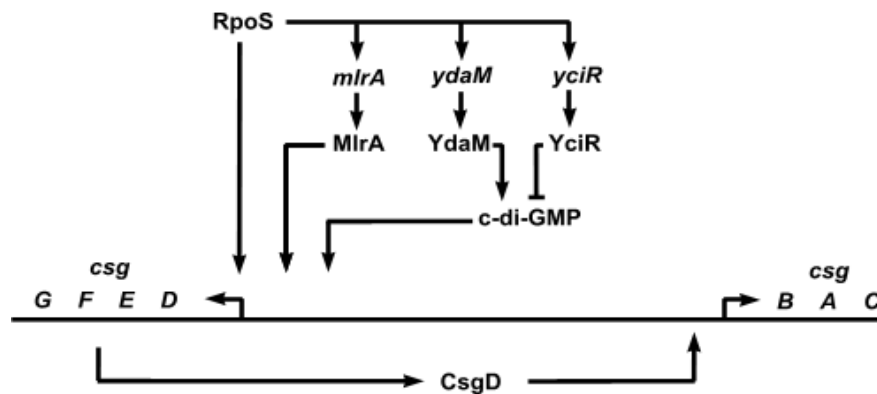
Effekte konnten bei Untersuchungen an YddU im Rahmen dieser Arbeit (Ergebnisse nicht gezeigt) nicht gefunden werden. Eventuell ist dies auf unterschiedliche Stammhintergründe und Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. Um die Funktion der übrigen  $\sigma^S$ -abhängigen GGDEF/EAL Gene zu identifizieren, könnte zuerst mittels *lacZ*-Reporterfusionen die Wachstumsbedingungen ausgetestet werden, unter denen diese Gene am stärksten exprimiert werden, um sie anschließend unter eben diesen Bedingungen mittels Microarrayanalyse zu untersuchen. Aufgrund seiner Nähe zum *csgD* Operon auf dem *E. coli* Chromosom, wurde in der vorliegenden Arbeit auch das GGDEF-Gen *yedT* untersucht (Ergebnisse nicht dargestellt). Die *yedT* Mutante zeigte keinen Phänotyp auf Kongorotplatten und in der Sedimentationsanalyse und mit der Microarrayanalyse (Übergang in die stationäre Phase bei 28° C in LB) konnten keine durch *yedT* regulierten Gene identifiziert werden. Insgesamt wurden durch die vorliegende Arbeit erstmalig GGDEF/EAL Proteine bzw. das bakterielle Signalmolekül c-di-GMP in den Kontext des  $\sigma^S$ -Netzwerkes gestellt und damit die Basis für künftige Untersuchungen auf diesem Gebiet geschaffen.

#### 4.2.2 YdaM und YciR kontrollieren die Curliexpression und sind Teil eines regulatorischen Moduls im $\sigma^S$ -Netzwerk

Die Curliexpression unterliegt einer sehr komplexen Regulation, welche überwiegend am *csgD* Promotor stattfindet (für eine Zusammenfassung siehe Gerstel et al., 2003). Bereits (Olsen et al., 1993b) zeigten, daß die *csgD*-Transkription  $\sigma^S$ -abhängig ist und (Brown et al., 2001) beschrieben MlrA (ein MerR-ähnlicher Transkriptionsfaktor) als einen essentiellen Faktor der Curli-Expression der ebenfalls  $\sigma^S$ -abhängig ist. Mit YciR und YdaM sind zwei weitere  $\sigma^S$ -abhängige Regulatoren an der Curliexpression beteiligt, welche die Transkription von *csgD* kontrollieren. Damit wird die Expression von *csgD* durch eine multiple 'Feedforward-Schleife' (Mangan et al., 2003) kontrolliert, d.h. der *csgD* Promotor steht unter direkter (Robbe-Saule et al., 2006) und mehrfach indirekter Kontrolle des Sigmafaktors (Abbildung 2).  $\sigma^S$  aktiviert die Transkription des MerR-ähnlichen Regulators MlrA, welcher essentiell für die Transkription von *csgD* ist. Außerdem stehen die GGDEF/EAL Proteine YdaM und YciR unter  $\sigma^S$ -Kontrolle und generieren ein weiteres wichtiges Signal für die *csgD* Transkription. Dieser multiple Signalinput, der auf die Aktivierung der *csgD* Transkription hin konvergiert, kann im Sinne einer Signalverstärkung und eines Rauschfilters wirken. Dabei ergibt sich die Signalverstärkung durch die parallel wirkenden Aktivatoren  $\sigma^S$ , MlrA und c-di-GMP und die Filterfunktion ist eine Eigenschaft von 'Feedforward-Schleifen' des Typs 'Kohärent I' (Mangan et al., 2003), wie sie in diesem Fall vorliegt. Kohärente 'Feedforward-Schleifen' sind Detektoren für Stetigkeit, d.h. kurze Signale werden verworfen und nur langanhaltende Signale können Effekte setzen (Mangan et al., 2003). Dieser Signalmechanismus erscheint bei der Curliexpression und Biofilmbildung durchaus angebracht, da Curliexpression und Biofilmbildung Entwicklungsprozesse darstellen, die an eine langfristige Überlebensstrategie geknüpft und nicht einfach umkehrbar sind.

