# **Regulation von Biofilmfunktionen durch c-di-GMP 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 Nicole Sommerfeldt-Impe aus Altdöbern

> > 2012

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Februar 2007 und Oktober 2012 (unterbrochen durch Elternzeit von April 2008 bis Dezember 2008) am Institut für Biologie - Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge

2. Gutachter: Prof. Dr. Kürsad Turgay

Tag der Disputation: 17.12.2012

# Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

# Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N, Possling A, Tschowri N, Mehlis A, Hengge R. (2008)

Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. Genes Dev. Sep 1;22(17):2434-46.

#### Sommerfeldt N, Possling A, Becker G, Pesavento C, Tschowri N, Hengge R. (2009)

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.

# Mika F, Busse S, Possling A, Berkholz J, Tschowri N, Sommerfeldt N, Pruteanu M, 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. 2012 Apr;84(1):51-65.

#### Sommerfeldt N. and Hengge R.

CsrD controls expression of the biofilm regulator and the curli fibres in *E. coli* via the Rcs phosphorelay and the sRNA RprA. (in Vorbereitung)

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Regine Hengge für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, sowie für die vielen inspirierenden Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihr und Prof. Dr. Kürşad Turgay gilt auch mein Dank für die Begutachtung dieser Arbeit. Bei Prof. Dr. Kürşad Turgay möchte ich mich auch für die vielen Ratschläge und Diskussionen bedanken.

Für das angenehme Arbeitsumfeld bedanke ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Hengge und AG Turgay. Danke auch für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und die spannende und lustige gemeinsame Zeit. Insbesondere Susan, Christina, Franzi, Olga, Ebi, Stefanie, Sandra und Anja möchte ich für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Gespräche danken, die sich glücklicherweise nicht immer um das Labor drehten.

Ein dickes Dankeschön auch an Alex für die technische Hilfe, wie das Animpfen von Kulturen und die Unterstützung bei Experimenten und die vielen Gespräche.

Danke auch an Arnhild und Mike und Frau Sauter für das Bereitstellen von Agarplatten, Lösungen und Wachstumsmedien. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Niklas für ihre freundliche Hilfe im Laboralltag. Ich möchte mich auch bei Harry Lenz und Herrn Kiske für ihre schnelle Hilfe bei technischen Problemen aller Art bedanken. Frau Wedel und Frau Wurm danke ich für ihre humorvolle Unterstützung in bürokratischen und anderen Anliegen.

Ein besonderes Dankeschön geht an Gisela. Danke für die Arbeitsatmosphäre, die Gespräche, die Emotionen, danke für alles. Ich werde die Potter-Geschichten im Labor sehr vermissen.

Auch meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung während der Promotionszeit. Danke für die Unterstützung und das Ertragen meiner Launen, besonders während des Schreibens dieser Arbeit.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis Tabellenverzeichnis Abkürzungen	V VII VIII
Zusammenfassung Summary	1 3
1. Einleitung	5
1.1 Genregulation durch Sigmafaktoren	5
1.1.1 Sigmafaktoren in <i>Escherichia coli</i> 1.1.2 Die Rolle von Sigmafaktoren während des bakteriellen Wachstums	5 7
1.2 Biofilme - eine Besiedlung von Oberflächen	9
<ul><li>1.2.1 Aufbau von Biofilmen</li><li>1.2.2 Komponenten des Biofilms</li></ul>	10 13
1.3 Der Sekundärbotenstoff c-di-GMP und die Regulation des Biofilm- regulators CsgD	14
1.3.1 der Sekundärbotenstoff c-di-GMP	15
1.3.1.1 Synthese und Abbau von c-di-GMP 1.3.1.2 c-di-GMP-Effektoren	16 18
1.3.2 Die Regulation von CsgD und sein Einfluss auf die Entwicklung von Biofilmen	20
1.3.2.1 Curli-Fimbrien 1.3.2.2 Cellulose	24 25
1.4 kleine regulatorische RNAs	26
1.5 das Rcs-Phosphorelay-System	28
1.5.1 Genregulation durch Zwei-Komponenten-Systeme 1.5.2 Die Komponenten des Rcs-Phosphorelay-Systems	28 29
1.6 Das Csr-System	31
2. Zielsetzung	35

3. Material und Methoden	37
3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte	37
3.2 Rezepte (Medien, Puffer)	38
3.2.1 Rezepte für Flüssigmedien	38
3.2.2 Rezepte für Agarplatten	38
3.2.3 Zusätze	39
3.2.4 Standardpuffer und Lösungen	39
3.3 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	42
3.4 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	59
3.4.1 Wachstumsbedingungen	59
3.4.2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	59
3.4.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten	59
3.4.4 Plattentests	59
3.4.4.1 ß-Galaktosidase-Plattentest	59
3.4.4.2 Motilitäts-Assay	59
3.4.5 Herstellung eines P1-Lysates	59
3.4.6 P1-Transduktion	60
3.4.7 Mikroskopie zur Ermittlung der Zelllänge	60
3.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden	60
3.5.1 DNA-Analytik	60
3.5.1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	60
3.5.1.2 Polymerasekettenreaktion (poly chain reaction - PCR)	60
3.5.1.3 DNA-Primer	61
3.5.1.4 Präparation chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA	69
3.5.1.5 Agarosegelelektrophorese	69
3.5.1.6 Plasmidkonstruktion	69
3.5.1.7 Herstellung chromosomaler <i>lacZ</i> -Fusionen	70
3.5.1.8 Inaktivierung chromosomaler Gene und chromosomale Markierung einzelner Gene mittels PCR-Produkten	70
3.5.1.9 Messung der Genexpression: β-Galaktosidasetest	71
3.5.2 RNA-Analytik	71
3.5.2.1 Präparation von Gesamt-RNA und Qualitätskontrolle	71
3.5.2.2 Northern Blot-Analyse	72
3.5.2.3 RNA-Stabilitätsanalysen (Rifampicin-Abbau)	73
3.5.2.4 Transkriptom-Analysen / Mikroarray-Analysen	73

Π

3.5.3 Protein-Analytik	74
3531 Proteinextraktion aus <i>E_coli</i> Zellen	74
3.5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)	74
3.5.3.3 Coomassie-Färbung	74
3.5.3.4 Immunoblot-Analyse (Western Blot)	74
3.5.3.5 Antikörperreinigung	75
3.6 Computerprogramme und Internetadressen	75
4. Ergebnisse	76
4.1 Expressionsanalyse und phänotypische Charakterisierung der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in <i>Escherichia coli</i>	76
4.1.1 Expressionsanalyse	78
4.1.1.1 Expression der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine bei 37°C und 28°C in Komplexmedium	78
4.1.1.2 Expression der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine bei 37°C und 28°C auf Festmedium	83
4.1.2 Phänotypische Charakterisierung	86
4.1.2.1 In silico Analyse der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in E. coli	86
4.1.2.2 Einfluss der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf die Motilität	88
4.1.2.3 Einfluss der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf CsgD und die Curli- Expression	88
4.2 Einfluss des degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD auf die Expression von CsgD und Curli-Fimbrien	91
4.2.1 CsrD wirkt unabhängig vom Csr-System auf die Curli-Expression 4.2.2 CsrD beeinflusst weitere kleine RNAs, neben CsrB	91 95
4221 Die CerD Mutation führt zu veränderten zellulären Konzentrationen	95
diverser sRNAs	))
4.2.2.2 Hat CsrD einen Einfluss auf die Stabilität der getesteten sRNAs?	98
4.2.3 CsrD reprimiert das Rcs-Phosphorelay-System	101
4.2.3.1 CsrD reprimiert Rcs-abhängige Gene	101
4.2.3.2 CsrD inhibiert das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembran- komponente RcsF	103
4.2.4. CsrD und das Aktinhomolog MreB	108
4.2.4.1 Ein erhöhter MreBCD-Gehalt inhibiert CsgD und die Curli-Expression	110
4.2.4.2. Das MreBCD-System aktiviert das Rcs-Phosphorelav-System	111
J 1 J J	

