

**Ein Blaulich-kontrolliertes regulatorisches
Netzwerk der Biofilmbildung
in *Escherichia coli***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Natalia Tschowri

Mai 2012

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen April 2007 und Mai 2012 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge
Institut für Biologie - Mikrobiologie
Freie Universität Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Kürşad Turgay
Institut für Mikrobiologie
Leibniz Universität Hannover

Tag der Disputation: 07.08.2012

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

1. **Tschowri N**, Lindenberg S, and Hengge R. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signaling pathway of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2012, Jul; doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08147.x.
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2958.2012.08147.x>
2. Mika M, Busse S, Possling A, Berkholz J, **Tschowri N**, Sommerfeldt N, Pruteanu M, Hengge R. Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2012 Apr; 84(1): 51-65; doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08002.x.
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2958.2012.08002.x>
3. Sommerfeldt N, Possling A, Becker G, Pesavento C, **Tschowri N**, Hengge R. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2009 Apr;155(Pt 4):1318-31; doi: 10.1099/mic.0.024257-0.
<http://mic.sgmjournals.org/content/155/4/1318.full.pdf+html>
4. **Tschowri N**, Busse S, Hengge R. The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 2009 Feb 15;23(4):522-34; doi: 10.1101/gad.499409
<http://genesdev.cshlp.org/content/23/4/522.full.pdf>
5. Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N, Possling A, **Tschowri N**, Mehliis A, Hengge R. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 2008 Sep 1;22(17):2434-46; doi: 10.1101/gad.475808.
<http://genesdev.cshlp.org/content/22/17/2434.full.pdf>

Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Prof. Dr. Regine Hengge, die mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses fesselnde Thema unter ihrer Aufsicht zu bearbeiten. Insbesondere danke ich ihr auch dafür, dass ich mit ihrer Unterstützung wunderschöne Orte dieser Welt im Zusammenhang mit meinen Konferenzteilnahmen bereisen konnte, die spannendste und aktuellste Forschung in mitreißenden Vorträgen live erleben durfte und viele großartige Wissenschaftler persönlich kennen gelernt habe.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Kürşad Turgay für die Begutachtung dieser Arbeit und dafür, dass er auch in seiner beruflichen Position und mit seiner Erfahrung so zugänglich und hilfsbereit geblieben ist.

Ich danke Frau Wurm, die stets mit diversen Leckereien für unser leibliches Wohl sorgte und allen gegenwärtigen und früheren Laborkolleginnen und -kollegen für eine angenehme und freundliche Atmosphäre im Labor. Besonders hervorheben möchte ich die Personen auf „unserer Laborseite“: Eberhard, der meist lehrende Wissenschaftler mit unzähligen Hobbies aus der Münz-, Pflanzen-, Aquarien-, Börsen- und Kunstwelt; Christine, die Hobby-Gärtnerin mit ausgeprägtem Organisationstalent; Alex, eine reiseffreudige, unglaublich disziplinierte Sportlerin, der kein Rechtschreibfehler entgeht; Diego, der sympathische „Argentinier“ mit vielen wertvollen Tipps zu Stipendienanträgen und natürlich Sandra, die beste Laborpartnerin auf der Welt, mit der ich viele freud- und tränenreiche Momente sowohl im Labor als auch beim Schauen der „Twilight-Saga“ geteilt habe.

Einige frühere Laborkollegen und -kolleginnen möchte ich an dieser Stelle auch namentlich erwähnen: Nassos, der nun als „Erfahrener“ immer einen Lebensratschlag für mich hat; Christina, mit der ich nach Anwendung eines ukrainischen Brauches mit Ostereiern nun für immer unzertrennlich bleibe; Tim, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und Susan, mit der ich Dank ihrem Einsatz in einer schwierigen Zeit der „Revision“ auf unserer Publikation verewigt bin.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die stetige Unterstützung, insbesondere Vitali, den ich seit dem 17. September 2011 mit großer Freude meinen Mann nennen darf.

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	XI
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Bakterielle Lebensstile und das Signalmolekül cyclisches di-GMP	5
1.1.1 Biofilme: eine weit verbreitete Lebensform von Mikroorganismen	5
1.1.2 Generelle Prinzipien der c-di-GMP-abhängigen Signalwege	6
1.1.3 C-di-GMP-abhängige Signaltransduktion in <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.4 Degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen Proteine	11
1.2 Lichtrezeptoren als Vermittler der Umweltsignale	13
1.2.1 Diversität der Photorezeptoren	13
1.2.2 Die photosensorischen BLUF-Domänen-Proteine in Bakterien	16
1.3 Signaltransduktion durch Zweikomponentensysteme	19
1.3.1 Allgemeine Eigenschaften der bakteriellen Zweikomponentensysteme	19
1.3.2 Aufbau und Funktion des RcsDBC-Phosphorelaysystems	21
1.3.3 Connektoren: Kleine Proteine führen zur Vielfalt der Signalwahrnehmung	25
1.4 Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren	27
1.4.1 Bakterielle Transkriptionsregulatoren	27
1.4.2 Die MerR-Familie der Transkriptionsfaktoren	28
2. ZIELSETZUNG	33
3. MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Chemikalien und Materialien	35
3.2 Medien und Medienzusätze	36
3.2.1 Flüssigmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	36
3.2.2 Feste Medien	37
3.2.3 Medienzusätze	37

3.3	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	38
3.4	Mikrobiologische Methoden	42
3.4.1	Wachstumsbedingungen	42
3.4.2	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	42
3.4.3	Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten	42
3.4.4	Sterilisation	42
3.4.5	Herstellung eines P1-Lysats	43
3.4.6	P1-Transduktion	43
3.4.7	Blaulicht-Experimente	43
3.4.8	Motilitätsassay	44
3.5	Molekularbiologische und biochemische Methoden	44
3.5.1	Isolation von Plasmid DNA	44
3.5.2	Isolation von genomischer DNA	44
3.5.3	Polymerasekettenreaktion	44
3.5.4	Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR	44
3.5.5	Agarosegelelektrophorese	49
3.5.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.5.7	Restriktionsenzymverdau von DNA	49
3.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten	50
3.5.9	TSS-Transformation	50
3.5.10	Herstellung elektrokompenter Zellen	50
3.5.11	Elektroporation	50
3.5.12	Sequenzierung von DNA	51
3.5.13	Konstruktion von Plasmiden mit translationaler <i>lacZ</i> -Fusion	51
3.5.14	Kreuzung translationaler <i>lacZ</i> -Fusion in das Chromosom von <i>Escherichia coli</i>	51
3.5.15	Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR-Produkten	52
3.5.16	β -Galaktosidaseaktivitätstest	52
3.6	RNA-basierte Methoden und DNA-Microarray-Analyse	53
3.6.1	RNA Handhabung und Aufbewahrung	53
3.6.2	Ernten der Zellen für die RNA-Isolation	53
3.6.3	Zellyse und RNA-Isolation	54
3.6.4	DNase Verdau und Extraktion der RNA	54
3.6.5	Quantitative Kontrolle der RNA	55
3.6.6	Qualitative Kontrolle der RNA	55

3.6.7	Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Microarray-Analyse	55
3.6.8	Hybridisierung	56
3.6.9	Scannen und Auswertung des Microarrays	56
3.6.10	Northernblot-Analyse	56
3.6.11	Primer-Extension-Analyse	57
3.7	Protein-basierte Methoden	58
3.7.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.7.2	Immunoblot Analyse (Western Blot)	59
3.7.3	Überproduktion und Reinigung von Proteinen	59
3.7.4	Protein-DNA-Bindestudien (Elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays, EMSA)	61
3.7.5	Nicht-radioaktive DNaseI Footprint Analysen	61
3.7.6	Bacterial-Two-Hybrid (BTH) Analysen	63
3.7.7	Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Co-Elution	63
3.7.8	Nachweis der Phosphodiesterase Aktivität	64
3.7.9	UV-Crosslinking	65
3.8	Datenbanken und bioinformatische Analysen	65
4.	ERGEBNISSE	67
4.1	Genetische Organisation der <i>ycgE-ycgF-ycgZ-ymgABC</i>-Region im Chromosom von <i>Escherichia coli</i>	67
4.1.1.	Das degenerierte BLUF-EAL Protein YcgF ist weit verbreitet in Bakterien	67
4.1.2.	Das MerR-ähnliche Protein YcgE - ein Paralog von MlrA?	69
4.1.3.	Die <i>ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB</i> Genregion ist konserviert in diversen Enterobakterien	71
4.2	Transkriptionsstarts in der <i>ycgE-ycgF-ycgZ</i> Region des <i>E. coli</i> Genoms	73
4.2.1.	Die Identifizierung der Transkriptionsstarts von <i>ycgE</i> , <i>ycgF</i> und <i>ycgZ</i>	73
4.3	Genexpressionsanalysen von <i>ycgE</i> und <i>ycgF</i> und der Einfluss von Blaulicht auf das Wachstum von <i>E. coli</i> K-12	74
4.3.1.	Die Expression von <i>ycgE</i> und <i>ycgF</i> steigt mit sinkender Temperatur	75
4.3.2.	Blaulicht hat einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von <i>E. coli</i> bei niedriger Temperatur	76

4.4	Funktionelle Charakterisierung des MerR-ähnlichen Proteins YcgE	77
4.4.1.	YcgE ist ein direkter Repressor des <i>ycgZymgABC</i> -Operons	78
4.4.2.	Identifizierung der YcgE Bindestellen in der <i>ycgZ</i> Promoter Region mittels Footprint Analysen	79
4.4.3.	YcgE ist ein Paralog von MlrA mit residualer Affinität für den MlrA abhängigen <i>csgD</i> -Promoter	82
4.5	Funktionelle Charakterisierung des degenerierten BLUF-EAL Proteins YcgF	83
4.5.1	YcgF kann c-di-GMP weder binden noch abbauen	84
4.5.2	Trotz Einführung von konservierten Aminosäuren notwendig für die Phosphodiesterase Aktivität, bleibt YcgF enzymatisch inaktiv und unfähig c-di-GMP zu binden	85
4.5.3	Mikroarrayanalysen zur Identifizierung YcgF abhängiger Gene	87
4.5.4	YcgF dereprimiert die Expression des <i>ycgZ-ymgABC</i> -Operons	89
4.5.5	YcgF antagonisiert Blaulicht-abhängig das YcgE Repressorprotein <i>in vitro</i>	91
4.5.6	YcgF antagonisiert das YcgE Repressorprotein durch direkte Protein-Protein-Interaktion	93
4.5.7	Die Einführung von konservierten Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF reduziert dessen Fähigkeit YcgE zu antagonisieren	95
4.5.8	Überexprimiertes YcgF reprimiert die Expression der Curli-Fasern <i>in vivo</i> und interagiert mit MlrA <i>in vitro</i>	96
4.5.9	Die Einführung von konservierten Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF führt zur verbesserten Interaktion zwischen YcgF und MlrA <i>in vivo</i>	98
4.6	Funktionale Analysen der YcgE/YcgF – abhängigen kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC	100
4.6.1	YmgA und YmgB verstärken die Synthese des Polysaccharids Kolansäure über das RcsDBC-Phosphorelaysystem	101
4.6.2	YmgB inhibiert die Expression der Curli-Fasern über die RcsB-abhängige kleine RNA RprA	102
4.6.3	YmgB aktiviert die Expression des RcsDBC-abhängigen Gens <i>bdm</i>	103
4.6.4	YcgZ, YmgA und YmgB bilden einen Komplex ohne YmgC	105
4.6.5	YmgB und YmgC interagieren mit der Histidin-Kinase Domäne von RcsC	106
5.	DISKUSSION	111
5.1	Die Evolution und Funktion von YcgE – ein MerR-ähnliches MlrA-Paralog mit speziellen Eigenschaften	111

5.2	Die Evolution und Funktion von YcgF – eine Phosphodiesterase wird zum anti-Repressor	114
5.3	YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC: kleine Proteine als Verbindung zwischen dem YcgF/YcgE-Netzwerk und dem RcsDBC-Phosphorelaysystem	119
5.4	YcgE-YcgF-YcgZ-YmgA-YmgB ist eine konservierte Einheit in Enterobakterien	124
5.5	Ein Gesamtbild: Das YcgF/YcgE/Ymg-abhängige Netzwerk integriert Licht-, Temperatur- sowie Stresssignale und moduliert die Biofilmbildung von <i>E. coli</i>	125
6.	LITERATURVERZEICHNIS	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Das Signalmolekül c-di-GMP und seine Funktionsprinzipien	7
Abb. 1.2	Inverse Koordination der Motilität und Curli-Expression in <i>E. coli</i>	11
Abb. 1.3	Die Topologie und die Struktur der AppA-BLUF-Domäne von <i>R.sphaeroides</i>	16
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des Rcs-Phosphorelaysystems	22
Abb. 1.5	Die Struktur des Cu-CueR-Dimers von <i>E. coli</i>	28
Abb. 4.1	Sequenzvergleich zwischen den EAL-Domänen der aktiven PDE YahA und der verschiedenen YcgF-Homologe	69
Abb. 4.2	Sequenzvergleich zwischen YcgE und den anderen MerR-ähnlichen Regulatoren von <i>E. coli</i>	71
Abb. 4.3	Genetische Organisation der <i>ycgE-ycgF-ycgZ-ymgABC</i> Region im Chromosom von <i>Escherichia coli</i> K-12	73
Abb. 4.4	Transkriptionsstarts in der <i>ycgE-ycgF-ycgZ</i> -Region	74
Abb. 4.5	Die Expression von <i>ycgE</i> und <i>ycgF</i> ist Temperatur-reguliert	76
Abb. 4.6	Bei niedrigen Temperaturen hat Blaulicht einen negativen Einfluss auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	77
Abb. 4.7	Gereinigtes YcgE bindet direkt und spezifisch an die <i>ycgZ</i> Promoterregion	79
Abb. 4.8	Identifizierung der YcgE-Bindestellen in der <i>ycgZ</i> -Promoterregion	80
Abb. 4.9	Verifizierung der YcgE-Bindestellen im <i>ycgZ</i> -Promoter	81
Abb. 4.10	Die Bindung von YcgE an die Promoterregionen von <i>csgD</i> und <i>ycgZ</i>	82
Abb. 4.11	Einfluss von pCAB18-kodiertem YcgE auf die Expression der <i>csgB::lacZ</i> -Reporterfusion	83
Abb. 4.12	YcgF kann c-di-GMP weder binden noch abbauen	85
Abb. 4.13	Einführung aller konservierter Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF ermöglicht nicht dessen Bindung oder Degradation von c-di-GMP	86
Abb. 4.14	Blaulicht stimuliert die <i>ycgZ</i> Expression in Abhängigkeit von YcgF	90
Abb. 4.15	YcgF dereprimiert die Expression der <i>ycgZ::lacZ</i> -Reporterfusion	91
Abb. 4.16	YcgF führt in Abhängigkeit vom Blaulicht zur Aufhebung der YcgE-Bindung an die <i>ycgZ</i> -Promoter DNA	93
Abb. 4.17	YcgF interagiert mit der DNA-bindenden Domäne von YcgE <i>in vitro</i>	94
Abb. 4.18	Einführung aller konservierter Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF reduziert dessen Fähigkeit die <i>ycgZ::lacZ</i> -Expression zu dereprimieren	95

Abb. 4.19	Überexprimiertes YcgF reprimiert die Expression der Curli-Fasern und interagiert mit MlrA <i>in vitro</i>	97
Abb. 4.20	Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YcgF und YcgF-M8 mit MlrA, MlrA-NTD, MlrA-CTD sowie YcgE-NTD und YcgE-CTD	99
Abb. 4.21	YcgZ-YmgABC-abhängige Effekte auf die Koloniemorphologie	102
Abb. 4.22	YcgZ-YmgABC-abhängige Effekte auf die Expression der <i>csgB::lacZ</i> -Reporterfusion	103
Abb. 4.23	YmgB-abhängige Effekte auf die Expression der <i>bdm::lacZ</i> -Reporterfusion	104
Abb. 4.24	Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen den YcgE/YcgF-kontrollierten kleinen Proteinen YcgZ-YmgABC	105
Abb. 4.25	Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YmgC sowie YmgB und den Komponenten des Rcs-Systems	106
Abb. 4.26	Co-elutionsexperimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen YmgA, YmgB und YcgZ sowie zwischen YmgC bzw. YmgB und RcsC	108
Abb. 4.27	Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YmgC sowie YmgB und den einzelnen Domänen der RcsC-Kinase	109
Abb. 5	Modell des BluF/BluR/Ymg-Netzwerks von <i>E. coli</i>	130

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1	Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen	35
Tab. 3.2	Medienzusätze und ihre Konzentrationen	37
Tab. 3.3	Zusammenstellung verwendeter Plasmide	38
Tab. 3.4	Zusammenstellung verwendeter Bakteriophagen	40
Tab. 3.5	Zusammenstellung verwendeter Bakterienstämme	40
Tab. 3.6	Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	45
Tab. 4.1	YcgE-abhängige Gene	78
Tab. 4.2	YcgF-abhängige Gene	88

Abkürzungen

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
A-site	active site; aktives Zentrum
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
c-di-GMP	cyclisches di-Guanosin Monophosphat
CTD	Carboxy-terminale Domäne
C-terminal	Carboxy-terminal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGC	Diguanylatzyklase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HK	Histidin-Kinase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
I-site	inhibitory site; inhibitorisches Zentrum
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mM	Millimolar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NTD	Amino-terminale Domäne
N-terminal	Amino-terminal
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm

ONPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RR	Response-Regulator
sek	Sekunde
spec. β -gal.act.	spezifische β -Galaktosidase Aktivität
Tab	Tabelle
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid

Zusammenfassung

Escherichia coli ist ein gram-negatives Enterobakterium, das sowohl innerhalb eines Wirtes als auch im Freien existieren kann. Die meisten *E. coli* K-12 Stämme kodieren für 29 GGDEF/EAL-Domänen Proteine, die im Allgemeinen Diguanylatzyklase- bzw. Phosphodiesterase-Aktivitäten besitzen und das in Bakterien ubiquitär vorkommende Signalmolekül c-di-GMP synthetisieren bzw. abbauen. Generell steuert c-di-GMP den Übergang von einer planktonischen zu einer adhäsiven Lebensweise von Bakterien. Vier der GGDEF/EAL-Domänen Proteine von *E. coli* sind jedoch stark degeneriert und haben statt der enzymatischen Aktivität alternative Funktionen im Laufe der Evolution erworben.

Das YcgF-Protein von *E. coli* repräsentiert ein degeneriertes EAL-Domänen Protein, das mittels der N-terminalen BLUF-Domäne Blaulichtsignale wahrnimmt. YcgF, der MerR-ähnliche Regulator YcgE und die kleinen Proteine YcgZ-YmgABC bilden ein komplexes Blaulicht-kontrolliertes Netzwerk in *E. coli*. Das Ziel dieser Dissertationsstudie war es, die molekulare und die physiologische Funktion dieses Blaulichtsignaltransduktionssystems im Kontext der Biofilmbildung unter Berücksichtigung evolutionärer Aspekte aufzuklären.

Während YcgF in anderen Bakterien eine konservierte EAL-Domäne aufweist und z. B. in *Klebsiella pneumoniae* als eine Blaulicht-regulierte Phosphodiesterase aktiv ist, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass YcgF von *E. coli* seine Fähigkeit das Signalmolekül c-di-GMP abzubauen oder zu binden aufgegeben hat und nun als direkter anti-Repressor agiert. Dabei interagiert es mit dem MerR-ähnlichen Protein YcgE und verhindert in Abhängigkeit von Blaulicht die Bindung dieses Repressors an seine Operator-DNA. Dies führt zu erhöhter Expression des an die *ycgE-ycgF* Region angrenzenden σ^S -abhängigen *ycgZ-ymgABC*-Operons, wobei die *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB*-Region eine in diversen Enterobakterien konservierte funktionale Einheit darstellt.

In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse zur Funktion der YcgE/YcgF-abhängigen kleinen Proteine verdeutlichen, dass YmgA und YmgB das komplexe RcsDBC-Phosphotransfer System, das wichtige Prozesse der Biofilmmreifung in Enterobakterien reguliert, aktivieren und dadurch u. a. zu erhöhter Expression der Biofilmmatrix Kolansäure und zu geringeren Synthese der adhäsiven Curli-Fasern führen. Dabei bilden YcgZ, YmgA, YmgB einen Komplex, der vermittelt durch YmgB mit der Histidin-Kinase-Domäne von RcsC interagiert und möglicherweise den Phosphotransfer zwischen den Komponenten des Rcs-Systems beeinflusst. Separat von diesem Komplex interagiert auch YmgC mit der Kinase-Domäne von RcsC. Somit agieren die kleinen Proteine unter der Kontrolle des anti-Repressors YcgF und des MerR-ähnlichen Regulators YcgE als Connektoren, die das YcgF/YcgE-Netzwerk mit dem RcsDBC-System verbinden und auf diese Weise das durch das Rcs-System wahrnehmbare Signalspektrum erweitern.

Insgesamt wird aus dieser Studie deutlich, dass YcgF sich im Laufe der Evolution aus einer aktiven Blaulicht-regulierten Phosphodiesterase zu einem anti-Repressor Protein entwickelte, das mit YcgE direkt interagiert und so über die kleinen Proteine YcgZ-YmgABC das RcsDBC-abhängige Regulon als Antwort auf Blaulicht, Stress und niedrige Temperaturen kontrolliert. Zusammenfassend hat diese Arbeit zu einem detaillierten Verständnis des Blaulicht-regulierten Netzwerks von *E. coli* geführt und erstmals die molekulare Wirkungsweise eines degenerierten EAL-Domänen Proteins aufgedeckt. Es konnten neuartige Erkenntnisse über die Funktion, Regulation und Evolution des BLUF-EAL Proteins YcgF, des MerR-ähnlichen Regulators YcgE sowie der kleinen Proteine YcgZ-YmgABC gewonnen werden. Basierend auf den nun bekannten funktionellen Kriterien wird schließlich die Neubenennung von YcgF zu „BluF“ und von YcgE zu „BluR“ vorgeschlagen.

Summary

Escherichia coli is a gram-negative enterobacterium, which can exist in the mammalian intestine as well as under outside conditions. Most *E. coli* K-12 strains have 29 GGDEF/EAL domain-containing proteins, which recently have been recognized to act as diguanylate cyclases and phosphodiesterases, respectively, that “make and break” the ubiquitous bacterial signaling molecule c-di-GMP. In general, c-di-GMP was shown to be a key regulator controlling the switch between the motile planktonic and sedentary biofilm-associated ‘lifestyles’ of bacteria. Interestingly, four of the GGDEF/EAL domain proteins of *E. coli* are degenerated and according to their amino acid sequences cannot be active as enzymes but have evolved alternative molecular functions.

The goal of this study was to characterize the molecular and the physiological function of the complex blue light-signaling pathway from *E. coli*, which consists of the degenerated EAL-domain-containing blue light-sensor YcgF, the MerR-like regulator YcgE and the YcgF/YcgE-controlled small proteins YcgZ-YmgABC.

Whereas YcgF-homologous proteins from some other enterobacteria e. g. *Klebsiella pneumoniae* contain a conserved EAL domain and act as blue-light regulated phosphodiesterases, this study revealed, that the degenerate YcgF protein from *E. coli* does not degrade nor even bind the signaling molecule c-di-GMP. Instead, YcgF evolved to act as a direct anti-repressor, which binds to and releases the MerR-like repressor protein YcgE from its operator DNA in a blue-light dependent manner. As a consequence, the expression of the σ^S -dependent *ycgZ-ymgABC* operon located next to the *ycgE-ycgF* region is strongly induced and genome-wide comparative analyses revealed that the *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgAB* region represents a functional unit conserved in various *Enterobacteriaceae*.

Our functional analyses of YcgE/YcgF-dependent small proteins demonstrated that YmgA and YmgB activate the RcsDBC-phosphorelay system, which is a major regulator of biofilm maturation processes in bacteria. Thereby YcgZ, YmgA and YmgB form a complex and contact the histidine-kinase domain of the RcsC kinase via the YmgB protein. Independent of the YcgZYmgAB-complex YmgC also interacts with the kinase domain of RcsC. Due to these interactions the small proteins under the YcgE/YcgF-control very likely influence the phosphotransfer between the Rcs-system components, which results in elevated expression of the biofilm matrix substance colanic acid and in down-regulation of adhesive curli fibers. In summary, the small proteins controlled by the anti-repressor YcgF and the MerR-like regulator YcgE act as connectors, which provide additional signal input into the RcsDBC-phosphorelay system.

Altogether, this work provides evidence that YcgF evolved from an active PDE to specifically interact with YcgE, to control the RcsDBC-regulon via the small proteins YcgZ-YmgABC in response to blue light, stress and low-temperature. In summary, this study led to

a detailed understanding of the blue-light regulated pathway in *E. coli* including the evolution, regulation and molecular functions of the BLUF-EAL protein YcgF, the MerR-like regulator YcgE and the small proteins YcgZ-YmgABC. Based on the functional criteria we now propose to rename *ycgF* as “*bluF*” and *ycgE* as “*bluR*” for more meaningful gene designations.

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Lebensstile und das Signalmolekül cyclisches di-GMP

1.1.1 Biofilme: eine weit verbreitete Lebensform von Mikroorganismen

In ihren natürlichen Lebensräumen existieren die Bakterien in Lebensgemeinschaften, die sowohl aus einer als auch aus mehreren Bakterienspezies gebildet werden und häufig, umgeben von einer extrazellulären Matrix, auf Oberflächen zu finden sind (Vlamakis & Kolter, 2010). Diese als Biofilm bezeichnete Lebensform von Mikroorganismen bringt einerseits viele Vorteile für Bakterien mit sich und steht andererseits in Verbindung mit vielseitigen Komplikationen im medizinischen Bereich.

Die Entwicklung eines Biofilms wird üblicherweise in fünf Stadien gegliedert: 1. reversible Adhäsion planktonischer Zellen an eine Oberfläche mit Hilfe von Fimbrien und Oberflächenadhäsinen, 2. Übergang von reversibler zu irreversibler Adhäsion, 3. frühes Reifestadium, 4. Entwicklung von Mikrokolonien zum reifen Biofilm und 5. Dispersion von Zellen aus dem Biofilm zurück zur planktonischen Lebensweise (van Houdt & Michiels, 2005). Umhüllt von einer Matrix, bestehend aus diversen Polysacchariden wie z. B. Cellulose oder Kolansäure und stabilisiert durch komplexe Strukturen wie Flagellen, Pili und Fimbrien werden die bakteriellen Zellen in einem Biofilm im Verbund zusammengehalten, was eine intensive Interaktion und Zell-Zell Kommunikation über kleine Signalmoleküle ermöglicht. Da die Biofilmmatrix zur Retention von extrazellulären Enzymen sowie aller Komponenten von lysierten Zellen beiträgt, repräsentiert sie ein vielseitiges Reservoir von Genen, die durch horizontalen Gentransfer aufgenommen werden können und dient auch als eine essentielle Nährstoffquelle. Weiterhin bietet die Biofilmmatrix Schutz gegen Austrocknung, oxidierende Biozide, UV-Licht und gegen Protozoen als Fressfeinde (Flemming & Wingender, 2010).

Die vielseitig ausgeprägte Resistenz von Bakterien in Biofilmen steht aber auch in Zusammenhang mit der erhöhten Resistenz dieser potentiellen Erreger gegen Antibiotika, Desinfektionsmittel und auch gegen das Immunsystem. Biofilme sind oft für chronische Infektionen verantwortlich und können widerstandsfähige Ablagerungen auf medizinischen Implantaten wie z. B. Kathetern bilden. Aus diesen und weiteren Gründen ist die Bekämpfung von Biofilmen von großem medizinischen Interesse, sodass detaillierte Kenntnisse der molekularen Vorgänge bei der Biofilmbildung von Mikroorganismen erforderlich sind.

1.1.2 Generelle Prinzipien der c-di-GMP-abhängigen Signalwege

Die Fähigkeit der Mikroorganismen in verschiedenartigen Habitaten zu überleben und sich an unterschiedliche Bedingungen anzupassen, erfordert die Koordination der Expression von einer Vielzahl von Genen, die spezifisch als Antwort auf bestimmte Umweltsignale aktiviert werden können. Diese selektive Genexpression im Zusammenhang mit vielseitigen Anpassungsstrategien ist häufig mit Änderungen des Lebensstils von Bakterien assoziiert. So durchläuft z. B. das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit verschiedene Wachstumsphasen, die mit einem Wechsel von der planktonischen zur adhäsiven Lebensweise zusammen hängen. Mit der Entdeckung des Signalmoleküls cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) vor etwa 25 Jahren in *Gluconacetobacter xylinus* sind die Wissenschaftler einem zentralen Regulator von solchen „Lebensstilentscheidungen“ auf die Spur gekommen (Hengge, 2010b; Ross *et al.*, 1987).

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP wird von Diguanylatzyklasen (DGC) aus zwei GTP-Molekülen synthetisiert, die durch ein GGDEF- (oder GGEEF) Motiv in ihrem aktiven Zentrum (A-site) charakterisiert sind und als Dimere agieren (Malone *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2004) (Abb. 1.1). Die Bindung von c-di-GMP an ein RxxD-Motiv (I-site) in der Nähe der A-site sorgt für allosterische Produktinhibition von aktiven DGCs, sodass zellulären c-di-GMP-Mengen eine Grenze gesetzt wird (Chan *et al.*, 2004; Christen *et al.*, 2006). Für den Abbau des c-di-GMPs zum linearisierten pGpG sind Phosphodiesterasen (PDE) zuständig, die typischerweise ein EAL- (bzw. EVL) Motiv sowie weitere, über die gesamte Polypeptidkette einzeln verteilte, konservierte Aminosäuren tragen (Christen *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2005). Etwas weniger häufig kommen die HD-GYP-Domänen Proteine vor, die ebenso den Abbau von c-di-GMP, allerdings zu zwei Molekülen GMP, bewerkstelligen (Ryan *et al.*, 2006) (Abb.1.1). GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen Proteine kommen sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vor und treten häufig in Kombination mit verschiedenartigen N-terminalen Sensordomänen auf, sodass c-di-GMP-abhängige Signalwege eine große Vielfalt an Stimuli integrieren können (Jenal & Malone, 2006). Zusammengesetzte Proteine, die sowohl eine GGDEF- als auch eine EAL- bzw. eine HD-GYP-Domäne in einer Polypeptidkette tragen, sind auch weit verbreitet. Die Mehrheit dieser Proteine, die bislang untersucht wurden, zeigen entweder eine DGC- oder eine PDE-Aktivität (Christen *et al.*, 2005; Pesavento & Hengge, 2010). Häufig ist eine der Domänen degeneriert und in allosterische Regulation der benachbarten, enzymatisch aktiven Domäne involviert. So besitzt z. B. das GGDEF-EAL-Protein PdeA von *Caulobacter crescentus* eine

degenerierte GGDEF-Domäne, die in der Lage ist GTP zu binden und dadurch die PDE-Aktivität der EAL-Domäne zu regulieren (Christen *et al.*, 2005). Die *in vitro* Analysen von zwei homologen GGDEF-EAL-Domänen-Proteinen von *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium tuberculosis* sowie vom Lp10329-Protein von *Legionella pneumophila* verdeutlichen allerdings, dass solche zusammengesetzten Proteine auch bifunktional sein können (Gupta *et al.*, 2010; Kumar & Chatterji, 2008; Levet-Paulo *et al.*, 2011).

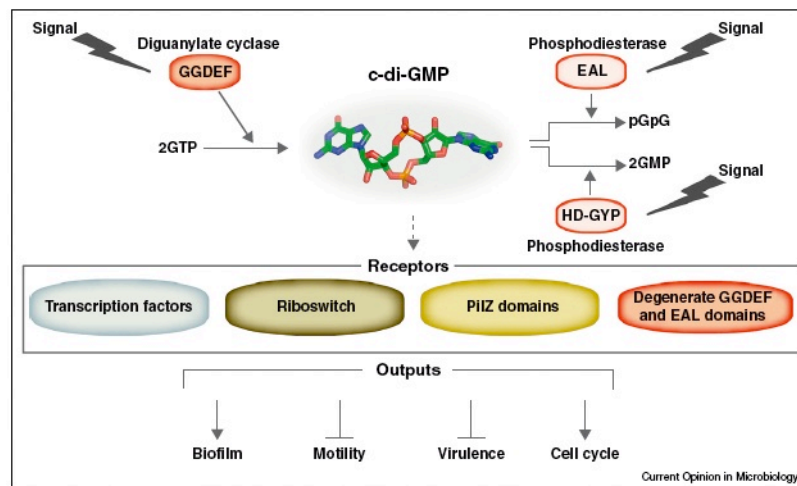


Abb. 1.1: Das Signalmolekül c-di-GMP und seine Funktionsprinzipien. C-di-GMP wird von Diguanylatzyklasen mit einer GGDEF-Domäne synthetisiert und von Phosphodiesterasen mit einer EAL- oder HD-GYP-Domäne degradiert. Transkriptionsfaktoren, Riboswitches, PilZ-Domänen Proteine und degenerierte GGDEF-/EAL-Domänen Proteine agieren als c-di-GMP-abhängige Effektoren. C-di-GMP wirkt generell stimulierend auf Biofilm-assoziierte Lebensstile und inhibiert vielseitige Formen der Motilität. (Reproduziert nach Sondermann *et al.*, 2012).

Ein typisches c-di-GMP-abhängiges Kontroll-Modul besteht aus vier Elementen: einer Phosphodiesterase, einer Diguanylatzyklase, einem Effektor-Molekül, das für die Bindung von c-di-GMP zuständig ist sowie einer Ziel-Komponente, die nach Kontakt mit dem Effektor zu einer Zellantwort führt (Hengge, 2009a). Auch wenn der generelle Aufbau eines solchen Kontroll-Moduls auf andere Nucleotid-basierte Signalwege übertragbar ist, besitzt das c-di-GMP-System eine Besonderheit. Während z. B. cAMP- oder (p)ppGpp-abhängige Signalkaskaden in den meisten Bakterien jeweils nur ein bzw. zwei Enzyme zur Synthese bzw. Degradation des Signalmoleküls sowie nur ein Effektor-Protein zur dessen Bindung involvieren, ist das c-di-GMP-System durch Multiplizität dieser Komponenten charakterisiert (Pesavento & Hengge, 2009). So kodiert beispielsweise *Salmonella enterica* serovar Typhimurium für 19 GGDEF/EAL-Domänen Proteine, *Pseudomonas aeruginosa* besitzt 41 Proteine mit GGDEF/EAL/HD-GYP-Domänen und bei *Vibrio cholera* findet man sogar 72 Proteine dieser Art (Galperin *et al.*, 2001; Simm *et al.*, 2004). Nach neuesten Erkenntnissen

wird mittels lokaler sowie temporaler Sequestrierung der Komponenten Spezifität in diesem durch Redundanz gekennzeichneten System erreicht (siehe Abschnitt 1.1.3) (Hengge, 2009a).

C-di-GMP-spezifische Effektoren stellen eine höchst diverse Gruppe dar, die sowohl Proteine als auch RNA-Strukturen umfasst (Sondermann *et al.*, 2012) (Abb. 1.1). Die PilZ-Domäne, genannt nach dem PilZ Protein von *Pseudomonas aeruginosa*, repräsentiert die erste identifizierte Proteindomäne, für die eine spezifische Bindung von c-di-GMP an ein RXXXXR-Motiv nachgewiesen werden konnte (Amikam & Galperin, 2006; Ryjenkov *et al.*, 2006). Heute weiß man, dass PilZ-Domänen-Proteine in Abhängigkeit von c-di-GMP fundamentale Prozesse wie Motilität, Synthese von extrazellulären Polysacchariden, Biofilmbildung sowie Virulenz in verschiedenen Bakterien regulieren (Boehm *et al.*, 2010; Christen *et al.*, 2007; Merighi *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007; Wilksch *et al.*, 2011). Während die meisten PilZ-Domänen-Proteine über Protein-Protein-Interaktionen agieren, stellen FleQ von *P. aeruginosa*, VpsT von *V. cholerae* sowie das CRP-ähnliche Protein Clp von *X. campestris* c-di-GMP-abhängige Transkriptionsfaktoren dar (Hickman & Harwood, 2008; Krasteva *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2010). Eine weitere Klasse c-di-GMP-abhängiger Effektoren trägt Merkmale aktiver Diguanylatzyklasten bzw. repräsentiert degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen Proteine. So bindet das PelD-Protein von *P. aeruginosa* mittels eines RxxD-Motivs, das an die I-site von aktiven DGCs erinnert, c-di-GMP und aktiviert in dieser Ligand-gebundenen Form die *pel*-Polysaccharidsynthese (Lee *et al.*, 2007b). Ähnlich ist die konservierte I-site des degenerierten GGDEF-Domänen Proteins PopA von *C. crescentus* für die Bindung von c-di-GMP notwendig (Duerig *et al.*, 2009). Die Studien an LapD von *P. fluorescens* sowie an FimX von *P. aeruginosa* verdeutlichen, dass auch degenerierte EAL-Domänen die Fähigkeit besitzen, cyclisches di-GMP zu binden und dadurch Proteinen Effektor-Funktionen zu verleihen (Navarro *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2010). Schließlich wurden kürzlich zwei Klassen von mRNA-Segmenten (genannt Riboswitches) identifiziert, die c-di-GMP binden und dadurch Genexpression beeinflussen (Lee *et al.*, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008). Aktuelle Daten belegen, dass auch eukaryotische Makrophagenzellen einen Rezeptor für die bakteriellen cyclischen Dinukleotide c-di-GMP und c-di-AMP besitzen, sodass die Diskussion über den Einsatz dieser Dinukleotide als potentielle Vakzine neu entflammt ist (Burdette *et al.*, 2011).

Cyclisches di-GMP reguliert Zell-Zyklus Mechanismen sowie die Transition von einer motilen zu einer sessilen Zelle in *C. crescentus* (Duerig *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2004), Virulenz in *V. cholerae* und anderen Tier- und Pflanzenpathogenen (Dow *et al.*, 2006; Tamayo *et al.*, 2007), Antibiotika-Produktion in *S. coelicolor* und *Serratia sp.* (den Hengst *et*

al., 2010; Fineran *et al.*, 2007) und andere Zell-Prozesse. Generell ist c-di-GMP aber hauptsächlich dafür bekannt, einerseits die Biosynthese von adhäsiven Strukturen und Exopolysacchariden zu stimulieren und andererseits vielseitige Formen der Motilität zu inhibieren, sodass c-di-GMP als zentraler Regulator von „Lebensstilentscheidungen“ gilt (Pesavento & Hengge, 2010) (Abb. 1.1). Da experimentelle Arbeiten der vorliegenden Studie an dem Modellorganismus *Escherichia coli* durchgeführt wurden, werden Details theoretischer Aspekte primär an diesem Organismus erläutert, so auch ausführliche Mechanismen der c-di-GMP-abhängigen Signaltransduktion im folgenden Abschnitt.

1.1.3 C-di-GMP-abhängige Signaltransduktion in *Escherichia coli*

Die meisten *Escherichia coli* K-12 Stämme kodieren für 29 GGDEF/EAL-Domänen Proteine, wobei 12 dieser Proteine eine GGDEF-Domäne besitzen, 10 Proteine sind durch eine EAL-Domäne charakterisiert und 7 dieser Proteine weisen sowohl eine GGDEF- als auch eine EAL-Domäne in einer Polypeptidkette auf. Basierend auf biochemischen und *in silico* Analysen sind 12 von diesen GGDEF/EAL-Domänen Proteinen als Diguanylatzyklasen und 13 als Phosphodiesterasen aktiv (Povolotsky & Hengge, 2011). Eine Vielzahl von diesen DGCs und PDEs stehen unter der Kontrolle des generellen Stress-Sigmafaktors RpoS und sind wesentlich an der inversen Regulation der Motilität und der Curli-vermittelten Adhäsion von *E. coli* beteiligt (Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006).

Der Übergang von *E. coli* von einer motilen zur sessilen Zelle während des Übergangs von der post-exponentiellen zur stationären Phase beinhaltet die „Kommunikation“ und wechselseitige negative Einflussnahme zwischen zwei Regulationskaskaden, welche die flagellare Motilität und die Bildung der adhäsiven Curli-Fasern kontrollieren (Abb. 1.2). Die Synthese von Flagellen in der frühen post-exponentiellen Phase ist ein 3-stufiger Prozess und steht unter der Kontrolle des Masterregulators FlhDC, der zusammen mit dem vegetativen Sigmafaktor RpoD die Expression des flagellaren Sigmafaktors *fliA*, des anti-Sigmafaktors *flgM* sowie ca. 50 weiterer Gene reguliert (Chevance & Hughes, 2008). Die Sigmafaktor-Kompetition zwischen RpoD, FliA und RpoS um das RNA-Polymerase Holoenzym trägt entscheidend zur gegenseitigen Inhibition der beiden Regulationskaskaden bei. Ebenso der regulatorische Faktor FliZ, der FlhDC-abhängig exprimiert wird und einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität des Masterregulators der generellen Stressantwort RpoS ausübt und dadurch der Motilität gegenüber der generellen Stressantwort Vorzug gewährt (Pesavento *et al.*, 2008; Pesavento & Hengge, 2012). Die FliA-abhängige Phosphodiesterase YhjH ist in

dieser Wachstumsphase hoch aktiv, was in geringen Mengen an zellulärem c-di-GMP resultiert, sodass das PilZ-ähnliche c-di-GMP Effektor Protein YcgR ligandfrei und somit inaktiv bleibt (Amikam & Galperin, 2006; Pesavento *et al.*, 2008). Verschlechtern sich die Nährstoffbedingungen weiterhin, so wird *flhDC* in der späten post-exponentiellen Phase nicht mehr exprimiert und es kommt zum ClpXP- und Lon-Proteasen vermittelten Abbau von verbleibenden FlhDC- und FliA-Proteinen. Das führt dazu, dass auch FliZ, YhjH und YcgR nicht mehr produziert und durch folgende Zellteilungen ausgedünnt werden (Pesavento *et al.*, 2008). Gleichzeitig kommt es zur Akkumulation von RpoS und damit einhergehend zur Induktion RpoS-abhängiger Gene, zu denen auch die aktiven DGCs YegE und YedQ gehören. Die Aktivität dieser Cyclasen führt zu erhöhten Mengen von zellulärem c-di-GMP, sodass ein aktiver YcgR/c-di-GMP-Komplex entsteht und durch Bindung an flagellare Motorproteine die Rotation des Flagellums und somit die Geschwindigkeit des Schwimmens reduziert wird (Boehm *et al.*, 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010). Diese erhöhten Mengen an c-di-GMP in der späten post-exponentiellen Wachstumsphase führen auch zur verstärkten Synthese von CsgD, was einen zentralen Aktivator der *csgBAC*-kodierte Curli-Fasern darstellt (Brombacher *et al.*, 2006; Brombacher *et al.*, 2003; Pesavento *et al.*, 2008; Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Demnach trägt das c-di-GMP-abhängige Kontroll-Modul, das die aktiven DGCs YedQ und YegE sowie die aktive PDE YhjH umfasst, auch zur wechselseitigen Inhibition der Motilitäts- und der Curli-Kaskade bei (Pesavento *et al.* 2008) (Abb. 1.2).

Neben dem YegE/YedQ/YhjH-kontrollierten c-di-GMP steht die Expression von *csgD* außerdem unter der Kontrolle von einer Vielzahl von Faktoren, zu denen auch die aktive DGC YdaM und das als PDE aktive GGDEF-EAL-Domänen Protein YciR gehört. Während das YegE/YedQ/YhjH-abhängige c-di-GMP-Reservoir sowohl einen Einfluss auf die Motilität als auch auf die Expression von *csgD* ausübt, ist die Auswirkung von YdaM/YciR-kontrolliertem c-di-GMP auf die Synthese von *csgD* limitiert (Pesavento *et al.*, 2008). Neuere Studien zeigen, dass YdaM und YciR zusammen mit dem MerR-ähnlichen c-di-GMP-abhängigen Effektorprotein MlrA (Abschnitt 1.4.2.) durch multiple Interaktionen einen aktivierenden Komplex auf dem *csgD*-Promotor bilden. Das lokal begrenzte Zusammenwirken dieser Faktoren verdeutlicht das Prinzip der lokalen Sequestrierung im durch Multiplizität von GGDEF- und EAL-Domänen Proteinen gekennzeichneten c-di-GMP-System (Lindenberg *et al.*, 2012).

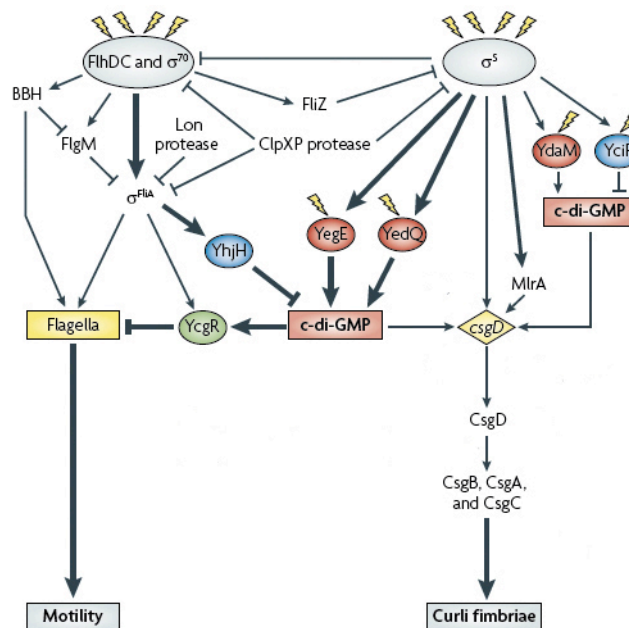


Abb. 1.2: Inverse Koordination der Motilität und Curli-Expression in *E. coli*. Die FlhDC/FliA-abhängige Motilitätskaskade und die RpoS/MlrA/CsgD-kontrollierte Curli-Fimbrien-Kaskade inhibieren sich gegenseitig auf mehreren Ebenen durch (i) Sigmafaktor-Kompetition zwischen RpoD, RpoS und FliA, (ii) das regulatorische Protein FliZ und durch (iii) das YegE/YedQ/YhjH-umfassende c-di-GMP Kontroll-Modul (Details siehe Text). (Reproduziert in vereinfachter Form nach Hengge, 2009a).

1.1.4 Degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen Proteine

Viele bakterielle Spezies besitzen degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen Proteine, bei denen die GGDEF- und EAL-Motive im aktiven Zentrum sowie weitere für die enzymatische Aktivität notwendige Reste nicht konserviert sind. Diese Proteine verdeutlichen die Evolution des c-di-GMP-Systems und können prinzipiell in zwei Klassen eingeordnet werden. So existieren degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen Proteine, wie die bereits erwähnten PdeA von *C. crescentus* oder LapD von *P. fluorescens*, die immer noch in der Lage sind GTP bzw. c-di-GMP zu binden jedoch ohne es umzusetzen. In diesen Fällen führt die Bindung des Signalmoleküls zu allosterischer Kontrolle der Partner-Proteindomäne oder verleiht dem bindenden Protein Effektorfunktionen (Christen *et al.*, 2005; Newell *et al.*, 2009).

Im Vergleich zu diesen enzymatisch inaktiven aber immer noch mit dem Signalmolekül assoziierten Proteinen existieren degenerierte GGDEF-/EAL-Domänen Proteine, die komplett unabhängig vom sekundären Botenstoff über direkte Interaktion agieren und eine evolutive Weiterentwicklung des c-di-GMP-Systems in Richtung funktionale Sequestrierung repräsentieren (Hengge, 2009a). Ein prominentes Beispiel hierfür stellt das degenerierte GGDEF-EAL Protein CsrD (YhdA) von *E. coli* dar, das weder eine DGC- noch eine PDE-

Aktivität aufweist. Stattdessen stimuliert CsrD den Abbau von zwei kleinen nicht-kodierenden RNAs CsrB und CsrC durch RNaseE, was zum aktiven RNA-bindenden Protein CsrA führt (Suzuki *et al.*, 2006). CsrA ist in die Regulation von vielen globalen zellulären Prozessen wie Kohlenstoff-Metabolismus, Motilität, Biofilmbildung und Exopolysaccharidsynthese involviert (Babitzke & Romeo, 2007). So stabilisiert CsrA z. B. die mRNA von *flhDC*, wodurch es somit einen positiven Einfluss auf die FlhDC-abhängige Motilitätskaskade hat. Auf der anderen Seite wirkt dieses RNA-bindende Protein negativ auf die mRNA von den GGDEF-Domänen Proteinen YcdT und YdeH von *E. coli*, sodass es aus diesem Grund mit der Synthese des Polysaccharids poly-GlcNAc interferiert (Babitzke & Romeo, 2007; Boehm *et al.*, 2009; Jonas *et al.*, 2008). Die kleinen RNAs CsrB und CsrC binden an CsrA und haben dadurch einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität dieses Proteins (Romeo, 1998; Weilbacher *et al.*, 2003). Da das degenerierte GGDEF-EAL-Domänen Protein CsrD die Degradation dieser kleinen RNAs fördert, übt es indirekt einen Einfluss auf viele CsrA-abhängige zelluläre Prozesse aus (Babitzke & Romeo, 2007).

YdiV bzw. STM1344 von *E. coli* bzw. von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ist ein degeneriertes EAL-Domänen Protein, das c-di-GMP weder abbauen noch binden kann und in beiden Organismen einen negativen Einfluss auf die Motilität aufweist (Hengge, 2010b; Simm *et al.*, 2009). In *Salmonella* wurde zusätzlich ein indirekter inhibitorischer Effekt auf CsgD, den Aktivator der Curli-Fasern Expression, beobachtet (Simm *et al.*, 2009). Aktuelle Studien zur molekularen Funktion dieses Proteins zeigen, dass YdiV als bifunktionaler Inhibitor des Masterregulators der flagellaren Kaskade FlhDC in *S. enterica* fungiert (Takaya *et al.*, 2012). Einerseits agiert es als Adaptorprotein, indem es an den FlhD₄C₂-Komplex bindet und ihn der ClpXP-abhängigen Proteolyse zuführt. Andererseits kann YdiV die Bindung des FlhD₄C₂-Komplexes an die Operator-DNA inhibieren bzw. bereits vorhandene FlhD₄C₂-DNA-Komplexe aufheben und weist dadurch eine anti-Aktivator Funktion auf (Takaya *et al.*, 2012). Die Analyse des YdiV-Proteins von *E. coli* lässt vergleichbare Schlussfolgerungen bezüglich der Funktion zu, allerdings ist YdiV in *Salmonella* am besten unter mangelnden Nährstoffbedingungen exprimiert, wobei es in *E. coli* unter diesen Bedingungen nur sehr ineffizient translatiert wird (Wada *et al.*, 2012; Wada *et al.*, 2011).

Neben YhdA und YdiV weist *E. coli* zwei weitere degenerierte GGDEF-/EAL-Domänen Proteine auf. Dabei handelt es sich um YeaI, das eine degenerierte GGDEF-Domäne aber eine intakte I-site besitzt und vermutlich als ein c-di-GMP-abhängiges Effektorprotein fungiert (Hengge, 2010b). Die molekulare Funktion des degenerierten BLUF-EAL-Proteins YcgF

wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt und wird in den Abschnitten 4 und 5 im Detail erläutert.

1.2 Lichtrezeptoren als Vermittler der Umweltsignale

1.2.1 Diversität der Photorezeptoren

Licht - die primäre Energiequelle für das Leben - ist nicht nur für Pflanzen und photosynthetische Bakterien von zentraler physiologischer Bedeutung, sondern dient auch als essentielles Umweltsignal für verschiedene regulatorische und adaptive Prozesse und wird von vielen Organismen zur Orientierung in der Umwelt verwendet. Hohe Lichtintensitäten, die über die Bildung von Sauerstoff- und anderen freien Radikalen in den Zellen unkontrollierte chemische Reaktionen mit biologisch wichtigen Makromolekülen herbeiführen können, haben das Potential ernsthafte Zellschädigungen hervorzurufen. Um Lichtsignale wahrzunehmen und auf diese entsprechend zu reagieren, haben viele Spezies Photorezeptoren entwickelt, die sich nach den Licht-absorbierenden Chromophoren in sechs verschiedene Familien einordnen lassen (van der Horst & Hellingwerf, 2004).

Bei den Rhodopsinen handelt es sich um einen Komplex aus dem Protein Opsin, bestehend aus sieben membrangebundenen alpha-Helices, und dem daran kovalent gebundenen Chromophor Retinal, einem Derivat von Vitamin A (Spudich *et al.*, 2000). Typ I - Rhodopsine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 568 nm (grünes Licht) und gehen nach Anregung durch Licht eine *all-trans* zu *13-cis* Photoisomerisierung ein. Das halophile Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* besitzt vier verschiedene Typ I - Rhodopsine: Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin und die sensorischen Rhodopsine I und II. Bakteriorhodopsine wandeln Lichtenergie in einen elektrochemischen Protonengradienten um, welcher für die ATP-Synthese verwendet wird (Lanyi, 1995). Halorhodopsine sind für den Transport von Chlorid-Ionen zuständig und die sensorischen Rhodopsine I und II vermitteln phototaktisches Verhalten z. B. zur Meidung von schädlichem Blau- und UV-Licht (Hoff *et al.*, 1997; Oesterhelt, 1995). Typ II - Rhodopsine, die nach Absorption eines Photons (Absorptionsmaximum bei 495 nm) eine *11-cis* zu *all-trans* Isomerisierung zeigen, sind in den Photorezeptorzellen bei Säugetieren weit verbreitet und ermöglichen den Sehvorgang (Spudich *et al.*, 2000).

Phytochrome sind Rot- (λ max 660 nm) / Dunkelrotlicht- (λ max 730 nm) absorbierende Photorezeptoren, die vor etwa 50 Jahren in Pflanzen entdeckt wurden (Butler *et al.*, 1959). Heute weiß man, dass Phytochrome unter Eu- und Prokaryoten weit verbreitet sind und dass

neben der pflanzlichen (Phy) auch cyanobakterielle (Cph), bakterielle (Bph) und pilzliche (Fph) Phytochrome existieren (Falciatore & Bowler, 2005). Alle Phytochrome binden kovalent ein lineares Bilin Tetrapyrrol als Chromophor und sind in der Lage zwischen der Rotlicht-absorbierenden Pr-Form und der Dunkelrotlicht-absorbierenden Pfr-Form reversibel zu photoisomerisieren, wobei die Pfr-Form als der aktive Zustand gilt. Sowohl pflanzliche als auch bakterielle Phytochrome bestehen aus einer N-terminalen photosensorischen und einer C-terminalen regulatorischen Domäne. Der photosensorische, Chromophor-bindende Teil des Proteins besitzt drei konservierte Subdomänen: PAS (PER-ARNT-SIM), GAF und PHY (GAF-Derivat). Das C-terminale Output-Modul ist bei den meisten Phytochromen eine Histidin-Kinase-ähnliche Domäne, wobei das BphG1-Protein von *Rhodobacter sphaeroides* und Cph2 von *Synechocystis* sp. PCC 6803 eine GGDEF- und EAL-haltige Output-Domäne aufweisen (Park *et al.*, 2000; Tarutina *et al.*, 2006). Pflanzliche Phytochrome steuern vielseitige photomorphogenetische Prozesse, wie z. B. Keimung, Blüteninduktion, Hypokotylwachstum und Schattenvermeidung (Chen *et al.*, 2004). In Bakterien sind Phytochrome dafür bekannt die Synthese von photosynthetischen Pigmenten (Giraud *et al.*, 2002) sowie Motilität zu regulieren (Wilde *et al.*, 2002).