Es stellt sich die Frage, welche konkrete Rolle YdaM und YciR in diesem Regulationskonzept zukommt. Mit ihren PAS-Domänen agieren YdaM und YciR als Sensoren für bis jetzt unbekannte Signale und modulieren den c-di-GMP Pool, welcher die Transkription von CsgD kontrolliert. Offensichtlich sind Bedingungen, welche die generelle Streßantwort auslösen, notwendig aber nicht hinreichend, um Curliexpression zu erzielen, wie schon die Temperaturabhängigkeit dieses Phänotyps zeigt. Mit YdaM und YciR stehen also Spezifitätsfaktoren bereit, die nur unter bestimmten Bedingungen Curliexpression zulassen. Da die Transkription von *csgD* unter Temperaturkontrolle steht, ist YdaM möglicherweise ein Thermosensor. So könnte es sein, daß YdaM bei 37° abgebaut wird und infolge dessen kein c-di-GMP generieren kann. Bei 28° wäre YdaM dagegen stabil und könnte über die Synthese von c-di-GMP die *csgD* Transkription stimulieren. Tatsächlich entspricht die C-terminale Aminosäuresequenz (LAA) von YdaM exakt dem Teil des *ssrA*-Tags welcher von der ClpXP Protease erkannt wird (Levchenko et al., 2000) und YdaM ist aufgrund der Untersuchungen von (Flynn et al., 2003) mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Substrat der ClpXP Protease *in vivo*. Mit HmsT aus *Yersinia pestis* wurde bereits ein GGDEF Protein beschrieben welches bei 37° abgebaut aber bei 26° stabil ist (Perry et al., 2004). Insgesamt erscheint YdaM als ein plausibler Kandidat für den bisher unbekanntem Thermosensor der Curliexpression und Degradationsstudien bei unterschiedlichen Temperaturen mit YdaM werden diese Frage klären können (erste Versuche scheiterten an der schlechten Detektierbarkeit von YdaM im Immunoblot, Daten hier nicht gezeigt).

Microarrayanalysen ergaben, daß YdaM und YciR und auch MlrA keine globalen Regulatoren sind, sondern (unter den getesteten Wachstumsbedingungen) ausschließlich die Expression der Curligene kontrollieren (Abschnitt 3.2.5). Globale Transkriptionsanalysen von (Brombacher et al., 2006) zeigten dagegen, daß CsgD außer den Curligenen auch *yaiC* und 6 weitere Gene in *E. coli* reguliert. Anzumerken ist allerdings, daß die Autoren *csgD* von einem Plasmid überexprimierten und damit möglicherweise pleiotrope Effekte auf die Genexpression provozierten. Auch in *Salmonella* wurde *yaiC* (dort *adrA* genannt) als *csgD* abhängiges Gen beschrieben, welches die Expression der Gene für die Cellulosesynthese kontrolliert (Romling et al., 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man erwarten, daß in der Globalanalyse von YdaM und YciR zumindest *yaiC* als weiteres differentiell reguliertes Gen erscheint. Tatsächlich ergaben Analysen mit *lacZ*-Reporterfusionen von *yaiC*, daß dieses später in der stationären Phase und YdaM-abhängig exprimiert wird (Diplomarbeit von Christina Pesavento). Offensichtlich zeigt die Regulation durch YdaM, YciR und CsgD auch eine zeitliche Dynamik, welche nicht durch ein Microarrayexperiment zu einem einzelnen Zeitpunkt erfaßt werden kann. Weitere Microarrayanalysen in einer späteren Wachstumsphase werden zeigen, ob noch mehr Gene dem YdaM/YciR-Regulon zugehören. Insgesamt können aufgrund der bestehenden Ergebnisse mit Sicherheit die Curli Strukturgene *csgEFG* und *csgBAC* gemeinsam mit ihren Regulatoren MlrA, YdaM, YciR und CsgD als regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk eingeordnet werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Die Curliexpression als regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk.  $\sigma^S$  (RpoS) aktiviert die Transkription von *mlrA*, *ydaM* und *yciR*. MlrA aktiviert die Expression des *csgD* Operons, YdaM und YciR wirken antagonistisch auf die c-di-GMP vermittelte Aktivierung des *csgD* Promotors. CsgD aktiviert die Expression der Curlistrukturgene im benachbarten divergent transkribierten Operon. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur Faktoren der Curliexpression dargestellt, welche unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen (für eine umfassende Darstellung weiterer Regulatoren der Curliexpression siehe Abbildung 7 in der Einleitung).

Da der in dieser Arbeit verwendete Stamm MC4100 weder motil ist (*flhDC*) noch Cellulose bildet (Zogaj et al., 2001), entgehen hier möglicherweise weitere interessante Effekte der Regulation durch YdaM und YciR. Andere *E. coli* Stämme zeigen negativen Einfluß von  $\sigma^S$  auf Flagellen- und Motilitätsgene (Patten et al., 2004) und sind in der Lage Cellulose zu bilden. Da GGDEF/EAL Proteine allgemein eine Rolle beim Übergang zwischen Sessilität und Motilität spielen und in *Salmonella* eine wichtige Funktion bei der Cellulosesynthese haben, kann mit dem Stamm MC4100 alleine nicht das volle Ausmaß der c-di-GMP Regulation in *E. coli* verstanden werden. Tatsächlich deuten die Ergebnisse einer Microarray-analyse mit dem motilen Stamm *E. coli* MM335 daraufhin hin, daß sich Flagellensynthese und Curliexpression antagonisieren (Daten hier nicht gezeigt). Im Gegensatz zum nichtmotilen Stamm MC4100 zeigt MM335 starke Expression der Flagellengene, aber keine Expression von Curli, bei Wachstum in LB bis OD 4,0. In Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen (Simm et al., 2004) ist es naheliegend, daß dieser Effekt durch die Phosphodiesterase *yhjH* vermittelt wird. Eine Mutation von *yhjH* im Stamm MM335 führte aber nicht zu veränderter Curliexpression, wie durch *lacZ*-Reporterfusionen von *csgB* gezeigt wurde (Diplomarbeit von Anika Mehli). Möglicherweise stimuliert die Flagellenexpression die Phosphodiesteraseaktivität von YciR welche sich negativ auf die Transkription von *csgD* auswirken könnte. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß Motilität die  $\sigma^S$  Aktivität unterdrückt und damit die Curliexpression auf einer höheren regulatorischen Ebene negativ beeinflusst. Tatsächlich kontrolliert  $\sigma^S$  selbst den Antagonismus zwischen Motilität und Biofilmbildung, indem es einerseits die Flagellen- und Motilitätsgene reprimiert (Patten et al., 2004) und andererseits die Curliexpression aktiviert (Olsen et al., 1993b).