III

4.3 Die Zielgene des CsgD/RprA-Kontrollnetzwerkes	114
4.3.1 Das CsgD-Regulon im <i>rprA</i> + und <i>rprA</i> - Hintergrund 4.3.2 Regulation durch <i>csgD</i> -mRNA sowie durch CsgD Protein	114 117
<ul> <li>4.3.3 RprA reguliert die Genexpression, wenn keine <i>csgD</i>-Expression stattfindet</li> <li>4.3.4 Die induzierten Gene der späten Stationärphase</li> <li>4.3.5 Aufklärung des YdaM- und YegE-Regulons zur Klärung ihres Einflusses auf CsgD</li> </ul>	120 122 125
4.3.5.1 Die DGC YdaM wirkt spezifisch auf CsgD 4.3.5.2 Die DGC YegE als Schnittstelle zwischen Motilität und Biofilmbildung	125 127
5. Diskussion	130
5.1 Die Expression und die Funktion aller 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in <i>Escherichia coli</i>	130
5.1.1 Die Expressionsstudie aller 29 GGDEF/EAL-Gene in <i>Escherichia coli</i> gibt Aufschluss über ihre mögliche zelluläre Funktion	131
5.1.2 20% der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine sind an der Kontrolle der	134
<ul> <li>5.1.3 Welche zelluläre Funktion übernehmen die restlichen 80% der</li> <li>GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in <i>Escherichia coli</i>, die keinen Einfluss auf die Motilität und/oder Regulation der Curli-Fimbrien haben?</li> </ul>	135
5.2 Der Einfluss des degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteins CsrD auf die Biofilmbildung	141
5.2.1 Das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD beeinflusst verschiedene kleine RNAs	141
5.2.2 Der Einfluss von CsrD auf das Rcs-Phosphorelay-System	143
<ul> <li>5.2.3 Wirkung von CsrD auf die bakterielle Zellmorphologie</li> <li>5.2.4 Der Einfluss des Aktinhomologs MreB auf die Biofilmbildung von Escherichia coli</li> </ul>	146 147
5.3 Der Biofilmregulator CsgD und die kleine RNA RprA bilden ein gemeinsames Regulon	150
5.3.1 Die duale Regulation durch <i>csgD</i> -mRNA und CsgD Protein	151
5.3.2 Weitere Zielgene der kleinen RNA RprA	152
5.3.3 die c-di-GMP-Kontrollmodule YdaM/YciR und YegE/YhjH	153
6. Literaturverzeichnis	154
7. Anhang	174

IV

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Die Wachstumsphasen und ihre entsprechenden Masterregulatoren in <i>E. coli</i> K-12	7
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung der Biofilmstadien am Beispiel von Pseudomonas	12
Abbildung 1.3:	Struktur und physiologische Funktion von c-di-GMP.	15
Abbildung 1.4:	Regulation von CsgD auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene	22
Abbildung 1.5:	Modell für die Signaltransduktionskaskade für RcsB- und RcsAB-abhängige Gene.	30
Abbildung 1.6:	Der autoregulatorische Kreislauf des Csr-Systems.	32
Abbildung 4.1:	Expression der GGDEF-Gene	79
Abbildung 4.2:	Expression der GGDEF- und EAL-Gene	80
Abbildung 4.3:	Expression der EAL-Gene	81
Abbildung 4.4:	Expression aller GGDEF/EAL-Gene von E. coli	84
Abbildung 4.5:	Insertionsmutationen in verschiedenen <i>E. coli</i> GGDEF/EAL-Genen verändern die Expression der Curli-Gene und den CsgD-Proteingehalt	89
Abbildung 4.6:	Einfluss kleiner RNAs auf die Curli-Expression und den CsgD- Proteingehalt.	92
Abbildung 4.7:	Einfluss von CsrD auf die RNA-Konzentration verschiedener kleiner RNAs entlang der Wachstumskurve.	96
Abbildung 4.8:	Einfluss von CsrD auf die RNA-Stabilität verschiedener kleiner RNAs entlang der Wachstumskurve.	99
Abbildung 4.9:	CsrD reprimiert die Expression von <i>rprA</i> und <i>bdm</i> und aktiviert die Expression von <i>flhDC</i> .	102
Abbildung 4.10:	CsrD reprimiert die Expression von <i>bdm</i> über die Außenmembrankomponente des Rcs-Phosphorelay-Systems RcsF.	104
Abbildung 4.11:	Einfluss von CsrD auf die Länge der Zelle entlang der Wachstumskurve.	107

Abbildung 4.12:	Einfluss der gewählten Antibiotikakassette in <i>csrD</i> auf das folgende Gen <i>mreB</i> entlang der Wachstumskurve.	109
Abbildung 4.13: Abbildung 4.14:	Überexpression von MreBCD verändert die Expression der Curli-Gene und den CsgD-Proteingehalt. Überexpression von MreBCD induziert die Expression von <i>bdm</i> und RprA.	110 112
Abbildung 4.15:	CsgD reguliert die Genexpression in E. coli	115
Abbildung 4.16:	CsgD reguliert zum einen als Protein und zum anderen als mRNA die Genexpression in <i>E. coli</i>	118
Abbildung 4.17:	RprA reguliert die Genexpression in <i>E. coli</i> , wenn <i>csgD</i> nicht exprimiert ist	121
Abbildung 4.18:	Darstellung der RNA-Konzentration des <i>csgD</i> -Transkripts und des zellulären Protein-Gehalts von CsgD in der Stationärphase.	122
Abbildung 5.1	Zusammenfassendes Modell zur Regulation vom degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD und dem MreBCD-Komplex auf das Rcs-Phosphorelay-System in <i>Escherichia coli</i>	145

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Geräte	37
Tabelle 3.2:	Übersicht der verwendeten Zusätze	39
Tabelle 3.3:	Übersicht der verwendeten Stämme	42
Tabelle 3.4:	Übersicht der verwendeten Plasmide	58
Tabelle 3.5:	Übersicht der verwendeten Bakteriophagen	58
Tabelle 3.6:	Liste der verwendeten Primer	61
Tabelle 4.1:	Zusammenstellung der induzierten Gene beim Vergleich von OD4 + 5h und OD4	123
Tabelle 4.2:	Zusammenstellung der inhibierten Gene beim Vergleich von OD4 + 5h und OD4	124
Tabelle 4.3:	Zusammenstellung aller durch YdaM regulierten Gene.	126
Tabelle 4.4:	Zusammenstellung aller durch YegE regulierten Gene in <i>csgD</i> -defizienten Hintergrund.	127
Tabelle 4.5:	Zusammenstellung aller durch YegE regulierten Gene im c <i>sgD</i> und <i>rprA</i> -defizienten Hintergrund.	128