Das ‚Photoactive Yellow Protein‘ (PYP) von *Ectothiorhodospira halophila* ist der am besten charakterisierte Vertreter der Xanthopsin Photorezeptorfamilie. Xanthopsine binden kovalent das Chromophor Cumarsäure und gehen nach Anregung durch Blaulicht eine *trans* zu *cis* Isomerisierung ein (van der Horst & Hellingwerf, 2004). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen der PAS-Domäne und des 14 kDa großen cytoplasmatischen PYP-Photorezeptors wurde dieses Protein zum Prototyp der PAS-Domänen Faltung erklärt (Pellequer *et al.*, 1998). Es gibt viele Hinweise dafür, dass das PYP-Protein in die Regulation der Blaulicht-abhängigen negativen Phototaxis von *Ec. halophila* involviert ist, obwohl der genaue Signaltransduktionsweg im Detail noch nicht aufgeklärt werden konnte (Sprenger *et al.*, 1993).

Cryptochrome wurden als erstes in *Arabidopsis thaliana* entdeckt und stellen Zwei-Chromophor Blaulichtrezeptoren mit hoher struktureller Homologie zu den Photolyasen dar (Ahmad & Cashmore, 1993). Photolyasen sind dafür bekannt, durch Ultraviolettes-Licht hervorgerufene DNA-Schädigungen wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte in Abhängigkeit von Blau-/UV-A-Licht zu reparieren (Weber, 2005). Alle Mitglieder der Cryptochrom-Familie besitzen eine Amino-terminale Photolyase Homologie Region (PHR), die für die Bindung des katalytischen Chromophors Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und des Licht-absorbierenden Chromophors Dezaflavin oder

Pterin zuständig ist. Pflanzliche Cryptochrome weisen zusätzlich eine Carboxy-Terminale Extension (CCT) auf, die in Photolyasen nicht vorhanden ist, und haben im Gegensatz zu den Photolyasen keine DNA-reparierende Aktivität (Sancar, 2004). Cry-DASH Cryptochrome repräsentieren eine neuere Klasse dieser Proteinfamilie und sind in *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und Menschen (humans) zu finden (Brudler *et al.*, 2003). Diese Photorezeptoren bestehen lediglich aus einer PHR-Domäne und sind in der Lage DNA zu binden und Einzelstrang-DNA-Reparaturen zu katalysieren (Selby & Sancar, 2006). Im Allgemeinen sind Cryptochrome dafür bekannt, Wachstums- und Entwicklungsprozesse bei Pflanzen sowie circadiane Rhythmen bei Vertretern des Tier- sowie Pflanzenreichs zu regulieren (Chaves *et al.*, 2011).

Phototropine repräsentieren eine weitere Klasse der Blaulicht-Photorezeptoren (λ max ca. 450 nm), die in Zusammenhang mit dem Phototropismus der Pflanzen identifiziert wurden und nach heutigen Erkenntnissen auch bei anderen pflanzlichen Prozessen wie Chloroplastenbewegung und Stomataöffnung involviert sind (Christie, 2007). Phototropine bestehen aus zwei distinkten Domänen: einer Amino-terminalen Sensordomäne und einer Carboxy-terminalen Serin/Threonin-Protein Kinase Domäne. Der sensorische Teil beinhaltet zwei ca. 110 Aminosäuren lange Domänen, die als LOV1 (Light, Oxygen, Voltage) und LOV2 bezeichnet werden und mit der PAS-Domäne nahe verwandt sind (Briggs *et al.*, 2001). Dabei binden beide LOV-Domänen jeweils ein Flavin Mononukleotid (FMN) als Chromophor. Bei der Lichtreaktion handelt es sich um eine reversible Cysteinyl-C4(a)-Addukt Formation zwischen dem Proteinanteil der LOV-Domänen und FMN, was bei Phototropinen die Autophosphorylierung der C-terminalen Kinase-Domäne reguliert (Swartz *et al.*, 2001). Nach dem heutigen Wissensstand sind LOV-Domänen-Proteine auch innerhalb der Pilze, Archaeen und Bakterien konserviert, allerdings bestehen die LOV-Proteine dieser Vertreter nur aus einer einzelnen LOV-Domäne. Nach einem modularen Prinzip treten 50% der bekannten bakteriellen LOV-Domänen in Kombination mit einer C-terminalen Histidin-Kinase Domäne auf, 20% machen LOV-GGDEF/-EAL Versionen aus und weniger häufig ist die LOV-Domäne an eine STAS-, HTH- sowie andere Domänen gekoppelt (Losi & Gärtner, 2008).

In 2002 ist es Aba Losi *et al.* gelungen erstmals einen Phototropin-ähnlichen Blaulichtrezeptor, YtvA, in *Bacillus subtilis* zu identifizieren. Dieses Protein trägt eine N-terminale LOV-Domäne, die mit einer C-terminalen STAS-Domäne, charakteristisch für ‚Sulfat-Transporter und Anti-Sigma-Faktor-Antagonisten‘, eine Einheit bilden (Losi *et al.*, 2002). YtvA scheint über den ‚Stressosom‘-Protein-Komplex von *B. subtilis* zu wirken und

stellt einen positiven Regulator des generellen Stress-Sigma Faktors σ^B dar. Lichtabhängig wird dabei eine Phosphotransferkaskade ausgelöst, die dazu führt, dass der anti-anti- σ -Faktor RbsV den anti- σ -Faktor RsbW sequestriert, sodass σ^B frei wird und gebunden an die RNA-Polymerase das Regulon zur Stressabwehr transkribiert werden kann (Avila-Pérez *et al.*, 2006; Elías-Arnanz *et al.*, 2011). In *Caulobacter crescentus* führt die Blaulicht-abhängige Aktivierung des LOV-HK-Proteins LovK zu erhöhter Zell-Adhäsion (Purcell *et al.*, 2007) und bei dem intrazellulären Pathogen *Brucella abortus* steht das BA-LOV-HK-Protein im Zusammenhang mit erhöhter Zell-Vermehrung in Makrophagen unter Lichtbedingungen (Swartz *et al.*, 2007).

1.2.2 Die photosensorischen BLUF-Domänen-Proteine in Bakterien

Eine weitere Photorezeptorfamilie, auf die an dieser Stelle etwas detaillierter eingegangen werden soll, stellen die BLUF-Domänen Proteine dar. Aus der Bezeichnung ‚BLUF‘ (**B**lue **L**ight sensing **U**sing **F**AD (Flavin Adenin Dinukleotid)) geht bereits hervor, dass es sich hierbei um Blaulicht-abhängige Photorezeptoren handelt, die ein nicht-kovalent gebundenes FAD als Chromophor benutzen (Gomelsky & Klug, 2002). Die BLUF-Domänen bestehen aus ca. 100 Aminosäuren, die eine kompakte α/β -Struktur ausbilden, wobei die Kern-Domäne einen $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4\beta_5$ -Aufbau aufweist (Abb 1.3) (Jung *et al.*, 2005; Losi & Gärtner, 2011).

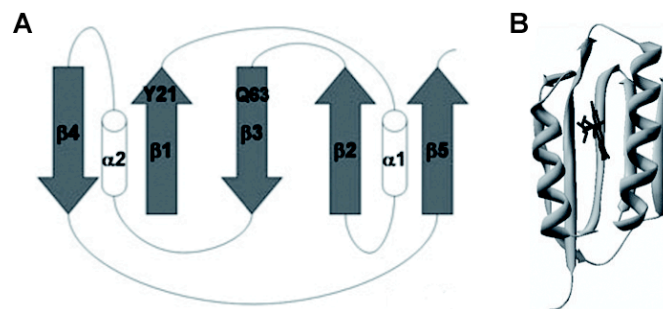


Abb. 1.3: Die Topologie (A) und die Struktur (B) der AppA-BLUF-Domäne von *R. sphaeroides*. Pfeil: β -Faltblatt, Zylinder: α -Helix. Y21 und Q63 sind in AppA-BLUF für die Bindung des Chromophors FAD (in schwarz) essentiell. (Reproduziert nach (Losi, 2007).

Ein konserviertes Glutamin (Gln, Q) lokalisiert in β_3 , sowie ein essentielles Tyrosin (Tyr, Y) in β_1 sind wesentlich an dem Rearrangement der Wasserstoffbrücken beteiligt, was nach Absorption von Blaulicht die Lichtreaktion darstellt und zur Aktivierung der BLUF-Domänen Proteine führt. Bedingt durch die Umlagerung der Wasserstoffbrücken zwischen dem Stickstoff- N(5) bzw. dem Sauerstoffatom O(4) des Isoalloxazinrings des FADs und den konservierten Aminosäuren Tyr und Gln erfahren die BLUF-Domänen Proteine eine

reversible Verschiebung des maximalen Absorptionsspektrums in den roten Bereich um ca. 10 nm (Losi & Gärtner, 2011; Rajagopal *et al.*, 2004).

Genomweite Analysen haben aufgedeckt, dass BLUF-Domänen ausschließlich in Bakterien und unter Eukaryoten nur in Euglenoiden repräsentiert sind. Der unizelluläre Flagellat *Euglena gracilis* stellt den einzigen bekannten Vertreter der Eukaryoten dar, der für ein BLUF-Domänen Protein kodiert, wobei es sich um die photoaktivierte Adenylylzyklase (PAC) handelt. Vermittelt durch die N-terminale BLUF-Domäne wird als Reaktion auf Blaulicht-Einwirkung die C-terminale Adenylylzyklase-Domäne aktiviert. Dies führt zur Entstehung von cAMP und einer damit einhergehenden Änderung des Schlagmusters des Flagellums, was in einer photophobischen Antwort resultiert (Iseki *et al.*, 2002; Ntefidou *et al.*, 2003).

Nach dem heutigen Wissenstand bestehen die meisten (87%) der bekannten BLUF-Domänen Proteine aus einer einzelnen BLUF-Domäne und wirken vermutlich *in trans* über Protein-Protein-Interaktionen. Die zwei interagierende Proteine PapA und PapB von *Rhodospseudomonas palustris* verdeutlichen dieses Prinzip: PapB, ein BLUF-Protein, bindet unabhängig vom Licht an PapA, das aus einer degenerierten GGDEF- und einer konservierten EAL-Domäne besteht, und aktiviert unter Blaulichtbedingungen die Phosphodieseterase-Aktivität dieses Proteins. Mutantanalysen haben ergeben, dass obwohl *R. palustris* unter Blaulicht verstärkt Biofilm bildet, die erhöhte PDE-Aktivität von PapA zu einem etwas geringeren Anstieg der Biofilmbildung führt (Kanazawa *et al.*, 2010). Etwa 9% der BLUF-Sensordomänen treten in Kombination mit GGDEF/EAL-Domänen auf, in Einzelfällen auch mit HTH- oder SCHICH- (Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin) Domänen und sind dafür bekannt, die Aktivität der Effektor-Domäne als Reaktion auf Blaulicht zu modulieren (Losi & Gärtner, 2008).

Das AppA Protein des fakultativ phototrophen α -Proteobakteriums *Rhodobacter sphaeroides* repräsentiert das erste charakterisierte Beispiel aus der Familie der BLUF-Photorezeptoren (Gomelsky & Kaplan, 1995a; Gomelsky & Kaplan, 1998). Bestehend aus einer N-terminalen BLUF und aus einer SCHICH- sowie einer Cystein-reichen Domäne im C-Terminus ist AppA in der Lage sowohl Blaulicht- als auch Redoxsignale zu integrieren. In fakultativ phototrophen Organismen stellt die Photosynthese typischerweise eine alternative Quelle der Energieproduktion dar, die nur unter anoxygenen Lichtbedingungen benutzt wird. Dementsprechend findet in *R. sphaeroides* die Expression der für die Photosynthese notwendigen Komponenten in Abhängigkeit vom Sauerstoff aber auch von Lichtqualität und -intensität statt und steht unter der Kontrolle des PpsR Repressorproteins (Gomelsky &

Kaplan, 1995b; Purcell & Crosson, 2008). Masuda und Bauer konnten zeigen, dass das Photorezeptorprotein AppA als ein transkriptionaler anti-Repressor von PpsR fungiert und die DNA-bindenden Fähigkeiten dieses Regulators in Abhängigkeit von Sauerstoff und Licht moduliert. Nimmt der Sauerstoffgehalt in der Umgebung ab, so bindet AppA in einer 1:2 Stochiometrie an PpsR und die für die anoxygene Photosynthese notwendigen Gene können von der RNA-Polymerase abgelesen werden. Kommt es jedoch bei semi-aeroben Bedingungen zu Blaulicht-Einwirkung, so zerfällt der AppA-PpsR₂-Komplex und PpsR wird wieder als Repressor funktional. Dieser Schutzmechanismus gewährleistet, dass die Entstehung von aktiven Sauerstoffspezies in gleichzeitiger Anwesenheit von Photosynthesepigmenten, Licht und Sauerstoff verhindert wird (Masuda & Bauer, 2002).

Die Entdeckung von AppA als ein Flavoprotein durch Gomelsky und Kaplan führte auch zu der Identifizierung und initialen Charakterisierung von YcgF von *Escherichia coli* (Gomelsky & Kaplan, 1998). Dieses Protein besteht aus einer N-terminalen BLUF-Domäne (Aminosäure (AS) 1-97), die durch einen 48 Aminosäuren langen Linker mit einer C-terminalen EAL-Domäne (AS 145-403) verbunden ist. YcgF bindet präferentiell FAD als Chromophor, hat ein Absorptionsmaximum bei 458 nm und eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von etwa 7 Minuten (Rajagopal *et al.*, 2004). Die Analysen von Schröder *et al.* haben gezeigt, dass unterschiedliche Faktoren die Halbwertszeit dieses Proteins beeinflussen. Wird z. B. FAD durch FMN oder Riboflavin substituiert, so führt dies zu kürzerer Halbwertszeit des angeregten Zustands und somit zu erhöhter Instabilität dieses Proteins. Vergleicht man eine erweiterte BLUF-Domäne Variante (AS 1-113) mit einem BLUF-Linker-Konstrukt (AS 1-137), so wird deutlich, dass die sogenannte J-(Joining)-alpha-Helix im Linker zur Stabilisierung der aktiven Konformation von YcgF führt. Interessanterweise hat auch die Temperatur einen Einfluss auf die Halbwertszeit von YcgF (AS 1-137). Diese steigt mit sinkender Temperatur ($15,9 \pm 6,9$ min bei 23°C und $97,6 \pm 13,1$ min bei 7°C), sodass YcgF als Blaulicht-abhängiger molekularer Thermometer deklariert wurde (Nakasone *et al.*, 2010; Schroeder *et al.*, 2008). Durch blaues Licht ausgelöste Konformationsänderungen wurden sowohl in der BLUF-Domäne als auch im gesamten YcgF Protein detektiert und es wird angenommen, dass Licht und Temperatur Dimerisierungseigenschaften von YcgF beeinflusst (Hasegawa *et al.*, 2006; Nakasone *et al.*, 2007; Nakasone *et al.*, 2010). Basierend auf ‚Transient Grating‘- (TG) Messungen und Größen-Ausschluss-Chromatographie wird postuliert, dass YcgF unter Dunkelbedingungen in Abhängigkeit von der Temperatur ein Monomer-Dimer-Equilibrium ausbildet. Nach Anregung durch Licht werden bevorzugt Dimere gebildet, wobei die Dimerbildung über die jeweiligen BLUF-Domänen erfolgt

(Nakasone *et al.*, 2010). Andere Studien haben allerdings gezeigt, dass YcgF stabil eine Dimerkonformation aufweist (Barends *et al.*, 2009). Zudem zeigt die Kristallstruktur des YcgF homologen Proteins BlrP1 von *Klebsiella pneumoniae*, dass bei diesem BLUF-EAL-Domänen Protein zwei antiparallele BlrP1-Moleküle ein Dimer formen. Dabei interagiert die BLUF-Domäne des einen Monomers mit der EAL-Domäne des anderen Monomers (Barends *et al.*, 2009). BlrP1 stellt eine Blaulicht-abhängige Phosphodiesterase dar, wobei die biologische Rolle dieses Proteins bislang unbekannt ist. Obwohl das YcgF Protein von *E. coli* biophysikalisch recht gut untersucht ist, blieben die molekulare und die physiologische Funktion dieses Proteins ungeklärt und konnten erst im Laufe dieser Studien aufgedeckt werden.

1.3 Signaltransduktion durch Zweikomponentensysteme

1.3.1 Allgemeine Eigenschaften der bakteriellen Zweikomponentensysteme

Zweikomponentensysteme wurden vor etwa 25 Jahren zum ersten Mal in der Literatur beschrieben (Ninfa & Magasanik, 1986) und sind nach heutigen Erkenntnissen in Prokaryoten weit verbreitet aber auch in Archaeen z. B. *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997), Pilzen z. B. *Candida albicans* (Nagahashi *et al.*, 1998), Hefe (Maeda *et al.*, 1994) und einigen Pflanzen z. B. *Arabidopsis thaliana* (Chang *et al.*, 1993) präsent. In Korrelation mit der Vielseitigkeit der Lebensstile kann die Anzahl der Zweikomponentensystem-Proteine in verschiedenen Bakterien stark variieren. So besitzen einige Myxobakterien bis zu 200 dieser Proteine, während sie einigen *Mycoplasma* Vertretern komplett fehlen (Stock *et al.*, 2000). Zweikomponentensysteme sind für die Wahrnehmung und Verarbeitung von diversen externen und internen Stimuli wie z. B. kleine Signalmoleküle, Osmolarität, Redoxzustand, aber auch für die Regulation von fundamentalen Zellprozessen wie Entwicklung und Motilität essentiell (Gao & Stock, 2009).

Generell bestehen die klassischen Zweikomponentensysteme aus einer **H**istidin-**K**inase (HK) und einem **R**esponse-**R**egulator (RR) und sind zur Signaltransduktion durch die Übertragung eines Phosphats zwischen einem Histidinrest in der Kinase und einem Aspartat im Response-Regulator charakterisiert. Typischerweise stellt die Histidin-Kinase die ‚Input‘-Komponente dar und ist für die Wahrnehmung eines bestimmten Signals zuständig, wogegen der Response-Regulator das ‚Output‘ des Systems repräsentiert und die Zellantwort reguliert (Casino *et al.*, 2010). Die Histidin-Kinasen sind als Homodimere aktiv und haben einen modularen Aufbau (Ashenberg *et al.*, 2011). Sie setzen sich aus einer hochvariablen

Sensordomäne, die sowohl extra- als auch intrazellulär oder in der Membran lokalisiert sein kann, und einer konservierten Transmitter- bzw. Kinase-Domäne im Cytoplasma zusammen. Die Kinase-Domäne besteht wiederum aus einer hochkonservierten ATP-bindenden Domäne (CA), die als Reaktion auf ein bestimmtes Signal die Übertragung des γ -Phosphats vom ATP an das konservierte Histidin katalysiert, und einer weniger konservierten **D**imerisierungs- und **H**istidinphosphotransferdomäne (DHP), wo das essentielle Histidin lokalisiert ist (Gao & Stock, 2009). Typischerweise phosphoryliert die CA-Domäne des einen Monomers das zentrale Histidin in der DHP-Domäne des anderen Monomers nach einem *trans*-Phosphorylierungsmechanismus. Neue Studien belegen allerdings, dass einige Kinasen wie z. B. PhoR von *S. aureus* oder HK853 von *Thermotoga maritima* eine *cis*-Autophosphorylierung vollziehen (Casino *et al.*, 2009). Viele der bis heute charakterisierten Histidin-Kinasen sind bifunktional und besitzen neben der Autokinase- und der Phosphotransferaktivität auch eine Phosphataseaktivität in Bezug auf ihren zugehörigen Response-Regulator, sodass die Signalkaskade rechtzeitig beendet und mögliche ‚Cross-Phosphorylierung‘ minimiert werden kann (Laub & Goulian, 2007).

Ähnlich wie die Histidin-Kinasen zeigen auch die meisten Response-Regulatoren einen modularen Aufbau und bestehen aus einer konservierten **R**eciever-(REC) Domäne mit dem essentiellen Aspartat und einer variablen Effektor-Domäne. Am häufigsten treten die REC-Domänen in Kombination mit DNA-bindenden Domänen auf, sodass diese RR als direkte Transkriptionsregulatoren agieren (Galperin, 2010). Die REC-Domäne ist an der Katalyse der Mg^{2+} -abhängigen Phosphatübertragungsreaktion von der Histidin-Kinase an das eigene Aspartat beteiligt und moduliert dadurch die Aktivität der Effektor-Domäne. Neben der Kinase können auch kleine Moleküle wie z.B. Acetylphosphat oder Phosphoramidat als Phosphodonoren fungieren (Lukat *et al.*, 1992). Unphosphoryliert liegt die REC-Domäne in einer inaktiven Konformation vor und erfährt durch die Phosphorylierung eine Konformationsänderung in den aktiven Zustand. Dieser Prozess resultiert in strukturellen Änderungen der Effektor-Domäne und führt in den meisten Fällen zu Dimerisierung sowie zur veränderten Genexpression (Perry *et al.*, 2011).

Abweichend von diesen generellen Prinzipien bezüglich des Aufbaus und Funktion von Zweikomponentensystemen gibt es eine Fülle von Modifikationen dieser Signaltransduktionswege. So existieren Hybrid-Kinasen, die fusioniert an ihre Transmitter-Domäne eine REC-Domäne und häufig auch eine **H**istidin-**P**hospho**t**ransfer-Domäne (HPt) aufweisen, wobei die HPt-Domäne ebenso ein separates Modul darstellen kann. Bei solchen Phosphorelaysystemen erfolgt die Phosphatübertragung nach folgendem Schema:

1. Autophosphorylierung: $\text{HK-His}_I + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-His}_I\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Phosphotransfer I: $\text{HK-His}_I\sim\text{P} + \text{REC-Asp}_I \rightleftharpoons \text{HK-His}_I + \text{REC-Asp}_I\sim\text{P}$
3. Phosphotransfer II: $\text{REC-Asp}_I\sim\text{P} + \text{HPt-His}_{II} \rightleftharpoons \text{REC-Asp}_I + \text{HPt-His}_{II}\sim\text{P}$
4. Phosphotransfer III: $\text{HPt-His}_{II}\sim\text{P} + \text{RR-REC-Asp}_{II} \rightleftharpoons \text{HPt-His}_{II} + \text{RR-REC-Asp}_{II}\sim\text{P}$
5. Dephosphorylierung: $\text{RR-REC-Asp}_{II}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RR-REC-Asp}_{II} + \text{P}_i$

Escherichia coli besitzt 62 Zweikomponentensystem-Proteine, von denen 32 Proteine Response-Regulatoren darstellen und 29 Histidin-Kinase-Proteine repräsentieren (Mizuno, 1997). Fünf dieser Kinasen, nämlich RcsC, TorS, ArcB, EvgS und BarA sind Hybrid-Proteine und beinhalten eine eigene REC-Domäne in ihrer Polypeptidkette. TorS, ArcB, EvgS und BarA weisen zusätzlich eine interne C-terminale HPt-Domäne auf. Da in dieser Arbeit das komplexe RcsDBC-Phosphotransfersystem von *E. coli* im Fokus steht, sollen im folgenden Abschnitt am Beispiel dieses Systems detaillierte Mechanismen bezüglich der Funktion von Zweikomponentensystemen erläutert werden.

1.3.2 Aufbau und Funktion des RcsDBC-Phosphorelaysystems

Das Rcs-Phosphorelaysystem wurde im Zusammenhang mit der Regulation der Biosynthese des kapsulären Polysaccharids Kolansäure in *E. coli* entdeckt (Gottesman *et al.*, 1985) und scheint exklusiv in der Familie der Enterobakterien konserviert zu sein (Huang *et al.*, 2006). Es besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten: einer Membrangebundenen Hybrid-Kinase RcsC, einem eigenständigen, in der Membran verankerten HPt-Protein RcsD und einem cytosolischen Response-Regulator RcsB (Abb. 1.4). Wie die meisten HK-RR-Paare (Mizuno, 1997), bilden auch die Rcs-System Komponenten eine konservierte kodierende Einheit (Stout & Gottesman, 1990). So sind *rscB* und *rscC* nebeneinander lokalisiert, werden aber in entgegengesetzte Richtungen transkribiert. *RcsD* liegt stromaufwärts neben *rscB* und es wird angenommen, dass *rscD* und *rscB* möglicherweise ein Operon darstellen, obwohl es Hinweise dafür gibt, dass *rscD*-intern ein *rscB*-spezifischer Promoter existiert (Majdalani & Gottesman, 2005).

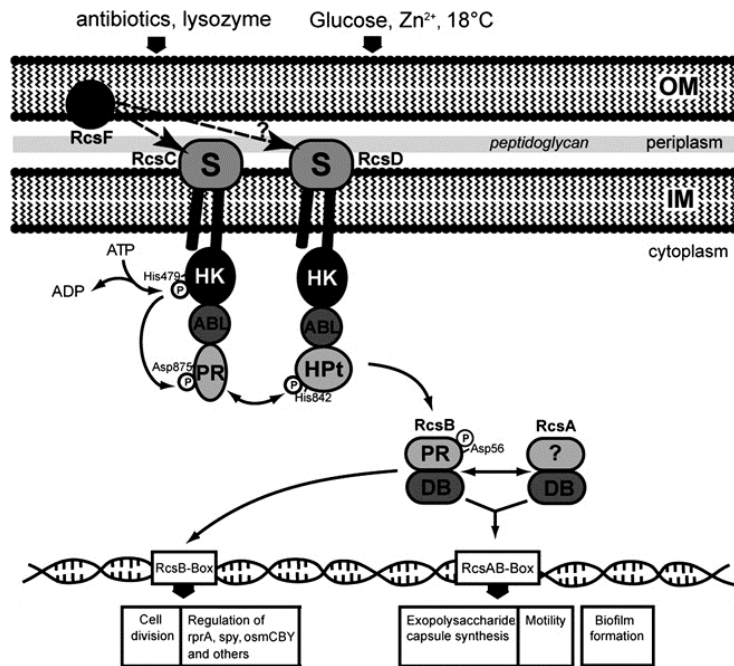


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Rcs-Phosphorelaysystems. Das Rcs-System umfasst RcsF, RcsC, RcsD, RcsB und RcsA. Nach Aktivierung durch ein externes Signal mittels des Lipoproteins RcsF, kommt es zur Autophosphorylierung der Hybrid-Kinase RcsC am konservierten Histidinrest und anschließender Phosphatübertragung an die PR-Domäne von RcsC sowie an die Hpt-Domäne von RcsD. Schließlich wird das Phosphat an den Transkriptionsfaktor RcsB übertragen, der dann allein oder in Kooperation mit dem Hilfsprotein RcsA Genexpression beeinflusst (Details siehe Text). (Reproduziert in modifizierter Form nach Schmöe *et al.*, 2011).

Die RcsC-Kinase und das HPt-Protein RcsD sind mittels zwei Transmembransegmente in der Membran verankert und besitzen beide eine im Periplasma lokalisierte sensorische Schleife (Stout & Gottesman, 1990; Takeda *et al.*, 2001). Obwohl der cytosolische Teil dieser Proteine auch sehr ähnlich aufgebaut ist, bestehen dennoch essentielle Unterschiede. Das cytosolische Fragment der RcsC-Kinase ist aus einer Kinase-Domäne, einer kürzlich identifizierten ABL-Domäne (Alpha-Beta-Loop) mit unbekannter Funktion sowie einer C-terminalen REC-Domäne mit dem wichtigen Asp⁸⁷⁵ aufgebaut (Rogov *et al.*, 2006). Der Kinase-Teil enthält sowohl die DHP-Domäne mit der sog. H-Box inklusive des konservierten Histidins (His⁴⁷⁹), und die hochkonservierten N-, G1-, F- und die G2-Boxen, die für die CA-Domäne charakteristisch und für die ATP-Bindung sowie für die katalytische Reaktion notwendig sind (Gao & Stock, 2009). Im Vergleich dazu besteht der cytosolische Teil des RcsD Proteins aus einer Pseudo-Histidin-Kinase-Domäne, einem Alpha-Beta-Loop und einer HPt-Domäne im C-Terminus mit dem konservierten His⁸⁴² (Schmöe *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu aktiven Histidin-Kinasen sind in RcsD die H-, N-, und G2-Boxen stark degeneriert bzw. nicht vorhanden und das zur Autophosphorylierung notwendige Histidin fehlt ebenso (Takeda *et al.*, 2001). Die NMR-Strukturen der RcsC-ABL- und der RcsD-ABL-Domänen verdeutlichen, dass RcsC-ABL aus fünf parallel orientierten zentralen β -

Faltblättern, zwei α -Helices und drei Schleifen (loops) besteht, wogegen RcsD-ABL ein zusätzliches antiparallel orientiertes β -Faltblatt und nur zwei Schleifen aufweist (Rogov *et al.*, 2006; Schmoe *et al.*, 2011). Die REC-Domäne von RcsC zeigt mit fünf β -Faltblättern und fünf α -Helices einen typischen Aufbau einer Receiver-Domäne (Rogov *et al.*, 2006). Ebenso ist die HPt-Domäne von RcsD strukturell konserviert und ähnelt stark der HPt-Domäne der ArcB-Hybrid-Kinase (Kato *et al.*, 1998; Rogov *et al.*, 2004).

Aus mehreren Studien geht hervor, dass das Rcs-System generell durch Veränderungen der Zellhüllen-Integrität induziert wird. So zählen zu den aktivierenden Bedingungen beispielsweise osmotischer Stress, niedrige Temperatur, Austrocknung, Wachstum auf Oberflächen sowie z. B. die Überexpression des DnaJ-ähnlichen Membranproteins DjIA oder auch Chlorpromazin, das durch seinen amphipatischen Charakter in die Lipid-Doppelschicht integrieren und dadurch die Membran-Krümmung verändern kann (Clarke *et al.*, 1996; Hagiwara *et al.*, 2003; Majdalani & Gottesman, 2005; Ophir & Gutnick, 1994; Sledjeski & Gottesman, 1996). Der exakte Stimulus, der zur Induktion des RcsDBC-Phosphorelays führt, ist jedoch noch nicht genau determiniert. Unklar bleibt ebenso, ob RcsC nach Anregung durch ein Signal wie typische Histidin-Kinasen homodimerisiert oder, wie von Takeda *et al.* vorgeschlagen, Heterodimere mit RcsD ausbildet (Takeda *et al.*, 2001). Die in diversen Studien beobachtete Phosphataseaktivität von RcsC in Bezug auf RcsB ist auch noch nicht im Detail verstanden, aber es gibt Hinweise darauf, dass das konservierte Aspartat (Asp⁸⁵⁹) in der REC-Domäne für diese Aktivität essentiell ist (Brill *et al.*, 1988; Clarke *et al.*, 2002; Majdalani *et al.*, 2002). Ähnlich ist der reverse Phosphotransfer von ArcA (RR) an ArcB (HK) von der REC- sowie von der HPt-Domäne der ArcB Hybrid-Kinase abhängig (Georgellis *et al.*, 1998), wobei in den klassischen Histidin-Kinasen wie z. B. EnvZ und PhoR von *E. coli* die DHp-Domäne und insbesondere das autophosphorylierbare Histidin mit der Phosphataseaktivität assoziiert wird (Carmany *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2000).

Der Response Regulator RcsB besteht aus einer N-terminalen REC-Domäne mit dem phosphorylierbaren Aspartat (Asp⁵⁶) sowie einer LuxR-ähnlichen DNA-bindenden C-terminalen Domäne mit fünf α -Helices und einem Helix-Turn-Helix Motiv (Pristovsek *et al.*, 2003). Obwohl LuxR (Zhang *et al.*, 2002) und andere LuxR-homologe Proteine wie z.B. NarL von *E. coli* (Baikalov *et al.*, 1998) oder TraR von *Agrobacterium tumefaciens* (Vannini *et al.*, 2002) als Dimere an ihre Operator-DNA binden, gibt es bislang keine experimentellen Belege, dass dies auch für RcsB zutrifft. Allerdings gibt es viele Hinweise darauf, dass RcsB sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit dem Hilfsprotein RcsA ausbildet (Majdalani & Gottesman, 2005). Bestehend aus einer N-terminalen degenerierten REC-Domäne - ohne

das phosphorylierbare Aspartat - und einer LuxR-verwandten DNA-bindenden Domäne im C-Terminus ist das cytosolische RcsA-Protein strukturell sehr ähnlich zu RcsB (Stout *et al.*, 1991) (Abb. 1.4). Die Studie von Pristovsek *et al.* belegt, dass RcsA die Bindung von RcsB an die RcsAB-Box (TaAGaatatTCctA) in der Operator-DNA stabilisiert, wobei viele Gene unter der Kontrolle von RcsB unabhängig von RcsA stehen (Pristovsek *et al.*, 2003; Wehland & Bernhard, 2000).

Ein weiteres Hilfsprotein, das bei der RcsDBC-abhängigen Signalkaskade eine wichtige Rolle spielt, ist RcsF (Abb. 1.4). Dabei handelt es sich um ein 14 kDa großes Lipoprotein, das in der Außenmembran verankert und zum Periplasma orientiert ist (Castanié-Cornet *et al.*, 2006). Die Überproduktion von RcsF führt abhängig von RcsC zur Induktion der Kolansäure-Synthese von *E. coli* und nach dem heutigen Wissensstand gilt, dass RcsF Signale in der Außenmembran wahrnimmt und diese an RcsC weiterleitet und damit das Rcs-System stimuliert (Gervais & Drapeau, 1992; Hagiwara *et al.*, 2003; Majdalani & Gottesman, 2005). Das aus fünf Transmembransegmenten bestehende Protein YrfF (IgaA in *Salmonella*) ist sowohl in *E. coli* als auch in *Salmonella* essentiell und wirkt ebenso modulierend auf die Aktivität des RcsDBC-Systems (Cano *et al.*, 2002; Domínguez-Bernal *et al.*, 2004; Tierrez & García-del Portillo, 2004). Mehrere Studien verdeutlichen, dass YrfF auf noch ungeklärte Weise auf der Aktivitätsebene das Rcs-System inhibiert und bestimmte *yrfF*-Allelmutationen zu einer Hyperaktivierung des Rcs-Systems führen (Mariscotti & García-Del Portillo, 2008; Mariscotti & García-del Portillo, 2009). Ein komplettes Ausschalten des *yrfF*-Gens ist lethal und kann nur durch Sekundärmutationen in *rcsC*, *rcsD* oder *rcsB* suppremiert werden (Costa *et al.*, 2003).

In *E. coli* durchgeführte genomweite Microarray-Analysen haben zu der Identifizierung von bis zu 150 Genen geführt, die unter der Kontrolle des Rcs-Systems stehen (Ferrières & Clarke, 2003). Anhand des ermittelten Rcs-Regulons wird deutlich, dass das Rcs-System eine zentrale Rolle bei der Regulation der Biofilmreifung in *E. coli* aber auch in *Salmonella* und *Proteus mirabilis* einnimmt (Majdalani & Gottesman, 2005). Dabei ist die Flagellen-vermittelte Motilität sowie Fimbrien- bzw. Pili-abhängige Zelladhäsion für die frühen Stadien der Biofilmbildung von Bedeutung, während Polysaccharidsynthese zur Matrixausbildung bei der Biofilmreifung eine wichtige Rolle spielt. Das Rcs-System reguliert die zeitliche Abfolge der Biofilmbildung und steuert dadurch den Übergang von adhären Zellen zum reifen Biofilm. So wird in *E. coli* die Expression des Masterregulators der flagellaren Kaskade, *flhDC*, und somit die Motilität, durch RcsB (zusammen mit RcsA) direkt reprimiert (Francez-Charlot *et al.*, 2003). Ein weiteres wichtiges RcsB-Zielgen in diesem Zusammenhang ist die

kleine RNA *rprA*, die nach neuesten Erkenntnissen die Expression von mehreren globalen Transkriptionsfaktoren reguliert (Majdalani *et al.*, 2001; Mika *et al.*, 2012). Frühere Studien haben bereits demonstriert, dass RprA die Translation von RpoS, das den generellen Stress-Sigmafaktor und den Masterregulator der Curli-Biosynthese darstellt, positiv beeinflusst (Hengge, 2010a; Majdalani *et al.*, 2001). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass RprA die Expression von *csgD*, einem essentiellen Aktivator der *csgBAC*-kodierte Curli-Fasern, sowie von *ydaM*, einer für die Curli-Biosynthese wichtigen Diguanylatzyklase, reduziert (Jørgensen *et al.*, 2012; Mika *et al.*, 2012). Diesen inhibitorischen Einflüssen des Rcs-Systems auf die Motilität sowie die Curli-vermittelte Zell-Adhäsion steht die aktivierende Wirkung des RcsBA-Komplexes auf die Biosynthese des kapsulären Polysaccharids Kolansäure gegenüber (Majdalani & Gottesman, 2005). Kolansäure ist ein negativ geladenes Polymer bestehend aus Glukose, Galaktose, Fukose und Glucuronsäure. Die Synthese dieser Matrix-Komponente führt zu einem mukoiden Phänotyp und erfordert die Expression des *cps* bzw. des *wza*-Operons, das in *E. coli* aus 19 Genen besteht und unter direkter Kontrolle von RcsB in Kooperation mit RcsA steht (Whitfield, 2006). Zu weiteren direkten bzw. indirekten Zielgenen des RcsDBC-Systems in *E. coli* gehören *ftsZ* (Zellteilungsregulator), *gadE* (Säurestress-Regulator), *katE* (Katalase), *osmC* (Peroxidase), *bdm* (Biofilm-modulierendes Protein) und eine Vielzahl von anderen Genen z. T. mit unbekannter Funktion (Ferrières & Clarke, 2003; Hagiwara *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006).

1.3.3 Connektoren: Kleine Proteine führen zur Vielfalt der Signalwahrnehmung

Connektoren stellen eine kürzlich definierte Proteingruppe dar, die auf post-translationaler Ebene die Aktivität der Sensor-Kinasen sowie Response-Regulatoren modulieren (Mitrophanov & Groisman, 2008). Dabei handelt es sich mehrheitlich um kleine Proteine (< 200 Aminosäuren), die sowohl membrangebunden als auch cytoplasmatisch lokalisiert sein können. Charakteristisch für Connektoren ist, dass sie als Antwort auf ein bestimmtes Signal synthetisiert werden und anschließend Systeme beeinflussen, die üblicherweise blind für diesen konkreten Stimulus sind. Dadurch führen diese Proteine zu Verknüpfungen zwischen eigentlich unabhängigen Signaltransduktionssystemen und ermöglichen eine Erweiterung der Signalwahrnehmung von bestimmten Signalkaskaden (Mitrophanov & Groisman, 2008).

Das am besten charakterisierte Connektor-Protein ist PmrD von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, welches das PhoP/PhoQ-Zweikomponentensystem mit dem PmrA/PmrB-System vernetzt und dadurch die Expression PmrA-abhängiger Genen unter

PhoP/PhoQ-aktivierenden Bedingungen ermöglicht (Kato & Groisman, 2004). Bestehend aus der Sensor-Kinase PmrB und dem Response-Regulator PmrA nimmt das PmrA/PmrB-Zweikomponentensystem erhöhte Mengen von extrazellulärem Fe^{3+} wahr und steht in Zusammenhang mit erhöhter Resistenz gegen das Antibiotikum Polymyxin B von *Salmonella* (Wösten *et al.*, 2000). Das PhoP/PhoQ-System wird durch niedrige Mg^{2+} -Mengen induziert (Kato *et al.*, 1999) und aktiviert die Expression von *pmrD*, das unter direkter Kontrolle des Response-Regulators PhoP steht. Das synthetisierte PmrD bindet an die N-terminale REC-Domäne von PmrA in seiner phosphorylierten Form und verhindert die Dephosphorylierung von PmrA durch PmrB, sodass PmrA-abhängige Gene transkribiert werden (Kato & Groisman, 2004). Demnach befähigt PmrD *S. enterica* nicht nur unter PmrA/PmrB-aktivierenden Bedingungen, sondern auch unter PhoP/PhoQ-stimulierenden Umständen, die Resistenz gegen Polymyxin B auszubilden (Kato *et al.*, 2007).

Während das PmrD-Connektorprotein durch direkte Interaktion mit einem Response-Regulator dessen Dephosphorylierung verhindert, führt das B1500-Protein durch seine Interaktion mit einer Kinase auf noch ungeklärte Weise zu einem verstärkt aktiven Response-Regulator. B1500 ist ein 65 Aminosäuren großes Protein von *E. coli*, das in der Membran verankert ist und unter der direkten Kontrolle des EvgA/EvgS-Systems steht (Eguchi *et al.*, 2007). Durch eine direkte Interaktion mit der PhoQ-Kinase führt B1500 zu erhöhter Expression PhoQ/PhoP-abhängiger Gene und stellt somit eine Verbindung zwischen dem EvgA/EvgS- und dem PhoQ/PhoP-System her (Eguchi *et al.*, 2007).

Obwohl Connektorproteine nach klassischem Verständnis Verbindungsglieder zwischen zwei Zweikomponentensystemen darstellen, werden die anti-Adaptor-Proteine IraP, IraD und IraM auch in diese Proteingruppe eingestuft (Mitrophanov & Groisman, 2008). Dabei handelt es sich um kleine Proteine (86 - 130 Aminosäuren) von *E. coli*, die das Adaptorprotein RssB binden und auf diese Weise antagonisieren (Ira steht für Inhibition der RssB Aktivität) (Bougdour *et al.*, 2008). IraP wird in Abhängigkeit von (p)ppGpp unter Phosphatmangelbedingungen verstärkt exprimiert, während IraM PhoP/PhoQ-abhängig durch Magnesiummangel und IraD durch DNA-Schädigungen induziert werden (Bougdour *et al.*, 2008; Bougdour *et al.*, 2006). Unter guten Nährstoffbedingungen bzw. in der exponentiellen Wachstumsphase vermittelt der Response-Regulator RssB die Degradation des generellen Stress-Sigmafaktors RpoS. Dabei bindet RssB als Adaptorprotein an RpoS und führt so den Sigmafaktor dem ClpXP-Protease-Komplex zum Abbau zu (Hengge, 2009b). Kommt es nun zur Induktion der Ira-Proteine, wird RssB sequestriert, sodass RpoS-abhängige Gene transkribiert werden können (Bougdour *et al.*, 2008).

Die vorliegende Arbeit hat zu der Identifizierung neuer Connektorproteine zwischen dem YcgF/YcgE- und dem RcsDBC-System in *E. coli* geführt, die in den Abschnitten 4 und 5 im Detail charakterisiert werden.

1.4 Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Bakterielle Transkriptionsregulatoren

Um auf häufig schwankende Umweltbedingungen sowie verschiedene Stresssignale, z. B. Nährstofflimitation, Temperaturunterschiede, Änderungen der Osmolarität, etc. entsprechend zu reagieren, haben Mikroorganismen vielseitige Regulationsmechanismen entwickelt, die im Allgemeinen zu veränderter Genexpression und dadurch zur Adaptation an gegebene Bedingungen führen. Die Initiation der Transkription ist dabei der wichtigste Kontrollpunkt der Genexpression und wird durch diverse Faktoren wie DNA-Sequenz und -Topologie, Proteine und kleine Signalmoleküle reguliert. Die Bindung des RNA-Polymerase Holoenzym (E σ) an die Promotorregion eines bestimmten Gens stellt den Ausgangspunkt für die Transkriptionsinitiation dar. Bei diesem Prozess sind Sigmafaktoren für die Erkennung der bestimmten -35 und -10 Hexamersequenzen sowie die Rekrutierung des Holoenzym verantwortlich (Helmann, 2010). Beispielsweise *E. coli* verfügt über sieben verschiedene Sigmafaktoren, die durch unterschiedliche Promotorspezifitäten gekennzeichnet sind, sodass relevante Gene als Antwort auf bestimmte Signale exprimiert werden können. Der vegetative Sigmafaktor σ^{70} (RpoD) stellt den Hauptsigmafaktor dar und ist primär in exponentiell wachsenden Zellen zu finden. Der Hitzeschocksigmafaktor σ^{32} (RpoH) dient der Bewältigung von hohen Temperaturen (Lim & Gross, 2010), σ^{28} (FliA) steuert die Expression von Genen für Motilität und Chemotaxis (Chilcott & Hughes, 2000), σ^E (RpoE) wird für die Expression von Genen benutzt, um periplasmatischem Stress entgegenzuwirken (Ades *et al.*, 2010), σ^{54} (RpoN) ist für die Regulation des Stickstoffmetabolismus zuständig (Merrick, 1993) und σ^{FecI} (FecI) ist an der Regulation des Eisentransportsystems beteiligt (Braun & Mahren, 2005). Etwa 10% aller *E. coli* Gene stehen unter der Kontrolle des generellen Stresssigmafaktors σ^S (RpoS), der für das Überleben unter diversen Stressbedingungen und in der stationären Phase essentiell ist (Hengge, 2010a; Weber *et al.*, 2005).

Neben Nukleoid-assoziierten Proteinen, die das Potential haben, die globale sowie die lokale Konformation der DNA und somit Genexpression zu verändern (Dame, 2005), repräsentieren die Transkriptionsfaktoren eine wichtige Klasse der bakteriellen Regulatoren. Diese können sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren agieren und bestehen häufig

aus einer Sensor- und einer DNA-bindenden Domäne, wobei 95% der prokaryotischen Transkriptionsfaktoren durch ein Helix-Turn-Helix Motiv zur Bindung ihrer Ziel-DNA charakterisiert sind (Seshasayee *et al.*, 2011). In vielen Fällen modulieren kleine Signalmoleküle oder der Phosphorylierungszustand die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, die sich basierend auf strukturellen sowie funktionellen Übereinstimmungen in verschiedene Proteinfamilien einordnen lassen (Ramos *et al.*, 2005). Da im Rahmen dieser Arbeit ein Vertreter der MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren ausführlich analysiert wurde, soll im nächsten Abschnitt auf die wesentlichen Eigenschaften dieser Proteinfamilie näher eingegangen werden.

1.4.2 Die MerR-Familie der Transkriptionsfaktoren

Genomweite Studien aus dem Jahr 2003 ergaben, dass in 80% der zum damaligen Zeitpunkt sequenzierten Prokaryoten, MerR-ähnliche Proteine vertreten sind, wobei die Anzahl dieser Proteine in verschiedenen Organismen stark variieren kann (Brown *et al.*, 2003). So besitzt das Bodenbakterium *Streptomyces coelicolor* 34 MerR-ähnliche Regulatoren, *E. coli* fünf und z. B. *Clostridium perfringens* nur ein Protein aus dieser Familie. Typischerweise bestehen die MerR-ähnliche Proteine aus einer konservierten N-terminalen DNA-bindenden Domäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv, einer antiparallelen ‚coiled-coil‘ Dimerisierungsregion sowie einer Ligand-bindenden Domäne im C-Terminus, die die Spezifität dieser Proteine determiniert (Kidd, 2011) (Abb. 1.5).

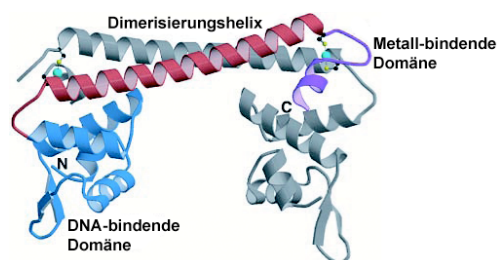


Abb. 1.5: Die Struktur des Cu-CueR-Dimers von *E. coli*. Eines der Monomere ist in grau dargestellt. Im anderen Monomer ist die DNA-bindende-Domäne in blau, die Dimerisierungshelix in rot und die Metall-bindende Domäne in violett hervorgehoben. Die durch die Cysteine Cys¹¹² und Cys¹²⁰ gebundenen Kupfer-Ionen sind durch Kugeln in türkis dargestellt. (Reproduziert in modifizierter Form nach (Changela *et al.*, 2003).

MerR, der Prototyp der MerR-ähnlichen Regulatoren, wurde zuerst auf dem transponierbaren Element Tn501 bei *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (Brown *et al.*, 1983) und stellt den Regulator des *mer*-Operons zur Resistenz gegen Quecksilber (Hg²⁺, engl.:

mercury) dar (Lund *et al.*, 1986). Die molekulare Funktion von vielen Metall-Ionen-abhängigen MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren ist heute recht gut verstanden und soll an dieser Stelle am Beispiel von MerR im Detail erläutert werden. Hochreaktive Quecksilber-Ionen haben eine hohe Affinität zu Schwefel und können deshalb Disulfidbrücken und dadurch die Struktur sowie die Funktionsfähigkeit von essentiellen Proteinen und Enzymen zerstören. Das *mer*-Operon ist das am weitesten verbreitete System zur Detoxifizierung von Quecksilber und umfasst bei dem Tn501 Element *merR/merD* für die Regulation sowie Detektion von Hg^{2+} , *merT/merP* für den Transport und *merA* für die enzymatische Entgiftung von Quecksilber-Ionen (Mathema *et al.*, 2011). Im Generellen binden MerR-ähnliche Regulatoren an Operatorsequenzen, die mit suboptimalen Promotoren überlappen, d. h. diese Promotoren sind durch einen mit 19-20 Basenpaaren zu langem Abstand (Spacer) zwischen den -35 und den -10 Hexameren ausgezeichnet, sodass dadurch eine effektive Bindung der RNA-Polymerase für die Transkriptionsinitiation beeinträchtigt ist. Im Vergleich dazu ist ein optimaler $E\sigma^{70}$ -abhängiger Promoter durch einen Spacer von 17 ± 1 bp charakterisiert (Typas & Hengge, 2006). So bindet auch der Regulator des *mer*-Operons, MerR, seine Operator-DNA innerhalb des suboptimalen P_{merT} -Promotors (19bp Spacer) und reguliert dadurch sowohl die Synthese der *merTPAD*-umfassenden polycistronischen mRNA als auch ausgehend vom divergent orientierten P_{merR} -Promotor die eigene Expression. In Abwesenheit von Hg^{2+} bindet das MerR-Homodimer teilweise überlappend mit den -35 und -10 Regionen an die *mer*-Operator- /Promotor-Region (*merOP*) (Shewchuk *et al.*, 1989) und verursacht in dieser Repressorkonformation eine Krümmung der gebundenen DNA-Region um ca. 25° (Ansari *et al.*, 1995), sodass die Bindung der RNA-Polymerase und somit die Transkription inhibiert wird. Gelangen jedoch Quecksilber-Ionen mittels des periplasmatischen Proteins MerP und des membrangebundenen Transporters MerT in das Cytosol, so bindet das MerR-Dimer mit sehr hoher Affinität und Selektivität ein Hg^{2+} Ion, wobei ein konserviertes Cystein des einen Monomers und zwei Cysteine des anderen Monomers dafür verantwortlich sind (Helmann *et al.*, 1990). Diese Bindung hat eine Konformationsänderung des Proteins und der DNA zur Folge und geschieht bei bereits sehr geringen Hg^{2+} -Konzentrationen von ca. 10^{-8} M, sodass die $MerR_2-Hg^{2+}$ vermittelte volle Induktion der Transkription vom P_{merT} Promoter bereits bei sublethalen Mengen von Hg^{2+} in der Zelle erfolgt (Ralston & O'Halloran, 1990). Die Aktivatorform von MerR führt zur Entspannung der *mer*-Operator-DNA um ca. 33° und damit zur einhergehenden optimalen Positionierung der -35 und -10 Hexamere, sodass die

RNA-Polymerase effektiv die Transkription von *merTPAD* initiieren kann (Ansari *et al.*, 1995; Newberry & Brennan, 2004). Vermittelt durch die Quecksilber Reduktase, MerA, wird das toxische Hg^{2+} in einer NAD(P)H-abhängigen Reaktion zum weniger toxischen und flüchtigen Hg^0 reduziert, welches anschließend aus der Zelle diffundiert (Mathema *et al.*, 2011). Sinken die intrazellulären Mengen von Quecksilber-Ionen, so trägt das MerR-ähnliche Protein MerD dazu bei, dass der Hg^{2+} -MerR₂-*merOP*-Komplex dissoziiert und dadurch die mRNA-Synthese vom P_{merR} ermöglicht wird (Champier *et al.*, 2004). In seiner Ligand-freien Form bindet MerR wieder als Repressor an seine Operator-DNA und inhibiert die Transkriptionsinitiation.

Bei den fünf MerR-ähnlichen Proteinen von *E. coli* handelt es sich um ZntR (YhdM), CueR (YbbI), SoxR, MlrA (YehV) und YcgE. Das ZntR-Protein bindet mittels vier Cysteinen und einem Histidinrest bevorzugt Zink-Ionen als Effektormoleküle und reguliert die Expression von *zntA*, das für eine $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ - Efflux ATPase codiert (Brocklehurst *et al.*, 1999). Drei der in die Bindung von Zn^{2+} involvierten Cysteine sind auch in MerR konserviert, allerdings bindet das dimere ZntR insgesamt vier Zink-Ionen, wobei Cd^{2+} und Pb^{2+} auch als Liganden fungieren können (Changela *et al.*, 2003). CueR aktiviert als Antwort auf Cu^+ , Ag^+ - oder Au^+ -Stress die Expression von *copA*, einer Cu^+ -und Ag^+ -abhängigen Efflux ATPase, sowie von *cueO*, einer Kupfer-Oxidase (Outten *et al.*, 2000). Im Fall von CueR sind zwei auch in MerR und ZntR konservierte Cysteinreste notwendig, um als Dimer insgesamt zwei Kupfer-Ionen zu binden (Changela *et al.*, 2003). Die Funktionsweise von ZntR und CueR ähnelt stark der Funktion von MerR. So sind die Promotor-Regionen von *zntA*, *copA* und *cueR* durch suboptimal lange Spacer (19-20 bp) charakterisiert. Die Bindung der jeweiligen Ligand-Regulator-Komplexe an die entsprechenden Operator-Sequenzen verursacht eine optimale Positionierung der -35 und -10 Hexamere und eine damit einhergehende Initiation der Transkription (Brown *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu MerR scheinen weder ZntR noch CueR in ihrer Ligand-freien Form einen repressorischen Einfluss auf ihre Ziel-Gene zu haben (Hobman *et al.*, 2005).

SoxR ist ein Regulator der oxidativen Stressantwort und weicht in seiner Funktion von den klassischen Metall-bindenden MerR-ähnlichen Regulatoren etwas ab. Als Antwort auf Superoxid-Stress aktiviert das SoxR Protein die Expression von *soxS*, welches die Synthese der zum SoxRS-Regulon gehörenden Zielgene aktiviert, sodass die Zellen die Stresssituation bewältigen können (Pomposiello & Demple, 2001). Gebunden an das $\text{CX}_2\text{CXCX}_5\text{C}$ -Motiv

enthält jedes Monomer des SoxR-Dimers ein [2Fe-2S]-Cluster, welches die Aktivität dieses Proteins beeinflusst. In reduzierter Form des Clusters ($[2\text{Fe-2S}]^{2+}$) ist das Protein an seine Operatorsequenz überlappend mit dem suboptimalen Promoter (19 bp Spacer) von *soxS* gebunden, jedoch als Aktivator inaktiv. Kommt es allerdings zur Oxidation des Eisen-Schwefel-Clusters durch O_2^- zu $[2\text{Fe-2S}]^{3+}$, so nimmt SoxR die Aktivator-Konformation ein und führt durch Änderungen der DNA-Topologie zur Induktion der Genexpression (Pomposiello & Demple, 2001). Ebenfalls etwas untypisch für einen MerR-ähnlichen Regulator verhält sich MlrA, das die Expression des essentiellen positiven Regulators *csgD* der *csgBAC*-kodierte Curli-Fasern in *E. coli* und anderen Enterobakterien aktiviert (Brombacher *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2001). Die Identifizierung der MlrA-Bindestellen im *csgD* Promotor macht deutlich, dass MlrA etwa 80 bp stromaufwärts vor den -35 und -10 RNA-Polymerase Erkennungssequenzen bindet und weicht in dieser Hinsicht von den klassischen MerR-ähnlichen Regulatoren ab, die meist überlappend mit dem Promoter binden (Ogasawara *et al.*, 2010). Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass im *csgD*-Promotor der Abstand zwischen den -35 und -10 Hexameren auch nur 15bp beträgt (Hammar *et al.*, 1995). Eine weitere Besonderheit dieses Proteins ist, dass es im Komplex mit der PDE YciR und der DGC YdaM c-di-GMP als Effektormolekül bindet (Lindenberg *et al.*, 2012). Der genaue Mechanismus der MlrA-vermittelten Transkriptionsinitiation ist allerdings noch nicht im Detail verstanden. Der fünfte MerR-ähnliche Regulator von *E. coli*, YcgE, weist eine hohe Ähnlichkeit von 76% zu MlrA auf (Brown *et al.*, 2001). Zu Beginn dieser Studie war über die Funktion dieses Proteins kaum etwas bekannt. Durch diese Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Rolle dieses Regulators gewonnen werden.