### 4.2.3 Wo liegt der Wirkort von c-di-GMP bei der YdaM/YciR-abhängigen Regulation der *csgD* Transkription?

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur gezeigt, daß die GGDEF/EAL Proteine YdaM und YciR die Expression von CsgD kontrollieren, sondern daß es sich tatsächlich um Guanylatcyclasen bzw. Phosphodiesterasen handelt (Abschnitt 3.2.6 und 3.2.7). Damit ist c-di-GMP mit großer Wahrscheinlichkeit ein Signalstoff, der die Vorgänge bei der *csgD* Transkription kontrolliert. Der genaue Mechanismus wie c-di-GMP im Detail auf die *csgD* Transkription wirkt, ist weiterhin unklar. Die Hypothese liegt nahe, daß c-di-GMP als kleines Molekül die Aktivität eines Transkriptionsfaktors kontrolliert, wie es ein klassisches Prinzip der Transkriptionsregulation bei Bakterien darstellt. Seit der Entdeckung, daß PilZ Proteine c-di-GMP binden (Amikam et al., 2006; Ryjenkov et al., 2006), sind diese die naheliegenden Kandidaten für die Vermittlung von c-di-GMP Effekten. In *E. coli* existieren nur zwei Proteine von diesem Typ, YcgR und BcsA (YhjO). Die YcgR Mutante zeigte keine Effekte auf die Curliexpression (Diplomarbeit von Anika Mehlis) und BcsA ist eine katalytische Untereinheit der kryptischen Cellulosesynthase in *E. coli* MC4100. Damit fällt YcgR als Vermittler der c-di-GMP Regulation am *csgD* Promotor aus. Auch BcsA ist kein sehr wahrscheinlicher Kandidat, da es vermutlich nicht exprimiert wird und seine PilZ-Domäne die Aktivität der Cellulosesynthase steuert. Dennoch, es kann nicht ausgeschlossen werden, daß BcsA eine regulatorische Rolle bei der Curliexpression spielt und dies soll künftig untersucht werden. Obwohl MlrA kein PilZ Protein ist wurde es als potentiell Ziel von c-di-GMP ausgewählt, da es aufgrund der Daten der globalen Transkriptionsanalyse ein identisches Regulon (die Curligene) wie YdaM und YciR kontrolliert. Dies unterscheidet MlrA von den weiteren Transkriptionsfaktoren und DNA-bindenden Proteinen am *csgD* Promotor wie OmpR, CpxR, IHF und H-NS. Von allen diesen Faktoren wurde gezeigt, daß sie globalen Einfluß auf die Genexpression haben (Oshima et al., 2002; De\_Wulf et al., 2002; Arfin et al., 2000; Hommais et al., 2001). Die Vermittlung der c-di-GMP Wirkung durch einen dieser Faktoren sollte globale Effekte setzen. Dies stünde im Widerspruch mit den Ergebnissen der Microarrayanalyse, welche *ydaM* und *yciR* nur eine lokale Wirkung auf die Curliexpression zuordnen. Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß einer dieser Globalregulatoren im spezifischen Kontext des *csgD* Promotors und c-di-GMP auch lokalisierte Effekte ausübt.

In einer ersten Annäherung an die Frage, welches Protein der Bindepartner von c-di-GMP ist, wurde die Interaktion von MlrA mit c-di-GMP *in vitro* untersucht. Verschiedene Methoden (UV-Crosslinking, Gleichgewichtsdialyse, Bandshiftanalyse) ergaben aber keinen Hinweis darauf, daß MlrA und c-di-GMP aneinander binden (Abschnitt ). Trotzdem scheidet MlrA damit noch nicht als Ziel der c-di-GMP Regulation aus, denn eventuell muß MlrA direkt mit YdaM und/oder YciR in Kontakt treten und eine Art Mikrokompartment oder Multienzymkomplex ausbilden. In Anbetracht der Tatsache, daß in *Xanthomonas axonopodis* pv *citrii* die Phosphodiesterase (HD-GYP) RpfG sowohl mit mehreren GGDEF-Proteinen als auch der  $\sigma^{54}$ -Aktivierungsdomäne von NtrC (Responseregulator) interagieren