# Abkürzungen

Δ	Ampere
Abb	Abbildung
Amn	Ampicillin
ΔΡ	Alkalische Phosphatase
	Ammoniumperoviddisulfat
A site	aktives Zentrum
A-SILC	A denosintrinhosphat
	5 Promo 4 Chloro 3 Indolul Dhoonhat
DUIF	S-BIOINO-4-CHIOIO-S-IndolyI-Filospilat
ор; ко	Basenpaare; Kilobasenpaare
CAMP	3, 5-zyclo-Adenosin-Monophosphat
CAMP	zyklisches Adenosin-3,5,-monophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinemonophosphat
Cm, cat	Chloramphenicol
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGC	diguanylate cyclase
DIG	Digoxigenin
DMF	N, N, Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotid
DTT	1.4Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	und andere
<i>ci ui.</i>	Gramm
g Gle	Glukose
Cly	Glucorin
CTD	Guanagin Trinhaghat
	Stunda
	Stunde
IPIG	isopropyi-p-D-1-Iniogalactopyranosid
I-site	innibitory site)
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
1	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m	milli
М	molar
M9	Minimalmedium 9
MES	4-N-Morpholmetanesulfonic acid
MgCl2	Magnesiumchlorid
MgSO4	Magnesiumsulfat
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumsalz

nt	Nukleotide
N-terminal	Amino-terminal
ΟDλ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge $\lambda$
ONPG	2-Nitrophenyl-B-D-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	(c-di-GMP-spezifische) Phosphodiesterase
pН	potentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der
	Wasserstoffkonzentration
PVDF	Polyvinylidenflourid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
ŔŢ	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sRNA	kleine RNA
ß-Gal	ß-Galaktosidase
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N`, N`-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur
Tn	Transposon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	transformation and storage solution
UTR	untranslated region, nichttranslatierte Region von mRNAs
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZKS	Zweikomponentensystem
β-gal. Akt.	β-Galaktosidase Aktivität
μ	mikro

### Zusammenfassung

Der in Bakterien ubiquitäre Sekundärbotenstoff c-di-GMP fördert die Biofilmbildung und inhibiert die Motilität [Sondermann et al., 2012]. C-di-GMP wird durch Diguanylatzyklasen (DGC), welche eine GGDEF-Domäne besitzen, synthetisiert und durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE), charakterisiert durch eine EAL-Domäne, hydrolysiert. Im Genom des gramnegativen Bakteriums Escherichia coli K-12 (E. coli) sind 29 dieser GGDEF/EAL-Gene kodiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle GGDEF/EAL-Domänen-Proteine des Bakteriums E. coli näher untersucht. Mit chromosomalen lacZ-Reportergenfusionen zu den einzelnen GGDEF/EAL-Genen wurde die Expression entlang der Wachstumskurve in Komplexmedium (LB) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 22 der 29 GGDEF/EAL-Gene unter diesen Bedingungen exprimiert werden. Die Studie zeigt, dass 50% der GGDEF/EAL-Gene Expression während dem exponentiellen Wachstum zeigen, und dass die anderen 50% eine Stationärphasen-induzierte Expression aufweisen. Dabei steht die Mehrheit der Stationärphasen-induzierten GGDEF/EAL-Gene auch unter der Kontrolle des Stationärphasen-Sigmafaktors RpoS ( $\sigma^{S}$ ). Dieser spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Biofilmentwicklung und kontrolliert bis zu 10% des E. coli Genoms [Weber et al., 2006]. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von insgesamt vierzehn GGDEF/EAL-Genen durch RpoS (zehn Gene positiv und vier Gene negativ) reguliert wird. Für vier Biofilmassoziierte und RpoS-abhängige GGDEF/EAL-Gene (ydaM, yciR, yaiC und yoaD) konnte bei der Untersuchung der Expression auf Festmedium eine induzierte Expression und für das Motilitätsassoziierte EAL-Gen yhjH eine reduzierte Expression nachgewiesen werden.

Ein Prozess, der positiv durch c-di-GMP reguliert wird, ist die Produktion der adhäsiven Curli-Fimbrien. Die Expression dieser Fimbrien hängt strikt vom Biofilmregulator CsgD ab und findet nur bei Temperaturen unter 30 °C statt. Pesavento *et al.* (2008) und Weber *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die GGDEF/EAL-Domänen-Proteinen YdaM, YciR, YegE und YhjH an der Regulation der *csgD*-Transkription beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD die *csgD*-Transkription und damit die Expression der adhäsiven Curli-Fimbrien beeinflusst. Der positive Einfluss von CsrD auf die *csgD*-Transkription wurde daraufhin näher untersucht.

Bei CsrD ist sowohl die GGDEF- als auch die EAL-Domäne degeneriert. Ein Einfluss auf den zellulären c-di-GMP-Umsatz kann also ausgeschlossen werden. Suzuki *et al.* (2006) konnten zeigen, dass CsrD durch Bindung den Abbau der kleinen sRNAs CsrB und CsrC fördert. Diese kleinen RNAs sind Teil des Csr-System, welches durch das RNA-bindende Protein CsrA die Motilität fördert und die Biofilmbildung inhibiert. Des Weiteren ist bekannt, dass das *csgD*-Transkript von fünf kleinen RNAs gebunden wird. Die Bindung der sRNAs hat eine Reprimierung von *csgD* zur Folge [Boehm &Vogel, 2012]. Bei der Untersuchung, ob es einen Zusammenhangs zwischen CsrD und den *csgD*-reprimierenden sRNAs OmrA, OmrB, RprA und McaS gibt, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer chromosomalen *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, dem ersten Gen des Curli-

Strukturoperons, gezeigt werden, dass CsrD und die kleinen RNAs einen additiven Einfluss auf die Curli-Fimbrien-Expression haben. Ein Einfluss des Csr-Systems auf die Curli-Fimbrien-Expression kann jedoch ausgeschlossen werden.

Da CsrD sRNAs destabilisieren kann, wurden in einem *csrD*-defizienten Hintergrund auch die Transkriptmenge und die Stabilität von verschiedenen kleinen RNAs mittels Northern Blot-Analysen untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien legen dar, dass CsrD nicht nur CsrB und CsrC, sondern auch weitere kleine RNAs (ArcZ, OmrA, OmrB und RprA) reguliert. Auffällig bei diesen Studien war der stark erhöhte RprA-Gehalt in einem *csrD*-defizienten Hintergrund.

Die Expression der kleine RNA RprA steht unter positiver Kontrolle des Rcs-Phosphorelay-Systems. Das Rcs-Phosphorelay-System spielt, durch die Aktivierung der Kapselsynthesegene und durch die Reprimierung des Masterregulators der flagellaren Kaskade, eine wichtige Rolle bei der Reifung des Biofilms. Mit chromosomalen *lacZ*-Reportergenfusionen zu verschiedenen Rcs-abhängigen Genen (*rprA, bdm* und *flhDC*) konnte gezeigt werden, dass CsrD das Rcs-Phosphorelay-System inhibiert. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass CsrD spezifisch über das RcsB-Homodimer und die kleine RNA RprA auf CsgD wirkt. Die Analyse des genauen Angriffspunktes von CsrD auf das Rcs-Phosphorelay-System ergab, dass in einem *csrD*-defizienten Hintergrund die Zellen verkürzt sind und dies über die Außenmembrankomponente RcsF wahrgenommen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiterer Regulator des Rcs-Phosphorelay-Systems aufgedeckt werden – der MreBCD-Komplex. Dieser Komplex spielt bei der Zellteilung und bei der Aufrechterhaltung der Zellform eine wichtige Rolle. Die Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems über MreBCD erfolgt ebenfalls über die Außenmembrankomponente RcsF, allerdings ohne die Zelllänge dabei zu beeinflussen.