2. Zielsetzung

Als zentraler Regulator unterschiedlicher bakterieller Lebensformen kontrolliert das Signalmolekül c-di-GMP im Allgemeinen den Übergang zwischen Motilität und Sessilität in vielen bakteriellen Spezies. Es wird von Diguanylatzyklasen, die durch ein GGDEF-Motiv im aktiven Zentrum charakterisiert sind, synthetisiert und von Phosphodiesterasen, die meist ein EAL-Motiv tragen, degradiert (Hengge, 2009a). C-di-GMP-abhängige Signaltransduktion ist durch Multiplizität der beteiligten Komponenten charakterisiert, d. h. sowohl *E. coli* als auch viele andere Bakterien besitzen multiple GGDEF-/EAL-Domänen Proteine. Einige dieser Proteine sind degeneriert und haben im Laufe der Evolution alternative, c-di-GMP-unabhängige Funktionen erworben. Die molekularen Mechanismen, durch welche die degenerierten GGDEF- und EAL-Domänen Proteine ihre biologischen Funktionen erfüllen, waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch weitestgehend unbekannt.

Das Photorezeptorprotein YcgF von *E. coli* nimmt mittels der N-terminalen BLUF-Domäne Blaulichtsignale wahr und weist eine degenerierte EAL-Domäne im C-Terminus auf. Ergebnisse vorangegangener Studien haben darauf hingewiesen, dass dieses Protein und der MerR-ähnliche Transkriptionsfaktor YcgE in einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg agieren und antagonistisch die Expression des *ycgZ-ymgABC*-umfassenden Operons regulieren (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Der genaue Wirkungsmechanismus von YcgF sowie der mit YcgF-assoziierten Proteine blieb bislang allerdings unverstanden.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare und die physiologische Funktion des BLUF-EAL-Proteins YcgF, des MerR-ähnlichen Regulators YcgE und der von YcgF/YcgE-kontrollierten kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC zu identifizieren. Die Aufklärung der biologischen Rolle dieser Proteine sollte zur Aufdeckung neuer Erkenntnisse über die Physiologie von *E. coli* im Zusammenhang mit der Biofilmbildung unter Blaulichtbedingungen führen. Weiterhin sollten mittels vergleichenden genomweiten Analysen Erkenntnisse über die mögliche Entstehung des YcgF/YcgE-Netzwerks im Laufe der Evolution gewonnen werden. Die detaillierte Untersuchung der molekularen Wirkungsweise eines degenerierten EAL-Domänen-Proteins sollte zudem neue Einblicke in die Evolution des c-di-GMP-Systems liefern.

Insgesamt sollte diese Studie die molekulare und physiologische Funktion eines komplexen Blaulichtsignaltransduktionswegs im Kontext der Biofilmbildung unter Berücksichtigung evolutionärer Aspekte aufklären.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

Alle Standard-Chemikalien und Materialien stammen – soweit nicht anders angegeben – von den Herstellern AppliChem, Difco, Millipore, Merck, Roth, Sigma-Aldrich, VWR. Weitere Produkte und Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 3.1: Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquellen

Produkt	Hersteller/Referenz
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Antibiotika (Amp, Cm, Tet, Kan)	Roth, Sigma Aldrich
Anti-Flag Antikörper	Sigma Aldrich
Anti-Rabbit Antikörper	Sigma Aldrich
Anti-Strep Antikörper	USBiological
APS (Ammonium Persulfat)	Roth
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat)	Roth
Blotmembran für Proteine (Roti-PVDF)	Roth
Blotmembran für RNA	Roche
Chitin-Beads	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blau R-250	AppliChem
DEPC	Roth
DNA-Längenmarker 100 bp	New England Biolabs
DNA-Längenmarker λ DNA-BstE II	New England Biolabs
DNA-Polymerasen (Opti-Taq, Pfu)	Eurex
dNTP-Stammlösungen	Qbiogene
<i>E. coli</i> K12 genomische DNA-Microarray	MPI für Infektionsbiologie
Elektroporationsapparatur	BioRad
ELISA Reader (Model 550)	BioRad
Geldokumentationsanlage	Biozym
IPTG	Roth

Laser-Scanner GenePix 4000	Biozym Scientific GmbH
Medien und Medienzusätze	Difco
NanoDrop	Peqlab
NBT	AppliChem
Nukleotid-Analoga Cy3-dUTP und Cy5-dUTP	Amersham Biosciences Europe GmbH
Oligonukleotide	Metabion
ONPG	Roth
PCR-Thermocycler	MWG Biotech, Peqlab
Photometer Ultrospec 1000	Amersham Biosciences Europe GmbH
Plasmidpräparationskit	Analytik Jena
Proteingrößenstandard	New England Biolabs
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Random Hexamer Primer	Invitrogen GmbH
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNeasy-Kit	Qiagen
Rnase-freie DNaseI	Roche Diagnostics GmbH
SuperscriptII Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH
Temed	Roth
X-Gal	Roth

3.2 Medien und Medienzusätze

3.2.1 Flüssigmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Die Zusammensetzung des reichhaltigen Mediums Luria-Bertani (LB) erfolgte nach den Angaben von Silhavy *et al.* (Silhavy *et al.*, 1984). Bei der Einschnitt-Inaktivierung chromosomaler Gene wurden SOB- und SOC-Medien eingesetzt, wobei das SOC-Medium zusätzlich zu den Komponenten im SOB-Medium 20 mM Glukose enthielt.

SOB-Medium:

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

0,5 g Natriumchlorid

mit 950 ml destilliertem Wasser auffüllen

+ 10 ml 250 mM Kaliumchlorid

Natronlauge zum Einstellen des pH-Wertes auf 7

vor Gebrauch Zugabe von 10 ml steriler 1M Magnesiumchlorid-Lösung

3.2.2 Feste Medien

Um Medien zu verfestigen, wurden zu einem Liter Medium 15 g Agar gegeben. Nach dem Autoklavivorgang wurden ca. 25 ml des Mediums in sterile Petrischalen gegossen. Motilitätsplatten enthielten 5 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl und 3 g Bacto-Agar pro Liter.

3.2.3 Medienzusätze

Die in nachfolgender Tabelle aufgeführten Medienzusätze wurden in hochkonzentrierten Stammlösungen angesetzt (100 – 1000-fach).

Tab. 3.2: Medienzusätze und ihre Konzentrationen

Medienzusätze	Lösungsmittel	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	70% Ethanol	20 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Natriumcitrat	H ₂ O	1M	20 mM
Tetrazyclin	70% Ethanol	5 mg/ml	5 µg/ml
X-Gal	DMF	10 mg/ml	30 µg/ml

3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Tab. 3.3: Zusammenstellung verwendeter Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pNAT2	pJL28-Derivat, <i>ycgF::lacZ</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
pNAT4	pJL28-Derivat, <i>ycgE::lacZ</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
pNAT5	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> (ATA als Startkodon)	N. Tschowri, Diplomarb.
pNAT6	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF	diese Arbeit
pNAT8	pCAB18:: <i>yaiC</i>	diese Arbeit
pNAT9	pCAB18:: <i>yhjH</i>	diese Arbeit
pNAT10	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R)	diese Arbeit
pNAT13	pTYB12-Derivat zur Überexpression von <i>ycgE</i> mit einem N-terminalen Intein- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT15	pET32a-Derivat zur Überexpression von <i>ycgE</i> mit einem N-terminalen TRX-His6-S- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT20	pJL28-Derivat, <i>bdm::lacZ</i>	diese Arbeit
pNAT21	pET32a-Derivat zur Überexpression von <i>ycgE</i> -NTD mit einem N-terminalen TRX-His6-S- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT22	pET32a-Derivat zur Überexpression von <i>ycgE</i> -CTD mit einem N-terminalen TRX-His6-S- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT23	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF-NTD	diese Arbeit
pNAT24	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF-CTD	diese Arbeit
pNAT25	pCAB18:: <i>ymgA</i>	diese Arbeit
pNAT26	pCAB18:: <i>ymgB</i>	diese Arbeit
pNAT27	pCAB18:: <i>ycgZymgAymgB</i>	diese Arbeit
pNAT30	pCAB18:: <i>ymgC</i>	diese Arbeit
pNAT31	pCAB18:: <i>ycgZ</i>	diese Arbeit
pNAT35	pCAB18:: <i>ycgE</i>	diese Arbeit
pNAT55	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R; M362E; A365E)	diese Arbeit
pNAT57	pTRG:: <i>ymgB</i> für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT59	pBT:: <i>rcsD</i> (cytoplasmatische Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT60	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R; M362E; A365E; T247N)	diese Arbeit
pNAT61	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R; M362E; A365E; T247N; H177Q)	diese Arbeit
pNAT63	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R; M362E; A365E; T247N; H177Q; H306D)	diese Arbeit
pNAT66	pQE30Xa- <i>lacI^f</i> -Derivat zur Überexpression von His6-YcgF (I193L; Q195R; M362E; A365E; T247N; H177Q; H306D; S328D)	diese Arbeit
pNAT74	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter	diese Arbeit

	(C-39A; T-38G), ATA als Startkodon	
pNAT75	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (C-39A; T-38G; G-37A), ATA als Startkodon	diese Arbeit
pNAT76	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (G-24A; C-21A), ATA als Startkodon	diese Arbeit
pNAT77	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (T-23C; A-22G; A-20G), ATA als Startkodon	diese Arbeit
pNAT78	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (G-24A; T-23C; A-22G; C-21A; A-20G), ATA als Startkodon	diese Arbeit
pNAT79	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> , ATG als Startkodon	diese Arbeit
pNAT80	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (C-39A; T-38G), ATG als Startkodon	diese Arbeit
pNAT81	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (C-39A; T-38G; G-37A), ATG als Startkodon	diese Arbeit
pNAT82	pJL28-Derivat, <i>ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (T-23C; A-22G; A-20G), ATG als Startkodon	diese Arbeit
pNAT86	pBAD18:: <i>ymgB</i> , C-terminaler Strep- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT87	pBT:: <i>ymgC</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT88	pTRG:: <i>rcsB</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT89	pBT:: <i>ymgA</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT90	pBT:: <i>ycgZ</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT91	pBT:: <i>rcsC</i> , (cytoplasmatische Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT92	pTRG:: <i>rcsC</i> , (cytoplasmatische Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT93	pBT:: <i>rcsB</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT94	pBT:: <i>ymgB</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT95	pBAD33:: <i>rcsC</i> , (cytoplasmatische Domäne), N-terminaler His- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT96	pBAD33:: <i>rcsB</i> , N-terminaler His- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT97	pBT:: <i>ycgF</i> -M8 (I193L; Q195R; M362E; A365E; T247N; H177Q; H306D; S328D), für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT98	pBT:: <i>ycgF</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT99	pTRG:: <i>ycgE</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT100	pBAD33:: <i>ymgA</i> , N-terminaler His- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT101	pTRG:: <i>ymgC</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT102	pTRG:: <i>ycgZ</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT108	pTRG:: <i>ymgA</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT110	pTRG:: <i>rcsD</i> , (cytoplasmatische Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT113	pBAD33:: <i>ycgZ</i> , N-terminaler His- <i>tag</i>	diese Arbeit
pNAT116	pTRG:: <i>ycgE</i> -NTD, für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT117	pTRG:: <i>ycgE</i> -CTD, für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT124	pTRG:: <i>rcsC</i> , (ABL-Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT125	pTRG:: <i>rcsC</i> , (PR-Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pNAT126	pTRG:: <i>rcsC</i> , (HK-Domäne) für Bacterial Two Hybrid-Analysen	diese Arbeit
pSL4	pTRG:: <i>mlrA</i> , für Bacterial Two Hybrid-Analysen	Lindenberg <i>et al.</i> , 2012

pSL11	pTRG:: <i>mlrA</i> -NTD, für Bacterial Two Hybrid-Analysen	Lindenberg <i>et al.</i> , 2012
pSL12	pTRG:: <i>mlrA</i> -CTD, für Bacterial Two Hybrid-Analysen	Lindenberg <i>et al.</i> , 2012
pBAD18	induzierbarer Vektor mit dem Promoter des <i>araBAD</i> -Operons, <i>araC</i> , pBR322 origin, Amp-Resistenz	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBAD33	induzierbarer Vektor mit dem Promoter des <i>araBAD</i> -Operons, <i>araC</i> , pACYC184 origin, Cm-Resistenz	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBT	BacterioMatch II Two-Hybrid System Vektor; kodiert für cI-Repressor des λ -Phagens, Cm-Resistenz	Agilent Technologies
pTRG	BacterioMatch II Two-Hybrid System Vektor; kodiert für RNAP α NTD, Tet-Resistenz	Agilent Technologies
pCAB18	IPTG-induzierbarer niedrig Kopienzahl Vektor mit einem p_{lac} Promoter, Amp-Resistenz	Barembuch und Hengge, 2007
pCP20	FLP-Helferplasmid, temperatursensitive Replikation, temperaturinduzierbare FLP-2000 Synthese, Amp-Resistenz	Datsenko & Wanner, 2000
pETDuet	Überexpressionsvektor mit zwei „Multiple-Cloning-Sites“ zur Co-Expression von Proteinen mit einem His6- oder S-tag	Merck, früher Novagen
pET32a	Überexpressionsvektor zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen TRX-His6-S-tag	Merck, früher Novagen
pJL28	<i>lacZ</i> -Proteinfusionsvektor, Amp-Resistenz	Lucht <i>et al.</i> , 1994
pKD3	Template-Plasmid für Einschnitt-Inaktivierung; Amp- und Cm-Resistenz	Datsenko & Wanner, 2000
pKD4	Template-Plasmid für Einschnitt-Inaktivierung; Amp- und Kan-Resistenz	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	Red Rekombinase-Expressions-Plasmid für Einschnitt-Inaktivierung; Amp-Resistenz	Datsenko & Wanner, 2000
pSUB11	Template-Plasmid für FLAG:: <i>Kan^R</i> Kasette (3xFLAG-Epitop), Kan-Resistenz	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pTYB12	Überexpressionsvektor (IMPACT-CN-System) zur Expression von Proteinen mit einem selbst-abspaltbaren N-terminalen Intein-tag, Amp-Resistenz	New England Biolabs
pQE30Xa- <i>lacI^f</i>	Überexpressionsvektor zur Expression von Proteinen mit einem N-terminalen His6-tag sowie einer Erkennungssequenz für die Faktor-Xa-Protease zur Abspaltung des His6-tags, Amp-Resistenz	Qiagen

Tab. 3.4: Zusammenstellung verwendeter Bakteriophagen

Lysat	Funktion	Referenz/Herkunft
λ RS45	transduzierender Phage	Simons <i>et al.</i> , 1987
λ RS74	transduzierender Phage	Simons <i>et al.</i> , 1987
P1 _{vir}	transduzierender Phage	Laborsammlung

Tab. 3.5: Zusammenstellung verwendeter Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
NAT1	MC4100 <i>ycgE::cat</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT5	MC4100 <i>ycgF::lacZ</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT7	MC4100 <i>ycgE::lacZ</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT16	MC4100 <i>ycgF::kan</i>	N. Tschowri, Diplomarb.

NAT21	MC4100 <i>ycgZ::lacZ</i> (ATA als Startkodon)	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT22	MC4100 <i>ycgZ::lacZ ycgF::kan</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT23	MC4100 <i>ycgZ::lacZ ycgE::cat</i>	N. Tschowri, Diplomarb.
NAT42	MC4100 <i>ycgZymgAymgB::cat</i>	diese Arbeit
NAT72	W3110 Δ <i>lacU169 bdm::lacZ</i>	diese Arbeit
NAT74	W3110 Δ <i>lacU169 bdm::lacZ rcsB::kan</i>	diese Arbeit
NAT78	W3110 Δ <i>lacU169 bdm::lacZ rcsC::cat</i>	diese Arbeit
NAT102	MC4100 <i>bdm::lacZ</i>	diese Arbeit
NAT103	MC4100 <i>bdm::lacZ ycgF::kan</i>	diese Arbeit
NAT104	MC4100 <i>bdm::lacZ ycgE::cat</i>	diese Arbeit
NAT113	MC4100 <i>bdm::lacZ rcsB::kan</i>	diese Arbeit
NAT114	MC4100 <i>bdm::lacZ rcsB::kan ycgE::cat</i>	diese Arbeit
NAT115	MC4100 <i>bdm::lacZ ymgB::kan</i>	diese Arbeit
NAT116	MC4100 <i>bdm::lacZ ymgB::kan ycgE::cat</i>	diese Arbeit
NAT122	W3110 Δ <i>lacU169 rcsB::kan</i>	diese Arbeit
NAT123	W3110 Δ <i>lacU169 rcsC::cat</i>	diese Arbeit
NAT124	W3110 Δ <i>lacU169 rcsD::kan</i>	diese Arbeit
NAT125	MC4100 <i>resD::kan</i>	diese Arbeit
NAT197	W3110 Δ <i>lacI-A ycgF::kan</i>	diese Arbeit
NAT216	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> , ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT217	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (C-39A; T-38G), ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT218	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (C-39A; T-38G; G-37A), ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT219	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (G-24A; C-21A), ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT220	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (T-23C; A-22G; A-20G), ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT221	W3110 Δ <i>lacI-A ycgZ::lacZ</i> mit Mutationen im Promoter (G-24A; T-23C; A-22G; C-21A; A-20G), ATA als Startkodon	diese Arbeit
NAT239	MC4100 <i>ycgZ::FLAG</i>	diese Arbeit
NAT240	MC4100 <i>ymgA::FLAG</i>	diese Arbeit
NAT241	MC4100 <i>ymgB::FLAG</i>	diese Arbeit
NAT242	MC4100 <i>ymgC::FLAG</i>	diese Arbeit
AP34	W3110 Δ <i>lacU169 yhjH::lacZ</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
MP43	MC4100 <i>resB::kan</i>	Mika <i>et al.</i> , 2012
MP59	MC4100 <i>resC::cat</i>	Mika <i>et al.</i> , 2012
MP111	MC4100 <i>rprA::kan</i>	Mika <i>et al.</i> , 2012
HW142	MC4100 <i>csgB::lacZ</i>	Weber <i>et al.</i> , 2006
SUB136	W3110 Δ <i>lacU169 csgB::lacZ rprA::kan</i>	Mika <i>et al.</i> , 2012
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhdsS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
ER2566	<i>F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 O(mcrCmrr) 114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	New England Biolabs
W3110	<i>E. coli</i> K12 <i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 2006
W3110 Δ <i>lacU169</i>	W3110O(<i>argF-lacU</i>)169 <i>zaj-3053::Tn10</i>	Nichols <i>et al.</i> , 1998 Peters <i>et al.</i> , 2003
MC4100	<i>E. coli</i> K12 F- <i>araD139 O(argF-lac)U169 deoC flbB5301 relA1 rpsL150 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden bei 37°C, 28°C, 23°C oder 16°C aerob im Reagenzglasroller oder im Wasserbad angezchtet. Dabei wurden die Kulturgefäße zu maximal 20% befüllt, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Die Kultivierung von Bakterienstämmen auf Festmedien erfolgte im Brutschrank oder im Brutraum bei 37°C, 28°C oder 16°C über Nacht bzw. wie angegeben.

3.4.2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde durch die Messung der optischen Dichte bei der Wellenlänge 578 nm bestimmt. Unbenutztes Ausgangsmedium diente als Referenz bei den Messungen. Um die Linearität des Verhältnisses der Zellkonzentration zur OD_{578} zu gewährleisten, musste auf eine entsprechende Verdünnung der Kultur ab Werten größer als $OD_{578} = 0,5$ geachtet werden.

3.4.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten

Für die Aufbewahrung von Bakterienstämmen über einen längeren Zeitraum wurden Übernachtskulturen in LB mit DMSO (Endkonzentration 7%) versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

Auf Festmedien wurden Bakterienstämme für maximal eine Woche im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Phagenlysate, mit wenigen Tropfen Chloroform versetzt, wurden zur Aufbewahrung bei 4°C in Glasröhrchen überführt.

3.4.4 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden 20 Minuten bei 1 bar und 120°C feucht autoklaviert. Glaswaren wurden 8 Stunden bei 180°C trocken sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden unter Verwendung von Millipore-Filtern (Porendurchmesser 0,25 µm oder 0,45 µm) sterilfiltriert.

3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats

Für die Herstellung eines P1-Lysats wurde eine Übernachtskultur (5 ml) des Spender-Bakterienstammes benötigt. Diese Kultur wurde dann 1:100 verdünnt (50 μ l in 5 ml LB) und bei 37°C bis zu einer $OD_{578} = 0,3$ angezüchtet. Nach Zugabe eines Tropfen 1 M $CaCl_2$ und ein bis zwei Tropfen eines Wildtyp P1_{vir}-Lysates erfolgte die Lyse der Bakterienzellen bei 37°C für ca. 3-8 Stunden.

Zeigte die Kultur keine Trübung mehr und wurden deutliche Zelltrümmer sichtbar, so wurden 5-10 Tropfen Chloroform zur gänzlichen Abtötung der Zellen hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Lysat für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2-3 Tropfen Chloroform wurde das Phagenlysate bei 4°C aufbewahrt.

3.4.6 P1-Transduktion

Die Stammkonstruktion mittels P1-Transduktion beinhaltet die Übertragung von DNA aus einer Spender- in eine Empfängerzelle und ermöglicht einen einfachen Transfer von speziellen, selektierbaren Markern (Miller, 1972; Miller, 1992).

Hierzu wurde vom Donorstamm ein P1-Lysat gezogen und zur Infizierung der Empfänger-Kultur folgendermaßen eingesetzt:

5 ml Übernachtskultur des Rezipienten wurden bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen und das Zellpellet im $\frac{1}{2}$ Volumen (2,5 ml) 10 mM Magnesiumsulfat resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 5 mM $CaCl_2$ wurde zu 500 μ l Zellsuspension 100 μ l des P1-Lysats hinzugegeben, die Kontrolle wurde ohne Zusatz des Lysats gleich behandelt. Die Kultur wurde 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml LB-Medium. Nach 20-minütigem Schütteln bei 37°C und Zugabe von einem Tropfen Na-Citrat wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem notwendigen Antibiotikum ausplattiert.

3.4.7 Blaulicht-Experimente

Zur Blaulichtexposition wurden die Zellkulturen in Bechergläsern, bedeckt mit einem durchsichtigen Plastikdeckel, bei unterschiedlichen Temperaturen wachsen gelassen. Die Belichtung mit Blaulicht (470 nm) mit einer Intensität von ca. 140 μ M / $m^2 \text{sec}^{-1}$ erfolgte mit Hilfe eines aus 112 LEDs bestehenden Array (gebaut von Gerhard Kiske, Elektromechaniker, FU-Berlin), der von oben an die Wachstumsgefäße angebracht wurde. Die gleiche Blaulichtquelle wurde auch bei den *in vitro* Enzymassays eingesetzt.

3.4.8 Motilitätsassay

Um die Motilität von Bakterienstämmen zu testen, wurden 3 µl einer Übernachtskultur (eingestellt auf OD_{578nm} von 4,0) in den Schwimmagar (0,5 % Bacto-Trypton, 0,5% NaCl, 0,3% Agar) pipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 5 Stunden bei 28°C.

3.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.5.1 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Isolation erfolgte mittels des InnuPrep Plasmid Mini Kits von Analytik Jena.

3.5.2 Isolation von genomischer DNA

Für die Präparation chromosomaler DNA wurde 1 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (14,000 x g) und das Pellet in 1 ml 0,85%-iger NaCl-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension des Pellets in 500 µl sterilem dH₂O. Anschließend wurde die Probe 10 min in heißem Wasser gekocht und nach 1-minütiger Zentrifugation auf das Eis gestellt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt. Alternativ wurde das DNA-Extraction Kit von Analytik Jena verwendet.

3.5.3 Polymerasekettenreaktion

Die PCR-Reaktion wurde mit dem Primus PCR Gerät von der Firma MWG-Biotech AG oder mit dem Thermocycler von Peqlab nach den allgemeinen Vorgaben von Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Amplifikation wurden die Pfu- oder die Opti-Taq-Polymerasen eingesetzt.

Ein üblicher PCR-Ansatz von 50 µl enthielt:

1 Einheit Polymerase, 1x Polymerase-Reaktionspuffer, 1 mM dNTPs, 0,4 pM Primer 1, 0,4 pM Primer 2, chromosomale DNA oder Plasmid-DNA als Template und bidestilliertes Wasser.

3.5.4 Punkt-spezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR

Zielgerichtete Mutationen im *ycgZ*-Promoter sowie in *ycgF* wurden mittels der Zwei-Schritt PCR unter Verwendung von vier Primern generiert (Higuchi, 1990). Zwei Primer, die stromaufwärts und stromabwärts an den äußeren Enden des Ziel-Templates binden, stellen „externe“ Primer dar. Die „internen“ komplementären Primer tragen die gewünschte Mutation und lesen jeweils stromaufwärts und stromabwärts. Die erste PCR beinhaltete die

Kombination eines entsprechenden „externen“ und eines „internen“ Primers zur Herstellung von zwei partiell überlappenden PCR-Fragmenten. Nach Elution dieser Fragmente aus einem Agarosegel, wurden sie im Verhältnis 1:1 als Template für die zweite PCR mittels der beiden „externen“ Primern eingesetzt. Das Produkt der zweiten PCR enthielt die gewünschte Mutation und wurde nach Gelelution mit entsprechenden Enzymen verdaut und in den vorgesehenen Vektor kloniert.

Tab. 3.6: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

1. Primer zur Herstellung der verwendeten DNA-Fragmente für die EMSA-Studien

<i>csgD</i>	5'- CACCGAAATATTTTTTATATGC -3' 5'- CAATCTAGCCATTACAAATCTTA -3'
<i>ycgZ</i>	5'- ATGCATTAGCACTAATTGCA -3' 5'- GTGATTGCTCCCGCAGAATC -3'

2. Primer zur Herstellung des in der Footprint-Analyse verwendeten DNA-Fragments

<i>ycgZp-fw</i>	5'- DIG-GTATAGATTGTCAGTTAAATGATGC -3'
<i>ycgZp-rev</i>	5'- GATGCATGCTACGCCTCTG -3'

3. Bei der Primer-Extension-Analyse verwendete Primer

<i>ycgE</i>	5'- GCCACAATTCCTCCTTGCGGTC -3'
<i>ycgF</i>	5'- CGTCGTCACGTATATGGCTACG -3'
<i>ycgZ</i>	5'- GTGATTGCTCCCGCAGAATC -3'

4. Primer zur Mutantenherstellung mittels One-Step-Inactivation

<i>ycgF::kan</i>	5'- GATATGTCTGTTACCGTCTTACTCTCGCCTCACCCATTACCCTGGA TTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3' 5'- CCTGCGCCAAAATGATCAATTGCTACACTGATACCAGCAGCCTTTA GCGCATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ycgE::cat</i>	5'- ATTGTACAAAGTATTATTGGGTCGTGTACAGGCGACGGAGATTTGTG ACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3' 5'- TGTGGGTTTACAGATTATAACATTCTGTCTAAGGGGCGGGATAAAGGTG AACATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ycgZymgAB::cat</i>	5'-CTGTACACATATTTTCGTACAAGTTTGCTATTGTTACTTCACTTAACA TTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' 5'-GAAGTTACATATCATCAGCTGTGTATCGCAACACGATTTCCAGTGTTT TTCCATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ymgB::kan</i>	5'- CCATGCTTGAAGATACTACAATTCATAATGCAATAACTGATGAAG CGTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3 5'-AAGTTACATATCATCAGCTGTGTATCGCAACACGATTTCCAGTGTTT TTCATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'
<i>rcsF::kan</i>	5'- GAGGAAATACTATGCGTGCTTTACCGATCTGTTTAGTAGCACTCATG CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3' 5'- GTGCGGTTGGAATGCTCGGCGGAGAGTCCTGATTAGAGGCCTGGCAAG AGATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'

5. Primer zur Herstellung von *lacZ*-Fusionen

<i>ycgF-EcoRI</i>	5'- CGGAATTCGTAACGAGTGATTGCTCCCGCAGAATC- 3'
<i>ycgF-HindIII</i>	5'- CGTGACAAGCTTCAGGTTTCGTCGTCACGTATATGGC- 3'
<i>ycgE-EcoRI</i>	5'- CGGAATTCGTTAGCCATATACGTGACGACGAAC- 3'
<i>ycgE-HindIII</i>	5'- CGTGACAAGCTTCGCAACGTTTCAGCAACATCACC- 3'
<i>ycgZ-EcoRI</i>	5'- CGGAATTCGACAGGTTTCGTCGTCACGTATATGGC- 3'

<i>ycgZ</i> -HindIII	5'-CGTGACA AAGCTT GAGTGATTGCTCCCGCAGAATC-3'
<i>bdm</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC CGCCTTCCAGTGTGCCTG-3
<i>bdm</i> -HindIII	5'-CGTGACA AAGCTT CCAGAGCGGGTTCTGCTGTTG-3

6. Primer für Klonierung und Mutagenese der *ycgZ*-Promoterregion auf dem pJL28-Vektor

<i>ycgZ</i> -EcoRI-fw	5'-CG GAATTC GACAGGTTTCGTCGTCACGTATATGGC-3'
<i>ycgZ</i> -HindIII-rev	5'-CGTGACA AAGCTT GAGTGATTGCTCCCGCAGAATC-3'
C-39A, T-38G	5'-ATCATTAGGTACACATATTTTC-3' 5'-GAAATATGTGTACCTAATGAT-3'
C-39A, T-38G, G-37A	5'-ATCATTAGATACACATATTTTC-3' 5'-GAAATATGTGTATCTAATGAT-3'
G-24A, C-21A	5'-CACATATTTTCATAAAAGTTTGC-3' 5'-GCAAACCTTTTATGAAATATGTG-3'
T-23C, A-22G, A-20G	5'-CACATATTTTCGCGCGAGTTTGC-3' 5'-GCAAACCTCGCGCGAAATATGTG-3'
G-24A, T-23C, A-22G, C-21A, A-20G	5'-CACATATTTTCACGAGAGTTTGC-3' 5'-GCAAACCTCTCGTGAAATATGTG-3'

7. Primer für Klonierungen in den pCAB18-Vektor

<i>yaiC</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC TAAGGAGGTTCTGAATGTTCCCAAAAATA-3'
<i>yaiC</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT TCAGGCCGCCACTTCGGTG-3'
<i>yhjH</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AAGGAGGACTGAGATGATAAGGCAGG-3'
<i>yhjH</i> -HindIII	5'-GCAG AAGCTT TCTGGTTGATAGTCGGTTTGTAGTC-3'
<i>ycgZ</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGATGCATCAAATTCAGTACTTTAG-3'
<i>ycgZ</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT TCATTCAAAAAGCAACCCAATTAGTGC-3'
<i>yngA</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGATGAAGACATCTGATAATGAACG-3'
<i>yngA</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT CAATGTATTCTGTTTATTTTCTTACCATTG-3'
<i>yngB</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGATGCTTGAAGATACTACAATTC-3'
<i>yngB</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT TCACATATCATCAGCTGTGTATCGC-3'
<i>yngC</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGATGAATAATTCAATCCAGAGAG-3'
<i>yngC</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT CTACTAAGAGAGCACGGATTCCCTG-3'
<i>ycgZyngAB</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGATGCATCAAATTCAGTACTTTAG-3'
<i>ycgZyngAB</i> -HindIII	5'-CGTA AAGCTT TCACATATCATCAGCTGTGTATCGC-3'
<i>ycgE</i> -EcoRI-fw	5'-CG GAATTC AGGAGGTAAGTACTGAGGTGGCTTATTACAGCATTGGTG-3'
<i>ycgE</i> -HindIII-rev	5'-CGTGACA AAGCTT CGCAACGTTACGCAACATCACC-3'

8. Primer für Klonierungen in den pET32a-Vektor

<i>ycgE</i> -NcoI	5'-CGG CCATGG CTTATTACAGCATTGGTG-3'
<i>ycgE</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC TCAGGGGGCATGAAAGATG-3'
<i>ycgE</i> -NcoI (NTD)	5'-CGG CCATGG CTTATTACAGCATTGGTG-3'
<i>ycgE</i> -EcoRI (NTD)	5'-CG GAATTC TCAGCGGGAGGTGTTGTGATCAAG-3'
<i>ycgE</i> -NcoI (CTD)	5'-CGG CCATGG GATACGGAAGATGACTGGAGCCGC-3'
<i>ycgE</i> -EcoRI (CTD)	5'-CG GAATTC TCAGGGGGCATGAAAGATG-3'

9. Primer für Klonierungen in den pTYB12-Vektor

<i>ycgE</i> -NdeI	5'-GGTGGT CATATG GTGGCTTATTACAGCATTGG-3'
<i>ycgE</i> -EcoRI	5'-CG GAATTC TCAGGGGGCATGAAAGATG-3'

10. Primer zur Herstellung der *ycgZ*-Sonde für Northernblot-Analysen und für die Synthese des DNA-Fragmentes mit der *ycgZ*-kodierenden Region für EMSA-Studien

<i>ycgZ</i> -for	5'-ATGCATCAAAATTCAGTGACTTTAG -3'
<i>ycgZ</i> -rev	5'-TTATTCAAAAAGCAACCCAATTAG -3'

11. Primer für Klonierung und Mutagenese von *ycgF* auf dem pQE30Xa-Vektor

<i>ycgF</i> -Phos-fw <i>ycgF</i> -HindIII- rev	5'- Phos-ATGCTTACCACCCTTATTTATC -3' 5'- GACA AAGCTTT TATTTTTTCTCTGGCCACGCTATG -3'
I193L	5'- GAAGCCCTGGTGCGTAAAAATG -3' 5'- CATTTTT ACGCACCAGGGCTTC -3'
H177Q	5'- TTTGCCTTTCAGCCTATTGTC -3' 5'- GACAATAGGCTGAAAGGCAAA -3'
H306D	5'- GCAATTGATGACTTTGGCGCA -3' 5'- TGCGCCAAAG TCATCAATTGC -3'
M362E, A365E	5'- GTCAGTGCTGAAGGCGTGGAAACACCAGAA -3' 5'- TTCTGGTGT TTCCACGCCTTCAGCACTGAC -3'
S328D	5'- ATTAAAATCGACCAGGAATTG -3' 5'- CAATTCCTGG TCGATTTTAAT -3'
T247N	5'- TTACCTATGA ACCTGGTTAAC -3' 5'- GTTAACCAG TTTCATAGGTAA -3'

12. Primer für Klonierung von *mlrA* auf den pETDuet-Vektor (Lindenberg *et al.*, 2012)

<i>mlrA</i> -NdeI	5'- GTCCATATGGCGCTTTACACAATTGGTG -3'
<i>mlrA</i> -XhoI	5'- GCTCTCGAGAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGG -3'

13. Primer für Klonierungen in den pTRG-Vektor

<i>mlrA</i> (Lindenberg <i>et al.</i> , 2012)	5'- GTAC GAATTC AGATGGCGCTTTACACAATTGGTG -3' 5'- GCTACT CGAGT TAAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGGCC -3'
<i>mlrA</i> -NTD (Lindenberg <i>et al.</i> , 2012)	5'- GTAC GAATTC AGATGGCGCTTTACACAATTGGTG -3' 5'- GCTACT CGAGCC ACGTTCCGACGGCTATGTAGATTGCC -3'
<i>mlrA</i> -CTD (Lindenberg <i>et al.</i> , 2012)	5'- GTAC GAATTC AGCTGCGAACGTGGATCAAAGAGCGCGG -3' 5'-GCTACT CGAGT TAAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGGCC-3'
<i>ycgE</i>	5'- CGGAATTC AGGCTTATTACAGCATTGG -3' 5'- CGCTCGAGT TAGGGGGCATGAAAGATG -3'
<i>ycgE</i> -NTD	5'- CGGAATTC AGGCTTATTACAGCATTGG -3' 5'- CGCTCGAGT CAGCGGGAGGTGTTGTGATCAAG -3'
<i>ycgE</i> -CTD	5'- CGGAATTC AGGATACGGAAGATGACTGGAGCCGC -3' 5'- CGCTCGAGT TAGGGGGCATGAAAGATG -3'
<i>resC</i>	5'- CGCGAATTC AGGAACTGGCGCATACTATCTC -3' 5'- CGCCTCGAGT CACGAATCCCAGGATTTCTGAC -3'
<i>resC</i> -HK	5'- CGCGAATTC AGGAACTGGCGCATACTATCTC -3' 5'- CGCCTCGAGT CACCAGCAGCGTTTACCACTCAA -3'
<i>resC</i> -ABL	5'- CGCGAATTC AGGCGTCGCTCTGTCAGTTCTG -3' 5'- CGCCTCGAGT CAGTCATTATCGCTGACCGCTTTGTC -3'
<i>resC</i> -PR	5'- CGCGAATTC AGCTGGCAGATCAGTTGGGATCG -3' 5'- CGCCTCGAGT CACGAATCCCAGGATTTCTGAC -3'
<i>resD</i>	5'- CGGAATTC AGCGCCATTTCTCCAGCCGC -3' 5'- CGCTCGAGT CACAGCAAGCTCTTGACATAAC -3'
<i>resB</i>	5'- CGGAATTC CAGAACAATATGAACGTAATTATTGC -3'

	5'- CGC CTCGAGT TCAGTCTTTATCTGCCGGACTTAA -3'
<i>ycgZ</i>	5'- CGC GAATTC CAGCATCAA AATTCAGTGACTTTAG -3' 5'- CGC CTCGAGT CATTCAA AAAAGCAACCCAATTAG -3'
<i>ymgA</i>	5'- CGC GAATTC CAGAAGACATCTGATAATGAACGTAT -3' 5'- CGC CTCGAGT CAATGTATTCTGTTTATTTTCTTACC -3'
<i>ymgB</i>	5'- CG GAATTC CAGCTTGAAGATACTACAATTC -3' 5'- CGC CTCGAGT CACATATCATCAGCTGTGTATCGC -3'
<i>ymgC</i>	5'- CGC GAATTC CAGAATAATTCAATCCCAGAGAG -3' 5'- CGC ACTAGTT CAAGAGAGCACGGATTCCCTGTC -3'

14. Primer für Klonierungen in den pBT-Vektor

<i>ycgF</i> (WT) und <i>ycgF</i> (M8)	5'- CG GAATTC CCCTTACCACCCTTATTTATC -3' 5'- CG CTCGAGT TATTTTTTCTCTGGCCACGCTATGG -3'
<i>rcsC</i>	5'- CG GAATTC CCCTGGAAGAACATGAGCAG -3' 5'- CGC CTCGAGT CACGAATCCC CGGATTTCCTGAC -3'
<i>rcsD</i>	5'- CG GAATTC CCCGCCATTTCTCCAGCCGC -3' 5'- CG CTCGAGT CACAGCAAGCTCTTGACATAAC -3'
<i>rcsB</i>	5'- CG GAATTC CAACAATATGAACGTAATT -3' 5'- CGC CTCGAGT CAGTCTTTATCTGCCGGACTTAA -3'
<i>ycgZ</i>	5'- CGC GAATTC CCCATCAA AATTCAGTGACTTTAG -3' 5'- CGC CTCGAGT CATTCAA AAAAGCAACCCAATTAG -3'
<i>ymgA</i>	5'- CGC GAATTC CAAGACATCTGATAATGAACGTAT -3' 5'- CGC CTCGAGT CAATGTATTCTGTTTATTTTCTTACC -3'
<i>ymgB</i>	5'- CGC GAATTC CCCTTGAAGATACTACAATTC -3' 5'- CGC CTCGAGT CACATATCATCAGCTGTGTATCGC -3'
<i>ymgC</i>	5'- CGC GAATTC CAATAATTCAATCCCAGAGAG -3' 5'- CGC AGATCTT CAAGAGAGCACGGATTCCCTGTC -3'

15. Primer zur Herstellung von Flag-Tag Fusionen

<i>ycgZ</i>	5'- CAGAAACATTATAATGCACTAATTGGGGTTGCTTTTT GAAGACTACAAAGACCATGACGG -3' 5'- CATAGCTAACCTGTAAATAATCAGGCTGTTGCA TTACATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ymgA</i>	5'- AAGTATGTTCAATGGTAAGAAAATAAACAGAATA CATGACTACAAAGACCATGACGG -3' 5'- CAAGCATGGTAACCTCTCATCTTACTTATGAAATT TTACATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ymgB</i>	5'- CACTGGAAATCGTGTTGCGATACACAGCTGATGAT ATGGACTACAAAGACCATGACGG -3' 5'- GAGTTTTCTATAAACTTATACTTAATAATTAGAAG TTACATATGAATATCCTCCTTAG -3'
<i>ymgC</i>	5'- CGGATATCATTATTAATGACAGGGAATCCGTGCTC TCTGACTACAAAGACCATGACGG -3' 5'- CAGCTGATGTTTATTCTAAAACCTTACTCAAGTT CTACATATGAATATCCTCCTTAG -3'

16. Primer für Klonierungen in den pBAD33-Vektor

His6- <i>rcsB</i>	5'- CG GAATTC CAGGAGGTA CTGAGATGCATCACCATCATCACCACGGCGCCGA GAACAATATGAACGTAATTATTGCCG -3' 5'- CGC AAAGCTT CAGTCTTTATCTGCCGGAC -3'
His6- <i>rcsC</i>	5'- CG GAATTC CAGGAGGTA CTGAGATGCATCACCATCATCACCACGGCGCCGA GGA ACTGGCGCATACTATCTC -3'

	5'-CGCAAGCTTTCACGAATCCCGCGATTTCCTGAC-3'
His6- <i>yngA</i>	5'-CGGAGCTCAGGAGGACTGAGATGGCTAGCCATCACCATCATCACCACGGC GCCAAGACATCTGATAATGAACGTAT-3' 5'-CGTAAGCTTTC AATGTATTCTGTTTATTTTCTTACCATTG-3'

17. Primer für Klonierungen in den pBAD18-Vektor

<i>yngB</i> -Strep	5'-CGGAATTCAGGAGGTAAGTACTGAGATGCTTGAAGATACTACAATTC-3' 5'-CGTAAGCTTTCATTATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACATATCATCAG CTGTGTATCGC-3'
--------------------	---

3.5.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde zu den Proben zunächst einmal 6-fach konzentrierter Ladepuffer gegeben. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Längenstandards (*Bst*IIIE verdaute λ DNA oder 100 bp-Marker). Die Elektrophorese erfolgte im 1 x TAE Puffer bei etwa 80 V für ca. 1 Stunde. Die im elektrischen Feld zur Kathode gewanderten Nukleinsäuren wurden durch etwa 15-minütige Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und anschließender Betrachtung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

50x TAE-Stammlösung:

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA

mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt

Gelauftragungspuffer (6x):

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

30 % Glycerin

in 1x TAE

3.5.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem DNA-Extraktionskit QIAquick von Qiagen aus dem Gel aufgereinigt.

3.5.7 Restriktionsenzymverdau von DNA

Restriktionsverdau zur Plasmidanalyse bzw. Klonierung wurde wie folgt angesetzt:

Etwa 0,2 - 1 μ g DNA wurde mit ca. 2 - 8 Einheiten Restriktionsenzym pro μ g DNA verdaut.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 50 μ l. Abhängig vom eingesetzten Enzym und Herstellerangaben wurde der Puffer in vorgeschriebener Menge hinzugegeben. Die Reaktionszeit betrug meistens zwei Stunden bei 37°C. Bei Notwendigkeit wurden die Enzyme nach der Inkubation für 20 min bei 65°C inaktiviert.

3.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach der Standardvorschrift von Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

3.5.9 TSS-Transformation

Die Übertragung von gereinigten Plasmiden in die gewünschten Rezipientenstämme erfolgte mit Hilfe der TSS-Transformation (Chung *et al.*, 1989). Bei der TSS-Transformation benötigt man 200 μ l des Rezipientenstammes, der sich in der exponentiellen Phase befinden sollte ($OD_{578} = 0,3 - 0,4$). Zu diesen Zellen wird dann 200 μ l 2 x TSS hinzugegeben, wobei der ganze Ansatz auf Eis stehen muss. 1 - 2 μ l Plasmid-DNA werden beigelegt und der Ansatz 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen bei 37°C für eine Stunde geschüttelt, um dann auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert zu werden.

2 x TSS: 20% PEG-6000, 10% DMSO (nach dem Autoklavieren zugeben), 10 mM $MgSO_4$ (nach dem Autoklavieren durch Sterilfiltration zugeben).

3.5.10 Herstellung elektrokompenter Zellen

Es wurden 500 ml LB-Medium mit 1/100 Volumen einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer $OD_{578} = 0,5 - 0,6$ angezogen und nach Umfüllen in kalte Zentrifugationsbecher für 30 min auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation (15 min, 6000 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml eiskaltem dH_2O resuspendiert. In weiteren Zentrifugationsrunden wurde das Pellet zunächst einmal in 10 ml und zum Schluss in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen und portionsweise (40 - 50 μ l) in Eppendorfgefäße abgefüllt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.5.11 Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation wurden zu 50 μ l elektrokompenter Zellen ca. 2 μ l DNA hinzugegeben. Nach Überführung des Ansatzes in Elektroporationsküvetten (0,2 cm, BioRad) wurde der Elektroporator auf 2500 V eingestellt. Nach der Applikation des elektrischen Pulses wurde sofort 1 ml LB dazugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer Selektionsplatte mit dem Zusatz des notwendigen Antibiotikums ausplattiert und über Nacht inkubiert.

3.5.12 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von isolierten DNA-Fragmenten bzw. Plasmid DNA wurden von der Firma GATC durchgeführt.

3.5.13 Konstruktion von Plasmiden mit translationaler *lacZ*-Fusion

Zur Konstruktion von Plasmiden, welche translationale *lacZ*-Fusionen unter der Kontrolle des Wildtyp Promotors tragen, wurde zur Amplifikation der ausgewählten Genregion chromosomale DNA von *E. coli* als Template eingesetzt. Bei der Klonierung des PCR-Fragmentes in den *lacZ*-Fusionsvektor pJL28 (Lucht *et al.*, 1994) wurde folgendermaßen vorgegangen:

Verdau: Zunächst wurde sowohl der Vektor als auch das DNA-Fragment mit den entsprechenden Enzymen verdaut. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass ihre Schnittstellen in der Sequenz des Vektors bzw. des PCR-Fragmentes nur einmal vorkamen.

Ligation: Nach dem Restriktionsverdau wurden 0,1 µg des geschnittenen Vektors mit etwa 1 µg Fragment unter Zugabe von 1-2 Einheiten T4-DNA-Ligase und 3 µl 10x Ligationspuffer in einem 30 µl Ansatz ligiert. Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht.

Es folgten Elektroporation, Reinigung der Transformanten, Plasmidpräparation, Kontrolle der Klonierung durch Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung. Wurde durch die Sequenzierung die korrekte Insertion des DNA-Fragmentes bestätigt und alle möglichen Mutationen ausgeschlossen, so konnte die *lacZ*-Fusion ins Chromosom von *Escherichia coli* gekreuzt werden.

3.5.14 Kreuzung translationaler *lacZ*-Fusion in das Chromosom von *Escherichia coli*

Um die konstruierte *lacZ*-Fusion in das Chromosom von *Escherichia coli* zu kreuzen, wurden die Plasmid-kodierten Fusionskonstrukte durch *in vitro*-Rekombination auf den Phagen λRS45 oder λRS74 übertragen (Simons *et al.*, 1987). Das Prinzip des Transfers beruht auf einer doppelt homologen Rekombination des Gene *lacZ'* und *bla'* des Phagen mit den auf den jeweiligen Fusionsplasmiden divergent orientierten Genen *lacZ* und *bla*. Über die Integration des Phagen an der *attB*-site von *E. coli* wurde die Fusion stabil in das Chromosom gekreuzt. Mittels eines PCR-Tests von Powell (Powell *et al.*, 1994) wurden die erzeugten Stämme auf Einzellysogenie untersucht und mehrfache Integration des Phagen ausgeschlossen.

3.5.15 Inaktivierung chromosomaler Gene mittels PCR-Produkten

Die Herstellung von *Knock-out* Mutanten erfolgte mit Hilfe der Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Dabei wurden chromosomale Gene von *E. coli* durch die Insertion eines Chloramphenicolresistenz – oder Kanamycinresistenz-Gens (*cat* bzw. *kan*) inaktiviert, wobei die Insertion über homologe Rekombination zwischen den Enden der durch PCR generierten Antibiotikakassette mit den flankierenden Regionen des chromosomalen Gens erfolgte.

Dabei war es zunächst notwendig, geeignete Primer zu konstruieren. Diese sollten an ihrem 5'-Ende ca. 50 bp enthalten, die homolog zu den flankierenden Sequenzen des zu mutierenden Gens sind. Am 3' Ende sollten die Primer ca. 20 bp aufweisen, die homolog zu der einzusetzenden Antibiotikakassette sind, wobei das Template-Plasmid pKD3 das *cat*-Gen trägt und pKD4 das *kan*-Gen aufweist.

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und über Qiagen Gelextraction Kit aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden durch Elektroporation in elektrokompente Zellen, die das pKD46 Plasmid enthielten, übertragen. Das temperatursensitive Helferplasmid pKD46 exprimiert bei 30°C die für die Rekombination notwendige λ Red Rekombinase, wobei die Induktion durch Zugabe von Arabinose bei der Herstellung kompetenter Zellen erfolgt. Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach den Vorgaben von Datsenko und Wanner. Die korrekte Insertion der Antibiotikakassette wurde mittels PCR überprüft (Datsenko und Wanner, 2000).

Nach einem ähnlichen Prinzip unter der Verwendung des pSUB11-Vektors wurden Stämme mit chromosomalen 3xFLAG Fusionen zu den Genen *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB* und *ymgC* hergestellt (Uzzau *et al.*, 2001).

3.5.16 β -Galaktosidaseaktivitätstest

Der β -Galaktosidaseaktivitätstest wurde, mit wenigen Änderungen, nach Miller *et al.* durchgeführt (Miller, 1972; Miller, 1992). Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde in μmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Im Gegensatz zu Miller wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei 578 nm und die Absorption des Farbstoffs ONPG bei 415 nm gemessen.

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden 1 ml Zellen der Hauptkultur entnommen und nach entsprechender Verdünnung in Z-Puffer überführt. Das Aufschließen der Zellen erfolgte mittels eines Tropfens 0,1% SDS und zwei Tropfen Chloroform. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl ONPG (4 mg/ml) gestartet und nach Erreichen

bestimmter Gelbfärbung bzw. nach einer Stunde durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat abgestoppt. Die Ansätze wurden 10 Minuten zentrifugiert, 300 µl des Überstandes in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend die Absorption im Microplate reader Model 550 (BioRad) bei 415 nm gemessen. Als Referenz diente ein Kontrollansatz, der anstelle der Bakteriensuspension nur Z-Puffer enthielt.

3.6 RNA-basierte Methoden und DNA-Microarray-Analyse

3.6.1 RNA Handhabung und Aufbewahrung

Die Arbeit mit RNA erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen, um die Degradation der RNA durch RNasen auszuschließen.

1. Alle RNA-Arbeiten erfolgten ausschließlich mit Handschuhen.
2. Eppendorfgefäße, die bei der Handhabung von RNA zum Einsatz kamen, wurden grundsätzlich zwei Mal autoklaviert.
3. Alle Lösungen wurden entweder zwei Mal autoklaviert oder mit DEPC-Wasser (0,1%) hergestellt.
4. Die für die Gelelektrophorese der RNA-Proben eingesetzte Gelkammer und das notwendige Zubehör wurden über Nacht mit 1% Klorix behandelt und vor dem Einsatz gründlich mit DEPC-Wasser ausgewaschen.
5. Sollten RNA-Proben für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, so wurden sie in RNase-freiem Wasser (RNeasy-Kit, Qiagen) gelöst und bei -80°C gelagert. Während der Experimente wurden die RNA-Ansätze immer auf Eis gehalten.

3.6.2 Ernten der Zellen für die RNA-Isolation

Für die Microarray- sowie Northernblot-Analyse wurde die RNA aus den angegebenen Stämmen isoliert, die in LB bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 angezüchtet und dann zu 16°C transferiert wurden. Nach weiteren 3 h Zellwachstum unter Blaulichtbedingungen wurden 30 ml von jeder Kultur entnommen und in schon vorbereitete Falcon-Tubes mit 1,25 ml eiskaltem 5% Phenol in Ethanol pro 10 ml Kultur gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurden die Zellen bei 5000 g und 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung der Zellen bis zur RNA-Isolierung erfolgte bei -80°C.

3.6.3 Zelllyse und RNA-Isolation

Zelllyse und RNA-Isolierung wurden nach den Angaben von Tani *et al.* durchgeführt (Tani *et al.*, 2002). Dabei ist im Einzelnen wie folgt vorgegangen:

1. Lösen des Zellpellets in 800 μ l Tris-EDTA pH 8 mit 0,5 mg/ml Lysozym
2. Zugabe von 80 μ l mit DEPC-Wasser frisch hergestelltes 10% SDS
3. Inkubation bei 64°C für 1-2 Minuten
4. Zugabe von 88 μ l 1 M Na-Acetat pH 5,2 und 1 ml H₂O-gesättigtes Phenol pH>7
5. Inkubation bei 64°C für 6 min.
6. Zentrifugation für 15 min. bei 14000 rpm und 4°C
7. Überführung der wässrigen Phase in ein frisches Eppendorfgefäß und Zugabe von einem Volumen Chloroform
8. Zentrifugation für 15 min. bei 14000 rpm und 4°C
9. Überführung der wässrigen Phase in ein frisches Eppendorfgefäß und Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 / 1 mM EDTA und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (100%)
10. Inkubation bei -80°C für 30 min.
11. Zentrifugation für 30 min. bei 14000 rpm und 4°C
12. Waschen des Pellets mit 1 ml kaltem Ethanol (80%)
13. Zentrifugation für 15 min. bei 14000 rpm und 4°C
14. Pellet luft-trocknen und anschließend in 100 μ l RNase-freiem Wasser resuspendieren und bei -80°C aufbewahren

3.6.4 DNase Verdau und Extraktion der RNA

Um DNA-Verunreinigungen der isolierten RNA auszuschließen, wurde ein DNase Verdau der RNA durchgeführt. Dabei wurde zu der RNA Suspension 10 μ l DNase-Puffer (1 M Natriumacetat / 50 mM Magnesiumsulfat; pH 5) und 30 Einheiten RNase-freie DNaseI (Roche) zugegeben. Der DNase-Verdau erfolgte bei 37°C für 20 Minuten, anschließend wurde die DNase für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Als nächstes folgte eine Extraktion der RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1), gefolgt von einer Alkohol-Fällung (Sambrook *et al.*, 1989). Die Resuspension der RNA erfolgte in 20 μ l RNase-freiem H₂O.