kann (Anjum et al., 2000), scheint die Ausbildung von Aktivierungskomplexen aus GGDEF/EAL Proteinen und Transkriptionsfaktoren auch im Fall von MlrA/YdaM/YciR nicht völlig abwegig. Erst eine solche direkte Interaktion würde möglicherweise die Guanylatcyclase Aktivität von YdaM stimulieren oder ausreichend hohe lokale Konzentrationen von c-di-GMP generieren, um die aktivierende Wirkung von MlrA auf die *csgD* Transkription zu erzielen. Ein solche Mikrokompartimentierung würde auch die hohe Spezifität der c-di-GMP vermittelten Wirkung von YdaM und YciR ausschließlich auf die Curligene erklären. In der Tat zeigten Messungen in *S. typhimurium*, daß die GGDEF/EAL Proteine STM2123 und STM3388 keinen Einfluß auf den zellulären c-di-GMP Spiegel haben, obwohl beide nachweislich Guanylatcyclase-Aktivität und Effekte auf die *csgD* Transkription zeigten. Im Gegensatz dazu hat AdrA, ein GGDEF Protein welches die Cellulosesynthese in *S. typhimurium* stimuliert (Zogaj et al., 2001), deutlichen Einfluß auf den zellulären c-di-GMP Spiegel aber dennoch keinen Einfluß auf die *csgD* Expression. Damit korrelieren biologische Effekte von Guanylatcyclasen nicht zwangsläufig mit dem absoluten zellulären c-di-GMP Level (Kader et al., 2006). Die Autoren vermuten, daß STM2123/STM3388 und AdrA zwei unabhängige c-di-GMP Kompartimente kontrollieren. Da STM2123/STM3388 und AdrA zur selben Zeit aktiv sind ergibt sich das Bild einer räumlichen Kompartimentierung, welche die c-di-GMP Effekte der beiden Systeme voneinander isoliert. Obwohl kompartimentierte c-di-GMP Pools existieren, bleiben diese nicht vollständig unbeeinflusst von den Vorgängen im Cytoplasma, wie Überexpressionsstudien mit verschiedenen GGDEF/EAL Proteinen zeigten (Garcia et al., 2004; Kader et al., 2006). Es ist aber fraglich, ob Schwankungen des cytoplasmatischen c-di-GMP Spiegels um mehrere Größenordnungen, wie sie bei Überexpression von GGDEF/EAL Proteinen auftreten, eine physiologische Bedeutung haben. In künftigen Untersuchungen soll der Einfluß von YciR und YdaM auf den c-di-GMP Spiegel in *E. coli* soll bestimmt werden, um den exakten Wirkmechanismus von c-di-GMP auf die *csgD* Transkription zu verstehen. Sollte eine Mutation von *ydaM* bzw. *yciR* keine Effekte auf den globalen c-di-GMP Pool der Zelle haben, dann würde dies die Annahme einer kompartimentierten c-di-GMP Wirkung stützen und mit dem Befund korrelieren, daß YdaM und YciR keine globalen Regulatoren sind, sondern sehr präzise nur die Curliexpression regulieren. Parallel dazu sollen Interaktionsstudien mit MlrA, YdaM und YciR zeigen, ob diese Proteine *in vitro* interagieren und damit das Modell der Mikrokompartimentierung *in vivo* unterstützen. Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Bindung von MlrA an die stromaufwärts gelegene DNA von *csgD* gezeigt werden konnte, soll untersucht werden, ob die Inkubation von MlrA mit YdaM/YciR zu einem Supershift in der Gelretardationsanalyse führt, ähnlich wie für *X. axonopodis* die Bindung von RpfG (Phosphodiesterase) an NtrC mit Far-Westernanalysen gezeigt wurde (Andrade et al., 2006).

Basierend auf den Daten von Northernblotanalysen und Untersuchungen von *csgD::lacZ*-Reporterfusionen (Abschnitt 3.2.5) wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von (Kader et al., 2006) YdaM/YciR bzw. c-di-GMP eine klare Rolle bei der Kontrolle der *csgD*

Transkription zugeordnet. Ektopische Expression von CsgD im chromosomalen *csgD* Hintergrund ergab, daß YdaM/YciR dabei auf die Transkriptionsinitiation wirken und der nichttranslatierte 5'-Bereich der mRNA nicht involviert ist. Diese Daten lassen auch keine weiteren Effekte auf von YciR/YdaM auf die Curliexpression vermuten. In *S. typhimurium* hingegen, führte die Überexpression der Phosphodiesterase YhjH zu verminderten CsgD-Spiegeln, wenn *csgD* ektopisch von einem Plasmid exprimiert wurde (Kader et al., 2006). Diese Beobachtung suggeriert einen post-transkriptionellen Effekt von c-di-GMP auf die CsgD-Expression der z.B. auf erhöhter Proteinstabilität beruhen könnte. Da YhjH unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluß auf die Curliexpression hat und Überexpression eines EAL-Proteins mit starken Effekte auf den cytoplasmatischen c-di-GMP Spiegel verbunden ist, handelt es sich hierbei möglicherweise um unspezifische Effekte, die nicht die Regulation der CsgD Expression unter Normalbedingungen reflektieren. Eigene Untersuchungen zur Proteinstabilität von CsgD sehen keinen Einfluß von YdaM/YciR (Abschnitt 3.2.8). Theoretisch könnte CsgD seine Transkription autoregulieren und c-di-GMP dabei als Cofaktor wirken, aber Analysen von *csgD::lacZ*-Reporterfusionen im *csgD* Hintergrund zeigten, daß CsgD nicht die eigene Expression kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Das System der Säureresistenz als regulatorisches Modul im $\sigma^S$ -Netzwerk