Die Transkriptom-Studien von S. Busse (2009) deckten auf, dass RprA und CsgD ein gemeinsames Regulon kontrollieren. Ein weiteres wichtiges Ziel diese Arbeit war die genauere Charakterisierung dieses gemeinsamen Regulons. Die gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zeigen, dass CsgD zum einen RprA-abhängig und –unabhängig Zielgene reguliert und zum anderen sowohl als Protein als auch als mRNA wichtige und unterscheidbare Rollen bei der Regulation seiner Zielgene spielt. Als Protein übernimmt CsgD die Funktion eines Transkriptionsfaktors und als mRNA bindet es verschiedene kleine RNAs, wie RprA, und inhibiert so deren Wirkung. Die Transkriptom-Analysen zu RprA ergaben, dass RprA neben den bekannten Zielen, weitere, wie beispielsweise *paaABCD* beeinflusst, aber nur, wenn kein *csgD*-Transkript in der Zelle nachweisbar ist.

Die zusätzlichen gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zur c-di-GMP-abhängigen Regulation des Biofilmregulators CsgD bestätigen die Annahme, dass das YdaM/YciR-Kontrollmodul spezifisch CsgD reguliert und dass das YegE/YhjH-Kontrollmodul neben CsgD noch weitere Ziele beeinflusst. Die hier gezeigten Analysen zu CsgD und RprA zeigen die Komplexität und die Wichtigkeit des Transkriptionsfaktor CsgD bei der Regulation der Aktivität kleiner RNAs und der Expression seiner Zielgene auf.

### Summary

The second messenger c-di-GMP is ubiquitous in bacteria. A high level of c-di-GMP promotes biofilm development and inhibits motility [Sondermann et al., 2012]. This second messenger is synthesized by diguanylate cyclases (dgc), which possess a GGDEF domain, and is hydrolized by phosphodiesterases, which are characterized by an EAL domain. The genome of the gram-negative bacteria Escherichia coli (E. coli) encodes for 29 GGDEF/EAL genes. In this thesis all GGDEF/EAL domain proteins of the enteric bacteria E. coli were analyzed. Using chromosomal lacZ fusions to the GGDEF/EAL genes, the expression was studied along the growth curve. It was shown that all 22 of the 29 GGDEF/EAL genes were expressed in complex media (LB). 50% of the GGDEF/EAL genes were expressed in the exponential growth phase and the other 50% in the stationary phase. The majority of the stationary-induced genes are also under the control of the stress sigma factor RpoS. This factor plays - among other things - an important role in biofilm development. Altogether, RpoS controls approx. 10% of the E. coli genome [Weber et al., 2006]. This thesis shows that RpoS regulates the expression of a total of 14 GGDEF/EAL genes (10 genes were regulated positively and 4 negatively). The expression studies on plates resulted in higher expression of 4 biofilm-associated and RpoS-dependent GGDEF/EAL genes (ydaM, yciR, yaiC and yoaD) and in lower expression of the EAL gene *yhjH*, which is associated with motility.

C-di-GMP positively regulates the production of adhesive curli fimbria. Their expression depends strictly on the biofilm regulator CsgD and on a temperature below 30°C. Pesavento *et al.* (2008) and Weber *et al.* (2006) point out, that the GGDEF/EAL domain proteins YdaM, YciR, YegE und YhjH are involved in the regulation of the *csgD* transcription. In this thesis it was shown that the GGDEF/EAL domain protein CsrD also influences the transcription of *csgD* and the expression of the adhesive curli fimbria. The positive influence of CsrD in relation to *csgD* transcription was investigated more closely.

CsrD has degenerated GGDEF and EAL domains, therefore any effect on c-di-GMP can be ruled out. The study by Suzuki *et al.* (2006) indicates that CsrD promotes the degradation of the small RNAs CsrB and CsrC by binding to them. These sRNA are part of the Csr system. Here the RNA binding protein CsrA promotes motility and inhibits biofilm development. Furthermore, it is known that 5 sRNAs can bind to the *csgD* mRNA. The sRNAs' binding to the *csgD* transcript leads to its destabilization [Boehm &Vogel, 2012]. The possible connection between CsrD and the *csgD*-repressing sRNAs OmrA, OmrB, RprA and McaS was investigated by a chromosomal *lacZ* fusion to *csgB*, the first gene of the structural curli operon. This study demonstrates an additional effect of CsrD and the sRNA on curli expression. Any influence of the Csr system on curli fimbria expression can be ruled out.

Since CsrD destabilizes sRNA, the amount and stability of different sRNAs were investigated in a *csrD*-deficient environment via Northern blot analysis. The results of this study demonstrate that CsrD

The expression of the small RNA RprA is under positive control of the Rcs phosphorelay system. The Rcs phosphorelay system is important for the maturation of the biofilm via activation of the capsule synthesis genes and repression of the flagellar cascade's master regulator. It was demonstrated with chromosomal *lacZ* fusions to different Rcs-dependent genes (*rprA*, *bdm* und *flhDC*) that the Rcs phosphorelay system is inhibited by CsrD. The results suggest that CsrD acts specifically via the homodimer of RcsB and the small RNA RprA to regulate CsgD. The analysis of the application point of CsrD to the Rcs phosphorelay system resulted in smaller cells in a *csrD*-deficient backround. The outer membrane component RcsF seems to sense this shortening in a *csrD*-deficient backround.

In this thesis, MreBCD were revealed as other regulators of the Rcs phosphorelay system. The MreBCD complex is important for cell division machinery and maintaining cell shape. The activation of the Rcs phosphorelay system via MreBCD is also realized by the outer membrane component RcsF, but cell length is unaffected.

The transcriptom studies by S. Busse (2009) specified a common regulon for CsgD and RprA. Another important goal of this thesis was the analysis of this common regulon. Whole-genome microarray analyses argue that, on the one hand, CsgD regulates targets in both RprA-dependent and - independent manners, and, on the other hand, that CsgD controls its target both as a protein and as mRNA. As a protein CsgD acts as a transcription factor; as mRNA it binds to sRNAs, such as RprA and inhibits their functions. The transcriptom studies on RprA have clearly shown that RprA controls other targets (in addition to its known targets), such as, for example, *paaABCD*, but only in the absence of csgD mRNA.

Further whole-genome microarray analysis of the c-di-GMP control modules of the biofilm regulator CsgD reveal the specificity of the YdaM/YciR control module. The results also show that the YegE/YhjH control module influences other targets in addition to CsgD. The analyses of CsgD and RprA presented here demonstrate the complexity and importance of the transcription factor CsgD in the regulation of sRNA activity and the expression of its targets.

### 1. Einleitung

#### **1.1 Genregulation durch Sigmafaktoren**

Mikroorganismen haben sich die vielfältigsten Lebensräume der Erde erfolgreich erschlossen. Sie können sowohl in flüssiger Umgebung wie Frisch- und Abwasser vorkommen, als auch auf biotischen (z. B. auf Arthropoden) und abiotischen Oberflächen (oft medizinische Geräte, wie Katheter oder Implantate) angesiedelt sein. In flüssiger Umgebung sind freischwimmende oder planktonische Zellen und in auf Oberflächen angehefteten Gemeinschaften sind sessile, nicht-motile Mikroorganismen zu finden.