3.6.5 Quantitative Kontrolle der RNA

Zur quantitativer Kontrolle der RNA und zur Feststellung des Verunreinigungsgrades wurde die Absorption der RNA-Suspension bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei absorbiert RNA Licht der Wellenlänge 260 nm, Proteine bei 280 nm und Phenol bei 230 nm. Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD_{260} / OD_{280} bestimmt werden, welches bei reiner RNA bei 1,7 bis 1,9 liegt. Die RNA-Konzentration wurde mittels eines NanoDrops (Peqlab) determiniert.

3.6.6 Qualitative Kontrolle der RNA

Zur qualitativen Kontrolle wurde die RNA mittels einer Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei wurden 20 µg RNA in 10 µl DEPC-Wasser mit 40 µl Ladepuffer 2 versetzt und für 15 min bei 65°C erhitzt. Nach Abkühlung (2 min auf Eis) wurden die Proben in einem 0,9% Agarose-Gel mit 1,75% Formaldehyd bei 80 V aufgetrennt (ca. 1 Stunde). MOPS-Puffer diente dabei als Gel- und Laufpuffer. Nach Auftrennung wurde das Gel eine Stunde lang in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend drei Stunden lang im DEPC-Wasser entfärbt. Unter UV-Licht konnte dann die RNA, besonders 16S-RNA und 23S-RNA, sichtbar gemacht werden.

MOPS-Puffer:

0,4 M MOPS
0,05 M Na-Acetat
0,01 M EDTA
0,1 % DEPC

Lade-Puffer 2 (400µl)

250 µl deionisierte Formamide
83 µl 37 % Formaldehyd
50µl 10 x MOPS
4 µl 1 % Bromphenolblau

Natronlauge zum Einstellen des pH auf 7,0 13µl DEPC Wasser

3.6.7 Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Microarray-Analyse

Zur Synthese von Fluoreszenz-markierter cDNA wurden gleiche Mengen RNA aus Wildtyp und Mutante eingesetzt (je 50 µg). Dabei erfolgte die Synthese mit Hilfe von willkürlichen (*random*) Hexamer-Primern und der Reversen Transkriptase SuperscriptII (Invitrogen) nach dem Protokoll der MWG-Biotech-AG. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Nukleotid-Analoga Cy3-dUTP und Cy5-dUTP (Amersham Biosciences Europe GmbH) verwendet. Die fluoreszenzmarkierte cDNA wurde anschließend über Centri-Sep Säulen (Princeton Separations / EMP Biotech GmbH) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Bei der

Reproduktion der Microarray-Analyse wurde die aus dem Wildtyp bzw. der Mutante isolierte RNA revers fluoreszenz markiert.

3.6.8 Hybridisierung

Der Microarray wurde vor der Hybridisierung nach Angaben des Herstellers geblockt.

Die beiden fluoreszenz-markierten Ansätze wurden gemischt und ebenfalls nach Angaben des Herstellers mit dem Array hybridisiert und nach 22-stündiger Inkubation bei 42°C gewaschen.

3.6.9 Scannen und Auswertung des Microarrays

Die Fluoreszenz bei 532 nm (Cy3-dUTP) und 635 nm (Cy5-dUTP) wurde bei einer 10 µm-Auflösung mit einem GenePix 4000 (Axon/Biozym Scientific GmbH) Laser-Scanner bestimmt. Die TIFF Bilder wurden mit der Software GenePix Pro 3.0 (Axon/Biozym Scientific GmbH) analysiert. Das normalisierte Cy5/Cy3-Verhältnis des Medians wurde genutzt, um relative Änderungen in der RNA-Menge anzuzeigen.

Als differentiell exprimiert wurden nur Gene betrachtet, die ein „signal-to-noise“(Signal-zu-Hintergrundrauschen)-Verhältnis von größer als 3 zeigten und Änderungen in der RNA-Menge zwischen Wildtyp und Mutante von wenigstens 2 aufweisen.

3.6.10 Northernblot-Analyse

10 µg isolierter gesamt RNA wurden in einem Volumen von 10 µl mit Ladepuffer 2 (siehe oben) versetzt und bei 65°C 15 min lang erhitzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem denaturierenden 1,2 %-igen Agarosegel mit 6,7 % Formaldehyd und 1x MOPS (siehe oben) bei 80-100 Volt für etwa 3 Stunden mit 1x MOPS als Laufpuffer. Nach der Auftrennung der RNA erfolgten mehrere Waschschrte mit DEPC-Wasser und 20-fachem SSC (2 x 15 min; 3 M NaCl, 0,3 M Sodiumcitrat, 0,1% DEPC, pH 7) gefolgt von dem Blotvorgang mittels eines Vakuum Blotgeräts (Semi Dry) für 1-2 Stunden bei 5 Hg auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche). Nach zwei 5 minütigen Waschschrten der Membran in 2xSSC wurde die RNA durch UV-Crosslinking (5-10 Minuten) auf der Membran fixiert und im Anschluss daran die ribosomalen RNAs (16S und 23S RNA) als Ladungskontrolle mit Methylenblau (0,02 % Methylenblau, 0,3 M NaAcetat pH 5,5, 0,1% DEPC) für 5 Minuten gefärbt. Zur Entfärbung wurde die Membran in einem Bleaching Puffer (0,2xSSC, 1% SDS, 0,1% DEPC) 2x15 min lang gewaschen und schließlich in 2xSSC für 5 min inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die Membran in ein vorgesehene Röhrrchen überführt und in 10

ml Dig Easy Hyb-Lösung bei 50°C im Hybridisierungssofen unter Rotation prähybridisiert. Anschließend wurde diese Lösung gegen 15 ml einer auf 50°C vorgewärmten Dig Easy Hyb Solution (Roche) ausgetauscht, welche die zuvor durch Erhitzen auf 95°C denaturierte Dig-markierte DNA-Sonde zur Detektion der *ycgZ*-spezifischen mRNA enthielt, wobei die Hybridisierung über Nacht bei 54°C erfolgte. Mehrere Waschschrte mit Waschpuffer 1 (2xSSC, 0,1% SDS, 0,1 % DEPC) und Waschpuffer 2 (0,1xSSC, 0,1 % SDS, 0,1% DEPC) am nächsten Tag dienten der Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde.

Zur Detektion wurde die Membran in Detektionspuffer 1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) geschwenkt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mittels Blocking-Puffer geblockt, bevor eine 90-minütige Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper erfolgte. Nach zwei Waschschrten für jeweils 15 Minuten im Detektionspuffer 1 und kurzem Schwenken der Membran im Detektionspuffer 2 (0,1 M Tris (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂) wurde unter der Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDPStar (Roche) die an entsprechende RNA-Bereiche gebundene Sonde nachgewiesen, was durch die Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde.

Blocking Reagenz: 10% (10 g in 100 ml Detektionspuffer 1 im Mikrowellengerät aufkochen, autoklavieren, 5 ml Aliquots bei – 20°C einfrieren)

Blocking Puffer: ein 5 ml Aliquot in 45 ml Detektionspuffer 1 (Endkonzentration =1%)

3.6.11 Primer-Extension-Analyse

Mittels der Primer-Extension-Analyse wurden die Transkriptionsstarts von *ycgE*, *ycgF* und *ycgZ* identifiziert. Um die transkriptionalen Startpunkte von *ycgE* und *ycgF* zu determinieren, wurden die Zellen in LB bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 angezchtet und dann zu 16°C zum weiteren Wachstum über Nacht transferiert. Zur Identifizierung des Transkriptionsstarts von *ycgZ* erfolgte das Zellwachstum über Nacht bei 37°C. Gesamt RNA wurde mit Hilfe des SV RNA Isolations Kits (Promega) aus dem Wildtypstamm MC4100, den *ycgE::cat*-, *ycgF::kan*- und *ycgZymgAB::cat*-Mutanten sowie aus Wildtypzellen, die pJL28-Derivative mit den entsprechenden Promoterregionen von *ycgF*, *ycgE* und *ycgZ* enthielten, isoliert.

Zur Primer-Extension-Analyse eingesetzte Primer wurden mit γ^{32P} -ATP im folgenden Reaktionsansatz markiert: 2 μ l Primer (10 pmol/ μ l), 1 μ l T4 Polynukleotid Kinase (PNK, 10 u/ μ l, Fermentas), 1,5 μ l T4 PNK-Puffer (Fermentas), 2 μ l γ^{32P} -ATP (Hartmann Analytik) und 8,5 μ l Wasser. Nach einer 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die T4 PNK hitzeinaktiviert (90°C für 3 min) und der markierte Primer wurde mittels einer Sephadex G-25 Säule (GE Healthcare) nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

10 µg gesamt RNA wurden mit 2 µl des markierten Primers und 11 µl Wasser sowie 1 µl von RNase-freien dNTPs (10 mM, Invitrogen) bei 65°C für 5 min inkubiert und anschließend 5 min lang auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl der Superscript reversen Transkriptase (Invitrogen), 4 µl von 5xFirst Strand Buffer (Invitrogen) sowie 1 µl DDT (0,1 M) und Inkubation dieses Ansatzes bei 45°C für 60 min mit darauf folgenden Hitzeinaktivierung des Enzyms (70°C für 15 min). Eine Sequenz Leiter wurde mit dem entsprechend gleichen Primer unter der Verwendung des CycleReader DNA Sequencing Kits (Fermentas) generiert.

Nach Zugabe von 5 µl Stop-Lösung (CycleReader DNA Sequencing Kits) zu 2 µl der Primer-Extension Reaktion und 4 µl einer 1:4 verdünnten Stop-Lösung zu 3 µl der jeweiligen Sequenzreaktionen, wurden die Proben bei 90°C für 3 min erhitzt und mittels eines denaturierenden 6 %-igen Polyacrylamid Gels (42 g Harnstoff, 10 ml 10xTBE, 15 ml Rotiphorese Gel 40, 50 µl TEMED, 500 µl 10 % APS in 100 ml) für 2 Stunden bei 60 W aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels erfolgte die Signaldetektion mittels Autoradiographie und dem FLA-2000G Imager (FujiFilm).

3.7 Protein-basierte Methoden

3.7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Extraktion von Proteinen aus einer Bakterienkultur erfolgte die Probenahme bei einer bestimmten OD_{578nm} , wobei die entnommene Menge so gewählt wurde, dass der Gesamtproteingehalt 40 µg betrug. Für die Berechnung der Gesamtproteinmenge gilt dabei die folgende Beziehung zwischen der OD_{578nm} und der Proteinkonzentration: 1 ml Zellsuspension einer OD_{578nm} von 1,0 entspricht 107 µg Gesamtprotein. Nach Zentrifugation und Entfernung des LB-Mediums wurde das Zellpellet in M9-Medium resuspendiert und mit 10 % (Endkonzentration) TCA (Trichloressigsäure) zur 30-minütiger Fällung versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Proteinpellets in SDS-Probenpuffer (0,06 M Tris (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerin, 3% β-Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenol-Blau) resuspendiert und für 5 min bei 100°C erhitzt.

Die SDS-PAGE wurde in Mini-PROTEAN II- oder III-Apparaturen (BioRad) nach den allgemeinen Vorgaben durchgeführt (Laemmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989). Dabei wurde ein 12 %-iges Trenngel (2,5 ml LT-Puffer (36,34 g Tris, 0,8 g SDS in 200 ml Wasser; pH 8,8),

4 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth, Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1), 3,45 ml Wasser, 5 µl TEMED, 25 µl 10% APS) mit einem 4 %-igen Sammelgel (1,25 ml UP-Puffer (6,06 g Tris, 0,8g SDS in 100 ml Wasser, pH 6,8), 0,65 ml Rotiphorese Gel 30, 3,07 ml Wasser, 5 µl TEMED, 25 µl 10% APS) überschichtet. Nach dem Auftrennen der Proteine bei 25 mA pro Gel im SDS-PAGE-Puffer (25 mM Tris, 0,19 M Glycerin, 0,1 % SDS) und maximaler Spannung wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie Brillant Blue R-250) gefärbt oder es erfolgte das Blotten auf eine Membran.

3.7.2 Immunoblot Analyse (Western Blot)

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mittels der Immunoblot Analyse. Dazu wurden die Proteine nach der SDS-PAGE mittels der Mini TransBlot-Apparatur (BioRad) auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran in Methanol equilibriert, dann in Wasser und Transblot Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20 % Methanol) geschwenkt und anschließend auf das SDS-Gel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen zwei Whatmanpapieren (Roth) positioniert und in der Blotapparatur fixiert. Der Blotvorgang erfolgte in kaltem Transblot Puffer für eine Stunde bei 100 Volt und maximaler Stromstärke.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, wurde diese für eine Stunde (oder über Nacht) in TBSTM (TBST Puffer (20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) mit 5 % Milchpulver) inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu blockieren. Nach dem Hinzufügen des primären Antikörpers (3 µl in 20 ml TBSTM anti-CsgD, 4 µl in 20 ml TBSTM anti-Strep, anti-Flag und anti-His Antikörper) erfolgte ein zwei-stündiger Inkubationsschritt mit anschließendem dreimaligen Waschen für 10 min mit TBST, gefolgt von Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde. Nach weiteren Waschrufen in TBST und Äquilibration der Membran in AP (alkalische Phosphatase)-Puffer (100 mM Tris (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) erfolgte die Entwicklung in einer Färbelösung (10 ml AP-Puffer, 33 µl BCIP Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid) und 66 µl NBT Lösung (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)). Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte durch den Austausch der Färbelösung gegen Wasser.

3.7.3 Überproduktion und Reinigung von Proteinen

YcgF sowie YcgF-NTD (BLUF-Domäne) wurden mittels eines N-terminalen His-tags unter der Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt. Zur Überexpression wurde der

Stamm MC4100 mit pQE30Xa-YcgF sowie pQE30Xa-YcgF-NTD transformiert und in LB/Amp bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 angezchtet. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG, gefolgt von dem Transfer der Kulturen zu 16°C zum weiteren Wachstum über Nacht. Nach Zellernte wurden die Zellpellets in Waschpuffer (Qiagen: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH=8,0) resuspendiert und durch Zugabe von Lysozym 1 mg/ml und mittels einer French-Press aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelllysate abzentrifugiert und der Überstand mit 1,5 ml Ni-NTA-Lösung bei 4°C inkubiert. Das Lysat / Ni-NTA-Gemisch wurde dann auf eine Säule überführt, gefolgt von mehreren Waschrufen, bis die gemessene Absorption (280 nm) der Waschfraktion $<0,001$ ergab. Die Eluation erfolgte mit Eluationspuffer nach Qiagen (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8,0) mit anschließender Dialyse der gereinigten Proteine (Dialysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 50% Glyzerin).

Das TRX-His6-S-YcgE-Protein sowie TRX-His6-S-YcgE-NTD und TRX-His6-S-YcgE-CTD wurden mittels des N-terminalen His6-tags unter der Verwendung von Ni-NTA-Agarose von pET32a-basierten Vektoren aus den BL21(DE3)-Zellen gereinigt. Zur Überexpression des gesamten YcgE-Proteins wurden die Zellen mit pET32a-YcgE transformiert und in LB/Amp bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,6 angezchtet. Dann erfolgte die Zugabe von 3 % (Endkonzentration) Ethanol und nach weiteren 30 min Wachstum wurde 0,3 mM IPTG zur Induktion der Überexpression hinzugegeben. Schließlich wurden die Zellkulturen zu 25°C überführt und für 90 min wachsen gelassen. Zur Überexpression der isolierten YcgE-Domänen wurden BL21(DE3)-Zellen, welche mit den Plasmiden pET32a-YcgE-NTD bzw. pET32a-YcgE-CTD transformiert worden sind, bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 in LB/Amp angezchtet, bevor die Zugabe von 0,5 mM IPTG erfolgte und die Zellen zu 16°C zum weiteren Wachstum für 8 Stunden überführt wurden. Die Reinigung von YcgE sowie der einzelnen Domänen dieses Proteins wurde nach dem gleichen Vorgehen, wie für YcgF beschrieben, durchgeführt.

Tag-freies YcgE wurde von dem pTYB12-Vektor als Fusion zum Intein-Tag, das durch einen autoproteolytischen Prozess abgespaltet wird, gereinigt. Dazu wurden ER2566-Zellen mit pTYB12-YcgE transformiert und in LB/Amp bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 bei 37°C angezchtet. Durch Zugabe von 0,3 mM IPTG erfolgte die Induktion der Überexpression bei 16°C für 16 Stunden. Nach Zellernte wurde das Zellpellet in Column Puffer (20 mM HEPES, pH 8,0, 0,5 M NaCl + 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Roche)) resuspendiert und die Zellen mittels einer French-Press aufgeschlossen. Pro 50 ml Zelllysate wurden 2 ml Chitinbeads-Lösung (=1ml reine beads) in Column Puffer äquillibriert und anschließend mit

dem Zellysat für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Lysat/Beads-Lösung wurde auf eine Säule geladen und mit Column Puffer so lange waschen, bis die Absorption_{280nm} der Waschfraktionen kleiner als 0,001 war. Das „on-column-cleavage“ des Inteintags wurde durch Zugabe von 3 Volumen (6ml) Cleavage Puffer (Column Puffer + 50 mM DTT) induziert. Die Säule wurde dann bei RT (ca. 20°C) 16 Stunden lang inkubiert. Die Proteinelution erfolgte mit Column Puffer. Anschließend wurde das gereinigte Protein über Nacht im Dialysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 50% Glycerin) dialysiert.

Zur Überexpression von *S-Tag-MlrA* wurden ER2566 Zellen mit pETDuet-MlrA transformiert und in LB/Amp bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 angezchtet. Nach Transfer der Zellkulturen zu 16°C wurde durch Zugabe von 100 µM IPTG die Überexpression induziert und über Nacht ermöglicht. PQE60 (Qiagen) kodiertes YhjH wurde mittels eines C-terminalen His6-tags gereinigt (Pesavento *et al.*, 2008). Dazu wurden die Zellen bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 bei 37°C herangewachsen und nach Zugabe von 0,5 mM IPTG bei 25°C für weitere 4 Stunden wachsen gelassen. Die Diguanyltzyklase PleD* wurde nach den Vorgaben von Paul *et al.* gereinigt (Paul *et al.*, 2004).

3.7.4 Protein-DNA-Bindestudien (Elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays, EMSA)

Die in den Protein-DNA-Bindestudien eingesetzten DNA-Fragmente wurden mittels PCR generiert, wobei entsprechende pJL28-Derivative als Template dienten. Nach der PCR wurden die amplifizierten Fragmente nach einer Agarose-Gelelektrophorese aus einem 1,5 %-igen Gel gereinigt. Die Durchführung des Elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assays erfolgte in Bandshift-Puffer (10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, 10 mM NaCl, und 1 mM MgCl₂) in 20 µl Endvolumen. Dabei wurden angegebene Mengen an Protein und DNA sowie 1 µg poly[d(I-C)] als Kompetitor-DNA in Bandshift-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend entweder auf ein 1%-iges Agarose-TAE-Gel oder ein 5 %-iges natives Polyacrylamid Gel (0,5 ml 10 x TBE Puffer, 1,25 ml Rotiphorese Gel 40, 8,25 ml Wasser, 16 µl TEMED, 66 µl APS) geladen. Der Gellauf erfolgte in 1xTAE-Puffer bzw. 0,5xTBE-Puffer bei 80 V für 100-120 min mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung und Visualisierung mittels der Geldokumentationsanlage (Biozym).

3.7.5 Nicht-radioaktive DNaseI Footprint Analysen

DNaseI Footprint Analysen erfolgten nach den Angaben von Heroven *et al.*, sowie von Mika und Hengge mit geringfügigen Änderungen (Heroven *et al.*, 2004; Mika & Hengge, 2005).

Das Dig-markierte DNA-Fragment, das der Identifizierung der YcgE-Bindestelle im *ycgZ*-Promoter diente, wurde unter der Verwendung der in Tabelle 3.6 gelisteten Primern generiert,

wobei pNAT5 (pJL28-*ycgZ::lacZ*), welches die Promoterregion von *ycgZ* umfasst, als Template eingesetzt wurde. Das amplifizierte DNA-Produkt wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion gereinigt. Die Dig-markierte Sequenzleiter wurde mit den gleichen Primern mit Hilfe des CycleReader DNA Sequencing Kits (Fermentas) hergestellt.

Die Ausbildung eines Komplexes zwischen der DNA (260 fmol) und steigenden Mengen von YcgE (0-3,94 μM) erfolgte in 20 μl Reaktionsansatz für 60 min bei Raumtemperatur wie für EMSA beschrieben (3.7.4). Anschließend wurden zu den DNA-Protein-Komplexen 5 μl DNaseI (1u/ μl , Fermentas) hinzugegeben, wobei der Verdau nach 10 sek durch Zugabe der Stop-Lösung (15 mM EDTA, 10 $\mu\text{g/ml}$ ytRNA in Wasser) abgestoppt wurde.

Bei der Phenol-Chloroform-basierten Extraktion der DNA-Fragmente wurden 50 μl PCI (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol, 25:24:1, pH 7,5-8,0) zu jedem Reaktionsansatz hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach der Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 20°C) wurde der Überstand mit 25 μl von 10 M Ammonium Acetat versetzt und die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 300 μl eiskaltem 100%-igen Ethanol mit 30-minütiger Inkubation bei -20°C. Nach einer wiederholten Zentrifugation (14000 rpm, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%-igen Ethanol gewaschen. Das luft-getrocknete Pellet wurde schließlich in 8 μl Footprint-Proben-Puffer (10 mM EDTA (pH 8), 0,125 % Xylene Cyanol, 0,125 % Bromphenol Blau in Formamid) resuspendiert

Mit Hilfe eines 6%-igen Polyacrylamid Gels (42 g Harnstoff, 10 ml 10xTBE, 15 ml Rotiphorese Gel 40, 50 μl TEMED, 500 μl 10 % APS in 100 ml) wurden die Proben und die Sequenzleiter bei 40 W für etwa 100 min aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf eine NYTRAN N Nylon Membran (0,2 μm Porengröße, Whatman) für 2 Stunden und UV-Crosslinking der Proben an die Membran für 4 min.

Katalysiert durch die Alkalische Phosphatase unter der Verwendung von CDP-Star (Roche) wurden die Dig-markierten DNA-Fragmente in einer Chemilumineszenz-Reaktion visualisiert. Dazu wurde die Membran in 100 ml Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3% Tween 20, pH 7,5) 1-5 min lang gewaschen und dann in 100 ml Blocking-Lösung (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 1% Blocking Reagenz (Roche)) für 30 min geblockt. Schließlich wurden 10 μl des anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase Antikörpers (Roche, 1:10000 Verdünnung) zu der Blocking-Lösung hinzugefügt und die Membran für 1 Stunde in dieser Lösung inkubiert. Durch vier Waschschrte mit 100 ml Waschpuffer für 10 min wurde der Antikörper entfernt und es folgte die Äquilibrierung der Membran in Detektions Puffer (0,1 M Tris (pH 9,5), 0,1 M NaCl) für 5 min. Anschließend wurde die

Membran mit 15 ml CDP-Star-Lösung für 5 min überschichtet und nach Entfernung dieser Lösung in transparente Folie eingewickelt. Die Signaldetektion erfolgte mittels eines Detektion-Films (Thermo Scientific).

3.7.6 Bacterial-Two-Hybrid (BTH) Analysen

Zur Analyse von direkten Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* wurde das BacterioMatch II Two-Hybrid System (Agilent Technologies / Stratagene) verwendet. Bei diesem System werden die zwei potentiell miteinander interagierenden Proteine bzw. Proteindomänen als Fusionsproteine zu den N-Termini des cI-Repressors des Lambdaphagen (vom pBT-Vektor) bzw. der alpha Untereinheit der RNA-Polymerase von *E. coli* (vom pTRG-Vektor) exprimiert (Dove & Hochschild, 2004). Die Durchführung des BTH-Assays erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Nach einer Co-Transformation der beiden Konstrukte in einen Histidin-auxotrophen *E. coli* Reporterstamm, führt die Interaktion der beiden Fusionsproteine zur erhöhten Expression des Hefe *his3*-Gens und ermöglicht dadurch Zellwachstum auf selektivem Medium in Gegenwart von 4 bzw. 5 mM 2-amino-1,2,4-triazol (3-AT), was einen kompetitiven Inhibitor des HIS3-Enzyms darstellt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C für 24 Stunden und anschließend bei 28°C für 48-64 Stunden.

3.7.7 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels Co-Elution

In vitro Co-Elutionsstudien erfolgten nach den Angaben von Mika und Hengge mit geringfügigen Änderungen (Mika & Hengge, 2005).

Zur Analyse der Interaktion zwischen YcgF und YcgE wurden das gesamte YcgE-Protein als auch seine isolierte N-terminale DNA-bindende Domäne (YcgE-NTD) wie auch die C-terminale Domäne (YcgE-CTD) mit einem TRX-His6-S-tag an den jeweiligen N-Termini gereinigt. Der TRX-His6-S-tag ermöglichte einerseits die native Reinigung mittels des His-tags und andererseits spezifische Bindung an S-Protein-Agarose durch den S-tag für die Interaktionsanalysen. Parallel dazu wurde das His6-YcgF-Protein wie auch die N-terminale BLUF Domäne (YcgF-NTD) mit einem N-terminalen His6-tag gereinigt. Zur Überprüfung der möglichen Interaktion wurden jeweils 0,65 nmol YcgE bzw. YcgE-NTD oder YcgE-CTD mit 1,3 nmol YcgF bzw. YcgF-NTD für 20 min bei 18°C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl S-Tag-Agarose (Merck, früher Novagen) in Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) äquilibriert und das Proteingemisch hinzugefügt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 18°C wurden die Reaktionsansätze fünf mal mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen, wobei nach jedem Waschriff die Proben 1 min bei 1000 rpm

zentrifugiert wurden und der Überstand abgesaugt wurde. Die Eluation erfolgte mit 40 µl 3 M MgCl₂ mit anschließender SDS-PAGE und Coomassie Färbung des Gels.

Zur Überprüfung der Interaktion zwischen YcgF und MlrA wurden Zellextrakte, die jeweils aneinander angegliche Mengen überexprimiertes MlrA-S-tag (100 µl) bzw. His6-YcgF (900 µl) oder auch leere Plasmide pETDuet bzw. pQE30Xa enthielten, mit 60 µl S-Protein-Agarose inkubiert und wie oben beschrieben weiter behandelt. Mit MlrA-S co-eluiertes His6-YcgF wurde mittels eines Westernblots mit einem anti-His-Antikörper nachgewiesen.

Um die Interaktionen zwischen YcgZ, YmgA und YmgB untereinander sowie die Interaktion zwischen YmgC mit der cytosolischen Fraktion der RcsC-Kinase zu untersuchen, wurde ein *in vivo* Co-Elutionsexperiment durchgeführt. Dazu wurde MC4100 mit YmgC::Flag, YmgA::Flag bzw. YcgZ::Flag im Chromosom mit den leeren pBAD33- bzw. pBAD18-Vektoren bzw. mit den Derivaten pBAD33-6His-*rscC* (cytosolische Fraktion), pBAD33-6His-*rscB*, pBAD33-6His-*ymgA* bzw. pBAD18-*ymgB*-Strep transformiert. Die Überexpression der entsprechenden pBAD-Konstrukte wurde mit 0,1%-Arabinose bei OD_{578nm} von ca. 0,7 induziert. Die Zellkulturen wurden über Nacht in LB/Amp bzw. LB/Cm bei 28°C angezüchtet und dann abzentrifugiert. Mittels einer French-Press erfolgte der Aufschluss der Zellen. Bei der Ni-NTA-basierten Reinigung wurden die Zellpellets in Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) gelöst. Das Waschen des Matrix-Lysat-Gemisches auf der Säule erfolgte mit dem Lysispuffer bis die Absorption_{280nm} der Waschfraktion < als 0,001 betrug. Mittels des Elutionspuffers (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) wurden die Proteine eluiert und mit einem Westernblot analysiert. Bei der Streptactin-Sepharose-basierten Reinigung wurde zum Lösen und Waschen der Zellen bzw. Zelllysate Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) verwendet. Das Eluieren erfolgte mit dem 1 x verdünnten Puffer E (bezogen von IBA).

Um die Interaktion zwischen YmgB und dem cytosolischen Fragment von RcsC zu analysieren, wurden die Konstrukte pBAD33-6His-*rscC* und pBAD18-*ymgB*-Strep bzw. in Kombination mit den jeweiligen Kontroll-Plasmiden in MC4100-Zellen co-transformiert und anschließend in LB/Amp/Cm nach Induktion mit 0,1% Arabinose bei OD_{578nm} von 0,7 bei 28°C über Nacht co-überexprimiert. Die Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose erfolgte nach oben beschriebenen Angaben.

3.7.8 Nachweis der Phosphodiesterase Aktivität

Enzymassays zum Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität wurden nach Angaben von

Weber *et al.* und Paul *et al.* mit geringen Änderungen durchgeführt (Paul *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006). Für die Analyse der Phosphodiesterase Aktivität von YcgF sowie YhjH als Kontrollprotein wurde radioaktives c-di GMP hergestellt. Dazu wurden 19 µl PleD* mit 1 µl [α -³²P]-GTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) für 60 min bei 30° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzepräzipitation des Proteins für 5 min bei 95°C und nach Zentrifugation (5min 14000 rpm) die Abnahme des radioaktiv markierten c-di-GMPs. Gereinigtes YcgF bzw. YhjH wurden mit 1 µl c-di-GMP (Endvolumen 20 µl in Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 25 mM TrisCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -Mercaptoethanol) für 60 min bei 30°C unter Blaulicht- bzw. unter Dunkelbedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (5 µl) entnommen und die Reaktion mit 5 µl EDTA (0,5 M pH 8,0) abgestoppt. Schließlich erfolgte die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie. Dabei wurden die Proben 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.

3.7.9 UV-Crosslinking

Zu 11µl Proteinsuspension (ca. 20 µM, in Reaktionspuffer (250 mM NaCl, 25 mM TrisCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -Mercaptoethanol)) wurde 1 µl synthetisiertes [α -³²P]-c-di-GMP zugegeben und 5 min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden dann in eine ELISA-Platte (Roth) umpipettiert, die auf eine Schale mit Eis gestellt und dann in einem Crosslinker BLX 365 (Peqlab) mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm und max. Intensität 20 min lang bestrahlt wurde. Nach Zugabe von SDS-Proben Puffer wurden 12 µl der Proben auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und bei 25 mA aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Phosphoimaging (Fuji).

3.8 Datenbanken und bioinformatische Analysen

Angaben zu Genen und Proteinen sowie deren Sequenzen wurden von den folgenden Datenbanken bezogen:

- NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- EcoCyc (ecocyc.org)
- EcoGene (www.ecogene.org)

Die Identifizierung homologer Proteine erfolgte mittels des BLAST-Programms (**blast.ncbi.nlm.nih.gov**) der NCBI-Datenbank (Altschul *et al.*, 1997). Sequenzvergleichende Darstellungen von diversen EAL-Domänen und MerR-ähnlichen Proteine von *E. coli* wurden mit Hilfe von CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) generiert (Thompson *et al.*, 1994). Genomweite vergleichende Analysen erfolgten mit der „Multi-Genome-Alignment“-Funktion von EcoCyc (Keseler *et al.*, 2011).

4. Ergebnisse

4.1 Genetische Organisation der *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgABC*-Region im Chromosom von *Escherichia coli*

Den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildeten vorangegangene Studien zur Regulation und Funktion des *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgABC-ycgG*-umfassenden Genclusters, die im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Die Ergebnisse dieser Analysen haben darauf hingewiesen, dass das degenerierte BLUF-EAL-Domänen Protein YcgF, der MerR-ähnliche Transkriptionsfaktor YcgE und die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC in dem nicht-motilen *Escherichia coli* K-12 Stamm MC4100 möglicherweise eine funktionale Einheit bilden. So konnte mittels Microarrayanalysen sowie Reporterfusionen aufgedeckt werden, dass YcgF und YcgE als Regulatoren für das *ycgZ-ymgABC*-umfassende Operon agieren. Bereits in dieser zurückliegenden Studie wurde deutlich, dass YcgE reprimierend während YcgF aktivierend auf die Expression dieser Gene wirkt (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Der genaue Wirkungsmechanismus dieser beiden Regulatoren sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

4.1.1 Das degenerierte BLUF-EAL Protein YcgF ist weit verbreitet in Bakterien

Genomweite Sequenzanalysen mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul *et al.*, 1997) und der „Multi-Genome Alignment“-Funktion von EcoCyc (Keseler *et al.*, 2011), machen deutlich, dass das Photorezeptorprotein YcgF, charakterisiert durch eine N-terminale BLUF und eine C-terminale EAL-Domäne, in diversen Bakterien verbreitet ist. Zieht man die heute zur Verfügung stehenden Genomsequenzen heran, so erkennt man, dass YcgF-Homologe überwiegend in der Familie der *Enterobacteriaceae* vertreten sind. Ausgewählte Mitglieder folgender Genera dieser zu den Gammaproteobakterien gehörenden Familie verfügen über dieses Protein: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Pectobacteria*, *Erwinia*, *Pantoea* und *Serratia*. Zusätzlich ist ein YcgF-homologes Proteins in den *Alcaligenaceae* (β -Proteobakterien) *Bordetella avium* und in den *Alteromonadaceae* (γ -Proteobakterien) *Alteromonas macleodii* zu finden.

Die BLUF-Domäne (**B**lue **L**ight sensing **U**sing **F**AD) ist für die Wahrnehmung von Blaulicht zuständig (Gomelsky & Klug, 2002), während EAL-Domänen mit der c-di-GMP-degradierenden Phosphodiesterase-Aktivität von Proteinen assoziiert ist (Schirmer & Jenal, 2009). Diese enzymatische Aktivität setzt das Vorkommen bestimmter Aminosäuren in der EAL-Domäne voraus (Rao *et al.*, 2008). So sind in dem als PDE aktiven Protein YahA von *E. coli* (Schmidt *et al.*, 2005) alle 14 Aminosäuren, die für die Bindung des cyclischen di-GMPs (Abb. 4.1, rot) und des Cofaktors Mg^{2+} (Abb. 4.1, blau) sowie für die katalytische Reaktion (Abb. 4.1, grün) konserviert. Diese für die enzymatische Aktivität essentiellen Reste sind auch in dem YcgF-homologen Proteinen BAV1524 von *Bordetella avium* 197N, KPK_2789 (BlrP1) von *Klebsiella pneumoniae* 342 und Ent638_2032 von *Enterobacter sp.* 638 konserviert (Abb. 4.1). Demnach kann angenommen werden, dass diese Proteine aktive Phosphodiesterasen darstellen, was für BlrP1 von *K. pneumoniae* 342 experimentell bewiesen ist (Barends *et al.*, 2009). Interessanterweise besitzen *K. pneumoniae* 342 und *Enterobacter sp.* 638 eine zweite Kopie des YcgF-Homologs, wobei diese Proteine einen gewissen Grad an Degeneration aufweisen. So fehlen in KPK_3794 von *K. pneumoniae* 342 ein Aspartat zur Bindung von c-di-GMP und eine Glutaminsäure zur Bindung vom Mg^{2+} (Abb. 4.1). Zusätzlich zu diesen beiden Resten fehlen in Ent638_1757 von *Enterobacter sp.* 638 ein weiteres Aspartat, das bekanntlich für die Bindung des Substrats c-di-GMP notwendig ist (Abb. 1.4). Im Vergleich zu diesen Proteinen weist YcgF von *E. coli* den stärksten Grad an Degeneration auf. So sind in YcgF alle Reste, die in die Bindung des Signalmoleküls c-di-GMP involviert sind, eine Glutaminsäure notwendig für die Bindung von Mg^{2+} sowie eine für die Spaltung der Phosphodiesterbindung essentielle Glutaminsäure degeneriert (Abb. 4.1).

Insgesamt wird deutlich, dass das BLUF-EAL-Protein YcgF besonders in Enterobakterien weit verbreitet ist und dass einige Organismen sogar zwei Kopien dieses Proteins besitzen. Dabei existieren sowohl konservierte Versionen von YcgF, die voraussichtlich aktive Phosphodiesterasen darstellen als auch degenerierte Homologe dieses Proteins, die möglicherweise alternative Funktionen erworben haben.

YahA	-----HEFKPWIQPVFCAQTGVLTCGEVLV ^R WEHPQTGIIPDPQFIPLAESSGL	168
BAV1542	TDRSDIAQNDDPPYQFALQPIVNP ^R RRDISS ^F FLI ^R GRNNGS---PEQFFSSYPAEH--	220
KPK_2789	-----NLTDQPCQFALQAI ^V EPAKRRVSS ^F EAL ^R ISPTGGS---PVEMFAAIAAED--	210
Ent638_2032	-----LISN--QICQF ^A FQPIVDPSE ^G KITSLEAL ^R IGNDGGS---PEHFFNALDPDR--	213
KPK_3794	-----IDNTESWSF ^A FQPIVDPFACEIISWEAL ^R ITPDGQS---PGAYFAGLAGDD--	213
Ent638_1757	-----IAKGADCSF ^A FQPIVDPLTQ ^V VSW ^E ALL ^R ITPSGGS---PAVYFESLTGNA--	224
YcgF	-----LSPTINDHF ^A FHP ^I VDPLSRRI ^I A ^F E ^A I ^V QKNEDSP---SAIAVGQRKDGE--	213
YahA	IVIMTRQLMKQTADILMPVKHLLPDNFHIGIN ^V SAGCF ^L AAG- ^F EKECLNLV ^N KLGN ^D KI	227
BAV1542	---RYRLDIESKALAFRLAHQIGQ ^H IKVAVN ^L FPMSLMTVPDAVDKLV ^A HIEASGLSPT	277
KPK_2789	---RYRFDLESKAF ^A FLAARLPLGKQ ^L AVN ^L LP ^G SLYNHPDAVGW ^L MDNLLAAGLRPE	267
Ent638_2032	---IYEIDLQTKAYAFALADKIGIGDHKIAI ^N LLPMSLVNVP ^G AVEFLVESIAKHHLLPE	270
KPK_3794	---IYLADLH ^S KRVALSLAGKLG ^L RNKALSIN ^L LPMTLVKAPNA ^V AVFL ^L DEISRNDLIPE	270
Ent638_1757	---IYESDLKSKQ ^V VALSMASALG ^L EGQ ^T LSL ^N LLPMTLVNVPNA ^V DFLLKEIAANGLVPE	281
YcgF	---IYTADL ^K SKALAF ^T MAHALELG ^D KMISIN ^L LPMTLVNEPDA ^V SFLLNEIKANALVPE	270
YahA	KLVL ^E EL ^T ERNPIPVTPPEARAI ^F DSLHQHNIT ^F ALDD ^F GTGYATYRYLQ ^A FPVDFIK ^I DKS	287
BAV1542	QVLV ^E ITE ^Q EAISCLRSFGNAIKRLRAF ^G VGV ^A IDD ^F GSGFAGLSLLA ^E FQ ^P DKL ^K IDRR	337
KPK_2789	QVLI ^E VE ^T TEVISCFDQ ^F RKVLKALRVAGMKL ^A IDD ^F GAGYSGLSLLTR ^F Q ^P DKIK ^V DAE	327
Ent638_2032	QVVVE ^V TE ^N EMISGFN ^Q FNSAIKQLRAAGIGL ^A IDD ^F GSGYAGLSLLTK ^F Q ^P DKIK ^I DRE	330
KPK_3794	QII ^V E ^F TE ^R EVISRMADFTDAVRK ^L KGAGINL ^A ID ^H FAGAGFAGLSLLA ^Q YQ ^P DRIK ^I DHE	330
Ent638_1757	QII ^I E ^F TE ^S EVISRLTE ^F KGAVRQLKSAGIS ^V AID ^H FAGAGFAGLLLLA ^Q FQ ^P DRIK ^I INRE	341
YcgF	QII ^V E ^F TE ^S EVISRFDE ^F AEAIKSLKAAGIS ^V AID ^H FAGAGFAGLLLLSR ^F Q ^P DRIK ^I SQE	330
YahA	FVQMASVDEISGHIVDNIVELARKPGLSIV ^A EG ^V ETQEQADLMIGKGVH ^F LQGYLYSPPV	347
BAV1542	IIQDIHTDGPRQAI ^V LAI ^V QVCTAMGITP ^V AEG ^V ESIDEWCW ^L QAAGVER ^F QGYLFAKPA	397
KPK_2789	LVRDIHISG ^T KQAI ^V ASVVRCCEDLGITV ^V AEG ^V ETIEEWCW ^L QSVGIRL ^F QGFLFSRPC	387
Ent638_2032	IITNIHRSGPKQAI ^V KSIIS ^C CTDMEITLVAEG ^I EQIDEWCW ^L ESAGIKR ^F QGF ^L FARPO	390
KPK_3794	LIRNIHQDGRQSI ^V QAI ^I KCCTSL ^E IAVSAV ^G VERAE ^E W ^W LESAGISQ ^F QGNLFAGAR	390
Ent638_1757	LVADVHKS ^G PRQAI ^V QAI ^I KCCASLEIQ ^F CAV ^G VEKAE ^E W ^W LESAGISE ^F QGH ^L FASPK	401
YcgF	LITNVHKS ^G PRQAI ^I QAI ^I KCCTSL ^E IQ ^V SAMG ^V ATPEE ^W W ^W LESAGIEM ^F QGD ^L FAKAK	390

■ c-di-GMP-Bindung ■ Mg²⁺-Bindung ■ Katalyse

Abb. 4.1: Sequenzvergleich zwischen den EAL-Domänen der aktiven PDE YahA und der verschiedenen YcgF-Homologe. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von CLUSTAL W generiert (Thompson *et al.*, 1994). Manuel wurden Aminosäuren farblich hervorgehoben, die anhand der aktiven Phosphodiesterase RocR von *P. aeruginosa* als essentiell für die Bindung von c-di-GMP (rot), Mg²⁺-Bindung (blau) und Katalyse (grün) deklariert wurden (Rao *et al.*, 2008). Die Phosphodiesterase-Aktivität des EAL-Domänen Proteins YahA wurde experimentell demonstriert (Schmidt *et al.*, 2005). Nach zunehmendem Grad der Degeneration sortiert, werden EAL-Domänen der YcgF homologen Proteinen von *Bordetella avium* 197N (BAV1542), *Klebsiella pneumoniae* 342 (KPK_2789 und KPK_3794), *Enterobacter sp.* 638 (Ent638_2032 und Ent638_1757) sowie von *Escherichia coli* K-12 (YcgF) gezeigt.

4.1.2 Das MerR-ähnliche Protein YcgE - ein Paralog von MlrA?

In direkter Nachbarschaft neben *ycgF* im Chromosom von *Escherichia coli* K-12 befindet sich *ycgE*, kodierend für einen MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktor (Abschnitt 1.4.2). Typisch für einen MerR-ähnlichen Regulator besteht YcgE aus einer N-terminalen DNA-bindenden Domäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv sowie einer C-terminalen Domäne, die bei den meisten MerR-ähnlichen Proteinen für die Bindung eines Liganden zuständig ist (Brown *et al.*, 2003). Neben YcgE besitzt *E. coli* vier weitere MerR-ähnliche Proteine: SoxR, CueR, ZntR und MlrA. Während SoxR, CueR und ZntR in die Regulation von Superoxid-Kupfer- bzw. Zinkstress involviert sind, stellt MlrA einen wichtigen c-di-GMP-bindenden

Aktivator der Curli-Fasern Expression dar (siehe Abschnitt 1.1.3 & 1.4.2; (Lindenberg *et al.*, 2012).

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen dieser Proteine untereinander, so fällt auf, dass YcgE und MlrA mit 243 Aminosäuren nicht nur gleich lang sind, sondern auch eine hohe Ähnlichkeit zu einander aufweisen (Abb. 4.2). So konnte mittels CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) ermittelt werden, dass YcgE zu 49% mit MlrA und nur zu 12% mit SoxR, zu 17% mit CueR und zu 14% mit ZntR identisch ist. Auffällig ist auch, dass bis auf fünf unterschiedliche Aminosäuren YcgE und MlrA das gleiche Helix-Turn-Helix-Motiv zur Bindung von DNA aufweisen (Abb. 4.2). Doch auch die C-terminale Domäne, die generell durch die Bindung eines Liganden die Spezifität der MerR-ähnlichen Regulatoren determiniert, ist bei diesen beiden Proteinen zu 37% übereinstimmend. Die Bindung eines Liganden - wobei es sich bei den meisten MerR-ähnlichen Regulatoren um ein Metall-Ion handelt - erfolgt überwiegend über in der C-terminalen Domäne konservierte Cysteinreste (Brown *et al.*, 2003). Während diese Cysteine in SoxR, CueR und ZntR größtenteils konserviert sind, sind sie in MlrA degeneriert. Stattdessen weist MlrA im C-Terminus ein RxxD-Motiv auf, das der I-site von DGCs ähnelt (Christen *et al.*, 2006) und daher möglicherweise an der Bindung des cyclischen di-GMPs beteiligt ist (Lindenberg *et al.*, 2012). Im Vergleich dazu besitzt YcgE kein einziges Cystein und auch kein RxxD-Motiv in seiner C-terminalen Domäne (Abb. 4.2).

Zusammenfassend lässt eine vergleichende Sequenzanalyse die Schlussfolgerung zu, dass aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen MlrA und YcgE diese Proteine höchstwahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind. Weiterhin kann man aus der Aminosäuresequenz ableiten, dass YcgE vermutlich weder ein Metall-Ion noch c-di-GMP als Ligand binden kann. Insgesamt erscheint es als wahrscheinlich, dass YcgE als Duplikat von MlrA eine neuartige Funktion erworben hat und somit ein Paralog von MlrA darstellt.

Helix-Turn-Helix Motiv

YcgE	-----MAYSIGDVAERCGINPVTLLRAWQRRYGLLKPQRSEGGHRLFDEEDIQRIE	52
MlrA	-----MALYTIGEVALLCDINPVTLLRAWQRRYGLLKPQRDGGHRLFNDADIDRIE	52
SoxR	MEKKLPRIKALLTPGEVAKRSGVAVSALHFYESKGLITS-IRNSGNQRRYKRDVLRVAI	59
CueR	-----MNISDVAKITGLTSKAI RFYEEKGLVTPPMRSENGYRTYTQOHLNELTL	49
ZntR	-----MYRIGELAKMAEVT PDTIRYYEKQOMMEHEV RTEGGFRLYTESDLQRLKF	50
YcgE	IKRWISNGVPGVKV KALLETTSQDTEDDWSRLQEEMMSILRMANPAKLRARIISL GREYP	112
MlrA	IKRWIDNGVQVSKVKMLLSNENV DVQNGWRDQQTLLTYLQSGNLHSLRTWIKER GQDYP	112
SoxR	IKIAQRIGIPLATIGEAFG-----VLPEGHTLSAKEWKQLSSQWREELDRIHTLVA---	111
CueR	LRQARQVGFNLEESGELVN-----LFNDPQRHSADV KR-RTLEKVAEIERHIEELQS---	100
ZntR	IRHARQLGFSLESIRELLS-----IRIDPEHHTCQESKGIVQERLQEV EARIAELQS---	102
YcgE	VDQLINHVYLPVRQRLVLDHNTSRIMSSMFDGALIEYAATSLFEMRRKPGKEA ILMAWN	172
MlrA	AQTLTTHLFIPLRRRLQCQPTLQALLAILDGVLIN YIAICLASARKKQ GKDALVVGWNI	172
SoxR	-----LRDELDCIGCGCLSRSDCPLRNP GDRLGEEGTGARLLEDEQN-----	154
CueR	-----MRDQLLALANACPG--DDSADCP IENLS-GCCHHRAG-----	135
ZntR	-----MQRSLQRLNDACCCTAHS SVYCSILEALEQGASGVKSGC-----	141
YcgE	EERARLWLEAWRLSLSGWHISVLADPIESRP ELFPTQTLIVWTGMAPTRRQNELLOHWG	232
MlrA	QDTRLWLEGWIASQQGWRIDVLAHSLNQLRPELFEGR TLLVWC GENRTSAQQQLTSWQ	232
SoxR	-----	
CueR	-----	
ZntR	-----	
YcgE	EQGYKVI F HAP	243
MlrA	EQGHDIFPLGI	243
SoxR	-----	
CueR	-----	
ZntR	-----	

Abb. 4.2: Sequenzvergleich zwischen YcgE und den anderen MerR-ähnlichen Regulatoren von *E. coli*. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von CLUSTAL W generiert (Thompson *et al.*, 1994). Manuel wurden Aminosäuren rot hervorgehoben, die bezogen auf die Aminosäuresequenz von YcgE identisch sind. Das konservierte DNA-bindende Helix-Turn-Helix-Motiv ist entsprechend den Angaben von Brown *et al.*, 2001 markiert (Brown *et al.*, 2001). Basierend auf den Analysen mittels CLUSTAL W ist YcgE zu 49% identisch mit MlrA, zu 12% identisch mit SoxR, zu 17% identisch mit CueR und zu 14% identisch mit ZntR.

4.1.3 Die *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB* Genregion ist konserviert in diversen Enterobakterien

Bereits zurückliegende Studien haben offenbart, dass YcgF, YcgE und die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC in *E. coli* K-12 nicht nur eine kodierende, sondern auch eine funktionale Einheit bilden (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). So liegen die Gene *ycgE* und *ycgF*, getrennt durch eine divergent verlaufende Kontrollregion, neben dem *ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC*-umfassenden Operon in *E. coli* (Abb. 4.3). Dabei haben das degenerierte BLUF-EAL-Domänen Protein YcgF und der MerR-ähnliche Transkriptionsfaktor YcgE einen regulierenden Einfluss auf die Expression der Zielgene *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB* und *ymgC*.

Im Rahmen der hier durchgeführten genomweiten Analysen zur näheren Charakterisierung der einzelnen Komponenten dieser Genregion ergab sich die Frage, ob das *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC*-umfassende Gencluster auch in anderen Bakterien, die für ein YcgF-homologes Protein kodieren, ebenso als Einheit konserviert ist. Die Applikation der „Multi-Genome Alignment“-Funktion von EcoCyc (Keseler *et al.*, 2011) zur Klärung dieser Fragestellung hat interessanterweise aufgedeckt, dass mit zwei Ausnahmen (SPM24T3_09509 von *Serratia sp.* M24T3 und PANA_1748 von *Pantoea ananatis* LMG 20103) alle erfassten YcgF-homologen Proteine, die einen gewissen Grad an Degeneration aufweisen und deshalb vermutlich enzymatisch inaktiv sind, konstant neben einem YcgE-Homolog sowie YcgZ-, YmgA- und YmgB-ähnlichen Proteinen kodiert sind. So ist das degenerierte BLUF-EAL-Protein KPK_3794 von *Klebsiella pneumoniae* 342 (Abb. 4.1) neben KPK_3793 kodiert. Dieses Protein trägt zwar die Bezeichnung „MlrA“ ist jedoch zu 65% identisch mit YcgE und nur zu 48% übereinstimmend mit MlrA von *E. coli*. Zusätzlich besitzt *K. pneumoniae* 342 ein weiteres MerR-ähnliches Protein (KPK_4910), das zu 37% identisch mit YcgE dagegen zu 44% identisch mit MlrA ist. Demnach handelt es sich bei der degenerierten YcgF-Version von *K. pneumoniae* 342 zusammen mit einem YcgE-Homolog sowie kleinen Proteinen verwandt mit YcgZ, YmgA und YmgB jedoch ohne YmgC um eine konservierte kodierende Einheit (Abb. 4.3). Im Vergleich dazu ist die konservierte und als Phosphodiesterase aktive Version von YcgF von *K. pneumoniae* 342, nämlich KPK_2789 (BlrP1), unabhängig von einem MerR-ähnlichen Protein kodiert. Ähnlich bildet das degenerierte YcgF-Homolog (Ent638_1757) von *Enterobacter sp.* 638 mit dem YcgE-verwandten Protein Ent638_1758 und drei kleinen Proteinen mit Ähnlichkeit zu YcgZ, YmgA und YmgB eine kodierende Einheit während das konservierte BLU-EAL-Protein Ent638_2032 mit putativer Phosphodiesterase-Funktion isoliert von solchen Proteinen kodiert ist (Abb. 4.1 und 4.3). In anderen bakteriellen Spezies wie z. B. *B. avium* oder auch *A. macleodii* existiert nur eine Version von YcgF, die stark konserviert und deshalb höchstwahrscheinlich enzymatisch aktiv ist (Abb. 4.1 und 4.3). Diese Proteine sind stets unabhängig von einem MerR-ähnlichen Regulator kodiert.

Es lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass *degenerierte* Versionen des BLUF-EAL-Proteins YcgF in diversen Bakterien fast immer eine kodierende Einheit mit einem YcgE-Homolog und YcgZ-, YmgA-, und YmgB-verwandten Proteinen bilden, während konservierte YcgF-ähnliche Proteine mit putativer Phosphodiesterase-Funktion unabhängig von diesen Proteinen kodiert sind. Zusätzlich wird deutlich, dass einige Enterobakterien im

Laufe der Evolution das YmgC Protein wahrscheinlich verloren haben oder alternativ YmgC in wenigen Organismen erst später hinzugefügt wurde.

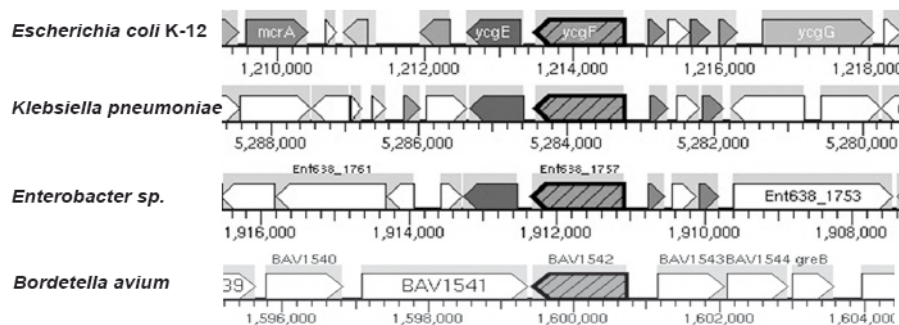


Abb. 4.3: Genetische Organisation der *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgABC* Region im Chromosom von *Escherichia coli* K-12. Im Vergleich sind die gleichen Genregionen von *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp. und *Bordetella avium* dargestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der „Multi-Genome Alignment“-Funktion von EcoCyc (Keseler *et al.*, 2011) generiert.

4.2 Transkriptionsstarts in der *ycgE-ycgF-ycgZ* Region des *E. coli* Genoms

Die Lage von *ycgE* und *ycgF* im Genom von *E. coli* führte zu der Frage, ob diese beiden Gene möglicherweise ein Operon darstellen und von einem gemeinsamen Promoter transkribiert werden. Bereits in früheren Studien (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007) konnte mittels zwei unterschiedlich langen *ycgE::lacZ*-Reportergenfusionen ermittelt werden, dass *ycgE* unabhängig von der *ycgF*-Kontrollregion exprimiert wird. Dabei enthielten beide Fusionen die komplette kodierende Region von *ycgF*, während nur eine der Fusionen zusätzlich den *ycgF*-Promoter umfasste. Da beide *ycgE::lacZ*-Fusionen unter allen getesteten Bedingungen eine beinahe identische Expression zeigten, konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *ycgE* und *ycgF* kein Operon darstellen (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). An dieser Stelle sollten die tatsächlichen Transkriptionsstarts von *ycgE*, *ycgF* und zusätzlich auch die des Zielgens *ycgZ* identifiziert werden.