#### 4.3.1 $\sigma^S$ kontrolliert den zentralen Regulator der Säurestreßantwort

Microarray- und Primerextensionanalysen ergaben, daß die Transkription von *gadE* beim Übergang in die stationäre Phase und bei osmotischen Schock von  $\sigma^S$  kontrolliert wird. Weitere Analysen zeigten, daß *gadE* beim Übergang in die stationäre Phase GadX-abhängig exprimiert (3.4.3) wird und bestätigen damit Untersuchungen, welche die GadX-Abhängigkeit von *gadE* unter anderen experimentellen Bedingungen fanden (Tucker et al., 2003; Hommais et al., 2004). Damit wurde in der vorliegenden Arbeit zum erstenmal demonstriert, daß GadE, der zentrale Regulator der Glutamat-abhängigen Säurestreßantwort, das Ziel einer regulatorischen Kaskade ist, welche von  $\sigma^S$  über GadX verläuft. Da GadE die Transkription von *gadA/BC* aktiviert (Ma et al., 2003b) und diese ebenfalls  $\sigma^S$ -abhängige Gene sind, ergibt sich zusammen mit den Literaturdaten ein konsistentes Modell der Regulation der Säurestreßantwort durch  $\sigma^S$ . Beim Übergang in die stationäre Phase oder anderen Streßbedingungen aktiviert  $\sigma^S$  die Transkription von *gadX* und GadX wiederum stimuliert die Expression von *gadE*. GadE alleine oder gemeinsam mit GadX aktiviert dann die Expression der Glutamat-Decarboxylasen GadA und GadB, des Glutamat-GABA Antiporters GadC, sowie weiterer Faktoren der Säureresistenz wie z.B. HdeA und HdeB. Im Prinzip ist damit der regulatorische Zusammenhang zwischen genereller Streßantwort und Säureresistenz aufgeklärt. Trotzdem bleiben Fragen über Details dieser Regulation, z.B. ob die Transkription von *gadE* und *gadA/BC* direkt von  $\sigma^S$  initiiert



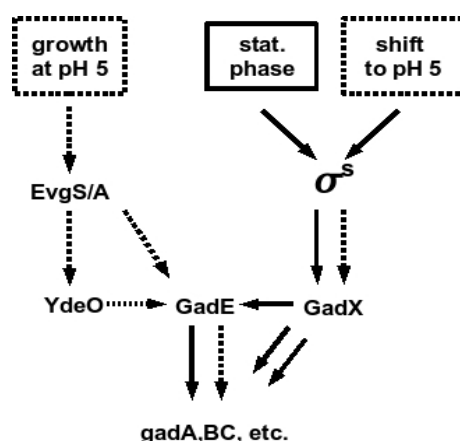
wird. Auch die Rolle von GadY, einer kleinen RNA, welche die *gadX* mRNA vor Abbau schützt und so die Säurestressantwort positiv kontrolliert (Opdyke et al., 2004), ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das 3'-Ende des *gadY* Gens befindet sich nur 17 Basenpaare entfernt vom Stopcodon von *gadX*, was bei der Konstruktion einer *gadX* Mutante berücksichtigt werden muß. Die in der vorliegenden Arbeit konstruierte *gadX* Mutante ist *gadY* positiv, so daß alle gemessenen Effekte nur auf *gadX*, aber nicht auf *gadY* zurückzuführen sind. Die Rolle von *gadW*, einem weiteren Regulator der Glutamat-abhängigen Säureresistenz, wurde hier nicht weiter untersucht. Daß GadX ein Repressor der *gadW* Transkription ist (Ma et al., 2002) widerspricht Microarrayanalysen der vorliegenden Arbeit, bei der *gadW* als ein von  $\sigma^S$  und GadX stark positiv reguliertes Gen identifiziert wurde. Auch daß GadW ein negativer Regulator von  $\sigma^S$  ist (Ma et al., 2003), konnte nicht reproduziert werden (unveröffentlichte Daten von Johanna Heuveling). Diese widersprüchlichen Daten erfordern weitergehende Untersuchungen zur Rolle von *gadW* im Kontext der generellen Stressantwort. Neueste Daten zeigen, daß das RcsCDB/AF Phosphorelay für die Expression der Glutamat-Decarboxylasen in der stationären Phase essentiell ist (Castanie-Cornet et al., 2007). Da die Effekte dieses Systems nicht von  $\sigma^S$  vermittelt werden, aber von GadE abhängen, stellt sich die Frage ob und wie es in den  $\sigma^S$ -abhängigen Aktivierungsweg von *gadA/B* integriert ist.

Vor dem Hintergrund, daß die Regulation der Säureresistenz innerhalb der generellen Stressantwort im Prinzip verstanden ist, erscheint das Konzept der drei Säureresistenzen ( $\sigma^S$ -abhängig, AR I; Glutamat-abhängig, AR II; Arginin-abhängig, AR III [Lin et al., 1995]) in *E. coli* nicht mehr angemessen. Die sogenannte  $\sigma^S$ -abhängige Säureresistenz erscheint lediglich als eine regulatorische Variante der Glutamat-abhängigen Säureantwort, welche ebenso über den EvgAS/YdeO Signalweg aktiviert werden kann (Masuda et al., 2003). Deshalb sollte sie als eigenständige Kategorie aufgegeben werden. Nur wenn tatsächlich bisher unbekannte und streng  $\sigma^S$ -abhängige Mechanismen der Säureresistenz existierten, gäbe es Anlass für eine eigenständige Kategorie. In *Shigella flexneri* konnte aber gezeigt werden, daß die Mutation von *gadC* zum Verlust der Säureresistenz in der stationären Phase führt (Waterman et al., 1996b). Da auch eine Mutation von HdeB, ein periplasmatisches Chaperon, zum Verlust der Säureresistenz bei pH 2 bis pH 3 in der stationären Phase führt (bei *S. flexneri* und *E. coli* untersucht), sind die Glutamatdecarboxylasen zwar notwendig aber nicht hinreichend für Säureresistenz (Waterman et al., 1996b; Kern et al., 2007). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Transformation von *S. typhimurium* mit *gadBC* auf einem Multicopy-Plasmid nicht ausreichend ist für Säureresistenz, obwohl sowohl *gadB* als auch GadC nachweislich exprimiert und aktiviert werden (De\_Biase et al., 1999) (zur Erinnerung: die Glutamat-abhängige Säureresistenz gibt es bei *Salmonella* nicht). Microarrayanalysen zeigten aber, daß die Säurestressantwort nicht nur die Glutamat-Decarboxylasen sondern stets auch HdeAB sowie andere Faktoren impliziert (Tucker et al., 2002; Tucker et al., 2003; Masuda et al., 2003; Hommais et al., 2004). Tatsächlich erscheint die Glutamat-abhängige Säureresistenz, welche auf der Aktivität der Decarboxylasen GadA und GadB, sowie dem Glutamat-GABA Antiporter GadC beruht, nur der Namensgeber eines umfassenden Säure-