Für diese Lebensräume haben sie einerseits hochspezialisierte Anpassungen entwickelt, um in extremen Habitaten wie heißen Quellen, Salz- und Alkaliseen, sowie anaeroben Lebensräumen leben zu können. Andererseits besitzen Mikroorganismen vielfältigste, koordinierte Anpassungsmechanismen, um sich ändernden Umweltparametern, auch im weniger lebensfeindlichen Habitat, schnell und effizient anzupassen. Für diese Anpassung sind globale Änderungen der Genregulation notwendig.

#### 1.1.1 Sigmafaktoren in Escherichia coli

Escherichia coli (E. coli) aus der Familie der Enterobacteriacaen ist das derzeit am besten untersuchte gramnegative Bakterium und dient in der Mikrobiologie seit langem als Modellorganismus zur Untersuchung genetischer Regulationsmechanismen. Mit über 250 Serotypen ist E. coli ein sehr vielseitiges Bakterium [Kaper et al., 2004]. Es kommt sowohl als unbedenklicher Darmkommensal als auch als intra- oder extraintestinales Pathogen vor. E. coli kann aber auch medizinische Geräte kolonisieren und ist der primäre Grund für rezidivierende Urogenitalerkrankungen [Kaper et al., 2004]. Dieses Bakterium und viele weitere sind häufig Umweltschwankungen ausgesetzt und sie müssen schnell auf diese reagieren können, um überleben zu können. Dazu besitzen Mikroorganismen Signaltransduktionssysteme, die diese Umweltsignale wahrnehmen und verarbeiten. Als Antwort auf einen Reiz wird meist eine Änderung der Genexpression oder der Motilität, aber auch anderer Mechanismen ausgelöst [Stock et al., 2000]. Eine wichtige Gruppe der bakteriellen Signaltransduktionssysteme sind die Zwei-Komponenten-Systeme (s. 1.5). Viele Bakterien haben als Anpassung auf sich ändernde Umweltbedingungen auch verschiedenste Sigmafaktoren evolviert.

Sigmafaktoren sind Untereinheiten der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und ermöglichen die Erkennung unterschiedlicher Promotoren. So kann bestmöglich auf verschiedene Umweltsignale und Wachstumsbedingungen mit der Expression der dafür relevanten Gene reagiert werden.

E. coli besitzt sieben Sigmafaktoren mit unterschiedlicher Promotorerkennung. Der vegetative Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  (RpoD) steuert die Transkription der so genannten Haushaltsgene. Die Haushaltsgene umfassen die Grundausstattung, die eine Zelle benötigt, um wachsen zu können [Gross et al., 1998]. Die Anwesenheit eines alternativen Sigmafaktors führt zur teilweisen und temporären Verdrängung von  $\sigma^{70}$  aus der RNA-Polymerase und zu einer globalen Änderung der Genexpression Bei Wachstum unter hohen Temperaturen übernimmt der Hitzeschock-Sigmafaktor  $\sigma^{H}$  (RpoH) [Gross *et al.*, 1996, Yura *et al.*, 2000] und um den Erhalt der Zellhülle bei periplasmatischem Stress und Hitzeschock zu gewährleisten, besitzt die Zelle den Sigmafaktor  $\sigma^{E}$  (RpoE) [Alba & Gross, 2004, Erickson & Gross, 1989]. Die Kontrolle der Expression von Genen für die Motilität und die Chemotaxis übernimmt der flagellare Sigmafaktor  $\sigma^{F}$  (FliA) [Arnosti & Chamberlin, 1989, Chilcott & Hughes, 2000]. Für die Regulation des Stickstoffmetabolismus ist der Sigmafaktor  $\sigma^{N}$  (RpoN) [Merrick, 1993, Kutsu *et al.*, 1989] und für die Regulation des Eisentransportsystems ist  $\sigma^{FecI}$ (FecI) zuständig [Pressler *et al.*, 1988, Braun *et al*, 2003]. Der letzte Sigmafaktor  $\sigma^{S}$  (RpoS) hat eine besondere Bedeutung für das generelle Überleben von Stressbedingungen und der Stationärphase [Hengge-Aronis, 1996, Tanaka et al., 1993]. Dieser Sigmafaktor kontrolliert ungefähr 10% des E. coli Genoms und ist für die generelle Stressantwort verantwortlich [Weber et al., 2005].

#### 1.1.2 Die Rolle von Sigmafaktoren während des bakteriellen Wachstums

Während des Wachstums bakterieller Zellen in komplexem Medium, wie LB, durchlaufen diese mehrere Phasen: die exponentielle (I), die postexponentielle (II) und die stationäre (III) Phase (Abb. 1.1). Die exponentielle Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass der Hauptteil der Ressourcen für die Synthese der Ribosomen aufgebraucht wird. Dies ist notwendig, da diese Maschinerie notwendig für schnelles Wachstum und Zellteilung ist [Lange & Hengge-Aronis, 1991]. In dieser Phase des Wachstums ist in *E. coli* fast ausschließlich der vegetative Sigmafaktor ( $\sigma^{70}$ , RpoD) vorhanden und an die RNA-Polymerase gebunden.



Abb. 1.1 Die Wachstumsphasen und ihre entsprechenden Masterregulatoren in E. coli K-12.

Als Modellsystem wurde der *E. coli* K-12 Stamm W3110 in Komplexmedium (LB) wachsen gelassen. Die drei Wachstumsphasen sind dargestellt: (I) exponentielle oder "log" Phase, (II) postexponentielle Phase (beginnt ungefähr bei einer OD von 0,3) und (III) Stationärphase. Es sind nur die relativen Mengen der Proteine / Proteinkomplexe angegeben. OD(578nm): optische Dichte der bakteriellen Kultur gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm; ON: über Nacht (ungefähr 24 h nach Inokulation der bakteriellen Kultur), E $\sigma$ : RNA-Polymerase Holoenzym,  $\sigma^{S}$ : Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS,  $\sigma^{F}$ : flagellarer Sigmafaktor; FlhDC: flagellarer Masterregulator [Hengge, 2011]

Wenn die Kohlenstoff- oder Energiequelle weniger optimal wird, erreichen die Bakterien die postexponentielle Phase. Diese Phase ist durch den Hunger der Bakterien gekennzeichnet, da hier die bevorzugte Kohlenstoffquelle limitiert ist [Ferenci, 2001]. Hier wird nun der flagellare Masterregulator, FlhDC exprimiert [Soutourina et al., 1999] (Abb. 1.1). Dieser kontrolliert einen feinregulierten Prozess, der in der Assemblierung mehrerer Flagellen pro Zelle mündet und motile Zellen zur Folge hat [Barembruch & Hengge, 2007, Zhao et al. 2007]. Die Synthese und die Funktion der Flagelle (und des Chemotaxis-Systems) benötigt die Expression von mehr als 50 Genen, die in 17 Operonen organisiert sind [Macnab, 1996]. Die Expression dieser Operone ist zeitlich reguliert und kann in drei Klassen eingeteilt werden. Die Klasse 1 besteht nur aus dem *flhDC*-Operon, welches für den transkriptionalen Masterregulator der Flagellen kodiert. An dieser Stelle werden viele verschiedene Umweltsignale integriert werden. Der Komplex aus FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> aktiviert dann die Expression der Gene der Klasse 2 Promotoren. Die Gene dieser Gruppe kodieren unter anderem für die funktionalen Proteine des Haken-Basal-Körpers, der die Grundlage der Flagelle darstellt. Zu dieser Gruppe gehören auch FliA, der flagellare Sigmafaktor, und FlgM, der Anti-Sigmafaktor. FliA aktiviert nun zusammen mit der RNA-Polymerase (Abb. 1.1), wenn der Hakenbasalkörper fertig gestellt ist, die Expression der Gene der Klasse 3. Die Gene dieser Klasse kodieren für die restlichen Untereinheiten der Flagelle und für das Chemotaxissystem [Chilcott & Hughes, 2000]. Später in der postexponentiellen Phase wird die Expression von FlhDC beendet und vorhandenes FlhDC abgebaut.