4.2.1 Die Identifizierung der Transkriptionsstarts von *ycgE*, *ycgF* und *ycgZ*

Mit Hilfe der „Primer Extension“-Methode konnten die 5'-Enden der *ycgE*-, *ycgF*- und *ycgZ*-mRNA und somit die Transkriptionsstarts dieser Gene identifiziert werden (Abb. 4.4 A und B). So ist der Beginn des Transkripts von *ycgE* 54 Nukleotide, von *ycgF* 30 Nukleotide und von *ycgZ* 36 Nukleotide vor dem Translationsstartpunkt lokalisiert. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig, dass *ycgE* und *ycgF* unabhängig von einander transkribiert werden. Der

Vergleich mit der Konsensus-Sequenz von $E\sigma^{70}$ - bzw. $E\sigma^S$ -abhängigen Promotoren (Typas *et al.*, 2007) bestärkt die in meiner Diplomarbeit gemachte Beobachtung, dass *ycgE* und *ycgF* in Abhängigkeit von $E\sigma^{70}$, während *ycgZ* abhängig von $E\sigma^S$ transkribiert werden (Abb. 4.4 B; N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007).

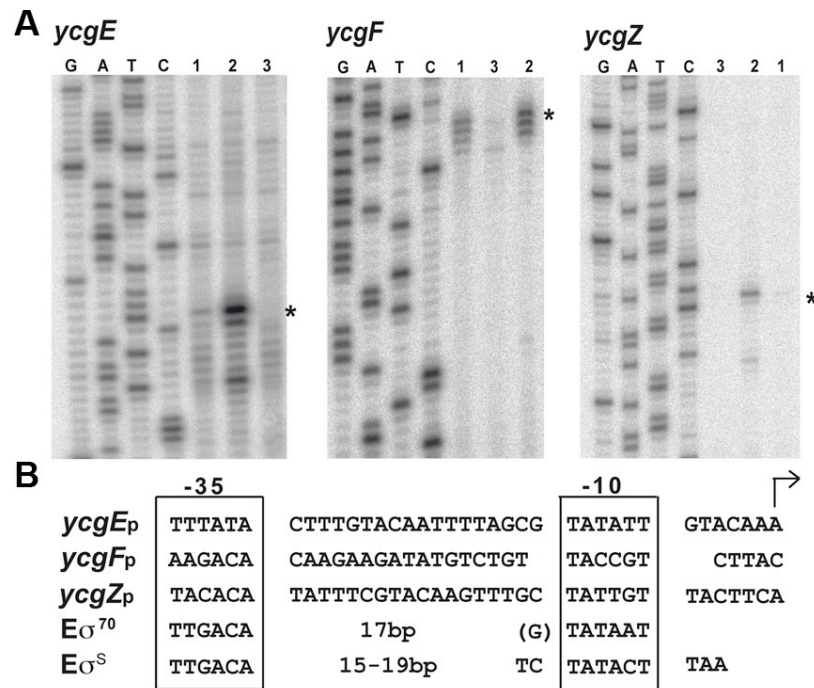


Abb. 4.4: Transkriptionsstarts in der *ycgE-ycgF-ycgZ*-Region. (A) Identifizierung der Transkriptionsstarts von *ycgE*, *ycgF* und *ycgZ* mittels Primer-Extension. Für die Primer-Extension-Analyse wurde Gesamt-RNA aus MC4100 Wildtyp-Zellen (1) sowie aus MC4100 Zellen, die Plasmide mit den *ycgE*-, *ycgF*- und *ycgZ*-umfassenden Promoterregionen enthielten (2) oder entsprechende Mutationen im Chromosom aufwiesen (3), isoliert. Die Primer-Extension-Analyse wurde nach den Angaben in Material & Methoden durchgeführt. Identifizierte Transkriptionsstarts sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. (B) Sequenzen der *ycgE*, *ycgF* und *ycgZ*-Promoterregionen. Die putativen -35 und -10 Promoterregionen sowie $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^S$ Konsensussequenzen sind eingerahmt dargestellt. Die Transkriptionsstarts sind mit einem Pfeil angedeutet.

4.3 Genexpressionsanalysen von *ycgF* und *ycgE* und der Einfluss von Blaulicht auf das Wachstum von *E. coli* K-12

Escherichia coli ist in der Lage sowohl innerhalb eines Wirtes als auch in der Außenumgebung zu existieren und kann basierend auf mehreren biophysikalischen Studien mittels des YcgF-Proteins blaues Licht wahrnehmen (Hasegawa *et al.*, 2006; Nakasone *et al.*, 2007; Nakasone *et al.*, 2010). Eines der zentralen Ziele dieser Studie war es aufzuklären, warum und unter welchen Bedingungen Blaulicht-Wahrnehmung relevant für *E. coli* ist. Es war naheliegend anzunehmen, dass die Detektion von Blaulicht eher in der Außenwelt als innerhalb eines Wirtes für *E. coli* eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang entstand die

Hypothese, dass auch Temperaturunterschiede, insbesondere niedrigere Temperatur, einen Einfluss auf die Expression des Photorezeptors YcgF und evtl. auch auf den mit YcgF assoziierten Regulator YcgE haben könnten. Übereinstimmend mit dieser Annahme haben bereits durchgeführte Studien ergeben, dass sowohl *ycgE* als auch *ycgF* bei 28°C im Vergleich zu 37°C verstärkt exprimiert werden (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Weiterführend sollte in dieser Arbeit der Einfluss von noch niedrigeren Temperaturen (23°C und 16°C) auf die Expression dieser Gene untersucht werden.

4.3.1 Die Expression von *ycgE* und *ycgF* steigt mit sinkender Temperatur

Der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Expression von *ycgE* und *ycgF* wurde mittels der in meiner Diplomarbeit konstruierten *ycgE::lacZ*- und *ycgF::lacZ*-Reporterfusionen getestet, wobei an dieser Stelle die „kurze“ *ycgE::lacZ*-Fusion d. h. ohne den *ycgF*-spezifischen Promoter verwendet wurde (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007).

In Abbildung 4.5 A sind die Ergebnisse der *ycgE::lacZ* und *ycgF::lacZ* Expressionsanalyse bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Dabei wurden MC4100-Zellen, die jeweils die entsprechende Reporterfusion in Einzelkopie an der *att* (λ)-Stelle im Chromosom integriert haben (siehe Material & Methoden) bei 37°C, 28°C und 23°C für 24 Stunden (h) und bei 16°C für 66 h in LB wachsen gelassen, bevor die Probenahme erfolgte. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass sowohl *ycgE::lacZ* als auch *ycgF::lacZ* mit sinkender Temperatur verstärkt exprimiert werden, wobei bei 16°C *ycgF::lacZ* besonders stark exprimiert wird (Abb. 4.5 A). Bei einem Vergleich der Expression beider Reporterfusionen bei 37°C versus 16°C, wird deutlich, dass *ycgE::lacZ* etwa um den Faktor 7 induziert wird, während *ycgF::lacZ* bei 16°C etwa >30-fach stärker als bei 37°C exprimiert wird (Abb. 4.5 A, B und C).

Die an dieser Stelle dargestellten Genexpressionsanalysen bestätigen demnach die Ausgangshypothese und verdeutlichen, dass *ycgE* und *ycgF* tatsächlich temperatur-reguliert sind und mit sinkender Temperatur verstärkt exprimiert werden. Dabei ist die Induktion von *ycgF* bei 16°C besonders stark und ist bei dieser Temperatur deutlich stärker als die von *ycgE*.

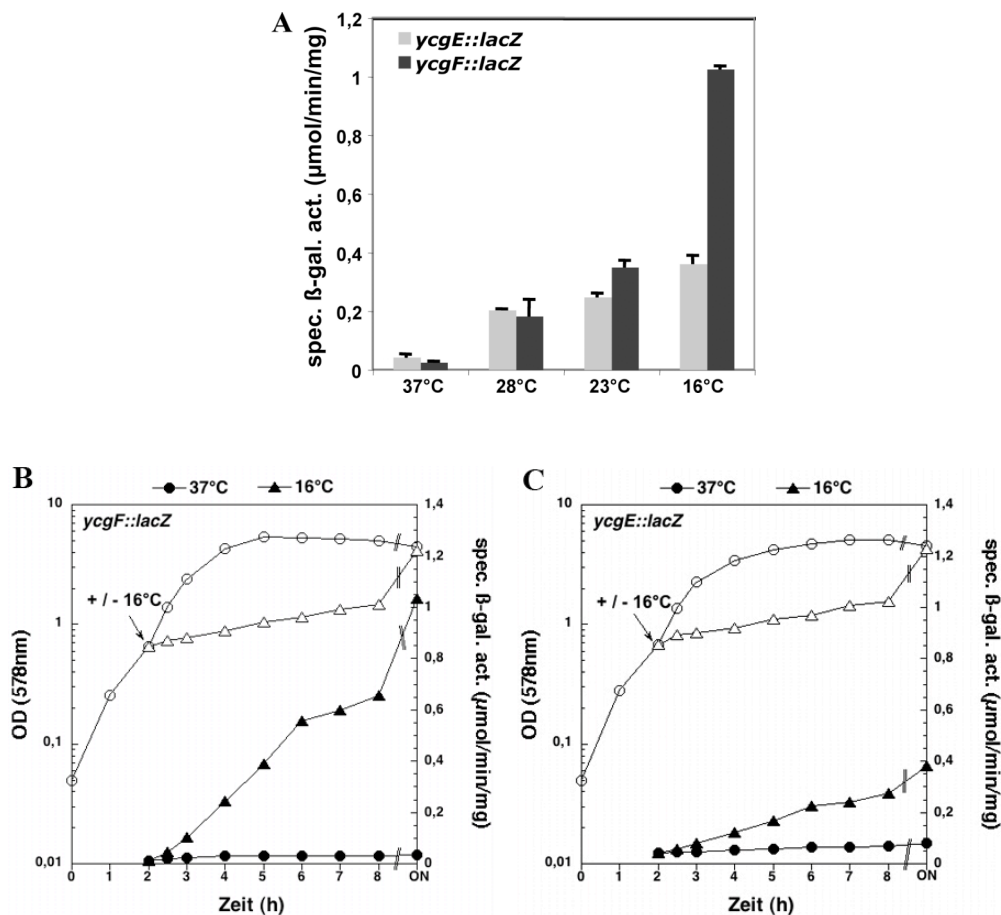


Abb. 4.5: Die Expression von *ycgE* und *ycgF* ist Temperatur-reguliert. Wildtyp MC4100 mit im Chromosom als Einzelkopie integrierten *ycgE::lacZ*- bzw. *ycgF::lacZ*-Reporterfusionen wurde im reichen LB-Medium bei angegebenen Temperaturen herangewachsen. **(A)** Die Probenahme zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 28 $^{\circ}\text{C}$, und 23 $^{\circ}\text{C}$ oder nach 66 h bei 16 $^{\circ}\text{C}$. Wildtyp MC4100 mit integrierter *ycgF::lacZ*-Fusion **(B)** oder mit einer *ycgE::lacZ*-Fusion **(C)** wurde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ bis zu einer $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,7 herangewachsen, bevor ein Teil der Kultur abgenommen und zu 16 $^{\circ}\text{C}$ zum weiteren Wachstum transferiert wurde. $\text{OD}_{578\text{nm}}$ (offene Symbole) und spezifische β -Galaktosidase-Aktivitäten (geschlossene Symbole) wurden entlang des Wachstums determiniert. ON, Übernacht.

4.3.2 Blaublicht hat einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* bei niedriger Temperatur

Der induzierende Einfluss von niedrigen Temperaturen auf die Expression des Blaublicht-Rezeptors YcgF (Abschnitt 4.3.1) führte zu der Frage, ob und bei welchen Temperaturen blaues Licht einen Effekt auf das Wachstum von *E. coli* ausübt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden MC4100- zum Vergleich auch motile MG1655-Zellen in Bechergläsern bedeckt mit einem durchsichtigen Plastikdeckel bei unterschiedlichen Temperaturen wachsen gelassen. Die Belichtung mit Blaublicht (470 nm) mit einer Intensität von ca. $140 \mu\text{M} / \text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ erfolgte mit Hilfe eines aus 112 LEDs bestehenden Array (gebaut von Gerhard Kiske, Elektromechaniker, FU-Berlin), der von oben an die Wachstumsgefäße angebracht wurde.

Die Messungen der optischen Dichte (578 nm) erfolgte von Zellkulturen, die bei 16°C, 23°C, 28°C und 37°C mit und ohne Blaulicht-Belichtung herangewachsen sind. Aus den Ergebnissen dieser Messungen, dargestellt in Abbildung 4.6 wird ersichtlich, dass blaues Licht bei 16°C einen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von MC4100 und den motilen Stamm MG1655 (Daten nicht gezeigt) hat. Folgende Verdopplungszeiten (dunkel / Blaulicht) konnten mittels der in Abb. 4.6 dargestellten Messwerte ermittelt werden: bei 37°C 22 min vs. 25 min; bei 28°C 46 min vs. 51 min; bei 23°C 82 min vs. 86 min; bei 16°C 285 min vs. 502 min. Somit wird deutlich, dass starkes Blaulicht unter den eingesetzten experimentellen Bedingungen besonders bei 16°C einen negativen Einfluss auf die Verdopplungszeit von MC4100 hat.

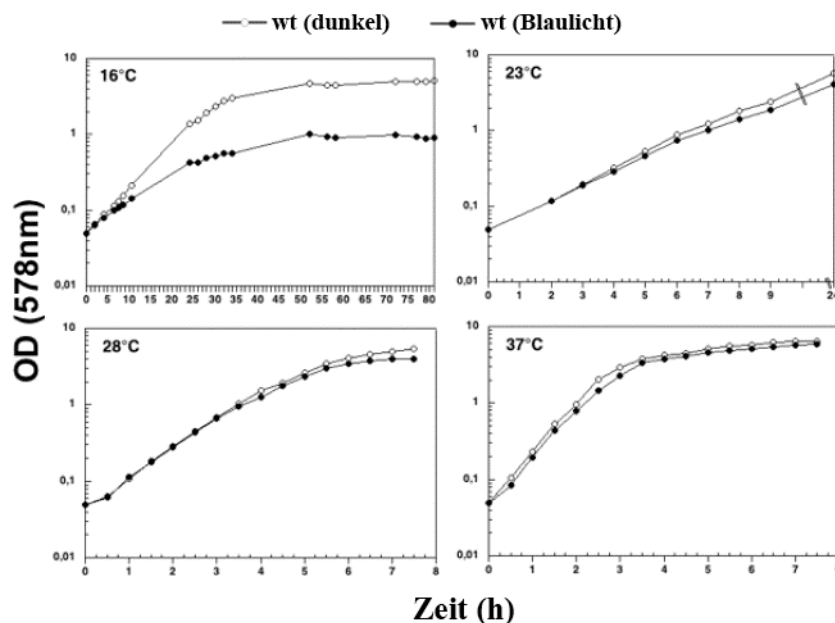


Abb. 4.6: Bei niedrigen Temperaturen hat Blaulicht einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli*. Wildtyp MC4100 wurde im reichen LB-Medium unter Dunkelbedingungen (offene Symbole) sowie unter Blaulichtbedingungen (geschlossene Symbole) wachsen gelassen. Die Messungen der optischen Dichte bei 578 nm erfolgten im Verlauf des Zellwachstums bei angegebenen Zeitpunkten.

4.4 Funktionelle Charakterisierung des MerR-ähnlichen Proteins YcgE

Da YcgE zu den transkriptionalen Regulatoren der MerR-Proteinfamilie gehört, konnte angenommen werden, dass YcgE die Expression bestimmter Gene kontrolliert. So wurden mit Hilfe einer globalen Transkriptomanalyse insgesamt 8 Gene identifiziert, auf die YcgE einen reprimierenden Einfluss hat (Tab. 4.1; N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007).

Tab. 4.1: YcgE-abhängige Gene. Mit Hilfe der Mikroarraymethode wurde genomweit die Genexpression im Wildtyp MC4100 sowie in einer *ycgE::cat* Mutante vergleichend analysiert. Zellernte erfolgte nach Wachstum in LB bei 28°C bei OD_{578nm} von 4,0. Erfasst sind differentiell im Wildtyp und in der *ycgE*-Mutante exprimierte Gene, ihre Expressionsverhältnisse, Funktionen und Länge in Anzahl der Aminosäuren (AS). Diese Ergebnisse stammen aus N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007.

Gen	Proteinfunktion	Expressionsverhältnis <i>ycgE</i> ⁻ / <i>ycgE</i> ⁺	Anzahl AS
<i>yliL</i>	unbekannt	6,61	89
<i>ycgZ</i>	unbekannt	22,54	78
<i>ymgA</i>	unbekannt	12,61	90
<i>ymgB</i>	Biofilm-und Säurestressmodulator	10,72	88
<i>ymgC</i>	unbekannt	11,22	82
<i>ynaK</i>	unbekannt	6,08	87
<i>gadB</i>	Glutamat Decarboxylase B	3,29	466
<i>hdeB</i>	Periplasmatisches Säurestress Chaperon	3,62	108

Diese Ergebnisse haben zu der Erkenntnis geführt, dass (i) YcgE als Repressor agiert, (ii) 7 von den 8 ermittelten YcgE-abhängigen Genen für kleine Proteine mit einer Länge von 78 bis 108 Aminosäuren kodieren und (iii) dass das neben der *ycgE-ycgF* Region lokalisierte Operon bestehend aus *ycgZ-ymgABC* (Abb. 4.3) ebenso Zielgene des YcgE-Repressorproteins darstellen. Es blieb allerdings offen, ob YcgE diese Gene direkt oder indirekt kontrolliert und sollte in dieser Studie experimentell untersucht werden.

4.4.1 YcgE ist ein direkter Repressor des *ycgZ-ymgABC*-Operons

Um aufzuklären, ob YcgE einen direkten Repressor des *ycgZ-ymgABC*-Operons darstellt, d. h. an die *ycgZ*-Promoterregion binden kann, wurde eine elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA) durchgeführt. Dabei wurde ein *tag*-freies, nativ-gereinigtes YcgE Protein jeweils mit zwei verschiedenen DNA-Fragmenten inkubiert. Eines der Fragmente enthielt lediglich die kodierende Region des *ycgZ*-Gens (Abb 4.7 DNA_{*ycgZ*cod}) während das andere DNA-Fragment zusätzlich zu der kodierenden Region von *ycgZ* auch den *ycgZ*-spezifischen Promoter umfasste (Abb 4.7 DNA_{*ycgZ*p}). Nach 20 min Inkubation wurden die Proben auf ein 1%-iges Agarose Gel aufgetragen und nach Ethidiumbromid-Färbung analysiert (Details siehe Material & Methoden).

Das in Abbildung 4.7 dargestellte Ergebnis dieses Experiments zeigt deutlich, dass YcgE spezifisch an das *ycgZ*-Promoter umfassende DNA-Fragment bindet. Im Vergleich dazu erfolgt keine Bindung von YcgE an die *ycgZ*-kodierende Region, wenn die Promoterregion von *ycgZ* nicht vorhanden ist. Ebenso wenig bindet das Kontrollprotein Rinderalbumin (BSA, von engl. bovine serum albumin) an *ycgZ_p*. Basierend auf diesen Daten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass YcgE einen direkten Repressor des *ycgZ-ymgABC*-Operons repräsentiert. Im Vergleich dazu, erfolgt keine Bindung von YcgE an die Promoterregionen von *yliL* oder *ynaK* (Daten nicht gezeigt), sodass diese Gene scheinbar unter indirekter Kontrolle von YcgE stehen.

YcgE (μM)	-	0,08	0,16	0,24	0,31	0,39	0,47	-	-	0,47
DNA _{ycgZ_p}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
DNA _{ycgZ_{cod}}	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
BSA (3μM)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

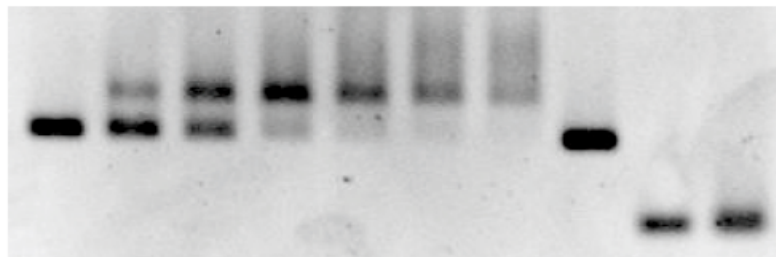


Abb. 4.7: Gereinigtes YcgE bindet direkt und spezifisch an die *ycgZ* Promoterregion. Gereinigtes *tag*-freies YcgE wurde in angegebenen Mengen mit einem DNA-Fragment inkubiert, das die kodierende Sequenz von *ycgZ* (DNA_{ycgZ_{cod}}, 237 bp) bzw. zusätzlich auch die Promoterregion von *ycgZ* (DNA_{ycgZ_p}, 407 bp) umfasste. Nach 20 min Inkubation wurden die Proben auf ein 1%-iges Agarose Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. BSA, von engl. bovine serum albumin.

4.4.2 Identifizierung der YcgE Bindestellen in der *ycgZ* Promoter Region mittels

Footprint Analysen

Zur Identifizierung der spezifischen YcgE-Bindestelle im *ycgZ*-Promoter wurde ein DNaseI Footprint-Experiment durchgeführt. Dabei wurde ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment, das die *ycgZ*-Promoterregion umfasste, mit gereinigtem, *tag*-freiem YcgE inkubiert und danach mit DNaseI verdaut. Nach dem Auftragen der Proben und einer Sequenzleiter auf ein 6%-iges Polyacrylamid Gel mit anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran, konnte die Signaldetektion mit Hilfe eines anti-Digoxigenin Antikörpers erfolgen (Details siehe Material & Methoden). Die vor dem DNaseI-Abbau durch YcgE protektierten Regionen in der *ycgZ*-Promoterregion sind in Abb. 4.8 durch vertikale Linien dargestellt und repräsentieren die Bindestellen von YcgE im *ycgZ*-Promoter.

Wildtypversion, (wt)). Übereinstimmend mit diesem Resultat zeigen die *in vivo* Analysen, dass *ycgZ::lacZ*-Reporterfusionen, die Punktmutationen in der *ycgZ*-Promoterregion tragen, im beinahe gleichen Maße dereprimiert sind wie in einer *ycgE::cat* Mutante. Demnach kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass YcgE an diese mutierte *ycgZ*-Promoterversionen auch *in vivo* nicht mehr binden kann und folglich keinen reprimierenden Einfluss auf die *ycgZ::lacZ*-Expression ausübt (Abb. 4.9 B, 1-5 im Vergleich zu *ycgE*- und wt). Zusammenfassend bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die mittels der DNaseI-Footprint-Analyse identifizierten Bindestellen von YcgE in der *ycgZ*-Promoterregion tatsächlich für die *in vitro* und *in vivo* Bindung von YcgE an den *ycgZ*-Promoter notwendig sind. Da die Mehrheit der charakterisierten MerR-ähnlichen Regulatoren palindrome Motive in ihren Operatorsequenzen erkennen, erscheint es als wahrscheinlicher, dass die palindromisch strukturierten Pentamere **TGTAC(9N)GTACA** die tatsächliche YcgE-Bindestelle repräsentieren (Brown *et al.*, 2003).

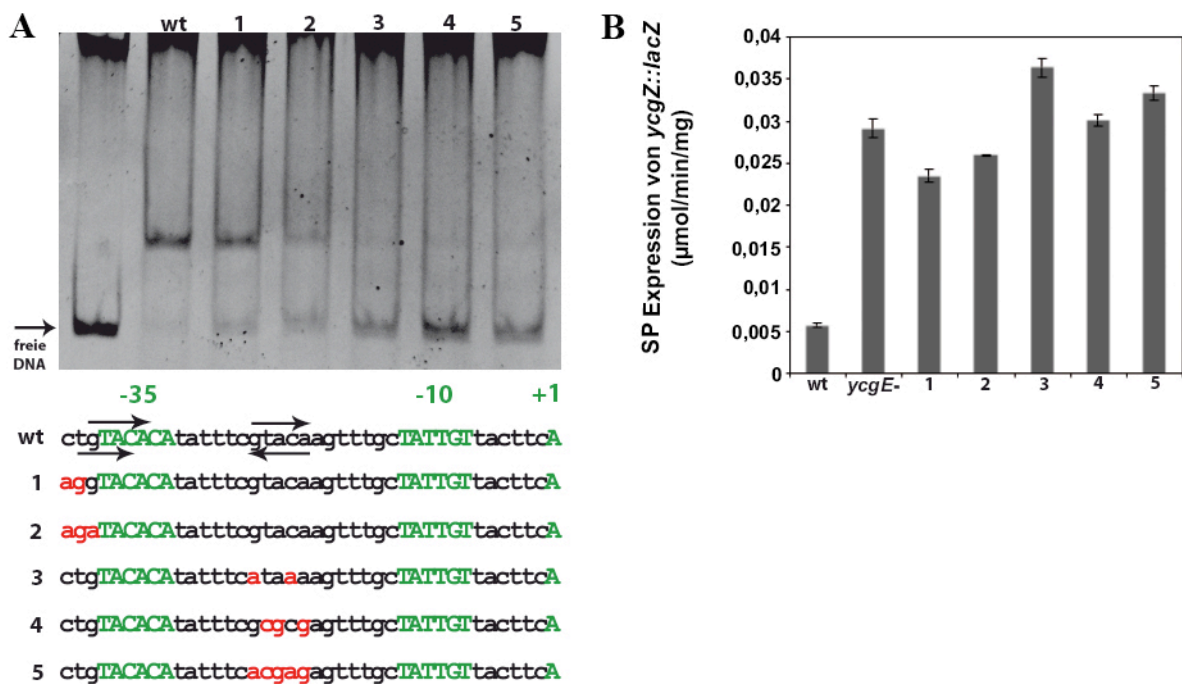


Abb. 4.9: Verifizierung der YcgE-Bindestellen im *ycgZ*-Promoter. Mit Hilfe der punktspezifischen Mutagenese wurden in der *ycgZ*-Promoterregion Punktmutationen in die YcgE-Bindemotive eingeführt und sind hier in rot hervorgehoben (1-5). **(A)** Diese verschiedenen *ycgZ*-Promoterversionen wurden in einem EMSA-Experiment (5% Polyacrylamidgel) mit gereinigtem YcgE (1,42 µM) und isolierten DNA-Fragmenten (DNA_{*ycgZ*}, 158bp, 107 fmol DNA) eingesetzt. **(B)** *ycgZ::lacZ*-Reporterfusionen, die jeweils Punktmutationen wie in A enthielten, wurden im Wildtyp W3110 (wt) sowie in einer *ycgE::cat* Mutante in einem β-Galaktosidase-Assay getestet. Zellwachstum erfolgte in LB bei 37°C und β-Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach 7, 8, und 9 Stunden Wachstum determiniert. SP, Stationäre Phase.

4.4.3 YcgE ist ein Paralog von MlrA mit residualer Affinität für den MlrA abhängigen *csgD*-Promoter

Die beiden MerR-ähnlichen Proteine MlrA und YcgE von *E. coli* weisen eine hohe Übereinstimmung bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung auf (49% Identität) und haben ein beinahe identisches Helix-Turn-Helix-Motiv zur Bindung der DNA (siehe Abb. 4.2). MlrA ist ein Aktivator von *csgD* und interessanterweise enthält die kürzlich identifizierte MlrA-Bindestelle (AAAGTTGTACA(12N)TGCACAATTTT) (Ogasawara *et al.*, 2010) im *csgD*-Promoter ein GT(C)ACA Motiv (fett hervorgehoben), das auch zur Bindung von YcgE im *ycgZ*-Promoter notwendig ist (Abschnitt 4.4.2, Abb. 4.8 & 4.9). In Anbetracht dieser Tatsachen, ergab sich die Frage, ob das putative Duplikat von MlrA, YcgE, ebenso die Fähigkeit besitzt an den *csgD*-Promoter zu binden.

Zur Überprüfung, ob das mit MlrA nahe verwandte Protein YcgE an den MlrA-abhängigen *csgD*-Promoter binden kann, wurde ein EMSA-Experiment durchgeführt, in dem die Bindung von YcgE an den *csgD*-Promoter im Vergleich zu der *ycgZ*-Promoterregion getestet wurde (Abb. 4.10). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass YcgE tatsächlich an den *csgD*-Promoter binden kann, jedoch mit einer viel geringeren Affinität als an die *ycgZ*-Promoterregion. Diese residuale Bindefähigkeit von YcgE an den MlrA-kontrollierten *csgD*-Promoter unterstützt die anhand der Sequenzanalysen aufgestellte Hypothese, dass YcgE ein Duplikat von MlrA darstellt.

YcgE (nM)	-	530	707	884	1060	1240	1420	-	530	707
<i>ycgZ</i> p 107 fmol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>csgD</i> p 107 fmol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

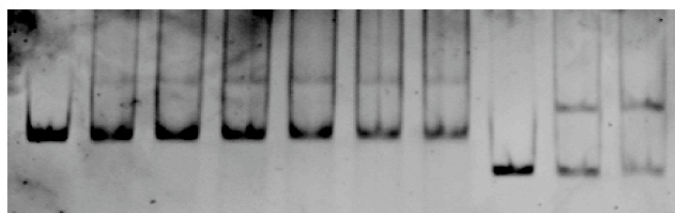


Abb. 4.10: Die Bindung von YcgE an die Promoterregionen von *csgD* und *ycgZ*. Mittels EMSA wurde die Bindung von YcgE in angegebenen Mengen an die Promoterregion von *csgD* (198 bp) im Vergleich zu der Promoterregion von *ycgZ* (158 bp) getestet. Auftragung der Proben nach 20 min Inkubation erfolgte auf ein 5%-iges Polyacrylamid Gel mit anschließender Ethidiumbromid Färbung.

Um die Fragestellung aufzuklären, ob die residuale Bindung von YcgE an den *csgD*-Promoter zur veränderten Expression des CsgD-abhängigen Gens *csgB* führt und somit einen Einfluss auf die Synthese der Curli-Fasern hat, wurde die Expression von *csgB::lacZ* in Anwesenheit vom pCAB18-kodierten YcgE in dem motilen Stamm W3100 getestet. Dabei

handelt es sich bei pCAB18 um ein *tac*-Promoter Expressions-Plasmid, das auf dem Niedrig-Kopienzahl Vektor pACYC184 basiert (Barembuch & Hengge, 2007). *CsgB* ist das erste Gen des *csgBAC*-Operons, das für die Curli-Fasern kodiert. Aus den in Abbildung 4.11 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass das von pCAB18 exprimierte YcgE einen reprimierenden Einfluss auf die Expression der *csgB::lacZ*-Fusion aufweist, insbesondere wenn IPTG als Induktor zugegeben wird.

Zusammengenommen weisen die in dem Abschnitt 4.4 gezeigten Daten darauf hin, dass YcgE ein Paralog von MlrA darstellt, das zwar immer noch eine residuale Affinität für den MlrA-abhängigen *csgD*-Promoter aufweist, jedoch spezifisch und direkt die Expression des *ycgZ-ymgABC*-umfassenden Operons reprimiert.

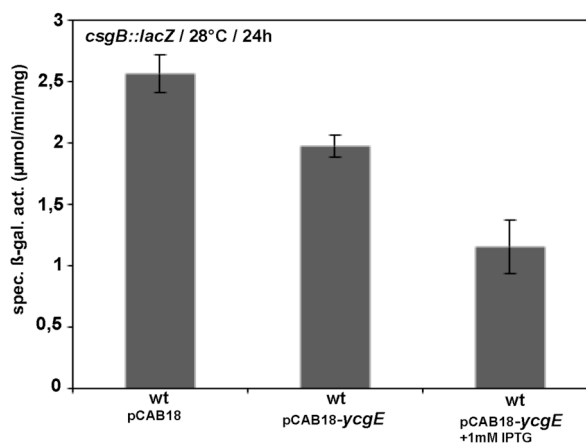


Abb. 4.11: Einfluss von pCAB18-kodiertem YcgE auf die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion. Die Expression von *csgB::lacZ* in dem Stammhintergrund W3110 wurde in Anwesenheit von dem leeren Vektor pCAB18 sowie pCAB18-kodiertem *ycgE* getestet. Zellwachstum erfolgte bei 28°C in LB/Amp mit bzw. ohne IPTG wie angegeben für 24 h, bevor die Probenahme zur Determination der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte. Wt, Wildtyp.

4.5 Funktionelle Charakterisierung des degenerierten BLUF-EAL

Proteins YcgF

Aus den zu Beginn dieser Arbeit bereits publizierten Studien zur initialen Charakterisierung des Photorezeptorproteins YcgF war bekannt, dass dieses Protein in Assoziation mit dem Chromophor FAD blaues Licht wahrnimmt und ein Absorptionsmaximum bei 458 nm aufweist (Rajagopal *et al.*, 2004). Zudem haben FTIR-Differenz-Spektren Analysen ergeben, dass Blaulichtbestrahlung sowohl in der isolierten BLUF-Domäne von YcgF als auch im gesamten Protein zu Konformationsänderungen führt und es wurde postuliert, dass blaues Licht die Dimerbildung von YcgF fördert (Hasegawa *et al.*, 2006; Nakasone *et al.*, 2007). Zur

biologischen Rolle dieses Proteins wurde in allen diesen Studien die Hypothese aufgestellt, dass Blaulicht die Phosphodiesterase Aktivität der C-terminalen EAL-Domäne moduliert.

Die Daten aus meiner Diplomarbeit haben den ersten Hinweis dafür geliefert, dass YcgF einen leicht aktivierenden Einfluss auf die Expression des YcgE-kontrollierten *ycgZ-ymgABC*-Operons hat (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Die molekulare Funktion von YcgF blieb allerdings unverstanden und sollte im Rahmen dieser Studie aufgeklärt werden.

4.5.1 YcgF kann c-di-GMP weder binden noch abbauen

Fusioniert an die N-terminale BLUF-Domäne besitzt das YcgF-Protein eine degenerierte EAL-Domäne im C-Terminus. Im Vergleich zu EAL-Domänen Proteinen, die als Phosphodiesterasen aktiv sind, fehlen in der EAL-Domäne von YcgF 4/4 Resten zur Bindung des Substrats c-di-GMP, 1/8 Aminosäuren zur Mg²⁺-Bindung und eine für die katalytische Reaktion notwendige Glutaminsäure (Abschnitt 4.1.1; Abb. 4.1). Demnach konnte bereits basierend auf diesen Sequenzanalysen angenommen werden, dass YcgF c-di-GMP weder binden noch umsetzen kann. Dennoch sollte für diese Annahme ein experimenteller Beweis erbracht werden.

Zur Überprüfung, ob YcgF als PDE aktiv ist, wurde ein Enzymassay mit radioaktiv markiertem c-di-GMP als putatives Substrat mit anschließender Auftrennung der Proben mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt (Details siehe Material & Methoden; Abb. 4.12 A). Das in diesem Enzymassay und in dem UV-Crosslinking Experiment (Abb. 4.12 B) verwendete c-di-GMP wurde mit Hilfe der konstitutiv aktiven Diguanylzyklase PleD* (Paul *et al.*, 2004) aus [α -³²P]-GTP generiert. Aus den in Abbildung 4.12 A dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass im Vergleich zu der aktiven Phosphodiesterase YhjH (Pesavento *et al.*, 2008) sowohl die Wildtypversion von YcgF (YcgF-WT) als auch die mutierte Version dieses Proteins (YcgF^{I193L/Q195R}) mit einem konservierten EALVR-Motiv nicht in der Lage sind, c-di-GMP abzubauen und zwar unabhängig davon, ob Blaulichtbestrahlung der Proben während der Enzymreaktion appliziert wurde oder nicht. Unabhängig von der vorliegenden Arbeit kamen auch Barends *et al.*, zu dem Ergebnis, dass YcgF keine Phosphodiesterase Aktivität aufweist (Barends *et al.*, 2009). Mit Hilfe der UV-Crosslinking Methode konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl YcgF-WT als auch YcgF^{I193L/Q195R} im Vergleich zu YhjH und PleD* c-di-GMP nicht binden können, wobei YhjH als aktive PDE c-di-GMP im aktiven Zentrum, während die konstitutiv aktive DGC PleD* das

Signalmolekül an der allosterisch aktiven I-site binden (Pesavento *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2004).

Folglich konnte, in Übereinstimmung mit den aus den Sequenzanalysen abgeleiteten Vorhersagen, an dieser Stelle experimentell gezeigt werden, dass YcgF nicht in der Lage ist, c-di-GMP abzubauen oder zu binden und demnach weder als Phosphodiesterase noch als c-di-GMP-abhängiges Effektorprotein fungieren kann.

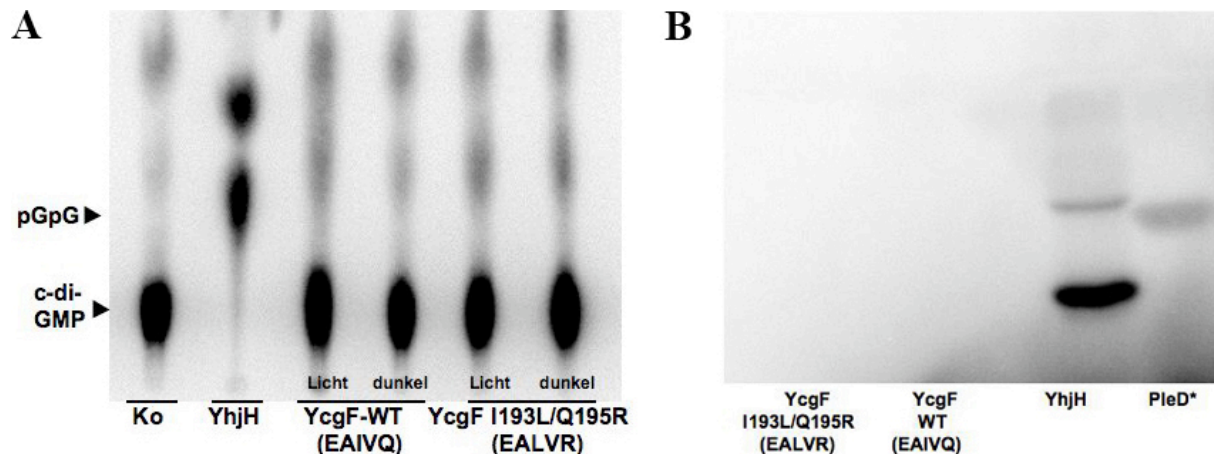


Abb. 4.12: YcgF kann c-di-GMP weder binden noch abbauen. (A) Phosphodiesteraseassay mit radioaktiv markiertem c-di-GMP. Radioaktiv markiertes c-di-GMP wurde mittels der konstitutiv aktiven DGC PleD* und [α - 32 P]-GTP hergestellt (Paul *et al.*, 2004). Gereinigtes YcgF und die mutierte YcgF Version (I193L/Q195R) wurden im Vergleich zu der aktiven PDE YhjH (Pesavento *et al.*, 2008) sowohl unter Blaulicht- als auch unter Dunkelbedingungen auf ihre Fähigkeit getestet c-di-GMP zu degradieren. Ko, proteinfreie Kontrolle. (B) Detektion der c-di-GMP-Bindung durch UV-Crosslinking. Die gleichen Proteine wie in (A) sowie PleD* wurden mit radioaktiv markiertem c-di-GMP inkubiert und anschließend mittels UV-Licht miteinander vernetzt. Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel.

4.5.2 Trotz Einführung von konservierten Aminosäuren notwendig für die Phosphodiesterase Aktivität, bleibt YcgF enzymatisch inaktiv und unfähig c-di-GMP zu binden

Mit dem Ziel der „reversen Evolution“ und der Fragestellung, ob es möglich ist, durch Einführung aller für die PDE-Aktivität notwendigen Aminosäuren (siehe Abb. 4.1) aus dem enzymatisch inaktiven YcgF-Protein eine aktive Phosphodiesterase zu generieren, wurden mittels punktspezifischer Mutagenese ausgehend aus dem bereits vorgestellten mutierten YcgF-Protein I193L/Q195R (M2) folgende YcgF-Proteinversionen hergestellt: M4: M2+M362E+A365E, M5: M4+T247N, M6: M5+H177Q, M7: M6+H306D und M8: M7+S328D. Diese mutierten Versionen von YcgF wurden mittels eines N-terminalen His6-tags gereinigt und analog zu der Vorgehensweise dargestellt in Abschnitt 4.5.1 bzw. nach den

Angaben in Material & Methoden auf ihre Fähigkeit getestet c-di-GMP abzubauen bzw. zu binden.

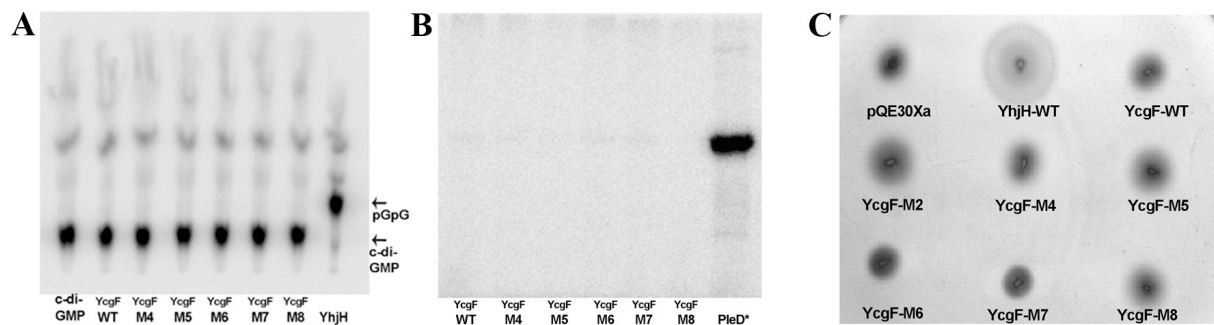


Abb. 4.13: Einführung aller konservierter Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF ermöglicht nicht dessen Bindung oder Degradation von c-di-GMP. (A) Phosphodiesteraseassay mit radioaktiv markiertem c-di-GMP. Wildtyp YcgF (WT) und die mutierten YcgF-Proteinvarianten YcgF-M4 (M2+M362E+A365E), YcgF-M5 (M4+T247N), YcgF-M6 (M5+H177Q), YcgF-M7 (M6+H306D) und YcgF-M8 (M7+S328D) sowie die aktive PDE YhjH wurden in gereinigter Form mit radioaktiv markiertem c-di-GMP unter Blaulichtbedingungen inkubiert. Probenauftrennung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. (B) Detektion der c-di-GMP Bindung mittels der UV-Crosslinking Methode. Die gleichen YcgF-Varianten wie in (A) und die konstitutiv aktive DGC PleD* wurden mit radioaktiv markiertem c-di-GMP inkubiert und anschließend durch UV-Licht miteinander vernetzt. Probenauftrennung erfolgte mittels eines 12%-igen SDS-Polyacrylamidgels. (C) Die W3110 *yhjH::kan* Mutante wurde mit dem leeren Vektor pQE30Xa sowie pQE30Xa-basierten Plasmiden kodierend für die verschiedenen YcgF-Proteinvarianten wie in (A) inkl. YcgF-M2 (I193L/Q195R) transformiert und auf Motilität getestet. *YhjH*-Expression erfolgte von dem Niedrig-Kopienzahl *p(tac)* Vektor pCAB18. Die Zellen wurden auf Motilitätsplatten mit 100µg/ml Ampicillin bei 28°C für 5 h inkubiert.

Aus den in Abbildung 4.13 A und B dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass trotz der Einführung aller Aminosäuren, die für die Phosphodiesterase Aktivität von EAL-Domänen Proteinen essentiell sind (Rao *et al.*, 2008), das YcgF-Protein weiterhin unfähig bleibt c-di-GMP zu binden oder es zu degradieren. So bleibt sogar die YcgF-M8-Proteinvariante im Vergleich zu der aktiven PDE YhjH auch unter Blaulichtbedingungen enzymatisch inaktiv (Abb. 4.13 A) und kann verglichen zu der aktiven DGC PleD* radioaktiv markiertes c-di-GMP nicht binden (Abb. 4.13 B).

Zusätzlich wurden das Wildtyp YcgF-Protein sowie die mutierten YcgF-Varianten M2-M8 in einem Motilitätsassay auf ihre Fähigkeit getestet, c-di-GMP *in vivo* abzubauen (Abb. 4.13 C). Für diese Analyse wurde eine *yhjH::kan* Mutante des motilen Stammes W3100 mit dem leeren Vektor pQE30Xa (Qiagen) als Kontrolle sowie mit den auf pQE30Xa basierten Plasmiden kodierend für die verschiedenen YcgF-Proteinversionen transformiert. Die *yhjH::kan* Mutation resultiert in erhöhten Mengen an zellulärem c-di-GMP, was vermittelt durch das c-di-GMP abhängige Effektorprotein YcgR zur Inhibition der Motilität führt (Pesavento *et al.*, 2008). Wird allerdings die *yhjH* Mutation mit einer aktiven PDE z. B. YciR

(C. Pesavento und R. Hengge, unveröffentlicht) oder YhjH *in trans* komplementiert, so kommt es zum Abbau des zellulären c-di-GMPs und damit einhergehend zur Suppression des nicht-motilen Phänotyps. Aus den Ergebnissen dieses Assays geht hervor, dass im Vergleich zu der aktiven PDE YhjH, exprimiert von dem Niedrig-Kopienzahl pCAB18-Vektor, keines der pQE30Xa-Konstrukte, kodierend für die verschiedenen YcgF Varianten, in der Lage ist, den nicht-motilen Phänotyp der *yhjH* Mutante zu supprimieren. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass in Übereinstimmung mit den *in vitro* Resultaten (Abb. 4.13 A) die getesteten YcgF-Proteinvarianten auch *in vivo* keine Phosphodiesterase Aktivität aufweisen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Einführung der für die PDE-Aktivität essentiellen Aminosäuren nicht ausreichend ist, um aus dem YcgF-Protein eine aktive Phosphodiesterase zu generieren oder dessen Bindung von c-di-GMP zu ermöglichen. Offenbar hat sich YcgF aus evolutiver Sicht bereits recht weit von den aktiven PDEs wegentwickelt und stellt ein speziell für eine alternative Funktion adaptiertes Protein dar.

4.5.3 Mikroarrayanalysen zur Identifizierung YcgF abhängiger Gene

Aus den Daten, die in den Abschnitten 4.5.1 und 4.5.2 erläutert wurden, konnte die Vermutung abgeleitet werden, dass die tatsächliche Funktion des BLUF-EAL-Proteins YcgF nicht in direkter Assoziation mit dem Signalmolekül c-di-GMP steht. Um der physiologischen Rolle dieses Proteins auf die Spur zu kommen, sollten zunächst mit Hilfe der Microarrayanalyse YcgF-abhängige Gene identifiziert werden, auch wenn es bereits erste Hinweise dafür gab, dass YcgF aktivierend auf die Expression des *ycgZ-ymgABC*-Operons wirkt (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Basierend auf den Studien zur Regulation von *ycgF* (Abschnitt 4.3.1) war bekannt, dass *ycgF* bei 16°C besonders stark exprimiert wird und aufgrund der biophysikalischen Analysen (Rajagopal *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2006) konnte angenommen werden, dass dieses Protein unter Blaulichtbedingungen aktiv ist. Aus diesen Gründen erfolgte das Wachstum der Zellen zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in MC4100 (Wildtyp) im Vergleich zu der entsprechenden *ycgF::kan*-Mutante bei 16°C unter Blaulichtbedingungen.

Tab. 4.2: YcgF-abhängige Gene. Mit Hilfe der Mikroarraymethode wurde genomweit die Genexpression im Wildtyp MC4100 sowie einer *ycgF::kan* Mutante vergleichend analysiert. Die beiden Stämme wurden in LB bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 angezchtet und dann zu 16°C transferiert. Nach weiteren 3 h Zellwachstum unter Blaulichtbedingungen erfolgte die Zellernte für die RNA-Preparation. Erfasst sind differentiell im Wildtyp und in der *ycgF*-Mutante exprimierte Gene, ihre Expressionsverhältnisse, Funktionen und Länge in Anzahl der Aminosäuren (AS).

Gen	Proteinfunktion	Expressionsverhältnis <i>ycgF</i> ⁺ / <i>ycgF</i> ⁻	Anzahl AS
<i>ybgS</i>	unbekannt	3,68	126
<i>yliL</i>	unbekannt	40,56	89
<i>ycgZ</i>	unbekannt	12,66	78
<i>ymgA</i>	unbekannt	60,20	90
<i>ymgB</i>	Biofilm-und Säurestressmodulator	85,90	88
<i>ymgC</i>	unbekannt	70,70	82
<i>ynaK</i>	unbekannt	27,74	87
<i>bdm</i>	Biofilmmodulator	8,66	71

Aus den Ergebnissen dieser Mikroarrayanalyse, dargestellt in Tab. 4.2 wird deutlich, dass YcgF als Aktivator für ein Regulon, bestehend aus 8 Genen agiert. Bemerkenswert ist, dass *yliL*, *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB*, *ymgC* und *ynaK* YcgE-abhängige Gene darstellen (Tab. 4.1). Während YcgE die Expression dieser Gene reprimiert, wirkt YcgF aktivierend auf ihre Expression. Interessant ist auch, dass *ybgS* und *bdm*, die mittels der zurückliegenden Mikroarrayanalyse nicht als YcgE-abhängig erfasst wurden, mit 126 bzw. 71 Aminosäuren (AS) ebenfalls für kleine Proteine kodieren.

Vergleicht man die Ergebnisse beider Mikroarrayanalysen (Tab. 4.1 und 4.2) so wird deutlich, dass YcgF und YcgE antagonistisch die Expression eines beinahe identischen Regulons kontrollieren, zu dem auch das zu der *ycgE-ycgF*-Region benachbarte *ycgZ-ymgABC*-Operon gehört. Dabei agiert YcgE als direkter Repressor dieses Operons (siehe Abschnitt 4.4), während YcgF auf noch ungeklärte Weise aktivierend auf die Expression seiner Zielgene wirkt. Die nicht vollständige Übereinstimmung der beiden Regulons kann möglicherweise an den unterschiedlich gewählten experimentellen Bedingungen bei der Durchführung der beiden Mikroarraystudien liegen.

4.5.4 YcgF dereprimiert die Expression des *ycgZ-ymgABC*-Operons

Bezogen auf die Expression des *ycgZ-ymgABC*-Operons wurden die aus der Mikroarrayanalyse gewonnenen Daten mittels der *ycgZ::lacZ* Reporterfusion verifiziert. Dabei erfolgte die Probenahme zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität von MC4100 Wildtypstamm sowie von einer entsprechenden *ycgF::kan* Mutante entlang des Zellwachstums bei 16°C mit und ohne Blaulichtbedingungen. Die in Abb. 4.14 A dargestellten Ergebnisse bestätigen die mittels der Mikroarrayanalyse erzielten Resultate und zeigen, dass YcgF die Expression der *ycgZ::lacZ* Reporterfusion aktiviert. Es wird ebenfalls deutlich, dass bei 16°C Blaulicht stimulierend auf die *ycgZ::lacZ*-Expression wirkt, jedoch nur in Anwesenheit von YcgF (Abb. 4.14 A). In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass niedrige Temperatur (16°C) allein bereits zur messbaren Induktion der *ycgZ::lacZ*-Fusion führt und dass bei 37°C blaues Licht keinen aktivierenden Einfluss auf die Expression von *ycgZ::lacZ* hat (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Erkenntnisse gewinnt man aus den Ergebnissen der in Abb. 4.14 B gezeigten Northernblot Analyse. Dabei erfolgte die Probenahme zur Preparation der Gesamt RNA exakt wie bei der in Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Mikroarrayanalyse und es wurde eine zu der *ycgZ*-kodierenden Region komplementäre Sonde zur Detektion des Zieltranskripts eingesetzt (Details siehe Material und Methoden). So wird deutlich, dass Bestrahlung mit Blaulicht zu deutlichem Anstieg der *ycgZ-ymgABC* mRNA im MC4100 Wildtypintergrund (wt) führt. In einer *ycgE::cat* (*ycgE*-) Mutante, d.h. in Abwesenheit des Repressors, ist unabhängig vom Blaulicht eine angestiegene Menge der Ziel mRNA detektierbar, während in einer Δ (*ycgZymgAB*)::*cat* Mutante (*ycgZymgAB*-) gemäß den Erwartungen gar kein Transkript detektierbar ist. Dass auch in einer *ycgF::kan* Mutante keine Ziel mRNA vorhanden ist, spricht dafür, dass die Expression von *ycgZ-ymgABC* sowohl unter Blaulicht- als auch unter Dunkelbedingungen YcgF-abhängig ist. Interessanterweise hat die Einführung der *ycgF::kan* Mutation in einen *ycgE::cat*-Stamm keinen zusätzlichen Effekt auf die *ycgZ-ymgABC*-Transkript Mengen im Vergleich zu der *ycgE::cat* Einzelmutante. Ähnlich wurde bereits in einer vorangegangenen Studie die Beobachtung gemacht, dass in einer *ycgE::cat* Mutante die *ycgF::kan*-Mutation keinen Einfluss auf die Expression der *ycgZ::lacZ*-Reporterfusion aufwies. (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Demnach kann die Vermutung aufgestellt werden, dass YcgF über YcgE die *ycgZ-ymgABC*-Expression kontrolliert.

Mittels der Northernblot Analysen (Abb. 4.14 B) konnte auch ein experimenteller Nachweis erbracht werden, dass *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB* und *ymgC* tatsächlich ein Operon

darstellen, auch wenn bereits die genetische Organisation dieser Gene das erkennen lässt (Abb. 4.3). So wurde sowohl mit einer zu *ycgZ* komplementären Sonde (Abb. 4.14 B) als auch mittels der zu *ymgC* komplementären Sonde (Daten nicht gezeigt) das gleiche Transkript mit einer Länge von ca. 1400 Nukleotiden detektiert, was etwa der Gesamtlänge der *ycgZ-ymgABC*-umfassenden polycistronischen mRNA entspricht (berechnet: 1392 Nukleotide). Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass *ymgC* zusätzlich unter der Kontrolle eines Operon-internen Promoters steht (siehe Diskussion).

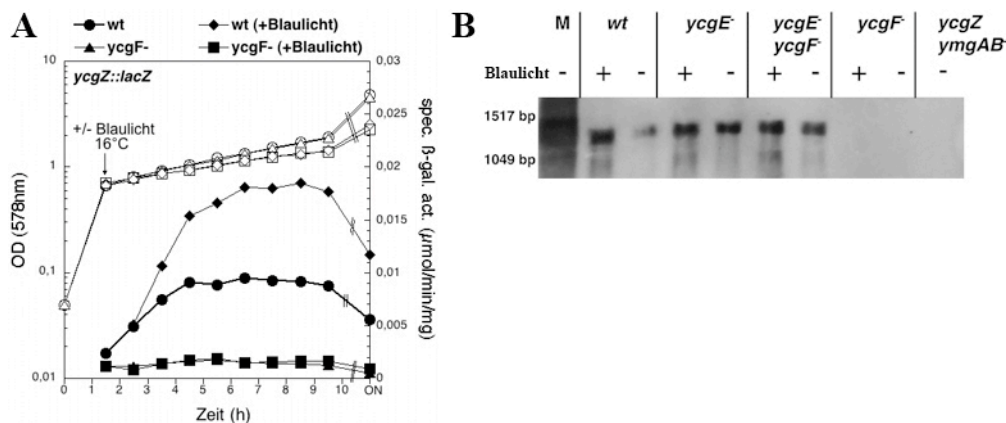


Abb. 4.14: Blaulicht stimuliert die *ycgZ* Expression in Abhängigkeit von YcgF. (A) Wildtyp MC4100 sowie die entsprechende *ycgF::kan*-Mutante mit im Chromosom als Einzelkopie integrierter *ycgZ::lacZ*-Reportergenfusion wurden bei 37°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 angezchtet und anschließend zu 16°C zum weiteren Wachstum transferiert. Dabei wurde ein Teil der Zellkultur Blaulichtbedingungen ausgesetzt, während der andere Teil weiter ohne Blaulichtbestrahlung heranwuchs. OD_{578nm} (offene Symbole) und spezifische β-Galaktosidase-Aktivitäten (geschlossene Symbole) wurden entlang des Wachstums determiniert. ON, Übernacht. (B) Northern Blot Analyse der *ycgZ-ymgABC* mRNA Expression. MC4100 (wt) sowie die entsprechenden *ycgE::cat*-, *ycgF::kan*- und $\Delta(\textit{ycgZ-ymgAB})::\textit{cat}$ -Mutanten wurden wie in (A) angezchtet. Die Probenahme zur RNA-Preparation erfolgte nach 3 h Zellwachstum nach dem Transfer der Kulturen zu 16°C. Die Detektion der *ycgZ-ymgABC*-mRNA erfolgte mittels einer *ycgZ*-Sonde.