resistenzsystems zu sein, welches etwa ein Dutzend Gene umfasst, die sich überwiegend auf dem gleichen Gencluster befinden ('fitness island for acid adaptation') und darüberhinaus coexprimiert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist es dieses gesamte System an Genen welches *E. coli* die hohe Säureresistenz verleiht, sowohl bei Säurestreß in der Logphase (via EvgAS/YdeO) als auch als Teil der generellen Streßantwort (via  $\sigma^S$ ) in der stationären Phase oder anderen Streßbedingungen. Trotzdem existieren möglicherweise weitere Faktoren, die als Teil der generellen Streßantwort einen  $\sigma^S$ -spezifischen Vorteil bei Säurestreß verleihen. Angesichts der Tatsache, daß die *gadC* oder *hdeB* Mutante nicht mehr säureresistent in der stationären Phase ist, wird der Beitrag solcher Faktoren zur Säureresistenz aber wahrscheinlich marginal sein.

#### 4.3.2 Die $\sigma^S$ -Abhängigkeit der Säurestreßantwort wird von der spezifischen Streßsituation beeinflusst

Wie die Microarrayanalyse zeigte, wird die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit der Gene der Säurestreßantwort von den Wachstumsbedingungen stark beeinflusst (Abschnitt 3.4.1). Dabei zeigen *gadA/BC* um ein Vielfaches erhöhte  $\sigma^S$ -Abhängigkeit beim Übergang in die stationäre Phase als bei Säurestreß. Der zentrale Regulator GadE verliert unter Säurestreßbedingungen sogar vollständig die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit. Es erscheint zunächst widersprüchlich, daß ausgerechnet die Säurestreßgene unter Säurestreß nicht mehr so stark  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden, wohingegen bei anderen Genen der generellen Streßantwort unter dieser Bedingung die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unverändert bleibt oder sogar noch zunimmt.  $\sigma^S$ -Abhängigkeit ist aber nicht gleichzusetzen mit Expression und wie die Messungen von *lacZ*-Reporterfusionen mit *gadA* und *gadB* zeigten, wird die Expression dieser Gene durch Säurestreß induziert. Offensichtlich wird die Expression von *gadA/B* und anderen Säurestreßgenen unter diesen Bedingungen von  $\sigma^{70}$  angetrieben und  $\sigma^S$  spielt eine verminderte Rolle, denn, soweit bekannt, ist bei Säurestreß kein weiterer Sigmafaktor als diese beiden involviert. Tatsächlich ist dies konsistent mit dem bisherigen Modell, daß die Expression der Gene der Glutamat-abhängigen Säureresistenz und anderer Säurestreßgene über zwei unabhängige Signalwege stimuliert werden kann (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Zusammenfassendes Modell der Regulation der Säureresistenzgene. Durchgehende Pfeile zeigen regulatorische Einflüsse beim Übergang in die stationäre Phase an, gestrichelte Pfeile stehen für regulatorische Einflüsse bei konstantem Wachstum bei oder plötzlichem Übergang zu saurem pH.

Der erste Signalweg operiert unabhängig von  $\sigma^S$  und unter Beteiligung der Transkriptionsregulatoren EvgS/A und YdeO, welche die Expression von *gadE* aktivieren (Masuda et al., 2003). EvgA kann aber auch unabhängig von YdeO in der Promotorregion von *gadE* binden und die Transkription aktivieren (Ma et al., 2004), was der Regulation durch eine Feedforward-Schleife entspricht (Mangan et al., 2003). Diese Regulationskaskade wird durch Säurestress in der Logphase in Komplexmedium induziert, ebenso wie die generelle Stressantwort unter dieser Bedingung induziert wird. Der zweite Signalweg verläuft über  $\sigma^S$  und GadX und wird insbesondere beim Übergang in die stationäre Phase, aber auch bei Säurestress als Teil der generellen Stressantwort induziert (De Biase et al., 1999; Tramonti et al., 2002). Hierbei aktiviert  $\sigma^S$  die Transkription von *gadX* und infolge davon die Expression von *gadE*. Da sowohl GadX als auch GadE direkt an den Promotoren der Targetgene die Transkription aktivieren können, handelt es sich auch hier um eine Signalverstärkung (Feedforward-Schleife) wie schon beim EvgAS/YdeO Signalweg. Bei Säurestressbedingungen in der Logphase in LB Medium sind also wahrscheinlich zwei unabhängige Signalwege gleichzeitig aktiv, welche beide auf die Expression von *gadE* hin konvergieren. Unter diesen Bedingungen überwiegt insgesamt der  $\sigma^{70}$ -abhängige Aktivierungsweg via YdeO/EvgAS. Da  $\sigma^{70}$  in weitaus höheren Mengen in der Zelle vorhanden ist und auch die höhere Affinität zum RNA Polymerase Kernenzym hat, ist dies nicht überraschend. Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß  $\sigma^S$  bei plötzlichem Säurestress nur kurzfristig induziert wird, aber die  $\sigma^S$  Level nicht hoch bleiben, wenn die Kultur kontinuierlich bei pH 5 wächst (unveröffentlichte Daten von Martin Metzner und Johanna Heuveling). Unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen (Ernte der Zellen 40 min nach Säurestress) ist die  $\sigma^S$ -abhängige Säurestressantwort möglicherweise schon am 'abklingen', wohingegen die EvgAS/YdeO-abhängige spezifische Antwort voll induziert bleibt. Das

Modell der dualen Aktivierung der Säurestressantwort bei Säurestressbedingungen in der Logphase in LB-Medium erklärt damit die verminderte  $\sigma^S$ -Abhängigkeit der Säurestressgene unter diesen Bedingungen gegenüber dem Eintritt in die stationäre Phase.