Parallel dazu beginnt in dieser Phase auch die Akkumulierung eines weiteren alternativen Sigmafaktors, RpoS (Abb. 1.1). In der postexponentiellen Phase ist die Bindung von RpoS an die RNA-Polymerase, aufgrund der hohen Konkurrenz mit anderen Sigmafaktoren, noch sehr ineffizient. Beim Übergang in die Stationärphase des Wachstums ändert sich das durch den Abbau alternativer Sigmafaktoren und durch die verstärkte RpoS-Produktion und die RpoS-abhängige Genexpression ist dann stark induziert [Hengge, 2011] (Abb. 1.1). Der zelluläre Gehalt dieses wichtigen Stress-Sigmafaktors RpoS wird, bedingt durch unterschiedliche Stressbedingungen, auf Ebene der Transkription, Translation und Proteolyse reguliert [Klauck *et al.*, 2007]. Die Stationärphase ist durch ein Gleichgewicht von sterbenden und sich teilenden Zellen gekennzeichnet und kann nicht nur bei Wachstum in Komplexmedium erreicht werden. Eine natürlich auftretende Stationärphase stellt ein Biofilm dar [Lopez *et al.*, 2010].

### 1.2 Biofilme - eine Besiedlung von Oberflächen

Biofilme sind der am häufigsten vorkommende bakterielle Zustand in der Natur, das bedeutet, dass 90% der Bakterien in Biofilmen vorkommen [Costerton et al., 1995]. Im Allgemeinen handelt es sich bei Biofilmen um eine Matrix-umschlossene bakterielle Population, die an sich selbst und/oder an einer biotischen oder abiotischen Oberfläche anhaftet. Die Biofilmbildung wird besonders unter Nährstoffmangelbedingungen favorisiert und die Struktur von Biofilmen ist sehr komplex [Costerton et al., 1995, Gerstel & Römling, 2001]. Im Labor können Biofilme auf Agarplatten beobachtet werden. Dieser spezielle Biofilm-Phänotyp beinhaltet u. a. die Ausbildung von faltigen oder runzeligen Kolonien [Branda et al., 2005]. Biofilme enthalten eine hohe Anzahl an Zellen, die phänotypisch heterogen sind, sich also in vielen verschiedenen physiologischen Stadien befinden [Fux et al., 2005, Stewart & Franklin, 2008] (Abb. 1.2). So ist auch nur ein gewisser Teil an der Matrixproduktion beteiligt. Verschiedene andere Zellen koexistieren mit den Matrixproduzenten und machen in toto den Biofilm aus. Aufgrund der ausgebildeten Strukturen kann ein Biofilm bis hundert Mikrometer tief sein und dadurch entstehen Gradienten von Nährstoffen, Elektronenakzeptoren, Sauerstoffmolekülen, sowie von Signalmolekülen innerhalb der strukturierten Gemeinschaft. Die Gradientenbildung führt dazu, dass einige Zellen sogar metabolisch inaktiv sind [Stewart & Franklin, 2008].

Die Bildung dieser bakteriellen Gemeinschaften folgt keiner beliebigen Abfolge, sondern ist in einem strukturierten Ablauf koordiniert. Die Biofilmentwicklung beinhaltet mehrere Stadien - Initiation, Reifung, Erhaltung und Auflösung (Abb. 1.2). Alle diese Stadien benötigen eine globale Änderung der Genexpression, die eine komplexe Regulation einschließt [Prüß et al., 2006]. Biofilme werden in Abhängigkeit von Art und Umweltbedingung aus einer Spezies oder aus mehreren Bakterienarten gebildet. Der sessile Lebensstil bietet den Bakterien verschiedenste schützende Vorteile und erlaubt ihnen unterschiedliche Umweltnischen oder Wirte zu besiedeln. Verglichen mit freischwimmenden Bakterien können Biofilm-assoziierte Bakterien besser mit Nährstoffmangel, pH-Wert-Änderungen, Sauerstoffradikalen, Bioziden und antimikrobiellen Wirkstoffen umgehen [Costerton et al., 1995]. Die Biofilmbildung wird meist in Reaktion auf einen spezifischen Stimulus wie beispielsweise ein sich veränderndes Nährstoffangebot initiiert. Neben dem Nährstoffangebot beeinflussen auch andere Umweltsignale wie Temperatur, Osmolarität, pH-Wert, Eisenangebot und Sauerstoff die Biofilmentwicklung [O'Toole et al., 2000]. Biofilme können an abiotischen Oberflächen, wie Steinen, und an biotischen Flächen, wie Pflanzen ausgebildet werden. Im humanen Körper sind Bakterien in Biofilmen in nahezu jeder Nische, die sie besiedeln, zu finden. Das beinhaltet unter anderem die normale und die pathogene Hautflora und die normale und die pathogene intestinale Flora [Karatan & Watnick, 2009]. Die Biofilmbildung auf nahezu jeder Oberfläche spielt auch für medizinische und industrielle Prozesse eine wichtige Rolle. Biofilme begründen einen signifikanten Anteil der mikrobiellen Infektionen beim Menschen. Chronische Infektionen sind oft verbunden mit in Biofilmen lebenden Mikroorganismen. Dagegen konnte gezeigt werden, dass bei akuten Infektionen Biofilm-bildende Matrixkomponenten reprimiert und Virulenzfaktoren wie sekretierte Toxine und Typ 3 Sekretionssysteme aktiviert sind [Tischler & Camelli, 2004]. Der Biofilm vieler Enterobakterien wird mit verschiedenen Infektionen in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind bakteriellen Prostata-Infektionen [Domingue & Hellstrom, 1998], Katheterassoziierte Infektionen [Orme *et al.*, 2006], Kontaktlinsen-assoziierte Infektionen [Zegans *et al.*, 2002] oder auch Infektionen der Gallenblase [Prouty *et al.*, 2002].

#### **1.2.1.** Aufbau von Biofilmen

Für viele Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae* ist Motilität, nicht aber Chemotaxis, notwendig, um eine Biofilmbildung überhaupt erst zu ermöglichen [Pratt & Kolter, 1999]. Denn Flagellen sind notwendig, um sich in einer flüssigen oder viskosen Umgebung bewegen zu können, aber auch um sich auf einer Oberfläche zu verteilen. In *E. coli* korreliert die Möglichkeit einen Biofilm auszubilden, direkt mit der Möglichkeit zu schwimmen [Wood *et al.*, 2006]. Die Motilität ermöglicht den planktonischen freischwimmenden Bakterienzellen miteinander oder mit einer abiotischen oder biotischen Grenzfläche zu interagieren. Aber auch die Überwindung der hydrodynamischen Grenzschichten, die durch Widerstand und Reibung auf der Oberfläche entstehen, durch die flagellare Motilität ist denkbar [Goulter *et al.* 2009]. Unter bestimmten Bedingungen können auch nicht-motile Bakterien Biofilme ausbilden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass, wenn *E. coli* Oberflächenadhäsine wie Curli-Fimbrien (siehe unten) überexprimiert, eine Anheftung und eine normale Biofilmentwicklung möglich ist [Prigent-Combaret *et al.*, 2000].