Um die Beobachtung zu verifizieren, dass YcgF nur in Anwesenheit von YcgE wirksam ist, wurde die Expression der *ycgZ::lacZ*-Reportergenfusion im MC4100 sowohl mit Wildtyphintergrund (wt) als auch in einer *ycgF::kan* (*ycgF*-) - und einer *ycgE::cat* (*ycgE*-) - Mutante in Anwesenheit des leeren Vektors pQE30Xa im Vergleich zu pQE30Xa-kodiertem YcgF analysiert (Abb. 4.15). Entsprechend den Erwartungen verdeutlichen die erzielten Ergebnisse, dass die Einführung der *ycgF::kan* Mutation zu einer geringeren *ycgZ::lacZ*-Expression führt, während in einer *ycgE::cat*-Mutante diese Reportergenfusion deutlich dereprimiert ist (Abb. 4.15, vergleiche schwarze Balken). Zudem geht aus den Ergebnissen hervor, dass das Plasmid-kodierte YcgF im Vergleich zum leeren pQE30Xa zu einem deutlichen Anstieg der *ycgZ::lacZ* Expression sowohl im Wildtyphintergrund als auch in einer *ycgF::kan*-Mutante führt und zwar beinahe im gleichen Maße wie in der *ycgE::cat*

Repressormutante. In einer *ycgE::cat*-Mutante hat das von pQE30Xa-exprimierte YcgF keinen zusätzlich aktivierenden Effekt auf die getestete *lacZ*-Fusion (Abb. 4.15)

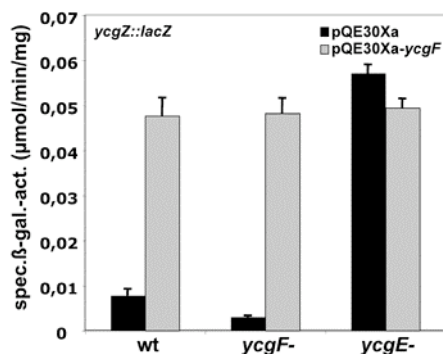


Abb. 4.15: YcgF derepressiert die Expression der *ycgZ::lacZ*-Reporterfusion. Die Expression der im Chromosom als Einzelkopie integrierten *ycgZ::lacZ*-Reporterfusion wurde im Wildtyp MC4100 (wt) sowie in entsprechenden *ycgF::kan* (*ycgF*-) sowie *ycgE::cat* (*ycgE*-) Mutanten in Gegenwart von pQE30Xa bzw. pQE30Xa-kodiertem YcgF getestet. Die Probenahme zur Messung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 37°C in LB/Amp.

Insgesamt konnten aus den Ergebnissen, die in diesem Abschnitt (4.5.4) erläutert wurden, folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- (i) Übereinstimmend mit den Mikroarrayergebnissen aktiviert YcgF die Expression der *ycgZ::lacZ* Reporterfusion.
- (ii) Besonders bei niedriger Temperatur (16°C) hat Blaulichtbestrahlung einen induzierenden Effekt auf die Expression der *ycgZ::lacZ* Reporterfusion. Da der stimulierende Einfluss von Blaulicht auf die Expression dieser Genfusion sowie des *ycgZ-ymgABC*-Transkripts nur in Anwesenheit von YcgF erfolgt, kann angenommen werden, dass das Photorezeptorprotein das Blaulichtsignal vermittelt.
- (iii) YcgF hat nur in Anwesenheit von YcgE einen aktivierenden Einfluss auf die Expression von *ycgZ*. Da bezogen auf die *ycgZ::lacZ*-Expression die positiven Effekte der YcgF-Überexpression und der *ycgE::cat*-Mutation nicht additiv sind, spricht es dafür, dass YcgE und YcgF in einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg agieren und YcgF möglicherweise einen Antagonisten des YcgE-Repressorproteins darstellt.
- (iiii) *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB* und *ymgC* stellen ein Operon dar und werden in einer gemeinsamen polycistronischen mRNA exprimiert.

4.5.5 YcgF antagonisiert Blaulicht-abhängig das YcgE Repressorprotein *in vitro*

Die im Abschnitt 4.5.4 dargestellten Ergebnisse der *in vivo* Analysen zur YcgE / YcgF-abhängigen Regulation des *ycgZ-ymgABC*-Operons lassen eine mögliche Schlussfolgerung

zu, dass *in vivo* YcgF den YcgE-Repressor antagonisiert. Zu der Frage nach dem genauen Mechanismus entstand die Hypothese, dass YcgF die Bindung von YcgE an den *ycgZ*-Promoter inhibiert. Diese Annahme wurde mittels eines EMSA-Experiments mit gereinigtem *tag*-freien YcgE und N-terminal His6-getaggttem YcgF sowie einem die *ycgZ*-Promoterregion umfassenden DNA-Fragment getestet. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass unter Blaulichtbedingungen die Zugabe von steigenden Mengen an YcgF dazu führt, dass die Bindung von YcgE an den *ycgZ*-Promoter aufgehoben wird (Abb. 4.16 A, vergleiche Spur 2 und 3-6). Im Vergleich dazu, hat YcgF keinen Effekt auf die DNA-Bindung von YcgE, wenn die Probeninkubation im Dunkeln erfolgte (Abb. 4.16 A Spuren 7-10). Deutlich wird auch, dass YcgF selbst - wie auch das Kontrollprotein BSA - nicht an den *ycgZ*-Promoter binden.

Interessanterweise haben die Reihenfolge der Zugabe der relevanten Komponenten und die Anzahl der Blaulichtbestrahlungseinheiten einen Effekt auf die YcgF-bedingte Aufhebung der DNA-Bindung von YcgE. So wurden die in Abb. 4.16 A gezeigten Ergebnisse dadurch erzielt, dass YcgE und das DNA-Fragment mit dem *ycgZ*-Promoter für 20 min vorinkubiert wurden und anschließend die Zugabe von YcgF und Blaulichtbestrahlung der entsprechenden Proben für 20 min erfolgte, während die Kontrollproben im dunkeln verblieben. Wurden allerdings YcgE und YcgF unter Blaulichtbedingungen vorinkubiert, bevor die DNA hinzugegeben wurde, so konnten bereits geringere Mengen von YcgF die Bindung von YcgE an den *ycgZ*-Promoter aufheben (Abb. 4.16 B). Wurde das Vorgehen in (B) um eine weitere Bestrahlungseinheit nach der Zugabe der DNA erweitert, so konnten beinahe äquimolare Mengen von YcgF die DNA-Bindung von YcgE aufheben (Abb. 4.16 C).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass YcgF tatsächlich einen Antagonisten des YcgE-Repressorproteins repräsentiert und die Bindung dieses Regulators an seine Operator-DNA inhibiert. Während *in vivo* YcgF auch ohne Blaulichtbestrahlung einen dereprimierenden Effekt auf die Expression des *ycgZ-ymgABC*-Operons aufweist (Abb. 4.14 & 4.15), ist dieses Protein *in vitro* nur unter Blaulichtbedingungen als YcgE-Antagonist aktiv. Die Beobachtung, dass höhere Mengen an YcgF erforderlich sind, um bereits ausgebildete YcgE-DNA-Komplexe zu lösen als vergleichsweise die Bindung von noch freiem YcgE an seine Ziel-DNA zu inhibieren, spricht dafür, dass YcgF mit der *ycgZ*-Promoter-DNA um die Bindung an YcgE konkurriert.

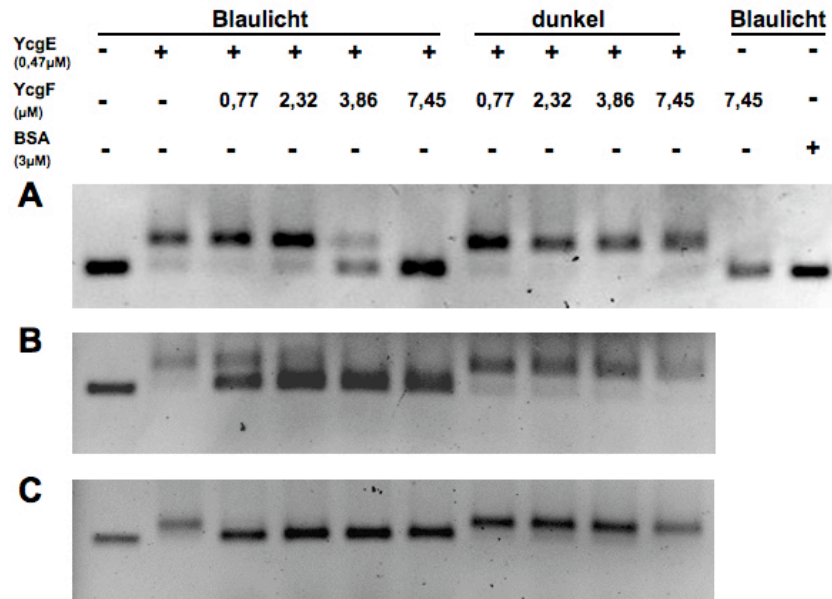


Abb. 4.16: YcgF führt in Abhängigkeit vom Blaulicht zur Aufhebung der YcgE-Bindung an die *ycgZ*-Promoter DNA. Gereinigtes *tag*-freies YcgE sowie His6-getaggtetes YcgF wurden in angegebenen Mengen mit einem den *ycgZ*-Promoter (*ycgZ_p*DNA) umfassenden DNA-Fragment (407bp, 18ng) inkubiert. Die Probenauftrennung erfolgte mittels eines 1%-igen Agarosegels mit anschließender Ethidiumbromid Färbung. **(A)** YcgE und *ycgZ_p*DNA wurden für 20 min vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von YcgF mit anschließender Blaulichtbestrahlung für 20 min. **(B)** YcgE und YcgF wurden 20 min lang unter Blaulichtbedingungen inkubiert und erst dann erfolgte die Zugabe des entsprechenden DNA-Fragments. **(C)** Wie in (B) mit zusätzlicher Bestrahlungseinheit nach Zugabe der DNA. BSA, von engl. bovine serum albumin.

4.5.6 YcgF antagonisiert das YcgE Repressorprotein durch direkte Protein-Protein-Interaktion

Die Erkenntnis, dass YcgF als ein anti-Repressor agiert und die Bindung von YcgE an den *ycgZ*-Promoter inhibiert führte zu der Frage, wie genau YcgF die Bindung von YcgE an seine Ziel-DNA inhibiert. Die Vermutung lag nahe, dass dies über direkte Protein-Protein Interaktion erfolgt und sollte in einem Co-Elutionsexperiment („Pull-down“) überprüft werden. Dazu wurden das gesamte YcgE-Protein als auch seine isolierte N-terminale DNA-bindende Domäne (YcgE-NTD) wie auch die C-terminale Domäne (YcgE-CTD) mit einem TRX-His6-S-*tag* an den jeweiligen N-Termini gereinigt. Der TRX-His6-S-*tag* ermöglichte einerseits die native Reinigung mittels des His-*tags* und andererseits spezifische Bindung an S-Protein-Agarose durch den S-*tag* für die Interaktionsanalysen. Parallel dazu wurde das His6-YcgF-Protein wie auch die N-terminale BLUF Domäne (YcgF-NTD) mit einem N-terminalen His6-*tag* gereinigt. Ungünstigerweise konnte die isolierte EAL-Domäne von YcgF nicht in löslicher Form gereinigt werden. Zur Überprüfung der möglichen Interaktion wurden die putativen Interaktionspartner mit S-Protein-Agarose, an die lediglich die YcgE-Proteinvarianten binden konnten, inkubiert und nach fünf Waschschritten eluiert.

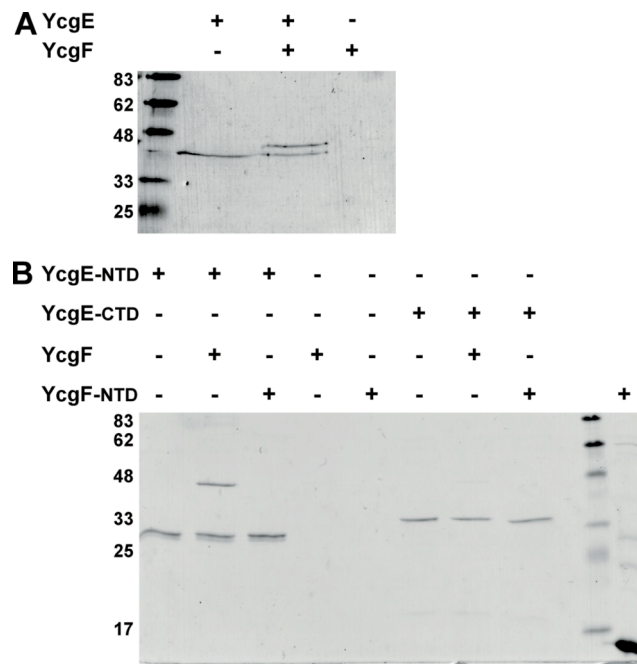


Abb. 4.17: YcgF interagiert mit der DNA-bindenden Domäne von YcgE *in vitro*. YcgE und YcgF (A) sowie die einzelnen Domänen dieser Proteine (B) wurden gereinigt und in einem Co-Elutionsassay mittels S-Protein-Agarose auf Interaktion getestet (Details siehe Material und Methoden). YcgE sowie YcgE-NTD (MerR-ähnliche, DNA-bindende Domäne) und YcgE-CTD (C-terminale Domäne) tragen einen TRX-His6-S-tag am N-Terminus und können an die S-Protein-Agarose binden. YcgF und YcgF-NTD (N-terminale BLUF-Domäne) haben einen N-terminalen His6-tag. Die letzte Spur in B zeigt die gereinigte BLUF-Domäne von YcgF (YcgF-NTD) zum Vergleich.

Aus den in Abb. 4.17 A gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass während das His6-YcgF Protein allein an die S-Protein-Agarose nicht bindet, wird es nach Inkubation mit dem gesamten TRX-His6-S-YcgE miteluiert, was für eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen spricht. Zusätzlich lässt diese *in vitro* Interaktionsanalyse erkennen, dass das gesamte YcgF Protein mit der N-terminalen Domäne von YcgE, d. h. mit der DNA-bindenden Domäne dieses Proteins interagiert, da His6-YcgF nur nach Inkubation mit YcgE-NTD und nicht nach Inkubation mit YcgE-CTD co-eluiert wird (Abb. 4.17 B). Die Beobachtung, dass YcgF-NTD weder mit YcgE-NTD noch mit YcgE-CTD miteluiert wird, macht deutlich, dass die isolierte BLUF-Domäne von YcgF nicht für die Interaktion zwischen YcgF und YcgE-NTD verantwortlich ist.

Zusammenfassend führen diese *in vitro* Interaktionsstudien zu der Erkenntnis, dass YcgF über direkte Protein-Protein Interaktion die Bindung von YcgE an die *ycgZ*-Promoterregion antagonisiert. Dabei interagiert YcgF direkt mit der DNA-bindende Domäne von YcgE. Diese Beobachtung stimmt mit der aus den Daten des vorherigen Abschnittes gezogenen Schlussfolgerung überein, dass YcgF mit der *ycgZ*-Promoter-DNA um die Bindung an YcgE konkurriert. Zudem wird an dieser Stelle deutlich, dass die EAL-Domäne für die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen notwendig ist.

4.5.7 Die Einführung von konservierten Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF reduziert dessen Fähigkeit YcgE zu antagonisieren

Mit der neu gewonnenen Erkenntnis, dass YcgF einen direkten anti-Repressor von YcgE darstellt, und mit dem Hinweis, dass die EAL-Domäne von YcgF für die Interaktion zwischen YcgF und YcgE notwendig ist, stellte sich die Frage, ob der Verlust der konservierten und für die PDE-Aktivität notwendigen Aminosäuren in der EAL-Domäne von YcgF mit der Spezialisierung dieses Proteins an seine neue Funktion als anti-Repressor im Zusammenhang steht. Deshalb sollten die im Abschnitt 4.5.2 vorgestellten mutierten YcgF-Proteinvarianten, die trotz Einführung der konservierten Aminosäuren, die für die enzymatische Aktivität als PDE notwendig sind, unfähig blieben c-di-GMP zu binden oder abzubauen (Abb. 4.13), an dieser Stelle auf ihre Fähigkeit getestet werden, YcgE *in vivo* zu antagonisieren. Dabei wurde die Expression der *ycgZ::lacZ*-Reporterfusion in Anwesenheit der verschiedenen von pQE30Xa-exprimierten YcgF-Proteinversionen getestet.

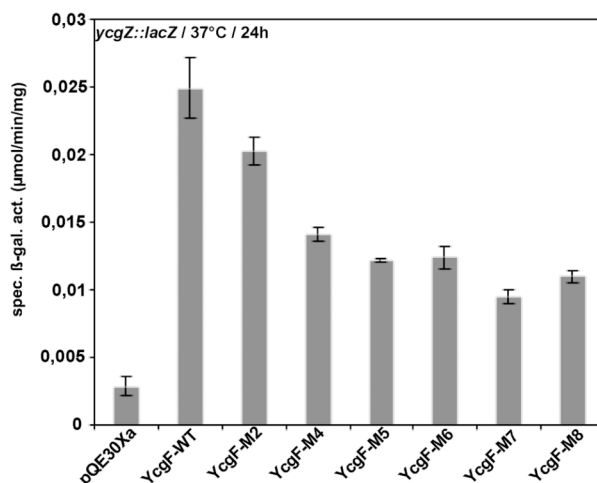


Abb. 4.18: Einführung aller konservierter Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF reduziert dessen Fähigkeit die *ycgZ::lacZ*-Expression zu dereprimieren. Die Expression der im Chromosom als Einzelkopie integrierten *ycgZ::lacZ*-Reporterfusion wurde im Wildtyp W3100 in Gegenwart von pQE30Xa bzw. pQE30Xa-kodierten YcgF-Proteinversionen getestet. Der Effekt folgender YcgF-Proteinvarianten wurde hier analysiert: YcgF-WT (Wildtyp), M2: I193L/Q195R, M4: M2+M362E+A365E, M5: M4+T247N, M6: M5+H177Q, M7: M6+H306D und M8: M7+S328D. Die Probenahme zur Messung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 37°C in LB/Amp.

So wird aus den Ergebnissen dieser Expressionsanalyse deutlich, dass lediglich die YcgF-M2-Proteinversion (I193L/Q195R), die an Stelle des degenerierten EAIVQ Motifs nun die Konsensussequenz EALVR aufweist, die Fähigkeit besitzt, im beinahe gleichen Maße wie die YcgF-Wildtypversion die *ycgZ::lacZ*-Expression zu dereprimieren (Abb. 4.18). Die mutierten YcgF-Varianten M4-M8 haben ein messbar reduziertes Potential den YcgE-Repressor *in vivo*

zu antagonisieren (alle hier getesteten Proteine liegen in gleichen Mengen in der Zelle vor; Daten nicht gezeigt). Es sollte auch hinzugefügt werden, dass in einem *in vitro* Co-Elutionsexperiment - ohne eingesetzte *ycgZ*-Promoter-DNA - auch die mutierten YcgF-Varianten mit YcgE-NTD interagieren und folglich trotz eingeführter Mutationen löslich und höchstwahrscheinlich nativ gefaltet sind (Daten nicht gezeigt). Dennoch weisen die *in vivo* Expressionsanalysen darauf hin, dass (i) die EAL-Domäne in die Interaktion zwischen YcgF und YcgE involviert ist und dass (ii) YcgF offenbar ein als anti-Repressor speziell adaptiertes Protein darstellt, das mittels seiner EAL-Domäne in *degenerierter* Form *in vivo* effektiv den YcgE-Repressor antagonisieren kann.

4.5.8 Überexprimiertes YcgF reprimiert die Expression der Curli-Fasern *in vivo* und interagiert mit MlrA *in vitro*

Die Einführung einer *ycgF::kan* Mutation in *E. coli* MC4100 oder auch W3110 hat sowohl beim Wachstum der Zellen bei 28°C (Sommerfeldt *et al.*, 2009) als auch bei 16°C mit oder ohne Blaulichtbestrahlung (Daten nicht gezeigt) keinen Effekt auf die Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion. Ebenso hat eine *ycgF*-Mutation keinen Effekt auf die Proteinmengen des *csgBAC*-Aktivators CsgD (Abb. 4.19 C). Interessanterweise ergaben jedoch weiterführende *in vivo* Analysen der mutierten YcgF-Proteinvarianten YcgF-M2 und YcgF-M4-M8, dass eine moderate Überexpression des pQE30Xa-kodierten YcgF-Wildtypproteins wie auch der mutierten YcgF-Versionen im Vergleich zum leeren Vektor einen stark inhibierenden Effekt auf die Expression der *csgB::lacZ*-Fusion aufweisen (Abb. 4.19 A). In Abb. 4.19 C gezeigte Westernblotanalysen haben ergeben, dass überexprimiertes YcgF zu geringeren Proteinmengen von CsgD führt, was sich letztendlich in reduzierter *csgB::lacZ*-Expression äußert. Dieser negative Einfluss von erhöhten Mengen an YcgF auf die Curli-Expression ist auch in einer *ycgE::cat*-Mutante zu beobachten (Daten nicht gezeigt) und ist folglich unabhängig von YcgE, sodass angenommen werden konnte, dass in diesem Zusammenhang YcgF über einen anderen Signaltransduktionsweg agiert.

Da der physiologische Interaktionspartner von YcgF, YcgE, ein Paralog von MlrA darstellt, kam die Frage auf, ob YcgF in nicht-physiologisch erhöhter Menge in der Lage ist, auch mit MlrA zu interagieren. Diese putative Interaktion würde möglicherweise MlrA, den Aktivator der *csgD*-Expression, in seiner Funktion einschränken und könnte der Grund dafür sein, warum erhöhte Mengen an YcgF zu geringeren Mengen von CsgD führen. Zur Überprüfung dieser möglichen Interaktion zwischen YcgF und MlrA wurde ein *in vitro* Co-

Elutionsexperiment durchgeführt. Diesmal wurden Zellextrakte, die jeweils in aneinander angeglichenen Mengen das überexprimierte S-getaggte MlrA bzw. das His6-getaggte YcgF oder auch leere Vektoren enthielten, hergestellt und entsprechend den Angaben (Abb. 4.19 B; Material und Methoden) miteinander gemischt. Diese Mischlysate wurden anschließend mit S-Protein-Agarose inkubiert, wobei lediglich MlrA, das einen C-terminalen S-tag aufwies, unter diesen experimentellen Bedingungen an die S-Protein-Agarose binden konnte, während das miteluierte YcgF-Protein mittels eines Westernblots mit einem His6-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Trotz Anwesenheit von einer Vielzahl von anderen zellulären Proteinen in den getesteten Zellextrakten, konnte His6-YcgF nach Inkubation mit dem MlrA-S-Lysat von der S-Protein-Agarose eluiert werden, was für eine spezifische Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen spricht (Abb. 4.19 B).

Aus diesen Ergebnissen geht also hervor, dass YcgF *in vitro* mit MlrA interagiert. Diese Beobachtung lässt die Schlußfolgerung zu, dass YcgF, wenn überproduziert, möglicherweise auch *in vivo* mit MlrA interagieren kann und folglich als ein anti-Aktivator mit der MlrA-abhängigen Expression von *csgD* und somit auch von *csgB::lacZ* interferiert.

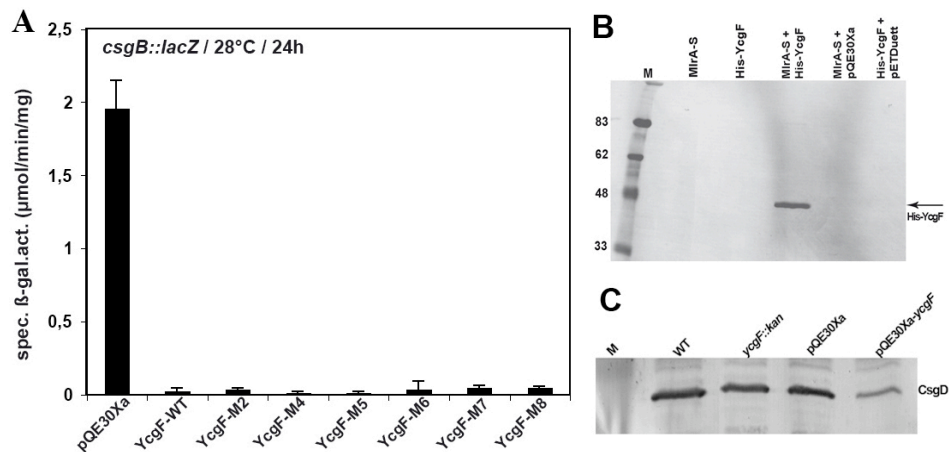


Abb. 4.19: Überexprimiertes YcgF reprimiert die Expression der Curli-Fasern und interagiert mit MlrA *in vitro*. (A) Die Expression der im Chromosom als Einzelkopie integrierten *csgB::lacZ*-Reportergenfusion wurde im Wildtyp W3100 in Gegenwart von pQE30Xa bzw. pQE30Xa-kodierten YcgF-Proteinversionen getestet. Der Effekt folgender YcgF-Proteinvarianten wurde hier analysiert: YcgF-WT (Wildtyp), M2: I193L/Q195R, M4: M2+M362E+A365E, M5: M4+T247N, M6: M5+H177Q, M7: M6+H306D und M8: M7+S328D. Die Probenahme zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 28°C in LB/Amp. (B) *In vitro* Co-Elutionsexperiment zur Analyse der Interaktion zwischen MlrA und YcgF. Zellextrakte, die überexprimiertes MlrA-S-tag bzw. His6-YcgF oder auch leere Plasmide pETDuet bzw. pQE30Xa enthielten, wurden wie angegeben gemischt und mit S-Protein-Agarose inkubiert. Mit MlrA-S co-eluiertes His6-YcgF wurde mittels eines Westernblots mit einem anti-His-Antikörper nachgewiesen. (C) Nach dem Auftragen von 10 μg Gesamtprotein wurden zelluläre Mengen von CsgD mittels einer Westernblotanalyse mit einem anti-CsgD Antikörper im Wildtyp W3100 (WT), einer entsprechenden *ycgF::kan*-Mutante sowie in W3100 mit dem leeren pQE30Xa bzw. pQE30Xa-kodiertem YcgF detektiert. Zellwachstum erfolgte bei 16°C in LB (Plasmid-freie Stämme) bzw. in LB/Amp (Stämme mit Plasmid) ohne Induktor bis zur Ernte bei $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 3.

4.5.9 Die Einführung von konservierten Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF führt zur verbesserten Interaktion zwischen YcgF und MlrA *in vivo*

Mit einem BacterioMatch II Two Hybrid System sollte der experimentelle Beweis erbracht werden, dass auch *in vivo* eine Interaktion zwischen YcgF und MlrA stattfindet. Da MlrA mit der aktiven PDE YciR und der DGC YdaM einen Komplex ausbildet (Lindenberg *et al.*, 2012), ergab sich auch die Frage, ob MlrA möglicherweise mit der YcgF-M8-Variante, die bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung einer PDE am ähnlichsten ist, eine stärkere Interaktion als mit YcgF-WT aufweist. Zudem sollte an dieser Stelle geklärt werden, welche Domäne von MlrA für die Interaktion mit YcgF verantwortlich ist. Während YcgF *in vitro* mit der N-terminalen Domäne von YcgE interagiert (Abb. 4.17 B), ist die C-terminale Domäne von MlrA in die Interaktion zwischen MlrA und YciR involviert (Lindenberg *et al.*, 2012).

Bei dem BacterioMatch II Two Hybrid System werden die zwei potentiell miteinander interagierenden Proteine bzw. Proteindomänen als Fusionsproteine zu den N-Termini des cI -Repressors des Lambdaphagen (vom pBT-Vektor) bzw. der alpha Untereinheit der RNA-Polymerase von *E. coli* (vom pTRG-Vektor) exprimiert. Nach einer Co-Transformation der beiden Konstrukte in einen Histidin-auxotrophen *E. coli* Reporterstamm, führt die Interaktion der beiden Fusionsproteine zur erhöhten Expression des Hefe *his3*-Gens und ermöglicht dadurch Zellwachstum auf selektivem Medium (Details siehe Material und Methoden (Dove & Hochschild, 2004)). So wurden einerseits das YcgF-Wildtypprotein (YcgF-WT) als auch YcgF mit den Mutationen I193L, Q195R, M362E, A365E, T247N, H177Q, H306D, S328D (YcgF-M8) vom pBT-Plasmid exprimiert. Auf der anderen Seite erfolgte die Expression von MlrA als auch der einzelnen Domänen dieses Proteins MlrA-NTD (DNA-bindende-Domäne) und MlrA-CTD vom pTRG-Vektor. Zum Vergleich und zur weiteren Bestätigung der *in vitro* Daten bezüglich der YcgE-YcgF-Interaktion wurden auch die einzelnen Domänen von YcgE in diese Analyse einbezogen, wobei das Gesamtprotein sich als toxisch herausgestellt hat und deshalb an dieser Stelle nicht analysiert werden konnte. Als Positivkontrolle diente die bekannte Interaktion zwischen den cytosolischen Fraktionen der RcsC-Kinase und dem HPT-Protein RcsD des Rcs-Phosphorelaysystems (Rogov *et al.*, 2008). Zur Auswertung der putativen Interaktionen wurden jeweils fünf einzelne Klone, die nach der Co-Transformation auf dem nicht-selektiven Medium gewachsen sind, auf einer selektiven und anschließend auf einer nicht-selektiven Platte ausgestrichen (Abb. 4.20 A). Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der nach der Co-Transformation auf dem selektiven Medium gewachsenen Kolonien in

Bezug zu denen, die auf dem nicht-selektiven Medium Wachstum zeigten, bestimmt (Abb. 4.20 B).

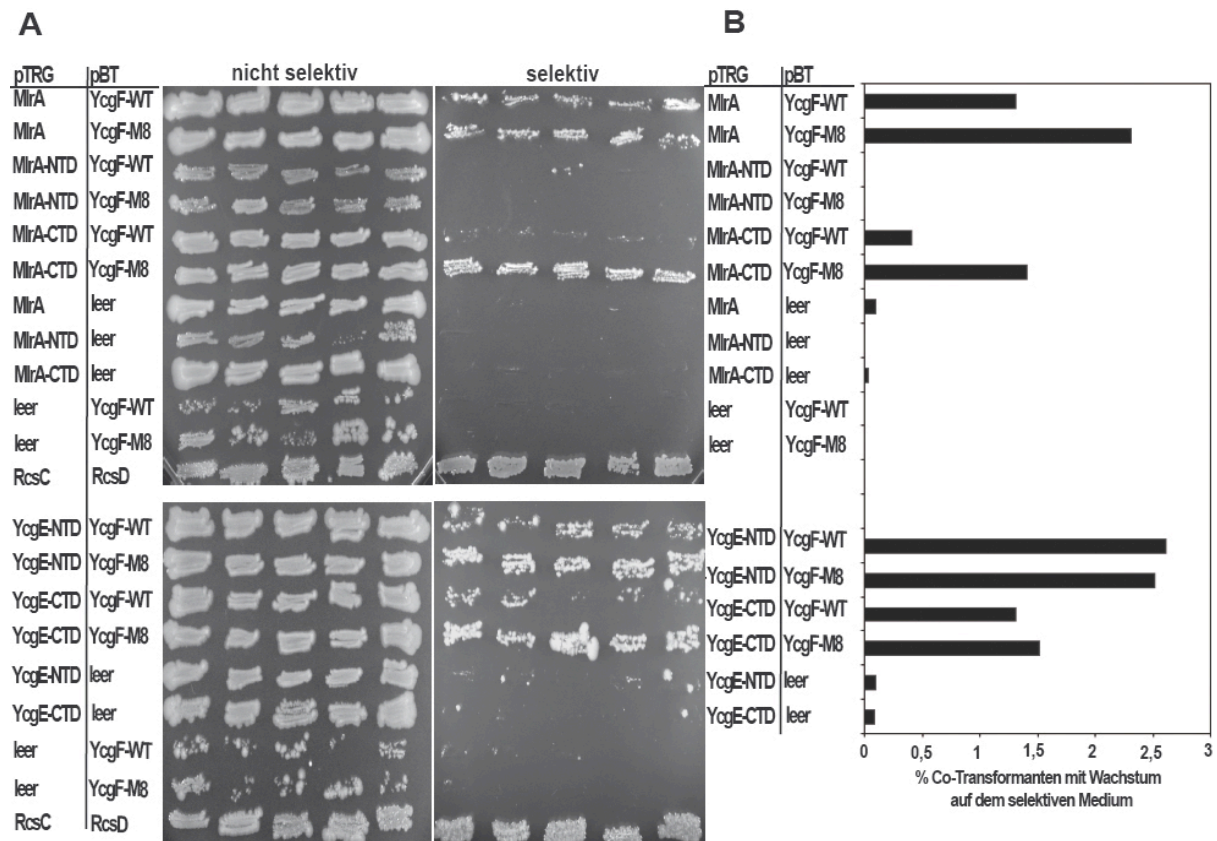


Abb. 4.20: Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YcgF und YcgF-M8 mit MlrA, MlrA-NTD, MlrA-CTD sowie YcgE-NTD und YcgE-CTD. YcgF und YcgF-M8 (I193L, Q195R, M362E, A365E, T247N, H177Q, H306D, S328D) wurden als Fusionsproteine zu cI-NTD vom pBT exprimiert. MlrA und die einzelnen Domänen von MlrA sowie die isolierten Domänen von YcgE wurden vom pTRG als Fusionsproteine an die alpha-NTD der RNAP synthetisiert. Die Co-Transformation von entsprechenden Konstrukten in Kombinationen wie angegeben erfolgte in Histidin-auxotrophe Reporterzellen, die nur bei Interaktion der entsprechenden Fusionsproteine in Anwesenheit von 5 mM des His3-Inhibitors 3-AT auf den selektiven Platten Wachstum zeigen. Als Positivkontrolle dienen die cytosolischen Fraktionen der Histidinkinase RcsC und des Hpt-Proteins RcsD. **(A)** Einzelne Co-Transformanten mit Wachstum auf nicht-selektivem Medium wurden auf selektiver und dann auf nicht selektiver Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h und anschließend bei 28°C für 48 h inkubiert. **(B)** Prozentuale Anteile der Co-Transformanten, die auf selektiven Medium Wachstum zeigten in Bezug auf Co-Transformanten, die auf nicht-selektiven Medium gewachsen sind.

Aus den in Abb. 4.20 gezeigten Ergebnissen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- (i) Das Gesamtprotein MlrA interagiert auch *in vivo* mit YcgF, wobei die YcgF-M8 Variante tendenziell eine etwas stärkere Interaktion mit MlrA zeigt.
- (ii) Die C-terminale Domäne von MlrA ist für die Interaktion zwischen MlrA und YcgF verantwortlich. Die Analyse der einzelnen Domänen von MlrA zeigt eindeutig, dass YcgF-M8 viel stärker mit MlrA-CTD interagiert als YcgF-WT.

(iii) In Bezug auf YcgE interagieren sowohl YcgF-WT als auch YcgF-M8 etwa vergleichbar stark mit den einzelnen Domänen dieses Proteins. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Analysen zeigen die hier erzielten Resultate, dass YcgF verstärkt mit YcgE-NTD interagiert, es wird jedoch deutlich, dass *in vivo* offenbar auch eine Interaktion zwischen YcgF und YcgE-CTD stattfindet.

Insgesamt führen die mit dem BacterioMatch II Two Hybrid System durchgeführten Interaktionsanalysen zu der Schlussfolgerung, dass sowohl MlrA wie YcgE über ihre CTD das YcgF-Protein binden können. Lediglich YcgE bindet YcgF auch mit der N-terminalen Domäne - diese Bindung scheint eine YcgE-spezifische Neuentwicklung zu sein. Zudem wird deutlich, dass die Einführung der mit der PDE-Aktivität assoziierten Aminosäuren in das YcgF-Protein die Interaktion zwischen MlrA-CTD und YcgF-M8 verbessert, was möglicherweise eine evolutionär ursprüngliche Funktion von YcgF reflektiert.

4.6 Funktionale Analysen der YcgE/YcgF – abhängigen kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC

Nach der Aufklärung der molekularen Funktion des MerR-ähnlichen Regulators YcgE als Repressor und des BLUF-EAL-Proteins YcgF als YcgE-spezifischer anti-Repressor, blieb nun die Frage nach den physiologischen Konsequenzen der antagonistischen Regulation gemeinsamer Gene durch diese zwei Proteine. Es stellte sich also die Frage nach der biologischen Rolle der YcgE / YcgF-abhängigen Proteine. Insbesondere standen dabei die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC im Fokus, die nachgewiesen unter *direkter* Kontrolle von YcgE stehen und in einem Operon benachbart zu der *ycgE-ycgF*-Region kodiert sind.

Basierend auf Mikroarrayanalysen war zu Beginn dieser Studie bekannt, dass *ycgZ*, *ymgA* und *ymgB* RpoS-abhängige Gene darstellen (Weber *et al.*, 2005) und dass *ymgABC* als Antwort auf Säurestress verstärkt exprimiert werden (Kannan *et al.*, 2008). Zudem ging aus genomweiten Mikroarraystudien hervor, dass das vollständige *ycgZ-ymgABC*-umfassende Operon zum Kälte-Stimulon gehört (Polissi *et al.*, 2003; White-Ziegler *et al.*, 2008) und während der Biofilmmreifung exprimiert wird (Domka *et al.*, 2007). Zur Funktion dieser kleinen Proteine konnte man der Literatur entnehmen, dass in einem Kristall-Violett Biofilm-Assay YmgA, YmgB und YmgC inhibierend auf die Biofilmbildung wirken und dass YmgB das Überleben von *E. coli* BW25113 bei Säurestress fördert (Lee *et al.*, 2007a). Die

molekulare Funktion von YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC blieb allerdings weiter ungeklärt und sollte an dieser Stelle analysiert werden.

4.6.1 YmgA und YmgB verstärken die Synthese des Polysaccharids Kolansäure über das RcsDBC-Phosphorelaysystem

Zur initialen phänotypischen Charakterisierung der YcgZ-, YmgA-, YmgB- und YmgC-Funktion wurden die vier Gene jeweils separat sowie die *ycgZ-ymgAB*-umfassende Region auf den *tac*-Promoter-basierten Niedrig-Kopienzahl Vektor pCAB18 (Barembuch & Hengge, 2007) kloniert. Auch ohne Zugabe von IPTG als Induktor führte die Basalexpression von pCAB18-*ymgB* (pYmgB) wie auch von pCAB18-*ycgZ-ymgAB* (pYcgZ-YmgAB) sowohl in *E. coli* MC4100 (Abb. 4.21 A) als auch in W3110 (Daten nicht gezeigt) bei Wachstum der Zellen auf LB/Amp-Platten bei 28°C zu einem stark mukoiden Phänotyp. Erfolgte die Inkubation der Platten bei 16°C, so führte auch die Basalexpression des pCAB18-*ymgA*- (pYmgA) Konstruktes zur schleimigen Koloniemorphologie (Abb. 4.21 A).

Ein mukoider Phänotyp von *E. coli* wird häufig mit verstärkter Biosynthese des kapsulären Polysaccharids Kolansäure assoziiert. Die Expression von Kolansäure wird durch das Rcs-Phosphorelaysystem kontrolliert, das im Wesentlichen aus der Histidin-Kinase RcsC, aus dem Phosphotransferprotein RcsD und dem Response-Regulator RcsB besteht. Dabei aktiviert RcsB in Kooperation mit dem Hilfsprotein RcsA in direkter Weise die Expression des *cps*-Operons (Majdalani & Gottesman 2005; Abschnitt 1.3.2). Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei dem pYmgB- und pYmgA-induzierten mukoiden Kapselmateriale um das Polysaccharid Kolansäure handelt. Entsprechend den Erwartungen konnten der pYmgA- und pYmgB-abhängige schleimige Phänotyp durch eine *rscB::kan* (*rscB*-) - wie auch durch eine *rscC::cat*- und eine *rscD::kan*-Mutation supprimiert werden (Abb. 4.21 A & B), während in einer *rscF::kan* Mutante, pYmgA und pYmgB immer noch zur verstärkten Kolansäure-Synthese führen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wird aus diesen Ergebnissen deutlich, dass bei niedrigen Temperaturen erhöhte Mengen von YmgB und bei 16°C auch von YmgA über das RcsDBC-Phosphotransfersystem die Synthese des Polysaccharids Kolansäure verstärken. Da das Ausschalten der RcsC-Kinase - der Ausgangskomponente der Phosphotransferkaskade - den YmgA/B-abhängigen Effekt auf die Koloniemorphologie supprimiert, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass YmgA und YmgB über RcsC wirken.

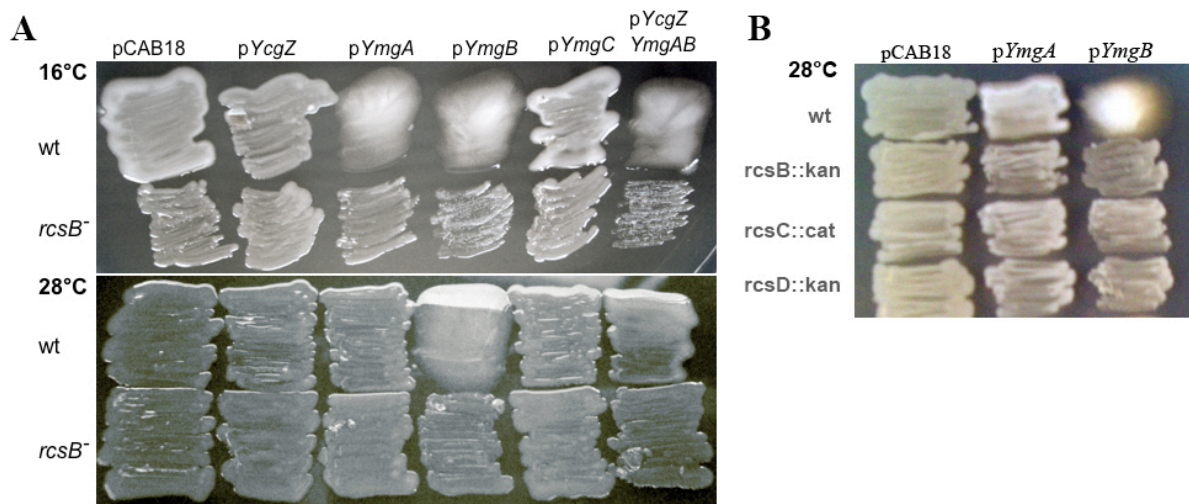


Abb. 4.21: YcgZ-YmgABC-abhängige Effekte auf die Koloniemorphologie. (A) Wildtyp MC4100 und eine entsprechende *rcsB::kan* Mutante (*rcsB*⁻) wurden mit dem leeren pCAB18-Vektor und den pCAB18-Derivaten kodierend für *ycgZ*, *ymgA*, *ymgB*, *ymgC* und *ycgZ-ymgAB* transformiert. Die Transformanten wurden auf LB/Amp-Platten flächig ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte für 50 h bei 16°C bzw. für 24 h bei 28°C. (B) Die Transformation von pCAB18 und pCAB18-*ymgA* sowie pCAB18-*ymgB* erfolgte in den Wildtyp W3110 (wt) und in die entsprechenden *rcsB::kan*-, *rcsC::cat*- und *rcsD::kan*-Mutanten. Nach einem flächigen Ausstrich der frischen Transformanten auf festem LB/Amp-Medium erfolgte die Inkubation der Platte bei 28°C für 24 h.

4.6.2 YmgB inhibiert die Expression der Curli-Fasern über die RcsB-abhängige kleine RNA RprA

Wurde der Einfluss der bereits vorgestellten pCAB18-basierten Konstrukte auf die Expression der Curli-Fasern, repräsentiert durch eine *csgB::lacZ*-Fusion getestet, so wurde deutlich, dass erhöhte Mengen des YmgB-Proteins sowohl bei 28°C als auch bei 16°C zu einer sehr starken Inhibition der Curli-Expression führen. Lediglich bei 16°C führte auch die basale Expression des YmgA-Proteins vom pCAB18-Vektor zu einer deutlichen Reduktion der *csgB::lacZ*-Expression, wobei interessanterweise die niedrige Temperatur allein (16°C) bereits einen stark inhibierenden Effekt auf diese Reporterfusion ausübt (Abb. 4.22 A).

Die Expression der *csgBAC*-kodierte Curli-Fasern steht unter der positiven Kontrolle des CsgD-Proteins, dessen Expression von der RcsB-abhängigen kleinen RNA RprA inhibiert wird (Mika *et al.*, 2012). Mit der Erkenntnis, dass YmgB und YmgA über das Rcs-System die Kolansäure-Synthese aktivieren (Abb. 4.21) konnte angenommen werden, dass diese kleinen Proteine auch auf die Expression von *csgD* und folglich auch von *csgB::lacZ* über die Rcs-System kontrollierte kleine RNA RprA inhibierend wirken. Diesen Erwartungen entsprechend hatte das pCAB18-*ymgB* Konstrukt sowohl in einem *rcsB::kan* Stammhintergrund (Daten nicht gezeigt) als auch in einer *rprA::kan*-Mutante keinen Effekt mehr auf die Expression der *csgB::lacZ*-Fusion (Abb. 4.22 B). In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass

das Ausschalten des *ycgZ-ymgABC*-Repressors YcgE durch eine *ycgE::cat*-Mutation in dem motilen Stamm W3110 in einer messbaren Reduktion der *csgB::lacZ* Expression resultiert. Dieser Effekt wird jedoch durch die Einführung einer sekundären *ymgB::kan* Mutation wieder aufgehoben (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt geht aus den in Abbildung 4.22 dargestellten Ergebnissen hervor, dass YmgB und vermutlich auch YmgA über das Rcs-Phosphorelaysystem, genauer über die RcsB-abhängige kleine RNA RprA, einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression der Curli-Fasern ausüben.

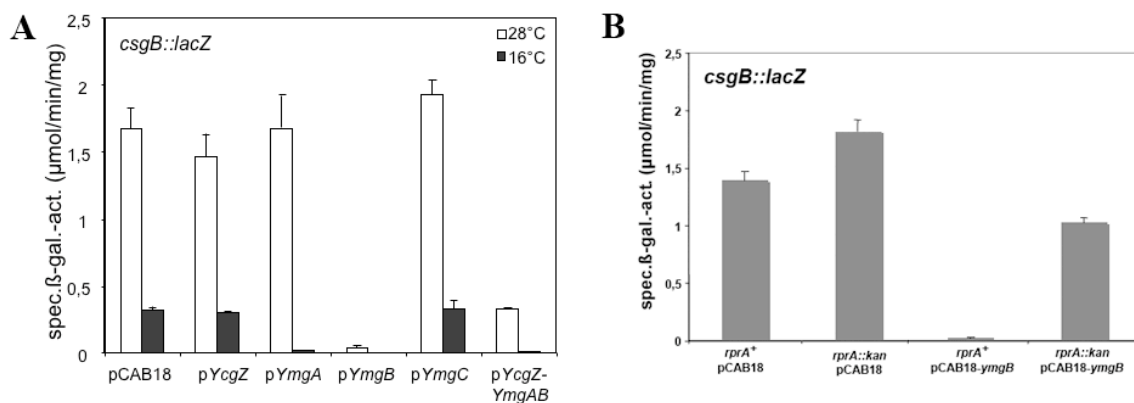


Abb. 4.22: YcgZ-YmgABC-abhängige Effekte auf die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion. (A) Wildtyp MC4100 mit einer im Chromosom als Einzelkopie integrierten *csgB::lacZ*-Reporterfusion wurde mit dem leeren Vektor pCAB18 sowie pCAB18-Derivaten kodierend für die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YcgB und YmgC transformiert. Die Probenahme zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 28°C bzw. nach 50 h Wachstum bei 16°C in LB/Amp. (B) Wildtypzellen sowie eine entsprechende *rprA::kan*-Mutante mit einer im Chromosom als Einzelkopie integrierten *csgB::lacZ*-Reporterfusion wurde mit dem leeren Vektor pCAB18 sowie pCAB18-*ymgB* transformiert. Die Probenahme zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach 24 h Zellwachstum bei 28°C in LB/Amp.

4.6.3 YmgB aktiviert die Expression des RcsDBC-abhängigen Gens *bdm*

Die Expression von *bdm* (engl. **b**iofilm-**d**evelopment **m**odulation) steht unter direkter Kontrolle des Response-Regulators RcsB (Francez-Charlot *et al.*, 2005) und basierend auf Mikroarrayanalysen wird postuliert, dass die Expression dieses Gens innerhalb eines Biofilms reprimiert ist (Prigent-Combaret *et al.*, 1999), wobei die genaue Funktion von Bdm bislang nicht geklärt werden konnte.

Interessanterweise wurde bei der in dieser Studie durchgeführten genomweiten Mikroarrayanalyse *bdm* als YcgF-reguliert erfasst (Tab. 4.2). Mittels EMSA-Experimenten konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um ein direktes Zielgen des YcgE-Repressors handelt (Daten nicht gezeigt). Mit einer *bdm::lacZ*-Fusion durchgeführte

Reporteranalysen führten schließlich zu der Erkenntnis, dass *bdm* von dem YcgE/YcgF-kontrollierten kleinen Protein YmgB über das RcsDBC-System reguliert wird. So bestätigen die in Abbildung 4.23 A dargestellten Ergebnisse, dass RcsB essentiell für die Expression der *bdm::lacZ*-Fusion ist und zeigen, dass die Einführung einer *ycgE::cat*-Mutation zu einer verstärkten Expression dieser Reporterfusion führt, wobei der aktivierende Effekt der *ycgE*-Mutation durch eine sekundäre *ymgB::kan*- sowie durch eine *rscB::kan*-Mutation supprimiert wird. Eine polare *ymgB::kan*-Mutation allein führt zu einer leicht reduzierten Expression der *bdm::lacZ* Fusion wie auch eine nicht-polare Δ *ymgB::scar*-Mutation (nicht gezeigt). Das pCAB18-kodierte *ymgB* hat gemäß den Erwartungen einen aktivierenden Einfluss auf *bdm::lacZ* im Wildtypstamm, jedoch nicht in einer *rscB::kan*-Mutante (Abb. 4.23 B). Das Ausschalten der RcsC-Kinase, die auch eine RcsB-spezifische Phosphatase-Aktivität aufweist, führt zu einer stark erhöhten Expression der *bdm::lacZ*-Fusion, wobei pCAB18-*ymgB* in einer *rscC::cat*-Mutante keinen Effekt mehr aufweist (Abb. 4.23 B), sodass im Einklang mit den in Abb. 4.21 dargestellten Ergebnissen angenommen werden kann, dass YmgB über die RcsC-Kinase wirkt. Ähnlich verhält es sich mit dem weiteren (basierend auf den Mikroarrayergebnissen) YcgF-kontrollierten Gen *ybgS* und auch mit dem YcgE-regulierten Gen *gadB*, deren Expressionen laut Reporterfusionen durch YmgB über das RcsDBC-System aktiviert werden (Tab 4.1 & 4.2; Daten nicht gezeigt).

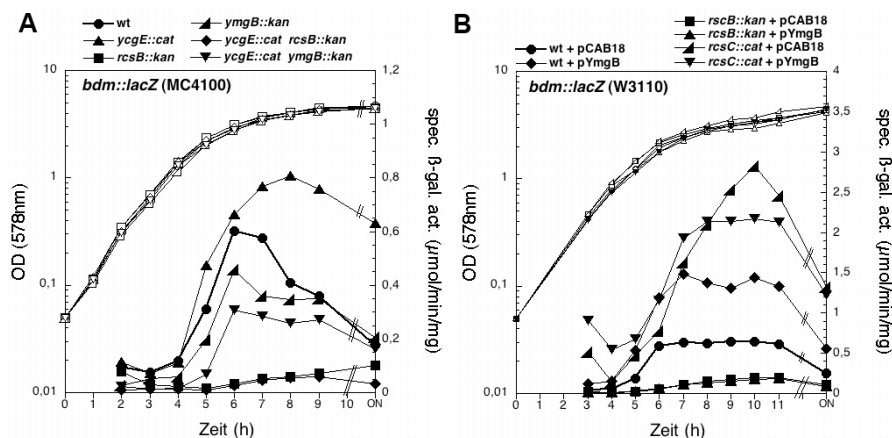


Abb. 4.23: YmgB-abhängige Effekte auf die Expression der *bdm::lacZ*-Reporterfusion. (A) MC4100 mit Wildtypintergrund sowie mit Mutationen in *ycgE*, *rscB* und *ymgB* wie angegeben und mit im Chromosom als Einzelkopie integrierter *bdm::lacZ*-Reporterfusion wurde im reichen LB-Medium bei 28°C angezchtet. **(B)** Der Effekt von pCAB18 bzw. pCAB18-*ymgB* auf die *bdm::lacZ*-Fusion wurde im Wildtyp W3110 sowie in den entsprechenden *rscB::kan* und *rscC::cat*-Mutanten getestet. Zellwachstum erfolgte im reichen LB/Amp-Medium bei 28°C. OD_{578nm} (offene Symbole) und spezifische β -Galaktosidase-Aktivitäten (geschlossene Symbole) wurden wie auch in (A) entlang des Wachstums determiniert. ON, Übernacht.

Folglich geht aus den in den Abschnitten 4.6.1 - 4.6.3 erläuterten Ergebnissen eindeutig hervor, dass das YcgE/YcgF-kontrollierte kleine Protein YmgB und partiell auch YmgA

RcsDBC-abhängige Genexpression beeinflussen. Dabei verdichten sich die Hinweise, dass YmgB speziell über die RcsC-Kinase wirkt, was die Ausgangskomponente der gesamten Phosphotransferkaskade darstellt. Da pCAB18-*ymgB* basierend auf Mikroarrayanalysen keinen Einfluss auf die Transkriptmengen von *rscC*, *rscD* oder *rscB* aufweist (S. Busse, Dissertation, 2009) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass YmgB das Rcs-System auf der Protein- bzw. Aktivitätsebene moduliert.

4.6.4 YcgZ, YmgA und YmgB bilden einen Komplex ohne YmgC

Zur Klärung der Fragestellung, durch welchen molekularen Mechanismus das YcgE/YcgF-kontrollierte Protein YmgB die Aktivität des Rcs-Phosphorelaysystems moduliert, sollte zunächst einmal getestet werden, ob YcgZ-YmgABC nicht nur eine genetische sondern evtl. auch eine funktionale Einheit bilden und möglicherweise einen Komplex bilden. Mit Hilfe des bereits erläuterten BacterioMatch II Two Hybrid Systems (Abschnitt 4.5.10; Material & Methoden) wurde eine potentielle Interaktion zwischen YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC untersucht. Aus den in Abbildung 4.24 dargestellten Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass *in vivo* zwischen YmgB und YmgA, sowie zwischen YmgB und YcgZ und zwischen YmgA und YcgZ eine Interaktion besteht. Im Vergleich dazu gibt es keine Interaktion zwischen YmgC und YmgB (Abb. 4.24 A) bzw. zwischen YmgC und YmgA (Abb. 4.24 B) und auch nicht zwischen YmgC und YcgZ (Daten nicht gezeigt). Folglich bilden YcgZ, YmgA und YmgB ein Komplex, während YmgC separat von diesem Komplex zu agieren scheint.