### 4.3.3 Die Säurestressantwort als regulatorisches Modul im $\sigma^S$ -Netzwerk

Wie globale Transkriptionsanalysen zeigten, gehören die Gene der Glutamat-abhängigen Säureresistenz, *gadA* und *gadBC*, sowie deren Aktivatoren *gadX* und *gadE* zum  $\sigma^S$ -Regulon. Darüber hinaus gab es Hinweise, daß noch mehr Gene der Säurestressantwort unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen und deren Expression durch eine  $\sigma^S$  untergeordnete Regulation koordiniert wird. So zeigten von 31 Genen, welche durch Säurestress induziert werden (Tucker et al., 2002) 24  $\sigma^S$ -Abhängigkeit (Daten nicht gezeigt). Von 15 Genen welche unter der Kontrolle von GadX (ursprünglich als Aktivator von *gadA/BC* beschrieben) stehen (Tucker et al., 2003), sind 11  $\sigma^S$ -abhängig. Sowohl von den allgemein säureinduzierten als auch den spezifisch GadX-regulierten Genen befinden sich viele auf dem gleichen Gencluster, für den der Begriff 'fitness island of acid adaptation' eingeführt wurde (Hommais et al., 2004). Untersuchungen zum alternativen Aktivierungsweg der Säureresistenz ergaben, daß 23 Gene YdeO-abhängig exprimiert werden (Masuda et al., 2003) und von diesen sind aber nur 11  $\sigma^S$ -abhängig. Die Microarraydaten zum YdeO-Regulon wurden allerdings aufgrund von Überexpression von YdeO ermittelt. Überexpression ist aber nur bedingt geeignet um Regulone zu definieren, da sich aufgrund unphysiologisch hoher Level des Regulators, welche die gesamte Physiologie der Zelle beeinflussen können, leicht pleiotrope Effekte einstellen. Aus diesem Grund wurden dem YdeO Regulon möglicherweise mehr Gene zugeordnet als es unter physiologischen Bedingungen tatsächlich umfasst (Foster et al., 2004). Die 11  $\sigma^S$ - und YdeO-abhängigen Gene sind aber wieder überwiegend alle auf dem gleichen Gencluster lokalisiert, wie auch die  $\sigma^S$ -abhängigen Gene des pH-Stimulons und des GadX-Regulons. Insgesamt impliziert die Summe dieser Daten, daß eine klar definierte Menge von Genen existiert, welche im wesentlichen die Säurestressantwort ausmachen und deren Expression vom Aktivator GadE koordiniert wird. Die Expression von GadE selbst kann  $\sigma^S$ -abhängig von GadX aktiviert werden. Damit bilden die Effektoren der Säurestressantwort sowie ihre Regulatoren GadE und GadX ein regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk. Wird die Schnittmenge aller Effektorgene gebildet, die durch pH-Stress induziert (Tucker et al., 2002), GadX- (Tucker et al., 2003) und  $\sigma^S$ -abhängig (vorliegende Arbeit) sind, dann sind das: *gadA* (Glutamatdecarboxylase), *gadB* (Glutamatdecarboxylase), *gadC* (Glutamat-GABA-Antiporter), *hdeA* (periplasmatisches Chaperon), *hdeB* (periplasmatisches Chaperon), *hdeD* (Membranprotein), *slp* (Lipoprotein), *ybaS* (Glutaminase) und *yhiM* (Membranprotein). Gemeinsam mit den Transkriptionsfaktoren *gadE*, *gadX* und *gadW* bilden diese 12 Gene den Kern der Säureresistenz innerhalb der generellen Stressantwort (Abschnitt 3.4.1).

Im Kontext der generellen Stressantwort stellte sich die Frage, ob GadX und GadE noch weitere Gene beim Übergang in die stationäre Phase regulieren, welche nicht direkt mit Säurestress assoziiert sind. Tatsächlich existieren 20 weitere Gene, welche beim Übergang in