Die Anheftung an Oberflächen bringt den Bakterien einen Vorteil gegenüber der flüssigen Umgebung, da jede Oberfläche, unabhängig von chemischer oder physikalischer Beschaffenheit, (Makro-)Moleküle absorbiert [Palmer *et al.*, 2007]. Diese absorbierte Schicht verändert nicht nur die Eigenschaften der Oberfläche, sondern fördert auch die Akkumulierung von Proteinen, Polysacchariden und anderer Moleküle auf der Oberfläche. Die nun für bakterielle Zellen metabolisch optimale Oberfläche dient auch als initialer Nährstoff, um die Biofilmbildung einzuleiten [Petrova & Sauer, 2012]. Zu beachten ist dabei, dass nicht ein hohes Maß an Nährstoffen die Biofilmbildung fördert. Denn Bakterien, die unter hohem Nährstoffangebot gewachsen sind, bilden keine Biofilme oder nur lockere Flocken-ähnliche Strukturen auf dem Substrat aus. Diese können auch einfach durch die Scherkräfte der flüssigen Umgebung wieder entfernt werden [Costerton *et al.*, 1995; Jackson *et al.* 2002; Marshall 1988].

Die Anheftung an eine Oberfläche kann bei vielen Bakterien in zwei Schritte unterschieden werden [Agladze et al., 2003; Sauer et al., 2002]. Der erste Schritt, die reversible Anheftung, ist gekennzeichnet durch Zellen, die locker über einen Zellpol an die Oberfläche angeheftet sind (Abb. 1.2). In diesem Stadium können sich die Zellen leicht wieder ablösen und in die planktonische Phase übergehen. Die Bakterien können sich auf der Oberfläche schnell drehen, vibrieren oder über die Oberfläche bewegen. Das Drehen des Bakteriums um die eigene Achse ist ein Zeichen dafür, dass die Flagellen an die Oberfläche adheriert sind [Sauer et al., 2002; Toutain et al., 2007]. Der Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Anheftung hat eine globale Veränderung der Genexpression zur Folge und beinhaltet die Produktion von Adhäsiven, wie Curli-Fimbrien [Kuchma & O'Toole, 2000]. Die Untersuchung des Zweikomponentensystems Cpx, welches auf Membranstress reagiert, hat gezeigt, dass Bakterien in der Lage sind den Kontakt mit einer Oberfläche wahrzunehmen, und daraufhin ihre Genexpression hin zu einer stabilen Zell-Oberflächen-Interaktion zu verändern. Dieses Zweikomponentensystem besteht aus einem Sensorkinase CpxA und einem Responseregulator CpxR [Otto & Silhavy, 2002]. In Mikrotiterplatten gewachsene E. coli Bakterien, denen cpxR oder cpxA fehlen, bilden, verglichen mit dem Wildtyp, eine weniger stabile Zell-Oberflächen-Interaktion aus und formen Biofilme mit weniger Biomasse [Otto & Silhavy, 2002; Dorel et al., 1999]. Die Weiterleitung der Signale in diesem System hängt von den Außenmembranproteinen OmpA und NlpE ab. Wobei NlpE wahrscheinlich der direkte Sensor für den Kontakt mit einer Oberfläche ist [Ma & Wood, 2009; Otto & Silhavy, 2002].



#### Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Biofilmstadien am Beispiel von Pseudomonas

Stadien: (1) initiale Anheftung der motilen, freischwimmenden Zelle und Übergang in die sessile Phase, (2) irreversible Anheftung durch Produktion von adhäsiven Komponenten, (3) & (4) Reifung des Biofilms durch Produktion der extrazellulären Matrix (5) Auflösung des Biofilms und Übergang in die motile Phase. (Diese Abbildung wurde von der Webseite der Universität der Staatsuniversität von New York Binghampton entnommen [Stoodley *et al.*, 2002]

Aus den adhärierten Mikroorganismen bildet sich dann der reife Biofilm, der durch die Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten entsteht. Charakteristisch für reife Biofilme ist das Vorhandensein von differenzierten, pilz- oder säulenartige Strukturen oder von Mikrokolonien [O'Toole *et al.*, 2000] (Abb. 1.2). Zwischen diesen Mikrokolonien befinden sich Wasser-gefüllte Kanäle [Costerton *et al.*, 1995]. Diesen Kanälen wird eine Rolle beim Influx von Nährstoffen und dem Efflux von Stoffwechselendprodukten zugesprochen [Pratt & Kolter, 1999].

Der entstandene Biofilm entwickelt sich fort, solange eine Nährstoffquelle in der Umgebung erhältlich ist. Wenn die Bakterien nicht ausreichend mit Nahrung versorgt werden können, lösen sie sich vom Biofilm ab (Abb. 1.2), indem sie Enzyme ausscheiden, welche die Matrix in ihrer direkten Umgebung abbauen. Somit kehren sie zu ihrer planktonischen Lebensweise zurück [O'Toole *et al.* 2000]. Durch die komplexe Struktur und Vernetzung eines Biofilms liegt der Vergleich mit einem einfachen multizellulären Organismus nahe [Pratt & Kolter, 1999].

#### **1.2.2.** Komponenten des Biofilms

Die irreversible Anheftung an andere Zellen und an eine Oberfläche wird durch die Ausbildung adhäsiver Komponenten ermöglicht. Die Zellen eines reifen Biofilms sind dann noch zusätzlich von einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) aus Polysacchariden, extrazellulärer DNA (eDNA), Lipiden und Proteinen umgeben [Flemming *et al.*, 2010] (Abb. 1.2).

Die bakteriellen Exopolysaccharide können in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht nur bei verschiedenen Bakterien, sondern auch zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies, stark variieren. So ist bekannt, dass *P. aeruginosa* drei verschiedene Polysaccharide, Alginat, Psl und Pel, je nach Spezies und Bedingung produzieren kann [Ryder *et al.*, 2007]. Aber auch *E. coli* stehen verschiedene Polysaccharide, wie Cellulose, Kolansäure (colanic acid), und  $\beta$ -1,6-*N*-Acetyl-d-Glucosamin (PGA) zur Verfügung. Danese *et al.* (2000) konnten zeigen, dass in *E. coli* K-12 die Produktion des Polysaccharids Kolansäure nicht für die Anheftung an Oberflächen, sondern für die Ausbildung einer komplexen dreidimensionalen Biofilmstruktur notwendig ist [Van Houdt & Michiels, 2005]. CA scheint wichtig für das Überleben außerhalb des Wirts und Schutz gegen Austrocknung zu sein [Ophir & Gutnick, 1994]. Das Polysaccharid PGA scheint für die permanente Anheftung und die Zell-Zell-Interaktion gebraucht zu werden [Agladze *et al.*, 2005].

Die Möglichkeiten der Haftfestigkeit und Biofilmbildung hängt von der Zusammensetzung der verschiedenen Polysaccharide ab. Interessanterweise unterstützen nicht alle Polysaccharide die Anheftung von Biofilmen an eine Oberfläche. In *Vibrio* spp. konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Polysacchariden die Biofilmbildung verhindern [Kierek & Watnick, 2003; Joseph & Wright, 2004].