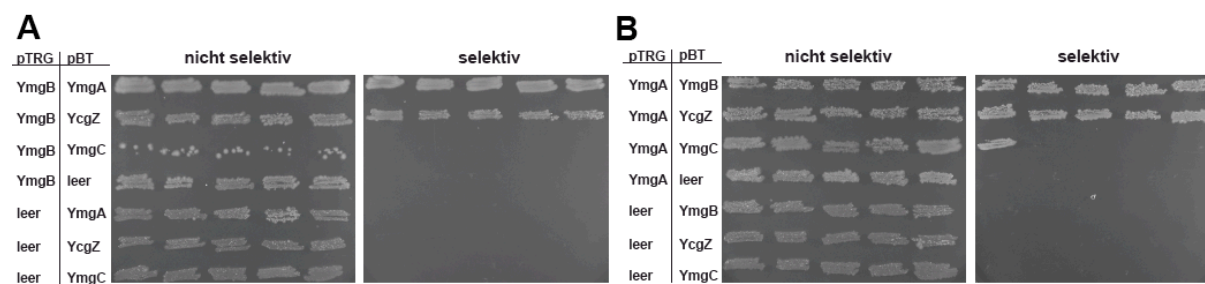


Abb. 4.24: Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen den YcgE/YcgF-kontrollierten kleinen Proteinen YcgZ-YmgABC. Die putativen Interaktionspartner wurden als Fusionsproteine entweder zum N-Terminus des cI -Repressors des Lambdaphagen vom pBT-Plasmid oder zum N-Terminus der alpha-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase vom pTRG-Vektor exprimiert. Die Co-Transformation von entsprechenden Konstrukten in Kombinationen wie angegeben erfolgte in Histidin-auxotrophe Reporterzellen, die nur bei Interaktion der entsprechenden Fusionsproteine in Anwesenheit von 4 mM des His3-Inhibitors 3-AT auf den selektiven Platten Wachstum zeigen. Fünf einzelne Co-Transformanten mit Wachstum auf nicht-selektivem Medium wurden auf selektiver und dann auf nicht selektiver Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h und anschließend bei 28°C für 48 h inkubiert.

4.6.5. YmgB und YmgC interagieren mit der Histidin-Kinase Domäne von RcsC

Mit der Erkenntnis, dass YmgB und partiell auch YmgA über das Rcs-Phosphorelaysystem Genexpression modulieren können, stellte sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus, der dafür verantwortlich ist. Da aus Mikroarrayanalysen hervorging, dass pCAB18-*ymgB* auf die Expression der Rcs-System-Komponenten keinen Effekt ausübt (S. Busse, Dissertation, 2009), wurde angenommen, dass YmgB das Rcs-System auf Protein- bzw. Aktivitätsebene beeinflusst, sodass die Hypothese entstand, dass zwischen den YcgE/YcgF-kontrollierten kleinen Proteinen YcgZ-YmgABC und den Rcs-System-Komponenten RcsC, RcsD und RcsB möglicherweise eine physikalische Interaktion besteht.

Mittels des BacterioMatch II Two Hybrid Systems konnte zunächst *in vivo* tatsächlich demonstriert werden, dass YmgC mit der cytosolischen Fraktion der RcsC-Kinase eine starke Interaktion zeigt (Abb. 4.25 A). Ebenso ist eine reproduzierbare Interaktion zwischen YmgB und dem cytosolischen Fragment der RcsC-Kinase zu verzeichnen (Abb. 4.25 B), während die in Abb. 4.25 B sichtbare Interaktion zwischen YmgB und der cytosolischen Fraktion von RcsD sowie die zwischen YmgB und RcsB bei Klonierung auf das jeweils andere Ausgangsplasmid nicht reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). In dieser experimentellen Reihe konnte keine Interaktion zwischen YmgA bzw. YcgZ und den Rcs-System-Komponenten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach wird aus diesen Daten deutlich, dass sowohl YmgC als auch YmgB *in vivo* mit dem cytosolischen Fragment der RcsC-Kinase interagieren.

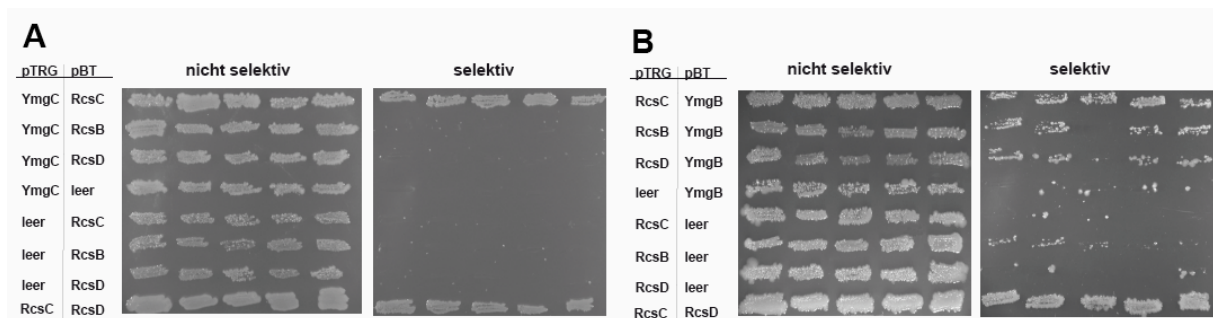


Abb. 4.25: Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YmgC sowie YmgB und den Komponenten des Rcs-Systems. Die putativen Interaktionspartner wurden als Fusionsproteine entweder zum N-Terminus des λ -Repressors des Lambdaphagen vom pBT-Plasmid oder zum N-Terminus der alpha-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase vom pTRG-Vektor exprimiert. Bezüglich der RcsC-Kinase und des RcsD-HPt-Proteins wurde lediglich die cytosolische Fraktion auf die entsprechenden Vektoren kloniert. Die Co-Transformation von den jeweiligen Konstrukten in Kombinationen wie angegeben erfolgte in Histidin-auxotrophe Reporterzellen, die nur bei Interaktion der entsprechenden Fusionsproteine in Anwesenheit von 4 mM des His3-Inhibitors 3-AT auf den selektiven Platten Wachstum zeigen. Fünf einzelne Co-Transformanten mit Wachstum auf nicht-selektivem Medium wurden auf selektiver und dann auf nicht selektiver Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h und anschließend bei 28°C für 48 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienen die cytosolischen Fraktionen der Histidinkinase RcsC und des HPt-Proteins RcsD.

Zur Verifizierung der mittels des BacterioMatch II Two Hybrid Systems beobachteten Interaktionen zwischen YcgZ, YmgA und YmgB untereinander sowie der Interaktion zwischen YmgC mit der cytosolischen Fraktion der RcsC-Kinase wurde ein *in vivo* Co-Elutionsexperiment durchgeführt. Dabei wurden *E. coli* Stämme generiert, bei denen an die chromosomal kodierten Gene *ymgC*, *ymgA* und *ycgZ* ein C-terminaler Flag-*tag* fusioniert wurde. Diese Stämme wurden jeweils nach Angaben in Abb. 4.26 A mit den leeren Vektoren pBAD33 bzw. pBAD18 oder mit den Derivaten pBAD33-6His-*rscC*, pBAD33-6His-*rscB* und pBAD33-6His-*ymgA* bzw. pBAD18-*ymgB*-Strep transformiert. Dabei wurde die cytosolische Fraktion von RcsC N-terminal mit einem 6His-*tag* versehen wie auch RcsB und YmgA, während YmgB mit einem C-terminalen Strep-*tag* exprimiert wurde. Nach Überexpression der jeweiligen Konstrukte mit anschließender Reinigung der Proteine mittels Ni-NTA-Agarose bzw. Streptactin-Sepharose wurden mitgereinigte Flag-getagte Proteine mit einem anti-Flag Antikörper detektiert.

So wird aus den Ergebnissen dieses Assays deutlich, dass das vom Chromosom exprimierte YmgC::Flag mit der His-getagten cytosolischen Fraktion der RcsC-Kinase jedoch nicht mit dem His-RcsB-Protein mitgereinigt wird (Abb. 4.26 A). Für YmgA::Flag konnte gezeigt werden, dass dieses Protein spezifisch mit YmgB-Strep jedoch nicht mit His-RcsC bzw. His-RcsB co-eluiert wird und YcgZ::Flag konnte lediglich in der Elutionsfraktion mit His-YmgA und nicht in der mit His-RcsC detektiert werden (Abb. 4.26 A). Somit konnte zum einen die Interaktion zwischen YmgC und RcsC und zum anderen die Interaktion zwischen YmgB, YmgA und YcgZ bestätigt werden.

Um die Interaktion zwischen YmgB und dem cytosolischen Fragment von RcsC zu verifizieren, wurden die Konstrukte pBAD33-6His-*rscC* und pBAD18-*ymgB*-Strep bzw. in Kombination mit den jeweiligen Kontroll-Plasmiden co-transformiert und anschließend co-überexprimiert. Nach einer Ni-NTA-basierten Proteinreinigung konnte mit Hilfe eines anti-Strep-Antikörpers das co-eluierte YmgB detektiert werden. So geht aus den in Abb. 4.26 B dargestellten Ergebnissen hervor, dass YmgB-Strep mit 6His-RcsC jedoch nicht mit 6His-RcsB mitgereinigt wird. Demnach konnte an dieser Stelle die mit dem BacterioMatch II Two Hybrid Systems beobachtete Interaktion zwischen YmgB und RcsC verifiziert werden.

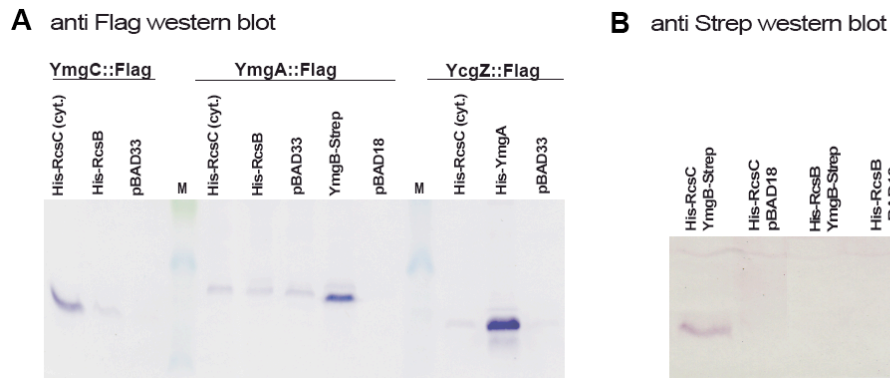


Abb. 4.26: Co-elutionsexperimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen YmgA, YmgB und YcgZ sowie zwischen YmgC bzw. YmgB und RcsC. (A) MC4100 mit YmgC::Flag, YmgA::Flag bzw. YcgZ::Flag im Chromosom wurde mit den leeren pBAD33- bzw. pBAD18-Vektoren bzw. mit den Derivaten pBAD33-6His-*rscC* (cytosolische Fraktion), pBAD33-6His-*rscB*, pBAD33-6His-*ymgA* bzw. pBAD18-*ymgB*-Strep wie angegeben transformiert. Die Überexpression der entsprechenden pBAD-Konstrukte wurde mit 0,1%-Arabinose bei OD_{578nm} von ca. 0,7 induziert. Die Zellkulturen wurden über Nacht in LB/Amp bzw. LB/Cm angezüchtet und dann abzentrifugiert. Mittels einer French-Press erfolgte der Aufschluss der Zellen mit anschließender Ni-NTA-Agarose- bzw. Streptactin-Sepharose-basierten Proteinreinigung. Mitgereinigte Proteine wurden mit einem anti-Flag Antikörper detektiert. (B) MC4100 wurde mit den leeren pBAD33- bzw. pBAD18-Vektoren bzw. mit den Derivaten pBAD33-6His-*rscC* (cytosolische Fraktion) bzw. pBAD18-*ymgB*-Strep in Kombinationen wie angegeben co-transformiert. Zellwachstum erfolgte wie bei (A) jedoch in LB/Amp+Cm. Nach der Reinigung von 6His-RcsC bzw. 6His-RcsB mit der Ni-NTA-Agarose erfolgte die Detektion des mitgereinigten YmgB-Strep-Proteins mittels eines anti-Strep Antikörpers.

Neben dem Membrananker besteht die RcsC-Kinase im Wesentlichen aus drei distinkten Domänen: der Histidin-Kinase Domäne (HK), der Alpha-Beta-Loop Domäne (ABL) und der Phosphoreceiver Domäne (PR). Um die Interaktion zwischen YmgC und YmgB mit der cytosolischen Fraktion von RcsC auf eine distinkte Domäne dieser Kinase einzugrenzen, wurde eine BacterioMatch II Two Hybrid-Analyse mit isolierten Domänen dieses Proteins durchgeführt. Dabei wurden die HK-, ABL- und die PR-Domänen von RcsC fusioniert an den N-Terminus der alpha-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase vom pTRG-Vektor exprimiert, während YmgB und YmgC als Fusionsproteine zum N-Terminus des cI-Repressors des Lambdaphagen vom pBT-Plasmid synthetisiert wurden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl YmgC als auch YmgB speziell mit der Histidin-Kinase-Domäne von RcsC interagieren. Die Interaktion zwischen YmgC und der ABL-Domäne von RcsC konnte nicht konstant reproduziert werden (Abb. 4.27).

Zusammenfassend belegen die in diesem Abschnitt erläuterten Interaktionsanalysen, dass die YcgE/YcgF-kontrollierten kleinen Proteine YcgZ, YmgA und YmgB einen Komplex formen und über das YmgB-Protein mit der Kinase-Domäne von RcsC interagieren. Unabhängig von YcgZ-YmgAB zeigt auch das YmgC-Protein eine deutliche Interaktion mit der Histidin-Kinase Domäne von RcsC. Insgesamt liegt die Vermutung nahe, dass über diese direkte Interaktion zwischen YmgB und RcsC-HK das kleine Protein YmgB evtl. im

Komplex mit YcgZ und YmgA die Expression Rcs-abhängiger Gene moduliert auch wenn der genaue Mechanismus in zukünftigen Studien aufgeklärt werden muss. Zusammenfassend wird jedoch aus den hier dargelegten Daten deutlich, dass die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC als Connektoren zwischen dem YcgE/YcgF- und dem Rcs-System agieren und dadurch Blaulichtsignale an das Rcs-System weiterleiten.

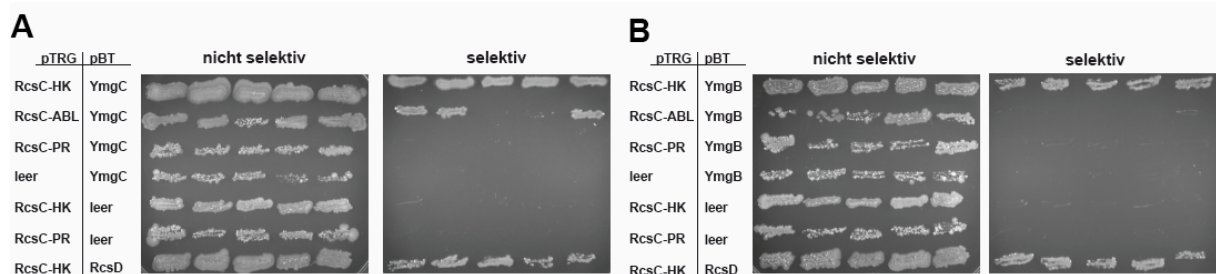


Abb. 4.27: Bacterio-Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen YmgC sowie YmgB und den einzelnen Domänen der RcsC-Kinase. YmgC sowie YmgB wurden als Fusionsproteine zum N-Terminus des cI -Repressors des Lambdaphagen vom pBT-Plasmid exprimiert, während die isolierten RcsC-Domänen als Fusionsproteine zum N-Terminus der alpha-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase vom pTRG-Vektor exprimiert worden sind. Die Co-Transformation von den jeweiligen Konstrukten in Kombinationen wie angegeben erfolgte in Histidin-auxotrophe Reporterzellen, die nur bei Interaktion der entsprechenden Fusionsproteine in Anwesenheit von 4 mM des His3-Inhibitors 3-AT auf den selektiven Platten Wachstum zeigen. Fünf einzelne Co-Transformanten mit Wachstum auf nicht-selektivem Medium wurden auf selektiver und dann auf nicht selektiver Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h und anschließend bei 28°C für 48 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienen Histidin-Kinase-Domänen von RcsC und die cytosolische Fraktion des HPT-Proteins RcsD.

5. Diskussion

5.1 Die Evolution und Funktion von YcgE – ein MerR-ähnliches MlrA-Paralog mit speziellen Eigenschaften

Proteine, die in die Familie der MerR-ähnlichen Regulatoren eingeordnet werden, weisen gemeinsame Merkmale bezüglich des Aufbaus und der Funktionsmechanismen auf. So bestehen diese Proteine typischerweise aus einer N-terminalen Domäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv zur Bindung der Operator-DNA und einer C-terminalen Domäne zur Bindung eines Liganden. Auch wenn die Liganden unterschiedlicher Natur sein können, wie z. B. Vitamine oder kleine Signalmoleküle, binden dennoch die Mehrheit der charakterisierten MerR-ähnlichen Proteine mittels konservierten Cysteinen Metall-Ionen. Eine bifunktionale Wirkungsweise ist ein weiteres kennzeichnendes Kriterium dieser Proteingruppe. Während sie in ihrer ligandfreien Form an suboptimalen Promotoren (19-20 bp Spacer) als Repressoren fungieren, resultiert die Ausbildung eines Protein-Ligand-Komplexes in optimaler Positionierung der RNA-Polymerase Erkennungssequenzen und führt zur Aktivierung der Transkriptionsinitiation (zusammengefasst in Brown *et al.*, 2003).

Die nahe verwandten MerR-ähnlichen Proteine YcgE und MlrA von *E. coli* sind mit 243 Aminosäuren nicht nur gleich lang, sondern auch zu 49% identisch und besitzen mit Ausnahme von vier Aminosäuren das gleiche Helix-Turn-Helix Motiv zur Bindung der Ziel-DNA (Abb. 4.2). Die hohe Übereinstimmung zwischen diesen beiden Regulatoren ist ein deutliches Indiz dafür, dass *mlrA* und *ycgE* einen gemeinsamen Ursprung haben und höchstwahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind. Dafür spricht auch, dass YcgE immer noch eine residuale Affinität für den MlrA-regulierten *csgD*-Promoter aufweist und nach Überexpression die Expression der Curli-Fasern direkt beeinflussen kann (Abb. 4.10 & 4.11).

Das YcgE-Protein hat im Laufe der Evolution spezielle Eigenschaften angenommen, die es von MlrA aber auch von den typischen MerR-ähnlichen Regulatoren abgrenzt. Interessanterweise haben sowohl MlrA als auch YcgE die für die MerR-ähnlichen Regulatoren charakteristische Bifunktionalität aufgegeben. Doch während MlrA bezogen auf die *csgD*-Expression keine Repressorfunktion mehr erfüllt, hat YcgE seine aktivierende Rolle verloren. So bindet YcgE einerseits teilweise überlappend mit dem -35 Hexamer, das als Erkennungsstelle für Sigmafaktoren dient, und andererseits in der Spacerregion zwischen den -35 und -10 Regionen und reprimiert direkt und spezifisch die Expression des *ycgZ-yngABC*-

Operons (Abb. 4.7 - 4.9). Zudem besitzt dieses Protein in erhöhter Konzentration das Potential, die Expression von *csgD* zu reprimieren, auch wenn YcgE am *csgD*-Operator den Aktivator MlrA verdrängt (Abb. 4.10 & 4.11).

Bedenkt man, dass typische MerR-ähnliche Regulatoren durch die Bindung eines Liganden die Aktivator-konformation annehmen, könnte man vermuten, dass YcgE die Fähigkeit ein Effektormolekül zu binden aufgegeben hat und deshalb in einer Repressor-konformation verbleibt. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung besitzt YcgE in seiner C-terminalen Domäne kein einziges Cystein, während bei den Metall-bindenden MerR-ähnlichen Regulatoren z. B. MerR, CueR oder ZntR konservierte Cysteinreste die Bindung des entsprechenden Liganden bewerkstelligen (Changela *et al.*, 2003; Helmann *et al.*, 1990). MlrA weist auch keines der konservierten Cysteine in seiner Aminosäuresequenz auf und bindet ein alternatives Effektormolekül: den sekundären Botenstoff c-di-GMP. So besitzt MlrA ein RxxD Motiv, das möglicherweise wie bei diversen anderen c-di-GMP-abhängigen Effektorproteinen in die Bindung von c-di-GMP involviert ist (Schirmer & Jenal 2009; Lindenberg *et al.*, 2012). Im Vergleich dazu, hat YcgE kein RxxD-Motiv in seiner C-terminalen Domäne und die Expression des YcgE-abhängigen Operons *ycgZ-ymgABC* wird auch durch drastische Veränderungen der zellulären c-di-GMP-Mengen durch Überexpression der aktiven PDE YhjH oder der aktiven DGC YaiC nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Somit erscheint es als unwahrscheinlich, dass YcgE ein Metall-Ion oder c-di-GMP als Effektor bindet. Vielmehr sprechen die in dieser Studie zur Funktion von YcgE erzielten Daten dafür, dass dieses Protein nicht mehr die Fähigkeit besitzt einen Liganden zu binden und deshalb in seiner Repressor-konformation verbleibt. Zur Expression YcgE-abhängiger Gene hat sich damit ein neuartiger Mechanismus etabliert. So interagiert nun das BLUF-EAL-Protein YcgF mit YcgE, was zur Aufhebung des YcgE-DNA-Komplexes führt und die Expression von *ycgZ-ymgABC* dereprimiert (Abb. 4.16 & 4.17).

Doch welche Rolle erfüllt die C-terminale Domäne des YcgE-Repressorproteins? Zum einen wird aus den *in vivo* Interaktionsanalysen deutlich, dass diese Domäne in die Interaktion mit dem YcgF-Protein involviert ist, auch wenn die N-terminale Domäne von YcgE sowohl *in vivo* wie ganz eindeutig auch *in vitro* primär für die Interaktion mit YcgF zuständig ist (Abb. 4.17 & 4.20). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die C-terminale Domäne des YcgE-Repressors zu dessen repressorischen Funktion beiträgt. So kann bezogen auf die *ycgZ::lacZ*-Expression die Überexpression der isolierten DNA-bindenden Domäne von dem pCAB18-Vektor eine *ycgE::cat* Mutation nicht komplementieren, während das von dem gleichen Vektor exprimierte vollständige YcgE dies tut (Daten nicht gezeigt). Auch *in vitro* ist die

gereinigte DNA-bindende Domäne des YcgE Proteins nicht in der Lage an ein DNA-Fragment mit dem *ycgZ*-Promoter zu binden (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass die Überexpression des YcgE Proteins von dem Hochkopienzahl-Vektor pQE60 in der Entstehung von Mutationen in diesem Protein resultierte, die YcgE in seiner repressorischen Funktion inaktivierten. Mehrfach konnte eine YcgE Variante mit der Mutation W23C in Kombination mit der A219T Mutation aufgelesen werden. Durch diese Veränderung hatte das vom pCAB18-exprimierte YcgE W23C A219T Protein keinen reprimierenden Effekt auf *ycgZ::lacZ*-Expression in einem *ycgE::cat* Mutantenhintergrund (Daten nicht gezeigt). Ob die C-Terminale Domäne lediglich zur stabilen Dimerkonformation des YcgE-Proteins beiträgt oder tatsächlich eine eigenständige molekulare Funktion erfüllt, muß allerdings in zukünftigen Analysen im Detail aufgeklärt werden.

Die Aufspaltung eines gemeinsamen Vorfahrgens in *ycgE* und *mlrA* ist offenbar nicht der einzige Vorgang dieser Art in der Familie der MerR-ähnlichen Regulatoren von *E. coli*. Die *in silico* Analysen von Martínez-Núñez *et al.* haben zu der Erkenntnis geführt, dass sowohl *zntA* als auch *copA*, kodierend für eine Zink- bzw. Kupfer-Efflux ATPase als auch deren MerR-ähnlichen Regulatoren ZntR und CueR einen gemeinsamen Ursprung haben (Martínez-Núñez *et al.*, 2010). Es wird also angenommen, dass in diesem Fall die Duplikation des Transkriptionsfaktors gemeinsam mit dem Zielgen erfolgte und sich erst im Laufe der Evolution sowohl Operator- als auch Signalsegregation entwickelte. Im Vergleich dazu, regulieren YcgE und MlrA mit dem *ycgZ-ymgABC*-Operon, kodierend für kleine Proteine, und *csgD*, kodierend für einen zentralen Aktivator der Curli-Biosynthese, unterschiedliche Zielgene. Dennoch kommt in den Bindestellen beider Regulatoren ein GTACA-Motiv (fett hervorgehoben) vor, wobei MlrA an AAAGTT**GTACA**(12N)**TGCACAATTTT** im *csgD*-Promoter und YcgE an **TGTAC**(9N)**GTACA** in der *ycgZ*-Promoterregion bindet (Ogasawara *et al.*, 2010; Abb. 4.8 & 4.9). In Anbetracht der Tatsache, dass YcgE und MlrA ein beinahe identisches Helix-Turn-Helix-Motiv zur Bindung der DNA besitzen (Abb. 4. 2) und auch beide ein GTACA-Motiv in der Ziel-DNA erkennen, stellt sich die Frage, wie diese Regulatoren zwischen dem physiologisch relevanten und dem fremden Operator differenzieren können. Eine Analyse zur Operatorspezifität der MerR-ähnlichen Paraloge CueR und Gols von *Salmonella* hat ergeben, dass obwohl diese nahe verwandten Regulatoren höchst ähnliche Sequenzen in ihren physiologisch relevanten Operatoren erkennen, sie dennoch spezifisch an ihre Ziel-DNA binden und eine geringfügige „Cross-Regulation“ ist jeweils nur in Abwesenheit des nativen Regulators detektierbar. Verantwortlich für diese

Spezifität der Operatorerkennung von CueR und Gols ist eine einzelne Base am 3' bzw. 3-Ende der entsprechenden Bindestelle und eine strikte Kontrolle der intrazellulären Mengen der beiden Regulatoren unter jeweils relevanten Bedingungen (Pérez Audero *et al.*, 2010). Auch wenn sowohl die MlrA-Bindestelle im *csgD*-Promotor als auch die YcgE-Bindestelle im *ycgZ*-Promoter das gemeinsame Bindemotiv GTACA enthalten, sind sie dennoch verschieden. Bestehend aus 11 bp langen Palindromen und 12 bp langem Intervall okkupiert MlrA einen mit 34 Basenpaaren ungewöhnlich langen Bereich in der *csgD*-Promoterregion (Ogasawara *et al.*, 2010). Hingegen bindet YcgE an zwei Pentamere, die durch 9 Basenpaare getrennt sind, (TGTAC(9N)GTACA) im *ycgZ*-Promoter und es befinden sich an 3' bzw. 3-Ende des Bindemotivs ein C bzw. ein G (unterstrichen), während dies bei der MlrA-Bindestelle im *csgD*-Promoter AAAGTTGTACA(12N)TGCACAATTTT ein A bzw. ein T ist. Demnach erscheint es als wahrscheinlich, dass diese Operatordifferenzen für die Determination der YcgE- bzw. MlrA-Spezifität verantwortlich sind. Zusätzlich spricht die RpoD-abhängige Expression von *ycgE* (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007) und die RpoS-Abhängigkeit von *mlrA* (Weber *et al.*, 2005) dafür, dass diese Regulatoren in unterschiedlichen Wachstumsphasen von *E. coli* in physiologisch relevanten Mengen vorkommen, sodass deren temporäre Expressionskontrolle möglicherweise zur spezifischen Regulation der entsprechenden Zielgene beiträgt.

5.2 Die Evolution und Funktion von YcgF – eine Phosphodiesterase wird zum anti-Repressor

Das Signalmolekül cyclisches di-GMP wird von Diguanylatzyklasen, die durch eine GGDEF-Domäne gekennzeichnet sind, synthetisiert und erfüllt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des bakteriellen Übergangs von einer motilen zu einer sessilen Lebensform. Die Degradation dieses Botenstoffes erfolgt mittels der c-di-GMP-spezifischen Phosphodiesterasen, welche eine EAL- oder weniger häufig eine HD-GYP-Domäne aufweisen. Enzymatisch aktive EAL-Domänen Proteine hydrolysieren die 3' cyclische Phosphatbindung von c-di-GMP, was zur Entstehung eines linearen di-GMP Moleküls 5'pGpG führt (Schirmer & Jenal, 2009).

Strukturelle und biochemische Untersuchungen der c-di-GMP-spezifischen Phosphodiesterase RocR von *P. aeruginosa* haben zu der Identifizierung von 14 konservierten Aminosäuren geführt, die für die enzymatische Aktivität der EAL-Domänen Proteine als essentiell gelten. Dabei sind acht dieser Aminosäuren wichtig für die Bindung des Cofaktors Mg²⁺, insgesamt vier Aminosäuren sind in die Bindung des Substrats c-di-GMP involviert und zwei Reste sind für die katalytische Reaktion essentiell (Rao *et al.*, 2008; Abb.

4.1). Eine genomweite *in silico* Analyse von insgesamt 5862 EAL-Domänen führte zu der Erkenntnis, dass 49% dieser Proteine alle katalytisch wichtigen Aminosäuren aufweisen und höchstwahrscheinlich aktive Phosphodiesterasen darstellen. 33% der analysierten EAL-Domänen weisen geringfügige Degenerationen auf, sodass an Hand der Aminosäurezusammensetzung keine Aussage über deren putative Phosphodiesteraseaktivität getroffen werden kann. Ein Vertreter dieser Proteingruppe stellt das zusammengesetzte GGDEF-EAL Protein DGC2 dar, welches als aktive Diguanylatzyklase in die Regulation der Cellulose-Biosynthese in *A. xylinus* involviert ist (Tal *et al.*, 1998). Bislang konnte weder für das Gesamtprotein, noch für die isolierte EAL-Domäne von DGC2 eine Phosphodiesterase-Aktivität detektiert werden. Wurde jedoch durch die Einführung von drei Mutationen die Konsensussequenz in diesem Protein restauriert, so konnte die enzymatische Aktivität der isolierten EAL-Domäne wiederhergestellt werden (Rao *et al.*, 2009). 18% der 5862 untersuchten EAL-Domänen Proteine sind stark degeneriert und werden in die Gruppe der enzymatisch inaktiven EAL-Domänen Proteine eingestuft (Rao *et al.*, 2009). Über die biologische Rolle der großen Mehrheit dieser Proteingruppe kann leider keine Aussage getroffen werden.

Basierend auf den von Rao *et al.* sowie in dieser Studie durchgeführten *in silico* Analysen gehört auch das BLUF-EAL-Protein YcgF von *E. coli* in die Gruppe der enzymatisch inaktiven EAL-Domänen Proteine. In diesem Protein sind eine Glutaminsäure zur Bindung von Mg^{2+} sowie eine weitere Glutaminsäure für die katalytische Reaktion und alle vier Aminosäuren zur Bindung von c-di-GMP nicht konserviert (Abb. 4.1). Entsprechend den Vorhersagen konnte auch experimentell keine Bindung von c-di-GMP an YcgF detektiert werden (Abb. 4.12 B) und übereinstimmend mit den Resultaten von Barends *et al.* ist YcgF von *E. coli* nicht in der Lage c-di-GMP zu degradieren (Barends *et al.*, 2009; Abb. 4.12 A). Stattdessen konnte im Rahmen dieser Studie aufgeklärt werden, dass dieses Protein über direkte Protein-Protein-Interaktion den YcgE-Repressor antagonisiert (Abb. 4.15 - 4.17).

Vergleicht man YcgF-homologe Proteine verschiedener Enterobakterien bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung, so wird deutlich, dass die EAL-Domäne dieses Proteins sowohl in konservierter als auch in unterschiedlich degenerierter Form in Assoziation mit der BLUF-Domäne vorkommt. Beispielsweise besitzt das BLUF-EAL-Protein Blrp1 von *K. pneumoniae* 342 eine konservierte EAL-Domäne und stellt eine aktive Blaulicht-regulierte Phosphodiesterase dar (Barends *et al.*, 2009). Durch eine Serie von Änderungen einzelner Aminosäuren hat das YcgF Protein von *E. coli* offenbar seine enzymatische Aktivität im Laufe der Evolution aufgegeben und hat sich nun an die neue Funktion als ein Blaulicht-

regulierter anti-Repressor adaptiert. Auch wenn es Rao *et al.* gelungen ist, die Phosphodiesterase Aktivität der EAL-Domäne des DGC2 Protein von *A. xylinus* durch die Einführung von drei konservierten Aminosäuren wiederherzustellen (Rao *et al.*, 2009), funktioniert solch ein „Retro-Evolutionsexperiment“ mit YcgF von *E. coli* nicht. Trotz der nahe liegenden Vermutung, dass YcgF ursprünglich eine aktive Blaulicht-regulierte Phosphodiesterase darstellte, bleibt dieses Protein auch nach der gezielten Einführung aller Aminosäuren, die für die Phosphodiesterase Aktivität als essentiell gelten, enzymatisch inaktiv (Abb. 4.13). Allerdings wird YcgF durch die Restauration der Konsensus Aminosäuren in der EAL-Domäne in seinem Potential den YcgE-Repressor *in vivo* zu antagonisieren geschwächt (Abb. 4.18). Diese Beobachtung könnte einerseits darauf hinweisen, dass YcgF ein für seine alternative Funktion speziell adaptiertes Protein repräsentiert und wirft andererseits die Frage auf, ob evtl. noch weitere als die von Rao *et al.* deklarierten Aminosäuren für die Phosphodiesterase Aktivität von Bedeutung sind (Rao *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu der konservierten EAL-Domäne von der aktiven Phosphodiesterase BlrP1 von *K. pneumoniae* 342 und der stark degenerierten EAL-Domäne des anti-Repressors YcgF von *E. coli* K-12 existieren eine Vielzahl von Zwischenformen dieses Proteins. So fehlen z. B. in den YcgF-Homologen KPK_3794 von *K. pneumoniae* 342 und in Ent638_1757 von *Enterobacter sp.* 638 lediglich zwei bzw. drei der mit der Phosphodiesterase-Aktivität assoziierten Aminosäuren (Abb. 4.1). Da keine experimentellen Daten bezüglich der Funktion dieser Proteine existieren, kann leider keine Aussage über deren biologische Rolle getroffen werden. Auffallend ist jedoch, dass fast alle auch nur geringfügig degenerierten YcgF-Varianten stets mit einem MerR-ähnlichen YcgE-Homolog und YcgZ-YmgAB-verwandten Proteinen in einem Gencluster kodiert vorliegen und vermutlich wie in *E. coli* auch funktional assoziiert sind. Auf der anderen Seite sind alle YcgF-homologe Proteine mit einer konservierten EAL-Domäne unabhängig von diesen Proteinen kodiert. Diese Regel trifft neben *Escherichia coli* K-12 für eine Vielzahl von Organismen zu z. B.: *K. pneumoniae* 342, *Enterobacter sp.* 638, *Citrobacter rodentium* ICC168, *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894, *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* PBR 1692, *Shigella flexneri* VA-6, *Erwinia billingiae* Eb661, *Bordetella avium* 197N u.s.w. Es gibt allerdings zwei Ausnahmen zu dieser Regel: Sowohl *Serratia sp.* M24T3 als auch *Pantoea ananatis* LMG 20103 besitzen ein YcgF-homologes Protein mit einer degenerierten EAL-Domäne (SPM24T3_09509 bzw. PANA_1748) und dennoch sind diese Proteine unabhängig von einem YcgE-Homolog und YcgZ-YmgAB-verwandten Proteinen kodiert. Über die Funktion dieser Proteine kann keine

Aussage getroffen werden und es kann lediglich spekuliert werden, dass sie nicht als aktive Phosphodiesterasen fungieren.

Auch wenn die Wiedereinführung aller für die Phosphodiesterase Aktivität wichtigen Aminosäuren in die EAL-Domäne von YcgF nicht in einer enzymatisch aktiven Proteinvariante resultiert, verleihen diese Veränderungen diesem Protein neuartige funktionale Eigenschaften. So zeigt die Phosphodiesterase-ähnliche YcgF-M8 Version (I193L, Q195R, M362E, A365E, T247N, H177Q, H306D, S328D) eine deutlich verbesserte Interaktion mit dem YcgE-Paralog MlrA (Abb. 4.20) und kann auf der anderen Seite nicht mehr so effektiv die *ycgZ::lacZ*-Expression *in vivo* dereprimieren (Abb. 4.18). Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass die EAL-Domäne von YcgF an der Interaktion mit YcgE und auch mit MlrA beteiligt ist. Zudem verdeutlichen diese Daten, dass YcgF nicht nur eine defekte Phosphodiesterase, sondern ein spezifisch für die Interaktion mit YcgE evolviertes Protein repräsentiert und nur in der heutigen Wildtyp Form den YcgE-Repressor effektiv antagonisieren kann (Abb. 4.18). Außerdem erlauben diese Analysen die Annahme, dass das YcgF Protein in seiner als Phosphodiesterase aktiven Form möglicherweise mit dem YcgE-Paralog MlrA einen Komplex bildete. Aktuelle Daten zeigen, dass MlrA, vermittelt durch seine C-terminale Domäne, mit der aktiven Phosphodiesterase YciR interagiert (Lindenberg *et al.*, 2012) und in Übereinstimmung damit ist diese Domäne auch für die Interaktion mit YcgF, insbesondere mit der YcgF-M8-Variante, zuständig (Abb. 4.20). Dennoch ist diese Interaktion physiologisch nicht mehr relevant und führt lediglich nach Überexpression von YcgF zur Inhibition der *csgD*- und Curli-Fasern Expression (Abb. 4.19) und es ist denkbar, dass die Bindung von YcgF an MlrA mit der DNA-Bindefähigkeit dieses Regulators interferiert oder durch Konkurrenz mit YciR die Formation eines funktionalen MlrA-YciR-YdaM-Komplexes stört.

Im Vergleich dazu sind beide Domänen des YcgE-Repressors in die Interaktion mit YcgF involviert auch wenn *in vivo* und insbesondere *in vitro* die N-terminale Domäne von YcgE eine stärkere Interaktion mit YcgF zeigt (Abb. 4.17 & 4.20). Der physikalische Kontakt zwischen YcgF und der DNA-bindenden Domäne von YcgE scheint aus evolutiver Sicht eine neue funktionale Errungenschaft von YcgF zu sein und ermöglicht eine effektivere Konkurrenz von YcgF mit der Operator-DNA um die Bindung an YcgE. Ein zu dem YcgE/YcgF-System ähnliches System findet man in *Myxococcus xanthus*. Die CarA/CarS Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Carotenoid-Biosynthese in diesem Organismus. Dabei wird der MerR-ähnliche Regulator CarA durch das CarS-Protein antagonisiert, welches mit der Operator-DNA um die Bindung an CarA konkurriert und

interessanterweise durch seine saueren Eigenschaften (pI 4,8) die Ziel-DNA von CarA imitiert (Navarro-Avilés *et al.*, 2007). Auffällig ist, dass der isoelektrische Punkt der EAL-Domäne von YcgF geringer ist (4,82) als der pI der konservierten EAL-Domänen der YcgF-Homologe von *B. avium* oder auch von *A. macleodii* (5,29 bzw. 5,28). Entsprechend kann angenommen werden, dass die aciden Charakteristika der EAL-Domäne von YcgF auch zur effektiveren Kompetition mit der Operator-DNA beitragen. So ist auch die Interaktion zwischen YcgE bzw. den isolierten Domänen dieses Proteins und der Phosphodiesterase-ähnlichen YcgF-M8-Variante sowohl *in vivo* (Abb. 4.20) als auch *in vitro* (Daten nicht gezeigt) bei ungenügender Menge bzw. Abwesenheit der YcgE-spezifischen Operator-DNA vergleichbar stark wie die zwischen YcgE und YcgF-WT. Muß jedoch YcgF um die Bindung an YcgE mit der *ycgZ*-Promoter-DNA konkurrieren, so hat die YcgF-M8-Variante ein deutlich geringeres Potential die *ycgZ::lacZ*-Expression zu dereprimieren (Abb. 4.18).

Doch inwiefern kontrolliert die N-terminale BLUF-Domäne des YcgF-Proteins die Aktivität der C-terminalen EAL-Domäne? Biophysikalische Studien haben gezeigt, dass YcgF mittels seiner BLUF-Domäne Blaulicht im Bereich von 458 nm absorbiert und nach Anregung wurden sowohl in der isolierten BLUF-Domäne als auch im gesamten YcgF-Protein Konformationsänderungen detektiert (Rajagopal *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2006; Nakasone *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie konnte deutlich demonstriert werden, dass *in vitro* YcgF lediglich unter Blaulichtbedingungen effektiv den YcgE-Repressor von seiner Ziel-DNA im *ycgZ*-Promoter ablösen kann (Abb. 4.16). *In vivo* wirkt YcgF stimulierend auf die Expression des *ycgZ-ymgABC*-Operons und Blaulichtbestrahlung führt zur verstärkten YcgF-abhängigen Aktivierung dieser Gene bei niedriger Temperatur (Abb. 4.14). Allerdings ist auch unter normalen Laborbedingungen bei Tageslicht ohne Applikation der Blaulichtbestrahlung eine Interaktion zwischen YcgE und YcgF detektierbar (Abb. 4.17). Ebenso führen unphysiologische Mengen von YcgF nach Überexpression auch ohne das Blaulichtsignal zur Derepression der *ycgZ::lacZ*-Expression (Abb. 4.15). Dennoch kann belichtetes YcgF deutlich effizienter mit der *ycgZ*-Promoter-DNA um die Bindung an YcgE konkurrieren (Abb. 4.14 & 4.16). Diese Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass YcgF auch in nicht angeregtem Zustand an freies YcgE bindet und erst die Blaulichteinwirkung die Affinität von YcgF für YcgE in dem Maße erhöht, dass es effizienter mit der *ycgZ*-Operator-DNA kompetitieren kann. Basierend auf Transient-Grating-Analysen postulieren Nakasone *et al.*, dass YcgF ohne Blaulichtbedingungen in einem Dimer-Monomer Equilibrium vorliegt und erst nach Anregung mit Blaulicht eine stabile Dimerkonformation einnimmt (Nakasone *et al.*, 2010), die möglicherweise die Affinität von YcgF für YcgE verstärkt. Interessanterweise hat

neben Blaulichtsignalen auch niedrige Temperatur einen stimulierenden Effekt auf Aktivität von YcgF. So führt niedrige Temperatur (16°C) allein zur messbaren Derepression der *ycgZ*-Expression, während bei 37°C sogar unter Blaulicht keine YcgF-abhängige Aktivierung der *ycgZ::lacZ*-Expression zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung damit verbleibt YcgF bei niedriger Temperatur länger in der durch Blaulicht angeregten, aktiven Konformation (Schröder *et al.*, 2008) und es wird angenommen, dass auch niedrige Temperatur die stabile Dimerbildung fördert (Nakasone *et al.*, 2010).

Welche Erkenntnisse erlaubt uns diese Studie in Bezug auf die Evolution des durch GGDEF-/EAL-Domänen Proteine kontrollierten c-di-GMP-Systems? Basierend auf dem heutigen Wissenstand zur Funktion des degenerierten GGDEF-EAL-Proteins CsrD, des degenerierten EAL-Domänen Proteins YdiV und des in dieser Arbeit charakterisierten YcgF-Proteins von *E. coli* wird ein generelles Prinzip bezüglich der Rolle dieser Proteine deutlich. Alle diese Proteine umgehen nun das diffundierbare kleine Signalmolekül c-di-GMP und wirken direkt und spezifisch über ihre jeweiligen Interaktionspartner. Nach heutiger Erkenntnis stimuliert das CsrD Protein unabhängig von c-di-GMP den Abbau der kleinen RNAs CsrB und CsrC und ermöglicht so CsrA-abhängige Genexpression (Suzuki *et al.*, 2006). YdiV agiert als direkter Antagonist und Proteolyse-Targetingfaktor des Masterregulators der flagellaren Motilitätskaskade (Takaya *et al.*, 2012; Wada *et al.*, 2011; Wada *et al.*, 2012). Und YcgF antagonisiert das YcgE-Repressorprotein über direkte Protein-Protein-Interaktion (diese Studie). Bemerkenswert ist allerdings, dass obwohl diese degenerierten GGDEF-/EAL-Domänen Proteine sich von dem sekundären Botenstoff c-di-GMP im Laufe der Evolution entfernt haben, sie dennoch ihre Funktion im c-di-GMP dominierten physiologischen Kontext der Regulation der Biofilmbildung bzw. der Motilität erfüllen.

5.3 YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC: kleine Proteine als Verbindung zwischen dem YcgF/YcgE-Netzwerk und dem RcsDBC-Phosphorelaysystem

Nach der Aufklärung der molekularen Funktion von YcgE als Repressor und des YcgF-Proteins als YcgE-spezifischer anti-Repressor stellt sich die Frage nach der biologischen Rolle des YcgF/YcgE-Systems, was eine eingehende Analyse der Funktion der YcgF/YcgE-abhängigen Proteine erfordert. Microarrayanalysen sowie weiterführende Untersuchungen ermöglichten die Erfassung der durch YcgE- und YcgF-kontrollierten Gene und haben aufgedeckt, dass diese beiden Regulatoren in direkter Weise die Expression von vier kleinen Proteinen, nämlich von YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC, regulieren (Tab. 4.1 & 4.2; Abb.

4.7 & 4.8). Auch wenn basierend auf den in den Microarrayanalysen ermittelten Expressionverhältnissen *ylil* und *ynaK* ebenso als deutlich YcgE- und YcgF-abhängig erfasst werden, konnte eine direkte Bindung des YcgE-Proteins an die Promotorregionen dieser Gene nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin hatten sowohl eine *ycgE::cat* als auch eine *ycgF::kan* Mutation keinen Einfluss auf die Expression von *yliL::lacZ* bzw. *ynaK::lacZ*-Reporterfusionen (Daten nicht gezeigt), sodass die Rolle von YcgE und YcgF in der Regulation der *ylil*- und *ynaK*-Expression im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte. Allerdings konnte sowohl mittels Microarrayexperimenten als auch mit Hilfe von Reporterfusionen gezeigt werden, dass die als YcgE- und YcgF-reguliert erfassten Gene *bdm*, *ybgS* und *gadB* (Tab. 4.1 & 4.2) unter der Kontrolle des YcgE/YcgF-abhängigen YmgB Proteins stehen (Abb. 4.23; S. Busse, Dissertation, 2009; Übersichtsdarstellung in Abb. 5.1).

Detaillierte Untersuchungen zur Funktion der durch YcgE/YcgF-direkt kontrollierten kleinen Proteine haben zu der Erkenntnis geführt, dass YmgB und bei besonders niedriger Temperatur (16°) auch YmgA einerseits die Biosynthese des Exopolysaccharids Kolansäure stimulieren und auf der anderen Seite einen stark inhibierenden Effekt auf die Synthese der Curli-Fasern ausüben (Abb. 4.21-4.22). Weiterführend haben die im Rahmen der Dissertation von S. Busse durchgeführten genomweiten Mikroarrayanalysen die Erfassung aller YmgB-kontrollierten Gene ermöglicht (S. Busse, Dissertation, 2009). Bei genauerer Betrachtung der YmgB-abhängigen Gene wurde erkennbar, dass eine Vielzahl dieser Gene unter der Kontrolle des RcsDBC-Phosphorelaysystems steht (Majdalani & Gottesman, 2005). Die Synthese des Polysaccharids Kolansäure erfordert die Expression des *cps*-Operons, welches direkt durch den Response Regulator RcsB in Kooperation mit dem Hilfsprotein RcsA aktiviert wird (Whitfield, 2006). Die Biosynthese der Curli-Fasern steht ebenfalls unter der Kontrolle des Rcs-Systems. So wirkt die RcsB-abhängige kleine RNA RprA inhibierend auf die Translation von CsgD, was einen wichtigen Aktivator der *csgBAC*-kodierten Curli-Fasern darstellt (Jørgensen *et al.*, 2012; Mika *et al.*, 2012). *Bdm* repräsentiert ebenfalls ein YmgB-kontrolliertes Gen, das unter direkter Kontrolle von RcsB steht (Francez-Charlot *et al.*, 2005; Hagiwara *et al.*, 2003). Zusätzliche Ziel-Gene von YmgB, die auch zum Rcs-Regulon gehören, sind die Säureresistenzgene *gadB*, *gadC*, *gadE* und *hdeA* sowie weitere Gene (S. Busse, Dissertation, 2009; Hagiwara *et al.*, 2003; Ferrieres & Clarke, 2003). In Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass YmgB die Expression Rcs-kontrollierter Gene moduliert, kann der YmgB- aber auch der YmgA-abhängige mucoide Koloniephänotyp, d. h. die verstärkte Synthese des Exopolysaccharids Kolansäure durch die Einführung einer *rcsB::kan* Mutation supprimiert werden (Abb. 4.21 A). Ähnlich hat YmgB in einem

rscB::kan-Stammhintergrund keinen stimulierenden Effekt mehr auf die Expression von *bdm* (Abb. 4.23). Und auch der inhibierende Effekt von YmgB auf die Curli-Expression kann durch eine *rprA::kan*-Mutation aufgehoben werden (Abb. 4.22 B).

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, durch welchen molekularen Mechanismus YmgB RcsDBC-abhängige Gene modulieren kann. YmgB ist ein 88 Aminosäuren langes Protein, das laut Kristallstrukturanalysen aus 3 alpha-Helices besteht und in Lösung eine Dimerkonformation einnimmt (Lee *et al.*, 2007). Die in der Studie von Lee *et al.* durchgeführten vergleichende Analysen von drei-dimensionalen Strukturen zeigen eine gewisse Ähnlichkeit der YmgB-Struktur zu der des Hha-Proteins (Lee *et al.*, 2007). Hha ist ebenfalls ein kleines Protein (72 Aminosäuren), das in die Expression des Toxins α -Hemolysin involviert ist und mit dem Nukleoid-assoziierten Protein H-NS ein Komplex bildet (Juárez *et al.*, 2000). Interessanterweise können die ersten drei Helices von Hha, die strukturell Ähnlichkeit mit YmgB aufweisen, die Oligomerisierungsdomäne des H-NS-Proteins funktional ersetzen (Rodríguez *et al.*, 2005), sodass Lee *et al.* die Hypothese aufstellen, dass YmgB auch als ein Nukleoid-assoziiertes Protein Genexpression beeinflussen kann (Lee *et al.*, 2007).

Basierend auf dieser Hypothese könnte angenommen werden, dass YmgB die Expression der Rcs-System-Komponenten *rscC*, *rscD* und *rscB* beeinflusst und dadurch einen Effekt auf das Rcs-Regulon ausübt. Allerdings zeigten diese Gene keine differentielle Expression bei der Erfassung YmgB-abhängiger Gene mittels Mikroarrayanalysen (S. Busse, Dissertation, 2009), sodass es als wahrscheinlicher erschien, dass YmgB auf der Proteinebene die Aktivität des RcsDBC-Systems beeinflusst. Mittels epistatischen Mutantenstudien konnte gezeigt werden, dass der YmgB-abhängige Einfluss auf Rcs-kontrollierte Gene die Anwesenheit der drei wesentlichen Rcs-Komponenten erfordert, jedoch unabhängig von dem Lipoprotein RcsF ist (Daten nicht gezeigt). Mutationen in *rscC*, *rscD* und *rscB* können den durch YmgB-induzierten mukoiden Koloniephänotyp supprimieren (Abb. 4.21 B) und die Einführung einer *rscC::cat* wie auch einer *rscB::kan* Mutation hebt den stimulierenden Effekt von YmgB auf die *bdm* Expression auf (Abb. 4.23 B). Demnach verdichteten sich die Hinweise, dass YmgB über die RcsC-Kinase, die den Ausgangspunkt der Phosphotransferkaskade bildet, wirkt. In Übereinstimmung damit konnte sowohl mittels des BacterioMatch II Two-Hybrid-Systems als auch mit Hilfe von Co-Elutionsexperimenten eine direkte Interaktion zwischen YmgB und der cytosolischen Fraktion der RcsC-Kinase detektiert werden (Abb. 4.25 B & 4.26 B). Zusätzlich konnte aufgedeckt werden, dass auch das YmgC-Protein mit dem cytosolischen Fragment von RcsC eine starke Interaktion aufweist (Abb. 4.25 A & 4.26 A). Weiterhin konnte mit Hilfe

von *in vivo* Interaktionsanalysen deutlich demonstriert werden, dass YmgB aber auch YmgC speziell mit der Histidin-Kinase-Domäne von RcsC interagieren (Abb. 4.27). Das Besondere an diesem System ist auch, dass YmgB mit YcgZ und YmgA einen Komplex ausbildet (Abb. 4.24 & 4.26; zusammengefasst in Abb. 5). Die Beobachtung, dass erhöhte Mengen von YmgB auch in einer $\Delta ycgZ$ -*ymgAB::cat*-Mutante zu einer mucoiden Kolonimorphologie führen (Daten nicht gezeigt), könnte darauf hinweisen, dass YmgB, zumindest nach leichter Überproduktion, auch unabhängig von YcgZ und YmgA funktional ist.

Exprimiert von dem Niedrig-Kopienzahl Vektor pCAB18 hat auch YmgA einen aktivierenden Effekt auf das RcsDBC-System. Dieser Effekt scheint jedoch einer Temperaturregulation zu unterliegen. Die Expression von YmgA führt lediglich bei 16°C und nicht bei 28°C und auch nicht bei 37°C zur verstärkten Synthese der Kolansäure und zur Inhibition der *csgB*-Expression (Abb. 4.21 A & 4.22 A). Da bei diesen Analysen die Expression von YmgA entkoppelt von dem nativen Promotor erfolgte, kann temperaturregulierte Transkription von *ymgA* als Ursache ausgeschlossen werden. Vielmehr erscheint es als wahrscheinlich, dass niedrige Temperatur einen stabilisierenden Einfluss auf die mRNA von YmgA ausübt oder die Aktivität der beteiligten Proteine verändert, was jedoch experimenteller Analysen bedarf.

YcgZ ist auch ein Bestandteil des YcgZ-YmgA-YmgB-Komplexes doch die biologische Rolle dieses kleinen Proteins kann nicht eindeutig determiniert werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass YcgZ geringfügig das YmgB-Protein und möglicherweise auch YmgA antagonisiert bzw. leicht inhibierend auf die Expression Rcs-abhängiger Gene wirkt. So fällt auf, dass die Expression von YcgZ von pCAB18 im Vergleich zum Leerplasmid zu einer geringeren Expression der Kolansäure führt, sodass die Kolonien weniger mucoid erscheinen (Abb. 4.21). Zudem wird deutlich, dass die Co-Expression von YcgZ-YmgAB nicht mehr in vollständiger Inhibition der *csgB::lacZ*-Expression bei 28°C resultiert, wie dies bei der Expression von YmgB allein zu beobachten ist (Abb. 4.22). Allerdings hat YcgZ keinen Effekt auf die Expression des RcsB-abhängigen Gens *bdm* (Daten nicht gezeigt), sodass weiterführende Analysen notwendig sind, um die physiologische Funktion von YcgZ zu verstehen. Auffällig ist auch, dass obwohl YmgC eine ganz starke Interaktion mit der RcsC-Kinase aufweist, die Expression dieses Proteins von dem pCAB18-Vektor keinerlei messbaren Effekte auf die Rcs-kontrollierten Gene hat, was in Abschnitt 5.4 (s. u.) im Detail diskutiert wird.