die stationäre Phase GadX/GadE-abhängig exprimiert werden (Abschnitt 3.4.5). Davon sind 14 Gene  $\sigma^S$ -abhängig und zwar alle beim Übergang in die stationäre Phase: *arcA*, *aidB*, *cnu*, *cbpA*, *cueR*, *hyaA*, *hyaB*, *hyaD*, *mdtE*, *mdtF*, *narJ*, *puuA*, *sufA* und *yjjU*. ArcA ist ein Responseregulator der auch bei der Proteolyse von  $\sigma^S$  eine Rolle spielt (Mika et al., 2005). AidB ist eine Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase und repariert vermutlich alkylierte DNA (Rohankhedkar et al., 2006). Cnu ist ein OriC-bindendes Protein (Kim et al., 2005). CbpA ist ein DnaJ Homolog, das unter Streßbedingungen Proteine faltet (Chae et al., 2004). CueR ist ein MerR-ähnlicher Transkriptionsregulator und kontrolliert das Kupferefflux-Regulon (Outten et al., 2000). HyaA, HyaB und HyaD sind Komponenten der Hydrogenase I (Menon et al., 1991). MdtEF bilden eine Multisubstrat-Effluxpumpe und neueste unabhängige Untersuchungen bestätigen, daß die Expression von MdtEF  $\sigma^S$ - und GadX-abhängig ist (Kobayashi et al., 2006). NarJ ist ein spezifisches Chaperon der Nitratreduktase (Liu et al., 1997). PuuA ist eine gamma-Glu-Putresine Synthase (Kurihara et al., 2005). SufA ist Teil eines Reparatursystems von oxidierten Fe-S-Clustern und wurde auch von (Patten et al., 2004) als  $\sigma^S$ -abhängig identifiziert. YjjU ist vermutlich neben RssA (Dissertation von Maya Marquardt) eine weitere Patatin-ähnliche und  $\sigma^S$ -abhängige Phospholipase im Genom von *E. coli*. Die übrigen 6 Gene, welche nicht mit Säurestreß assoziiert und trotzdem GadX/E-abhängig sind, aber in der Microarrayanalyse keine  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigten, sind *dsbC* (Proteindisulfidisomerase), *narG* (Nitratreduktase I), *putA* (Prolindehydrogenase), *putP* (Prolin::Natrium-Transporter), *tdcC* (Threonin/Serin-Transporter) und *ybaT* (Transporter). Bei *narG* und *ybaT* lagen die relativen Expressionsraten für  $\sigma^S$ -Abhängigkeit knapp unterhalb der Signifikanzgrenze. Da sie mit deutlich  $\sigma^S$ -abhängigen Genen ein Operon bilden, wurden auch sie den  $\sigma^S$ -abhängigen Genen zugeordnet. Damit sind insgesamt 27 von 31 GadX/GadE-abhängigen Genen (GadE selbst gehört auch zu dieser Gruppe) auch  $\sigma^S$ -abhängig, was den starken regulatorischen Zusammenhang dieser Gruppe unterstreicht. Diese Gene, inklusive der Regulatoren GadX und GadE bilden das Säurestreßmodul im  $\sigma^S$ -Netzwerk.

Über die Frage hinaus, wieviele und welche Gene GadX/E-abhängig beim Übergang in die stationäre Phase exprimiert werden, wurde auch die Binnenstruktur des GadX/E-Regulons unter diesen Bedingungen aufgelöst (Abschnitt 3.4.5). In der Tat bilden die Regulatoren GadX und GadE eine verzweigte Regulationskaskade in der es eine Gruppe von Genen gibt, die nur GadX- aber nicht GadE-kontrolliert sind. Diese sind *slp*, *cueR*, *ybaS* und *ybaT*. Für *slp* konnte mittels *lacZ*-Reporterfusionen bestätigt werden, daß es *gadX*-abhängig und *gadE*-unabhängig exprimiert wird (Johanna Heuveling, unveröffentlichte Daten). Da *slp* auch als YdeO-abhängiges Gen beschrieben wurde (Masuda et al., 2003), liegt die Vermutung nahe, daß YdeO auch direkt die Expression von *gadX* aktivieren könnte. Möglicherweise aktivieren also beide Signalwege der Säurestreßantwort (der  $\sigma^S$ -abhängige und der YdeO-abhängige) GadX, um so eine Signalverstärkung der GadE-Expression zu erreichen. Weiterhin wurde die Gruppe der GadE-kontrollierten Genen in zwei Untergruppen eingeteilt. Die eine Gruppe umfasst 17 Gene, welche strikt GadX- und GadE-kontrolliert sind. Davon sind 13 Gene  $\sigma^S$ -abhängig (*aidB*, *cnu*, *cbpA*, *hyaA*, *hyaB*, *hyaD*, *mdtE*, *mdtF*, *narG*,

*narJ*, *sufA*, *yhiM*, *yjjU*), wobei nur *yhiM* als Teil der Säurestressantwort beschrieben ist. Weitere 4 Gene (*dsbC*, *putA*, *putP*, *tdcC*) sind  $\sigma^S$ - und YdeO-unabhängig (Masuda et al., 2003). Eventuell existiert mit RcsB neben  $\sigma^S$  und (potentiell) YdeO noch ein weiterer Aktivierungsweg für GadX und gleichzeitig wirkt RcsB als Aktivator dieser 4 Gene (Castanie-Cornet et al., 2007). Die nächste Gruppe von Genen ist strikt GadE-abhängig, aber sowohl im *gadX*<sup>+</sup> als auch im *gadX* Hintergrund. Dabei ist aber die GadE-Abhängigkeit dieser Gene im *gadX* Wildtyp bis zu 15fach höher als in der *gadX* Mutante. Bei diesen Genen handelt es sich um *gadA*, *gadB*, *gadC*, *hdeA*, *hdeB*, *hdeD* welche alle  $\sigma^S$ -abhängig und zentrale Effektoren der Säurestressantwort sind. Beim Übergang in die stationäre Phase werden diese Gene stark  $\sigma^S$ - und damit GadX-abhängig exprimiert. Möglicherweise operiert aber unter diesen Bedingungen mit YdeO oder RcsB ein weiterer Regulator der ein  $\sigma^S$ -unabhängiges Basalniveau der Säurestressantwort aufrechterhält. Insgesamt zeigte sich, daß innerhalb des Säuremoduls im  $\sigma^S$ -Netzwerk regulatorische Untergruppen existieren und damit auch die durch GadX und GadE kontrollierten Gene keine einheitliche regulatorische Gruppe bilden.