Die Interaktion der kleinen Proteine YmgB und YmgC mit der RcsC-Kinase des komplexen Rcs-Systems erinnert an die wachsende Gruppe der kleinen Connektor-Proteine,

welche die Aktivität von spezifischen Zweikomponentensystemen beeinflussen. Beispielsweise wird das kleine Protein PmrD von *S. enterica* serovar Typhimurium in Abhängigkeit von dem PhoP/PhoQ-Zweikomponentensystem als Antwort auf erhöhte Mengen von extrazellulärem Fe^{3+} synthetisiert und verhindert durch direkte Interaktion die Dephosphorylierung des PmrA-Response Regulators, sodass PmrA-kontrollierte Gene verstärkt exprimiert werden (Kato & Groisman, 2004). Ein weiteres Beispiel aus dieser Gruppe stellt das B1500 Protein dar, dass durch einen direkten Kontakt mit der PhoQ-Kinase offenbar den Phosphorylierungszustand des PhoP-Response Regulators begünstigt und dadurch die Expression PhoP-abhängiger Gene aktiviert (Eguchi *et al.*, 2007). Insgesamt ist das gemeinsame Funktionsprinzip der Connektor-Proteine, dass sie Phosphorylierung, Phosphotransfer oder Dephosphorylierung von Zwei-Komponenten-Systemen beeinflussen und meist zur Erweiterung des wahrnehmbaren Signalspektrums der betreffenden Systeme beitragen (Kato & Groisman, 2004). Demnach ist auch vorstellbar, dass YmgB durch die Interaktion mit der Kinase-Domäne von RcsC die Autophosphorylierung dieser Kinase stimuliert und so zum verstärkt phosphorylierten und deshalb hyperaktiven Response-Regulator RcsB führt. Alternativ könnte die Interaktion zwischen YmgB und RcsC die Phosphatase-Aktivität von RcsC in Bezug auf RcsB hemmen, was durch „Crosstalk“-Phosphorylierung ebenfalls in einem verstärkt aktiven RcsB resultieren würde. Diese Hypothesen zur molekularen Funktion der durch YcgF/YcgE-kontrollierten kleinen Proteine sind in der Übersichtsdarstellung in Abb. 5 angedeutet und werden derzeit experimentell untersucht.

Insgesamt verknüpfen die kleinen Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC das YcgE/YcgF-System mit dem Rcs-Phosphorelaysystem und befähigen dadurch das Rcs-System auf blaues Licht zu reagieren. Auch wenn bis heute die konkreten Stimuli, die zur Induktion des Rcs-Systems führen, nicht genau determiniert sind, geht aus vielen Studien hervor, dass dieses System eine Vielzahl von diversen Signalen wie z. B. osmotischer Stress, niedrige Temperatur, Wachstum auf Oberflächen u.s.w. wahrnimmt (Majdalani & Gottesman, 2005). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wird deutlich, dass auch Blaulicht in die Liste der durch das Rcs-System wahrnehmbaren Stimuli eingeordnet werden kann.

5.4 YcgE-YcgF-YcgZ-YmgA-YmgB ist eine konservierte Einheit in Enterobakterien

Die Gene *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC* repräsentieren nicht nur eine zusammengehörige kodierende Gengruppe, sondern bilden auch eine regulatorische und funktionale Einheit. Organisiert in einem Operon stellen *ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC* direkte Zielgene des MerR-ähnlichen Repressors YcgE dar und stehen unter indirekter Kontrolle des degenerierten EAL-Domänen Proteins YcgF, welches durch Protein-Protein-Interaktion den YcgE-Repressor antagonisiert (Abschnitte 4.4 & 4.5). Während für YcgE und YcgF von einander unabhängige Transkriptionsstarts identifiziert wurden (Abb. 4.4), konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass *ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC* in einer gemeinsamen ca. 1400 Nukleotide langen polycistronischen mRNA exprimiert werden und somit ein Operon darstellen (Abb. 4.14 B).

Es gibt jedoch sowohl bezüglich der genetischen Organisation, des Vorkommens in anderen Bakterien und in Anbetracht der Daten zur Funktion von YmgC Hinweise dafür, dass dieses kleine Protein eine zu YcgZ, YmgA und YmgB teilweise separierte Rolle erfüllt. Detaillierte *in silico* Analysen der *ycgZ-ymgABC*-umfassenden Sequenz haben zu der Identifizierung eines putativen Terminatormotivs wie auch zu potentiellen -35 und -10 Hexameren in der nicht-kodierenden Region zwischen *ymgB* und *ymgC* geführt und lassen die Vermutung zu, dass *ymgC* zusätzlich unter der Kontrolle eines Operon-internen Promoters steht (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007). Im Einklang damit kann mit einer zu *ymgC*-komplementären Sonde sowohl das *ycgZ-ymgABC*-Gesamttranskript als auch ein kürzeres Transkript detektiert werden, das allerdings nicht der Länge von *ymgC* entspricht (Daten nicht gezeigt). Die tatsächliche Existenz eines *ymgC*-spezifischen Promoters muß jedoch in zukünftigen Studien experimentell bewiesen werden.

Vergleicht man das Vorkommen des YmgC-Proteins in anderen Bakterien mittels genomweiten Sequenzanalysen, so wird deutlich, dass *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB* in *K. pneumoniae* 342, *Enterobacter* sp. 638 (Abb. 4.3) wie auch z. B. in *Citrobacter rodentium* ICC168, *Cronobacter sakazakii* ATCC und *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* PBR1692 (nicht gezeigt) ohne YmgC als Einheit konserviert sind. Funktionale Analysen von YmgC in *E. coli* zeigen, dass während YcgZ, YmgA und YmgB im Komplex mit der Histidin-Kinase Domäne von RcsC interagieren, bindet YmgC separiert von diesem Komplex an die gleiche Domäne der RcsC-Kinase (Abb. 4.24 & 4.27). Auffallend ist auch, dass weder eine *ymgC*-Mutation noch überexprimiertes YmgC unter den getesteten Bedingungen einen Effekt auf die Expression RcsDBC-abhängiger Gene aufweist (Abb. 4.21 & 4.22; Daten nicht

gezeigt). Zukünftige Analysen sind erforderlich, um die biologische Rolle von YmgC in *E. coli* aufzuklären und es kann nur vermutet werden, dass YmgC möglicherweise in dieser Studie nicht erfasste Signale an die RcsC-Kinase vermittelt. Interessanterweise hat die genomweite Suche nach Genen, die zu einer verstärkten Glykogensynthese in *E. coli* führen, aufgedeckt, dass YmgC stimulierend auf die Synthese dieses intrazellulären Glukose-Polymers wirkt (Eydallin *et al.*, 2010). In Übereinstimmung damit ergaben die von N. Sommerfeldt-Impe durchgeführten Untersuchungen mittels eines Jod-Kristall-Assays, dass die Überexpression von YmgC zu einer leicht verstärkten Akkumulation von Glykogen führt (N. Sommerfeldt-Impe & R. Hengge, unveröffentlicht). Diese Ergebnisse erfordern jedoch eine Reproduktion und können lediglich als Hinweis aufgefasst werden, dass YmgC möglicherweise die verstärkte Synthese des Energiespeichers Glykogen stimuliert, sodass *E. coli* eine interne Energiequelle zur Verfügung steht, wenn es z. B. in der Außenumgebung mangelnden Nährstoffbedingungen ausgesetzt ist.

Bei der Betrachtung der flankierenden Gene in direkter Nachbarschaft zu der *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC*-Region, fällt auf, dass in unmittelbarer Nähe zu *ycgE* eine Vielzahl von Genen mit einem Prophagen Ursprung kodiert sind. So sind hier einerseits 21 Gene (*ymfD - stfE*) des e14-Prophagen lokalisiert. Zusätzlich repräsentiert das neben *ycgE* kodierte YcgX ein Homolog zu YbcV auf dem DLP12-Prophagen bzw. YdfO auf dem Qin-Prophagen. Diese deutliche Häufung an Prophagen-Genen in der Nähe der *ycgE-ycgF-ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC*-Region spricht dafür, dass diese komplette Genregion durch Phagen-vermittelten horizontalen Gentransfer durch *E. coli* erworben wurde und diesem Organismus möglicherweise einen selektiven Vorteil verschafft. In ausgewählten pathogenen *E. coli*-Stämmen wie z. B. EDL933 (EHEC) ist diese Region jedoch nicht vorhanden.

5.5 Ein Gesamtbild: Das YcgF/YcgE/Ymg-abhängige Netzwerk integriert Licht-, Temperatur- sowie Stresssignale und moduliert die Biofilmbildung von *E. coli*

Escherichia coli ist ein versatiles Bakterium, das sowohl innerhalb eines Wirtes aber auch in der Außenumgebung, beispielsweise im aquatischen Milieu oder auch im Erdboden gut gedeihen kann. Stellt man sich die Frage nach den physiologischen Bedingungen unter denen das YcgF/YcgE/Ymg-System für das Überleben von *E. coli* relevant sein könnte, ist es naheliegend anzunehmen, dass dieses Netzwerk für die Existenz von *E. coli* in der Außenumgebung von besonderer Bedeutung sein muß. So nimmt dieses System Signale wahr, die für die äußere Umwelt kennzeichnend sind: Blaulicht, niedrige Temperatur, Nährstoffmangel sowie andere Stressstimuli. Vermittelt durch die N-Terminale BLUF-

Domäne perzipiert YcgF Blaulichtsignale (Hasegawa *et al.*, 2006; Rajagopal *et al.*, 2004), wobei Sonnenstrahlung Spektren des Blaulichts enthält. Zudem nimmt dieses Protein niedrige Temperatur als begünstigendes Signal wahr. So ist *ycgF*, aber auch *ycgE* bei 16°C besonders stark exprimiert (Abb. 4.5). Doch die niedrige Temperatur wirkt sich nicht nur stimulierend auf die Expression von *ycgF* aus, sondern hat auch einen stabilisierenden Einfluss auf die Aktivität dieses Proteins, sodass nach Lichtanregung die Halbwertszeit des angeregten Zustands von YcgF mit sinkender Temperatur zunimmt (Schröder *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang ist auch erwähnenswert, dass YmgA und YmgB lediglich bei niedriger Temperatur einen Einfluss auf Rcs-abhängige Gene ausüben (Abb. 4.21 A & 4.22 A). Dadurch dass die Expression des YcgF/YcgE-abhängigen Operons *ycgZ-ymgABC* unter der Kontrolle des generellen Stresssigmafaktors RpoS steht, wird deutlich, dass dieses System auch Stresssignale wie z. B. Nährstofflimitation integriert, mit denen *E. coli* in der Außenumgebung konfrontiert wird (N. Tschowri & R. Hengge, Diplomarbeit, 2007; Übersichtsdarstellung in Abb. 5). Bedenkt man die Tatsache, dass blaues Licht bedingt durch seinen kurzwelligen Charakter im Vergleich zu langwelligen Lichtspektren deutlich tiefer eine Wassersäule durchdringen kann, ist denkbar, dass die YcgF-abhängige Signalkaskade für die Existenz von *E. coli* im aquatischen Milieu von Bedeutung ist.

Doch welchen Vorteil bietet das YcgF/YcgE/Ymg-Netzwerk für die Existenz von *E. coli* in der Außenumgebung? Blaulicht ist eine energiereiche Strahlung und induziert bei vielen Organismen eine photophobische Meidereaktion. Beispielsweise vermittelt das PYP-Protein von *Ectohiorhodospira halophila* die Blaulicht-abhängige negative Phototaxis dieses Organismus (Sprenger *et al.*, 1993). Auch *Euglena gracilis* nimmt mittels des BLUF-Domänen Proteins PAC Blaulichtsignale wahr, was zu einem veränderten Schlagmuster des Flagellums führt und in einer photophobischen Antwort resultiert (Iseki *et al.*, 2002; Ntefidou *et al.*, 2003). Interessanterweise berichtet bereits eine Studie von 1975, dass Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen 390-530 nm einen Effekt auf die Motilität von *E. coli* und *S. typhimurium* ausübt. Nach kurzen Lichtpulsen konnte mittels mikroskopischen Analysen eine Taumelreaktion beobachtet werden und längere Lichtexposition löste die Paralyse dieser Bakterien aus (Taylor & Koshland, 1975). Auch wenn die Details dieser Reaktion bis heute nicht verstanden sind, gibt es viele Hinweise darauf, dass insbesondere der Aerotaxis Rezeptor Aer diese Signalkaskade vermittelt und es wird angenommen, dass Sauerstoffradikale, die nach Blaulichtbestrahlung entstehen, von Aer als Signal perzipiert werden (Wright *et al.*, 2006). Obwohl unter den in dieser Studie angewandten Lichtbedingungen kein detektierbarer Effekt von Blaulicht bezüglich der Motilität von *E. coli*

auf Motilitätsagarplatten zu beobachten war, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass das YcgF/YcgE/Ymg-System eine Schutzfunktion ausüben und zum besseren Überleben von *E. coli* unter Blaulichtbedingungen in der Außenwelt beitragen könnte. So hat blaues Licht einen stark inhibierenden Effekt auf das Wachstum von *E. coli* insbesondere bei 16°C (Abb. 4.6), d. h. unter den Bedingungen, wenn die Expression von *ycgF* - des Blaulichtsensors - deutlich induziert wird (Abb. 4.5 A & B). Dennoch zeigen *ycgZymgAB-rcsB-*, und *rpoS*-Mutanten keinen messbaren Nachteil bezüglich des Wachstums bzw. des Überlebens bei 16°C bei Blaulichtexposition in Flüssigkultur (Daten nicht gezeigt), sodass die Schlussfolgerung gezogen werden muß, dass dieses System keine protektive Rolle unter diesen Bedingungen erfüllt. Über die genaue Ursache, warum Blaulicht explizit bei niedrigen Temperaturen einen wachstumsinhibierenden Effekt auf *E. coli* ausübt, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Denkbar ist, dass besonders bei niedrigen Temperaturen die Membranfluidität stark beeinträchtigt ist und starkes Blaulicht zu Photooxidation und der Bildung von Sauerstoffradikalen führt, die unter diesen Bedingungen einen größeren Schaden wichtiger Zellkomponenten bewirken können.

Dennoch scheint das YcgF/YcgE/Ymg-System für *E. coli* einen selektiven Vorteil zu bieten, weshalb dieses Bakterium die komplette *ycgF-ycgE-ycgZ-ymgA-ymgB-ymgC*-Genregion höchstwahrscheinlich über Phagen-vermittelten horizontalen Gentransfer übernommen hat (siehe Abschnitt 5.3). Im Vergleich zu anderen Organismen wird erkennbar, dass die Reorganisation von Biofilm-assoziierten Funktionen eine weit verbreitete bakterielle Reaktion als Antwort auf Blaulicht darstellt. Es ist z. B. auffällig, dass Blaulicht-sensitive Domänen wie LOV oder BLUF am häufigsten in Assoziation mit Histidin-Kinase-Domänen vorkommen und die zweit-häufigste Kombinationen LOV/BLUF- mit GGDEF/EAL-Domänen darstellen (Gomelsky & Hoff, 2011). GGDEF- und EAL-Domänen Proteine sind für die Synthese und Degradation des Signalmoleküls c-di-GMP zuständig, welches eine zentrale Rolle bei der Inhibition von diversen Formen der Motilität und bei der Stimulation von Biofilmkomponenten spielt. Demnach suggeriert bereits diese *in silico* Betrachtung, dass Blaulichtsignale überdurchschnittlich häufig in die Regulation dieser wichtigen Zellprozesse involviert sind und es gibt etliche biologische Systeme, die dies bestätigen. Beispielsweise zeigen Purcell *et al.* in ihrer Studie, dass Blaulichtbelichtung von *Caulobacter crescentus* zu einer stark erhöhten Zell-Zell und Zell-Oberflächen Adhäsion führt. Diese Zellantwort wird durch die Blaulicht-sensitive LovK-Kinase in Kooperation mit dem LovR-Response-Regulator kontrolliert (Purcell *et al.*, 2007). Offenbar bietet die Fähigkeit Licht zu detektieren diesem Frischwasser Bakterium den Vorteil, sich an Partikel nahe der Wasseroberfläche

festzusetzen, was möglicherweise eine bessere Nährstoffverfügbarkeit gewährleistet (Purcell *et al.*, 2007). Für *Rhodopseudomonas palustris* ist ebenfalls beschrieben, dass Blaulichtexposition durch einen bislang unbekanntem Mechanismus zu einem deutlichen Anstieg der Biofilmbildung führt (Kanazawa *et al.*, 2010).

Doch was ist der adaptive Vorteil, Blaulicht als einen induzierenden Stimulus zur Bildung und Modulation des Biofilms in *E. coli* und anderen Organismen zu nutzen? Biofilme repräsentieren die ursprünglichste und am weitesten verbreitete Lebensform der Bakterien, die viele Vorteile mit sich bringt (Flemming & Wingender, 2010). Von einer Matrix umhüllt, die aus diversen Polysacchariden, Proteinen und manchmal sogar DNA besteht und durch komplexe Strukturen wie Flagellen, Pili und Fimbrien stabilisiert wird, werden die bakteriellen Zellen im Verbund zusammengehalten, was eine intensive Interaktion und Zell-Zell Kommunikation ermöglicht. Die Biofilmmatrix repräsentiert ein vielseitiges Reservoir von Genen, die durch horizontalen Gentransfer aufgenommen werden können, und dient auch als eine essentielle Nährstoffquelle. Weiterhin bietet die Biofilmmatrix Schutz gegen Austrocknung, oxidierende Biozide, UV-Licht und gegen Protozoen als Fressfeinde (Flemming & Wingender, 2010). Somit erscheint es sinnvoll, dass *E. coli* durch das YcgF/YcgE/Ymg-System und evtl. auch durch andere Systeme wahrnimmt, dass es sich in einer Außenumgebung befindet, und daraufhin die Biofilmexistenz der planktonischen Lebensweise vorzieht. Möglicherweise erfüllt das YcgF-abhängige System auch gewisse Schutz- oder Biofilmarchitekturmodulations-Funktionen, die jedoch unter Laborbedingungen beim Wachstum der Zellen in Flüssigmedium nicht erfasst werden konnten.

Die Entstehung eines Biofilms ist ein mehrstufiger Entwicklungsprozess. Die initialen Stadien sind durch eine lose bzw. transiente Assoziation mit der Oberfläche charakterisiert, der eine robuste Adhäsion folgt. Spätere Entwicklungsstadien bei der Biofilmbildung beinhalten die Aggregation von Zellen in Mikrokolonien, Wachstum dieser Zellgemeinschaften und schließlich findet die Biofilmreifung, charakterisiert durch die Ausbildung einer komplexen Matrix, statt (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Das RcsDBC-System spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der zeitlichen Abfolge der Biofilmbildung und steuert primär den Übergang von adhären Zellen zum reifen Biofilm (Majdalani & Gottesman, 2005). Passend dazu werden die Proteine YcgZ, YmgA, YmgB und YmgC, die einen Einfluss auf die Aktivität des Rcs-Systems ausüben, während der Biofilmreifung verstärkt exprimiert (Domka *et al.*, 2007). Während das YcgF/YcgE-System über den Ymg/Rcs-Signalweg stimulierend auf die Synthese der Kolansäure und damit assoziierte Biofilmreifungsprozesse wirkt, hat es einen inhibierenden Einfluss auf die Curli-Fasern-

Synthese, die als adhäsive Strukturen mit den initialen Phasen der Biofilmbildung in Verbindung stehen (zusammengefasst in Abb. 5).

Betrachtet man das YcgF/YcgE/Ymg-System aus evolutiver Sicht, so wird eines deutlich: Unabhängig davon, ob YcgF als eine aktive Phosphodiesterase oder in einer enzymatisch aktiven Form womöglich als ein anti-Aktivator von MlrA agierte oder in der heutigen Form als ein YcgE-spezifischer anti-Repressor seine Funktion erfüllt, behielt dieses Protein im Laufe der Evolution seine Rolle als Inhibitor der Curli-Fasern-Biosynthese als Antwort auf Blaublicht. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass sowohl Blaublicht als auch niedrige Temperatur auch unabhängig von dem YcgF/YcgE/Ymg-System einen inhibierenden Effekt auf die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion ausüben (Abb. 4.22 A & Daten nicht gezeigt). Der tatsächliche Funktionsmechanismus von YcgF hat sich allerdings im Laufe der Evolution stark verändert. Während YcgF als aktive Phosphodiesterase mit multiplen aktiven EAL-Domänen Proteinen konkurrieren musste oder auch als anti-Aktivator von MlrA möglicherweise mit YciR um die Bindung an sein Partnerprotein in Konkurrenz stand, wirkt es nun als direkter Antagonist von YcgE. Dadurch agiert YcgF nun als Aktivator des Ymg/Rcs-Signalwegs, was die Expression der kleinen RNA RprA stimuliert, die durch Bindung an die mRNA von *csgD* die Translation dieses wichtigen Curli-Aktivators inhibiert (Mika *et al.*, 2012; zusammengefasst in Abb. 5). Auch wenn die YcgF-abhängige Curli-inhibierende Signalkaskade durch die Einbindung von vier zusätzlichen Proteinen YcgZ-YmgABC an Komplexität gewonnen hat, führte es auf der anderen Seite zur erheblichen Erweiterung der kontrollierten Ziel-Gene. So kann YcgF vermittelt durch die kleinen Proteine als Reaktion auf Blaublicht und niedrige Temperatur seinen Einfluss auf das komplette Rcs-Regulon ausüben. Zusammenfassend stellt das YcgF-YcgE-Ymg-Rcs-RprA-CsgD-Netzwerk eine physiologische Verknüpfung zwischen den initialen Curli-vermittelten und den späten Rcs-abhängigen Prozessen der Biofilmbildung her. Basierend auf der nun bekannten Funktion von YcgF und YcgE wird die Neubenennung dieser Proteine zu „BluF“ und „BluR“ vorgeschlagen.

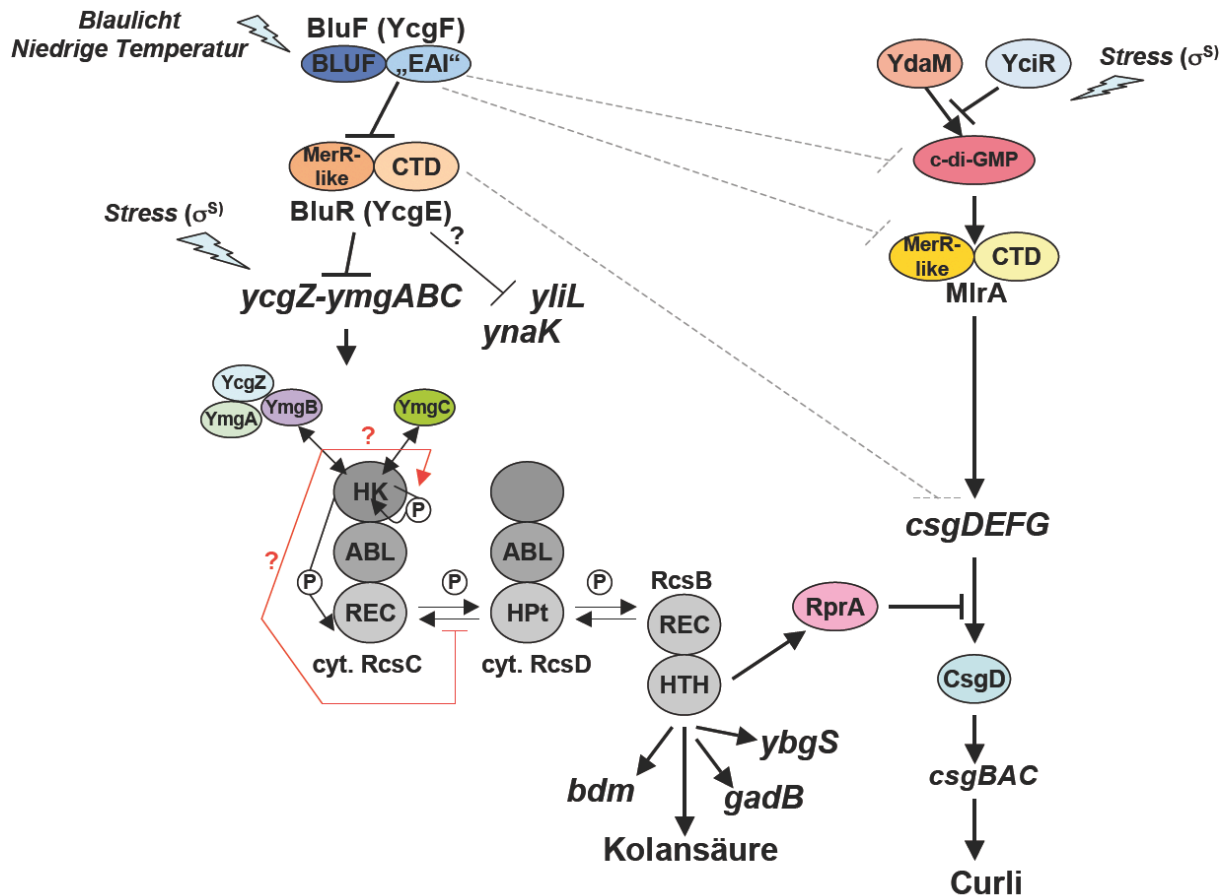


Abb. 5: Modell des BluF/BluR/Ymg-Netzwerks von *E. coli*. Das BLUF-EAL-Protein BluF nimmt Blaulichtsignale und niedrige Temperatur wahr und wirkt als direkter Antagonist des MerR-ähnlichen (MerR-like) Regulators BluR. BluR ist ein direkter Repressor des RpoS-abhängigen *ycgZ-ymgABC*-Operons und die BluF-bedingte Inaktivierung von BluR resultiert in verstärkter Expression dieser kleinen Proteine (78-90 Aminosäuren). Durch einen bislang ungeklärten Mechanismus wirkt BluR auch inhibierend auf die Expression von *yliL* und *ynaK*. YcgZ-YmgAB bilden einen Komplex und interagieren - vermittelt durch YmgB - mit der Histidin-Kinase-Domäne (HK) der RcsC-Kinase des komplexen RcsDBC-Phosphorelaysystems. Das YmgC-Protein interagiert ebenfalls mit der HK-Domäne von RcsC. YmgB und partiell auch YmgA aktivieren das Rcs-System und führen zur verstärkten Biosynthese des Exopolysaccharids Kolansäure sowie zur Induktion Rcs-abhängiger Gene z. B. *bdm*, *ybgS*, *gadB* und *rprA*. Durch die kleine RNA RprA wirkt das BluF/BluR/Ymg-System inhibierend auf die Expression der Curli-Fasern. Die potentiellen Wirkungsmechanismen der kleinen Proteine als Aktivatoren der Autokinase- oder als Inhibitoren der Phosphatase-Aktivität von RcsC sind mit roten Pfeilen angedeutet. Die möglichen Rollen von BluF im Laufe der Evolution als aktive c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterase oder als anti-Aktivator von MlrA sind mit gestrichelten Linien verdeutlicht. Die residuale Affinität des MlrA-Paralogs BluR für den MlrA-regulierten *csgD*-Promoter ist auch mit unterbrochener Linie angedeutet. YdaM, eine aktive Diguanylatzyklase, und YciR, eine aktive Phosphodiesterase, bilden einen Komplex mit MlrA, der die Transkription von *csgD* reguliert. Details und Referenzen siehe Text.

6. Literaturverzeichnis

- Ades, S.E., Hayden, J.D. and Laubacher, M.E. (2010) Envelope Stress. In Storz, G. and Hengge, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C., pp. 115-31.
- Ahmad, M. and Cashmore, A.R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **366**, 162-6.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Amikam, D. and Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, **22**, 3-6.
- Ansari, A.Z., Bradner, J.E. and O'Halloran, T.V. (1995) DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*, **374**, 371-5.
- Ashenberg, O., Rozen-Gagnon, K., Laub, M.T. and Keating, A.E. (2011) Determinants of homodimerization specificity in histidine kinases. *J Mol Biol*, **413**, 222-35.
- Avila-Pérez, M., Hellingwerf, K.J. and Kort, R. (2006) Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol.*, **188**, 6411-4.
- Babitzke, P. and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol.* , **10**, 156-63.
- Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Cascio, D., Gunsalus, R.P. and Dickerson, R.E. (1998) NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry*, **37**, 3665-76.
- Barembuch, C. and Hengge, R. (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol*, **65**, 76-89.
- Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoeman, R.L., Gomelsky, M. and Schlichting, I. (2009) Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, **459**, 1015-8.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V. and Jenal, U. (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, **141**, 107-16.
- Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F., Casanova, A., Hamburger, F., Ritz, D., Keck, W., Ackermann, M., Schirmer, T. and Jenal, U. (2009) Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol*, **72**, 1500-16.
- Bougdour, A., Cunnig, C., Baptiste, P.J., Elliott, T. and Gottesman, S. (2008) Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol*, **68**, 298-313.
- Bougdour, A., Wickner, S. and Gottesman, S. (2006) Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of σ^S stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **20**, 884-97.
- Braun, V. and Mahren, S. (2005) Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. *FEMS Microbiol Rev*, **29**, 673-84.
- Briggs, W.R., Christie, J.M. and Salomon, M. (2001) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal.* , **3**, 775-88.
- Brill, J.A., Quinlan-Walsh, C. and Gottesman, S. (1988) Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **170**, 2599-611.

- Brocklehurst, K.R., Hobman, J.L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S.J., Brown, N.L. and Morby, A.P. (1999) ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **31**, 893-902.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. and Landini, P. (2006) Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol*, **188**, 2027-37.
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A.J. and Landini, P. (2003) The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **149**, 2847-57.
- Brown, N.L., Ford, S.J., Pridmore, R.D. and Fritzinger, D.C. (1983) Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase. *Biochemistry*, **22**, 4089-95.
- Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P. and Hobman, J.L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 145-63.
- Brown, P.K., Dozois, C.M., Nickerson, C.A., Zuppardo, A., Terlonge, J. and Curtiss, R., 3rd. (2001) MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, **41**, 349-63.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V.A., Todo, T., Tainer, J.A. and Getzoff, E.D. (2003) Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell*, **11**, 59-67.
- Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Vance, R.E. (2011) STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, **478**, 515-8.
- Busse, S. (2009) Unorthodoxe Mechanismen der Regulation innerhalb von Zweikomponentensystemen in *Escherichia coli*. Dissertation.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W. and Hendricks, S.B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **45**, 1703-8.
- Cano, D.A., Domínguez-Bernal, G., Tierrez, A., Garcia-Del Portillo, F. and Casadesús, J. (2002) Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene igaA. *Genetics*, **162**, 1513-23.
- Carmany, D.O., Hollingsworth, K. and McCleary, W.R. (2003) Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol*, **185**, 1112-5.
- Casino, P., Rubio, V. and Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, **139**, 325-36.
- Casino, P., Rubio, V. and Marina, A. (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol*, **20**, 763-71.
- Castanié-Cornet, M.P., Cam, K. and Jacq, A. (2006) RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **188**, 4264-70.
- Champier, L., Duarte, V., Michaud-Soret, I. and J., C. (2004) Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon. *Mol Microbiol*, **52**, 1475-85.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U. and Schirmer, T. (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17084-9.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M. (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, **262**, 539-44.

- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V. and Mondragón, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*, **301**, 1383-7.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A. and Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol.*, **62**, 335-64.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet.*, **38**, 87-117.
- Chevance, F.F. and Hughes, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol*, **6**, 455-65.
- Chilcott, G.S. and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 694-708.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. and Jenal, U. (2006) Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem*, **281**, 32015-24.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenoe, P., Grzesiek, S. and Jenal, U. (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4112-7.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. and Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*, **280**, 30829-37.
- Christie, J.M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol.*, **58**, 21-45.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2172-5.
- Clarke, D.J., Jacq, A. and Holland, I.B. (1996) A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology. *Mol Microbiol*, **20**, 1273-86.
- Clarke, D.J., Joyce, S.A., Toutain, C.M., Jacq, A. and Holland, I.B. (2002) Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **184**, 1204-8.
- Costa, C.S., Pettinari, M.J., Méndez, B.S. and Antón, D.N. (2003) Null mutations in the essential gene *yrfF* (*mucM*) are not lethal in *rscB*, *yojN* or *rscC* strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, **222**, 25-32.
- Dame, R.T. (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol*, **56**, 858-70.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6640-5.
- den Hengst, C.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K. and Buttner, M.J. (2010) Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol.*, **78**, 361-79.
- Domínguez-Bernal, G., Pucciarelli, M.G., Ramos-Morales, F., García-Quintanilla, M., Cano, D.A., Casadesús, J. and García-del Portillo, F. (2004) Repression of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay by the IgaA protein is a requisite for *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol*, **53**, 1437-49.
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T. and Wood, T.K. (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol*, **9**, 332-46.
- Dove, S.L. and Hochschild, A. (2004) A bacterial two-hybrid system based on transcription activation. *Methods Mol Biol*, **261**, 231-46.

- Dow, J.M., Fouhy, Y., Lucey, J.F. and Ryan, R.P. (2006) The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**, 1378-84.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. and Jenal, U. (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev*, **23**, 93-104.
- Eguchi, Y., Itou, J., Yamane, M., Demizu, R., Yamato, F., Okada, A., Mori, H., Kato, A. and Utsumi, R. (2007) B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18712-7.
- Eliás-Arnanz, M., Padmanabhan, S. and Murillo, F.J. (2011) Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol.*, **14**, 128-35.
- Eydallin, G., Montero, M., Almagro, G., Sesma, M.T., Viale, A.M., Muñoz, F.J., Rahimpour, M., Baroja-Fernández, E. and Pozueta-Romero, J. (2010) Genome-wide screening of genes whose enhanced expression affects glycogen accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Res*, **17**, 61-71.
- Falciatore, A. and Bowler, C. (2005) The evolution and function of blue and red light photoreceptors. *Curr Top Dev Biol.*, **68**, 317-50.
- Fang, X. and Gomelsky, M. (2010) A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol*, **76**, 1295-305.
- Ferrières, L. and Clarke, D.J. (2003) The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol Microbiol*, **50**, 1665-82.
- Fineran, P.C., Williamson, N.R., Lilley, K.S. and Salmond, G.P. (2007) Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J Bacteriol.*, **189**, 7653-62.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 623-33.
- Francez-Charlot, A., Castanié-Cornet, M.P., Gutierrez, C. and Cam, K. (2005) Osmotic regulation of the *Escherichia coli* *bdm* (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol*, **187**, 3873-7.
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M.P., Gutierrez, C. and Cam, K. (2003) RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **49**, 823-32.
- Galperin, M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol*, **13**, 150-9.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. and Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett*, **203**, 11-21.
- Gao, R. and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*, **63**, 133-54.
- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P. and Lin, E.C. (1998) Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem.*, **273**, 32864-9.
- Gervais, F.G. and Drapeau, G.R. (1992) Identification, cloning, and characterization of *rscF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation *ftsZ84* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.*, **174**, 8016-22.
- Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. and Verméglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature*, **417**, 202-5.
- Gomelsky, M. and Hoff, W.D. (2011) Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol*, **19**, 441-8.

- Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1995a) appA, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol*, **177**, 4609-18.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1995b) Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of puc and bchF expression. *J Bacteriol.*, **177**, 1634-7.
- Gomelsky, M. and Kaplan, S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel fad binding domain. *J Biol Chem.* , **273**, 35319-25.
- Gomelsky, M. and Klug, G. (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci.*, **27**, 497-500.
- Gottesman, S., Trisler, P. and Torres-Cabassa, A. (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol*, **162**, 1111-9.
- Gupta, K., Kumar, P. and Chatterji, D. (2010) Identification, Activity and Disulfide Connectivity of C-di-GMP Regulating Proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, **5**, e15072.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, **177**, 4121-30.
- Hagiwara, D., Sugiura, M., Oshima, T., Mori, H., Aiba, H., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2003) Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 5735-46.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, **2**, 95-108.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. and Normark, S. (1995) Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, **18**, 661-70.
- Hasegawa, K., Masuda, S. and Ono, T.A. (2006) Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF(Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF). *Biochemistry*, **45**, 3785-93.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H. and Horiuchi, T. (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol*, **2**, 2006 0007.
- Helmann, J.D. (2010) Regulation by alternative sigma factors. In Storz, G. and Hengge, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C., pp. 31-43.
- Helmann, J.D., Ballard, B.T. and Walsh, C.T. (1990) The MerR metalloregulatory protein binds mercuric ion as a tricoordinate, metal-bridged dimer. *Science*, **247**, 946-8.
- Hengge, R. (2009a) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 263-73.
- Hengge, R. (2009b) Proteolysis of σ^S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **160**, 667-76.
- Hengge, R. (2010a) The general stress response in Gram-negative bacteria. In Storz, G. and Hengge, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 251-89.
- Hengge, R. (2010b) The role of c-di-GMP in the regulatory networks of *Escherichia coli*. In Visick, K.L. and Wolfe, A.J. (eds.), *The Second Messenger Cyclic Diguanilate*. ASM Press, Washington D.C., pp. 230-52.

- Heroven, A.K., Nagel, G., Tran, H.J., Parr, S. and Dersch, P. (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*, **53**, 871-88.
- Hickman, J.W. and Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol*, **69**, 376-89.
- Higuchi, R. (1990) Recombinant PCR. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.), *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- Hobman, J.L., Wilkie, J. and Brown, N.L. (2005) A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *Biometals*, **18**, 429-36.
- Hoff, W.D., Jung, K.H. and Spudich, J.L. (1997) Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, **26**, 223-58.
- Huang, Y.H., Ferrières, L. and Clarke, D.J. (2006) The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol*, **157**, 206-12.
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. and Watanabe, M. (2002) A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature*, **415**, 1047-51.
- Jenal, U. and Malone, J. (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, **40**, 385-407.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Romling, U. and Melefors, O. (2008) The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol*, **70**, 236-57.
- Jørgensen, M.G., Nielsen, J.S., Boysen, A., Franch, T., Møller-Jensen, J. and Valentin-Hansen, P. (2012) Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **84**, 36-50.
- Juárez, A., Nieto, J.M., Prenafeta, A., Miquelay, E., Balsalobre, C., Carrascal, M. and Madrid, C. (2000) Interaction of the nucleoid-associated proteins Hha and H-NS to modulate expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol*, **485**, 127-31.
- Jung, A., Domratcheva, T., Tarutina, M., Wu, Q., Ko, W.H., Shoeman, R.L., Gomelsky, M., Gardner, K.H. and Schlichting, I. (2005) Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12350-5.
- Kanazawa, T., Ren, S., Maekawa, M., Hasegawa, K., Arisaka, F., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ohta, H. and Masuda, S. (2010) Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemistry*, **49**, 10647-55.
- Kannan, G., Wilks, J.C., Fitzgerald, D.M., Jones, B.D., Bondurant, S.S. and Slonczewski, J.L. (2008) Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiol*, **8**.
- Kato, A. and Groisman, E.A. (2004) Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev*, **18**, 2302-13.
- Kato, A., Mitrophanov, A.Y. and Groisman, E.A. (2007) A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12063-8.
- Kato, A., Tanabe, H. and Utsumi, R. (1999) Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J Bacteriol*, **181**, 5516-20.

- Kato, M., Mizuno, T. and Hakoshima, T. (1998) Crystallization of a complex between a novel C-terminal transmitter, HPt domain, of the anaerobic sensor kinase ArcB and the chemotaxis response regulator CheY. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 140-2.
- Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Santos-Zavaleta, A., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Muñiz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A.G., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R.P. and Karp, P.D. (2011) EcoCyc: a comprehensive database of Escherichia coli biology. *Nucleic Acids Res*, **39**, D583-90.
- Kidd, S.P. (2011) Novel regulation in response to host generated stresses : the MerR family of regulators in pathogenic bacteria In Kidd, S.P. (ed.), *Stress response in pathogenic bacteria*. CABI, Wallingford, pp. 93-114.
- Krasteva, P.V., Fong, J.C., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V., Yildiz, F.H. and Sondermann, H. (2010) *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, **327**, 866-8.
- Kumar, M. and Chatterji, D. (2008) Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, **154**, 2942-55.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lanyi, J.K. (1995) Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature*, **375**, 461-3.
- Laub, M.T. and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet*, **41**, 121-45.
- Lee, E.R., Baker, J.L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. and Breaker, R.R. (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science*, **329**, 845-8.
- Lee, J., Page, R., García-Contreras, R., Palermino, J.M., Zhang, X.S., Doshi, O., Wood, T.K. and Peti, W. (2007a) Structure and function of the Escherichia coli protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *J Mol Biol*, **73**, 11-26.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007b) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*, **65**, 1474-84.
- Levet-Paulo, M., Lazzaroni, J.C., Gilbert, C., Atlan, D., Doublet, P. and Vianney, A. (2011) The atypical two-component sensor kinase Lpl0330 from Legionella pneumophila controls the bifunctional diguanylate cyclase-phosphodiesterase Lpl0329 to modulate bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP synthesis. *J Biol Chem*, **286**, 31136-44.
- Lim, B. and Gross, C.A. (2010) Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock. In Storz, G. and Hengge, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C., pp. 93-114.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., Weber, H. and Hengge, R. (2012) Local second messenger signaling in the control of bacterial biofilm formation. *submitted to Mol. Cell*.
- Losi, A. (2007) Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochem Photobiol*, **83**, 1283-300.
- Losi, A. and Gärtner, W. (2008) Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochem Photobiol Sci.*, **7**, 1168-78.
- Losi, A. and Gärtner, W. (2011) Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem Photobiol.*, **87**, 491-510.
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B. and Gärtner, W. (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J.*, **82**, 2627-34.

- Lucht, J.M., Dersch, P., Kempf, B. and Bremer, E. (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**, 6578-8.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M. and Stock, J.B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 718-22.
- Lund, P.A., Ford, S.J. and Brown, N.L. (1986) Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501. *J Gen Microbiol*, **132**, 465-80.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-5.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. and Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol*, **39**, 1382-94.
- Majdalani, N. and Gottesman, S. (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 379-405.
- Majdalani, N., Hernandez, D. and Gottesman, S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol*, **46**, 813-26.
- Malone, J.G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A.J. and Rainey, P.B. (2007) The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology*, **153**, 980-94.
- Mariscotti, J.F. and García-Del Portillo, F. (2008) Instability of the Salmonella RcsCDB signalling system in the absence of the attenuator IgaA. *Microbiology*, **154**, 1372-83.
- Mariscotti, J.F. and García-del Portillo, F. (2009) Genome expression analyses revealing the modulation of the Salmonella Rcs regulon by the attenuator IgaA. *J Bacteriol*, **191**, 1855-67.
- Martínez-Núñez, M.A., Pérez-Rueda, E., Gutiérrez-Ríos, R.M. and Merino, E. (2010) New insights into the regulatory networks of paralogous genes in bacteria. *Microbiology*, **156**, 14-22.
- Masuda, S. and Bauer, C.E. (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, **110**, 613-23.
- Mathema, V.B., Thakuri, B.C. and Sillanpää, M. (2011) Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol*, **193**, 837-44.
- Merighi, M., Lee, V.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, **65**, 876-95.
- Merrick, M.J. (1993) In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol*, **10**, 903-9.
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M. and Hengge, R. (2012) Targeting of csgD by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **84**.
- Mika, F. and Hengge, R. (2005) A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of σ^S (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev*, **19**, 2770-81.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics. A laboratory handbook for Escherichia coli and its related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mitrophanov, A.Y. and Groisman, E.A. (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev*, **22**, 2601-11.

- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res*, **4**, 161-8.
- Mogk, A., Schmidt, R. and Bukau, B. (2007) The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol.*, **17**, 165-72.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H. and Yamada-Okabe, H. (1998) Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology*, **144**, 425-32.
- Nakasone, Y., Ono, T.A., Ishii, A., Masuda, S. and Terazima, M. (2007) Transient dimerization and conformational change of a BLUF protein: YcgF. *J Am Chem Soc.*, **129**, 7028-35.
- Nakasone, Y., Ono, T.A., Ishii, A., Masuda, S. and Terazima, M. (2010) Temperature-sensitive reaction of a photosensor protein YcgF: possibility of a role of temperature sensor. *Biochemistry*, **49**, 2288-96.
- Navarro, M.V., De, N., Bae, N., Wang, Q. and Sondermann, H. (2009) Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure*, **17**, 1104-16.
- Navarro-Avilés, G., Jiménez, M.A., Pérez-Marín, M.C., González, C., Rico, M., Murillo, F.J., Elías-Arnanz, M. and Padmanabhan, S. (2007) Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Mol Microbiol*, **63**, 980-94.
- Newberry, K.J. and Brennan, R.G. (2004) The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J Biol Chem*, **279**, 20356-62.
- Newell, P.D., Monds, R.D. and O'Toole, G.A. (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3461-6.
- Nichols, B.P., Shafiq, O. and Meiners, V. (1998) Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. *J Bacteriol*, **180**, 6408-11.
- Ninfa, A.J. and Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5909-13.
- Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M. and Häder, D.P. (2003) Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.*, **133**, 1517-21.
- Oesterhelt, D. (1995) Structure and Function of Halorhodopsin. *Israel J. Chem.*, **35**, 475-94.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K. and Ishihama, A. (2010) Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **312**, 160-8.
- Ophir, T. and Gutnick, D.L. (1994) A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 740-5.
- Outten, F.W., Outten, C.E., Hale, J. and O'Halloran, T.V. (2000) Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem*, **275**, 31024-9.
- Park, C.M., Kim, J.I., Yang, S.S., Kang, J.G., Kang, J.H., Shim, J.Y., Chung, Y.H., Park, Y.M. and Song, P.S. (2000) A second photochromic bacteriophytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803: spectral analysis and down-regulation by light., **39**, 10840-7.

- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F. and Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell*, **38**, 128-39.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev*, **18**, 715-27.
- Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A. and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5884-90.
- Pérez Audero, M.E., Podoroska, B.M., Ibáñez, M.M., Cauerhff, A., Checa, S.K. and Soncini, F.C. (2010) Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. *Mol Microbiol*, **78**, 853-65.
- Perry, J., Koteva, K. and Wright, G. (2011) Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol Biosyst*, **7**, 1388-98.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. and Hengge, R. (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **22**, 2434-46.
- Pesavento, C. and Hengge, R. (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 170-6.
- Pesavento, C. and Hengge, R. (2010) Cyclic-di-GMP signalling. In Jung, K. and Kraemer, R. (eds.), *Bacterial Signaling*. Wiley VHC, Weinheim, pp. 377-94.
- Pesavento, C. and Hengge, R. (2012) The global repressor FliZ antagonizes gene expression by σ S-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.*, [Epub ahead of print].
- Peters, J.E., Thate, T.E. and Craig, N.L. (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol*, **185**, 2017-21.
- Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G. and Dehò, G. (2003) Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res Microbiol*, **154**, 573-80.
- Pomposiello, P.J. and Demple, B. (2001) Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol*, **19**, 109-14.
- Povolotsky, T.L. and Hengge, R. (2011) 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second messenger c-di-GMP. *J Biotechnol.*, [Epub ahead of print].
- Powell, B.S., Rivas, M.P., Court, D.L., Nakamura, Y. and Turnbough, C.L., Jr. (1994) Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5765-6.
- Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D. and Camilli, A. (2007) PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, **282**, 12860-70.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C. (2001) Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*, **183**, 7213-23.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 5993-6002.
- Pristovsek, P., Sengupta, K., Löhr, F., Schäfer, B., von Trebra, M.W., Rüterjans, H. and Bernhard, F. (2003) Structural analysis of the DNA-binding domain of the *Erwinia amylovora* RcsB protein and its interaction with the RcsAB box. *J Biol Chem*, **278**, 17752-9.

- Purcell, E.B. and Crosson, S. (2008) Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.*, **11**, 168-78.
- Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A. and Crosson, S. (2007) A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18241-6.
- Qi, Y., Chuah, M.L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K. and Liang, Z.X. (2010) Binding of C-di-GMP in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem*.
- Rajagopal, S., Key, J.M., Purcell, E.B., Boerema, D.J. and Moffat, K. (2004) Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Photochem Photobiol*, **80**, 542-7.
- Ralston, D.M. and O'Halloran, T.V. (1990) Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3846-50.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. and Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **69**, 326-56.
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. and Liang, Z.X. (2008) Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **190**, 3622-31.
- Rodríguez, S., Nieto, J.M., Madrid, C. and Juárez, A. (2005) Functional replacement of the oligomerization domain of H-NS by the Hha protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**, 5452-9.
- Rogov, V.V., Bernhard, F., Löhr, F. and V., D. (2004) Solution structure of the *Escherichia coli* YojN histidine-phosphotransferase domain and its interaction with cognate phosphoryl receiver domains. *J Mol Biol*, **343**, 1035-48.
- Rogov, V.V., Rogova, N.Y., Bernhard, F., Koglin, A., Löhr, F. and Dötsch, V. (2006) A new structural domain in the *Escherichia coli* RcsC hybrid sensor kinase connects histidine kinase and phosphoreceiver domains. *J Mol Biol*, **364**, 68-79.
- Romeo, T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, **29**, 1321-30.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. and Benziman, M. (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, **325**, 279-81.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., Zhang, L.H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. and Dow, J.M. (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6712-7.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U. and Gomelsky, M. (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem*, **281**, 30310-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sancar, A. (2004) Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Adv Protein Chem.*, **69**, 73-100.
- Schirmer, T. and Jenal, U. (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 724-35.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol*, **187**, 4774-81.

- Schmöe, K., Rogov, V.V., Rogova, N.Y., Löhr, F., Güntert, P., Bernhard, F. and V., D. (2011) Structural insights into Rcs phosphotransfer: the newly identified RcsD-ABL domain enhances interaction with the response regulator RcsB. *Structure*, **19**, 577-87.
- Schroeder, C., Werner, K., Otten, H., Kratzig, S., Schwalbe, H. and Essen, L.O. (2008) Influence of a joining helix on the BLUF domain of the YcgF photoreceptor from *Escherichia coli*. *Chembiochem*, **9**, 2463-73.
- Selby, C.P. and Sancar, A. (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17696-700.
- Seshasayee, A.S., Sivaraman, K. and Luscombe, N.M. (2011) An overview of prokaryotic transcription factors : a summary of function and occurrence in bacterial genomes. *Subcell Biochem*, **52**, 7-23.
- Shewchuk, L.M., Verdine, G.L. and Walsh, C.T. (1989) Transcriptional switching by the metalloregulatory MerR protein: initial characterization of DNA and mercury (II) binding activities. *Biochemistry*, **28**, 2331-9.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984) *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Römling, U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, **53**, 1123-34.
- Simm, R., Remminghorst, U., Ahmad, I., Zakikhany, K. and Römling, U. (2009) A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression and motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, **191**, 3928-37.
- Simons, R.W., Houtman, F. and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85-96.
- Sledjeski, D.D. and Gottesman, S. (1996) Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* , **178**, 1204-6.
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N. and al., e. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol*, **179**, 7135-55.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N. and Hengge, R. (2009) Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **155**, 1318-31.
- Sondermann, H., Shikuma, N.J. and Yildiz, F.H. (2012) You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol*.
- Sprenger, W.W., Hoff, W.D., Armitage, J.P. and Hellingwerf, K.J. (1993) The eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* is negatively phototactic, with a wavelength dependence that fits the absorption spectrum of the photoactive yellow protein. *J Bacteriol.*, **175**, 3096-104.
- Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H. and Spudich, E.N. (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 365-92.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **69**, 183-215.
- Stout, V. and Gottesman, S. (1990) RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **172**, 659-69.
- Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M.R., Gutnick, D. and Gottesman, S. (1991) RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol*, **173**, 1738-47.

- Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H. and Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, **321**, 411-3.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R. and Romeo, T. (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev*, **20**, 2605-17.
- Swartz, T.E., Corchnoy, S.B., Christie, J.M., Lewis, J.W., Szundi, I., Briggs, W.R. and Bogomolni, R.A. (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem.*, **276**, 36493-500.
- Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Comerci, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R. and Bogomolni, R.A. (2007) Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science*, **317**, 1090-3.
- Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T. and Hughes, K.T. (2012) YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol*, **83**, 1268-84.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. and Mizuno, T. (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol*, **40**, 440-50.
- Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P. and Benziman, M. (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol*, **180**, 4416-25.
- Tamayo, R., Pratt, J.T. and Camilli, A. (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, **61**, 131-48.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O. and Matthews, R.G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13471-6.
- Tao, F., He, Y.W., Wu, D.H., Swarup, S. and Zhang, L.H. (2010) The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol*, **192**, 1020-9.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem*, **281**, 34751-8.
- Taylor, B.L. and Koshland, D.E.J. (1975) Intrinsic and extrinsic light responses of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **123**, 557-69.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
- Tierrez, A. and García-del Portillo, F. (2004) The *Salmonella* membrane protein IgaA modulates the activity of the RcsC-YojN-RcsB and PhoP-PhoQ regulons. *J Bacteriol*, **186**, 7481-9.
- Tschowri, N. (2007) Regulation und Funktion eines an der c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion beteiligten Genclusters in *Escherichia coli*. Diplomarbeit.
- Typas, A., Becker, G. and Hengge, R. (2007) The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol*, **63**, 1296-306.
- Typas, A. and Hengge, R. (2006) Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigma promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **59**, 1037-51.

- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. and Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15264-9.
- van der Horst, M.A. and Hellingwerf, K.J. (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res.*, **37**, 13-20.
- van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2005) Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res Microbiol*, **156**, 626-33.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. and Marco, S.D. (2002) The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J*, **21**, 4393-401.
- Vlamakis, H. and Kolter, R. (2010) Biofilms. In Storz, G. and Hengge, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington D.C., pp. 365-73.
- Wada, T., Hatamoto, Y. and Kutsukake, K. (2012) Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene ydiV in Escherichia coli. *Microbiology*, [Epub ahead of print].
- Wada, T., Tanabe, Y. and Kutsukake, K. (2011) FliZ acts as a repressor of the ydiV gene, which encodes an anti-FlhD4C2 factor of the flagellar regulon in Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol*, **193**, 5191-8.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. and Hengge, R. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **62**, 1014-34.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F. and Hengge, R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, **187**, 1591-603.
- Weber, S. (2005) Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim Biophys Acta.*, **1707**, 1-23.
- Wehland, M. and Bernhard, F. (2000) The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem*, **275**, 7013-20.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P. and Romeo, T. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **48**, 657-70.
- White-Ziegler, C.A., Um, S., Pérez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J. and Young, S. (2008) Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in Escherichia coli K-12. *Microbiology*, **154**, 148-66.
- Whitfield, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli. *Annu Rev Biochem*, **75**, 39-68.
- Wilde, A., Fiedler, B. and Börner, T. (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol Microbiol.* , **44**, 981-8.
- Wilksch, J.J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C.E., Whitchurch, C.B., Schembri, M.A., Chuah, M.L., Liang, Z.X., Wijburg, O.L., Jenney, A.W., Lithgow, T. and Strugnell, R.A. (2011) MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls Klebsiella pneumoniae biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog.* , **7**, e1002204.
- Wösten, M.M., Kox, L.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C. and Groisman, E.A. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell*, **103**, 113-25.
- Wright, S., Walia, B., Parkinson, J.S. and Khan, S. (2006) Differential activation of Escherichia coli chemoreceptors by blue-light stimuli. *J Bacteriol*, **188**, 3962-71.
- Zhang, R.G., Pappas, K.M., Brace, J.L., Miller, P.C., Oulmassov, T., Molyneaux, J.M., Anderson, J.C., Bashkin, J.K., Winans, S.C. and Joachimiak, A. (2002) Structure of a

-
- bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature*, **417**, 971-4.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. and Inouye, M. (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7808-13.