Als Folge der Expression bestimmter EPS zeigen die Enterobakterien unter Laborbedingungen auf Kongorot (CR)-Agarplatten unterschiedliche Gestaltsformen und Farben (Morphotypen). Bei *S. Typhimurium* und *E. coli* führt die Expression von Curli-Fimbrien und Cellulose (s. 1.3.2) zum so genannten rdar (red, dry and rough) Morphotyp [Römling, 2005]. Die Expression des rdar Morphotypes ist Wachstumsphasen- und Temperatur-abhängig. Er wird in der Stationärphase [Römling *et al.* 1998a, Gerstel & Römling, 2001] und bei Temperaturen unter 30°C exprimiert. Die Expression des rdar Morphotypes unterbleibt ebenso bei hoher Osmolarität (0,5 M NaCl) oder bei Zugabe von Glukose (0,4 %) zum LB-Medium [Römling *et al.*, 1998a]. Wenn die Produktion der Curli-Fimbrien oder der Cellulose verändert ist, so ist das auch in einem veränderten Morphotyp auf CR-Platten zu beobachten [Römling *et al.* 1998b; Römling *et al.* 2000; Zogaj *et al.*, 2001].

# 1.3 Der Sekundärbotenstoff c-di-GMP und die Regulation des Biofilmregulators CsgD

Für die Fitness und das Überleben eines bakteriellen Organismus in verschiedenen Habitaten ist die Entscheidung sich niederzulassen oder weiter zu schwimmen unumgänglich. Die schnelle Natur von sekundären Botenstoffen ermöglicht eine unmittelbare Antwort auf die sich ändernden Umweltbedingungen. *De novo* Transkription und Translation von Proteinkomplexen, die als Antwort auf bestimmte Signale benötigt werden (z. B. Flagellen), kosten zu viel Zeit und Energie, wenn eine unmittelbare Anpassung an die Umwelt nötig ist. Die allosterische und posttranslationale Kontrolle durch den Umsatz eines sekundären Botenstoffes ist energetisch günstiger und schneller [Tuckerman *et al.*, 2009].

Zyklische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe bei der Signaltransduktion sind in allen Bereichen des Lebens weit verbreitet. Zyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosin 3',5'-Monophosphat (cGMP) sind die wichtigsten Nukleotidbotenstoffe in Eukaryoten. Bei den Bakterien ist cAMP auch an der Kontrolle verschiedenster Prozesse, wie bei der Verwertung alternativer Zucker, bei der Motilität und Virulenz, beteiligt [Gomelsky, 2011]. Auch für cGMP konnte vor kurzem gezeigt werden, dass es eine wichtige Funktion bei der Regulation in Bakterien inne hat [Marden *et al.*, 2011]. Auch zyklische Dinukleotide wie c-di-AMP und c-di-GMP spielen eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Signalweiterleitung. Über c-di-AMP ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass es, wenn Schäden an der DNA auftreten, bei der Zellzykluskontrolle in *Bacillus subtillis* beteiligt ist [Witte *et al.*, 2008]. Des Weiteren scheint es notwendig für das Überleben des Lebensmittelpathogens *Listeria monocytogenes* zu sein [Woodward *et al.*, 2010]. Dieser Botenstoff ist nur unter Bakterien und Archaeen verbreitet [Römling, 2008].

#### 1.3.1 der Sekundärbotenstoff c-di-GMP

Der Botenstoff c-di-GMP wurde durch Benziman und Kollegen Mitte der 1980er als aktivierender Faktor der Cellulose-Synthase in *Gluconacetobacter xylinus* entdeckt [Ross *et al*, 1987]. Dieser in Bakterien ubiquitäre Botenstoff beeinflusst die Produktion von Exopolysacchariden, die Anheftung an Oberflächen und die Motilität und gilt als zentraler Regulator für die Bildung und Erhaltung von Biofilmen in vielen Organismen [D'Argenio & Miller, 2004]. Der motilen Lebensstil wird mit einem niedrigen zellulären Gehalt an c-di-GMP in Verbindung gebracht. In der flagellaren Kaskade ist die PDE YhjH kodiert. Diese hält den zellulären Spiegel an c-di-GMP niedrig und fördert so die Drehung der Flagellen [Ko & Park, 2000, Pesavento *et al.*, 2008]. Ein hoher c-di-GMP-Spiegel ist mit dem sessilen Lebensstil verbunden, denn dieser hat die Induktion der Expression des Masterregulators der Biofilmbildung CsgD in *E. coli* zur Folge [Weber *et al.*, 2006, Pesavento *et al.*, 2008] (Abb. 1.3).



#### Abb. 1.3: Struktur und physiologische Funktion von c-di-GMP.

c-di-GMP ist ein bakterieller Sekundärbotenstoff, der die Umschaltung von der motilen in die sessile Lebensphase kontrolliert. Er wird aus 2 GTP durch Diguanylatzyklasen (GGDEF-Domäne) synthetisiert und durch spezifische Phosphodiesterasen (EAL- oder HD-GYP-Domäne) abgebaut. C-di-GMP wird durch Rezeptoren (Proteine mit PilZ- oder degenerierten GGDEF- oder EAL-Domänen und Transkriptionsfaktoren) oder durch RNAs (Riboswitches) wahrgenommen. Ein hoher c-di-GMP-Gehalt in der Zelle reduziert die Motilität und die Expression von Virulenzfaktoren und fördert die Biofilmbildung und die Zellzyklusentwicklung [Sondermann *et al.*, 2012].

C-di-GMP wird aus 2 Molekülen GTP durch Diguanylatzyklasen (DGC) synthetisiert und durch Phosphodiesterasen (PDE) in pGpG (5'-Phosphoguanylyl-(3'-5')-Guanosin) hydrolysiert (Abb. 1.3). Das Molekül pGpG wird anschließend in 2 Moleküle GMP gespalten. Die DGC-Aktivität ist mit der GGDEF-Domäne, die c-di-GMP-spezifische PDE-Aktivität mit der EAL- oder HD-GYP-Domäne assoziiert [Hengge, 2009].

#### 1.3.1.1 Synthese und Abbau von c-di-GMP

*In silico* Studien ergaben, dass die Mehrheit der Bakterien mit einem Genom unter 2Mb und 15% der Bakterien mit Genomen über 2Mb keine c-di-GMP-metabolisierenden Proteine enthalten [Seshasayee *et al.*, 2010]. Bei den restlichen 85% mit Genomen über 2Mb variiert die Anzahl der c-di-GMP-metabolisierenden Proteine von 50 (bei *Vibrio vulnificus*) über 31 (bei *Escherichia coli*) bis nur 1 (bei *Proteus mirabilis*) [Römling, 2011]. Diese hohe Variabilität könnte in der Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen begründet sein [Jenal & Malone, 2006].

Die meisten GGDEF- und EAL-Domänen sind mit anderen bekannten oder hypothetischen Signaleingangs-Domänen verbunden [Jenal, 2004]. Durch diese Kombination kann eine große Variation an Umweltsignalen im c-di-GMP-Signalnetzwerk wahrgenommen und verarbeitet werden [Galperin *et al.*, 2010]. Zusätzlich zu externen Signalen können durch Proteine mit GGDEF- und EAL-Domänen auch interne Signale wahrgenommen und in das c-di-GMP-Netzwerk integriert werden [Aldridge *et al.*, 2003, Christen *et al.*, 2005, Paul *et al.*, 2004]. Zum besseren Verständnis der c-di-GMP-Kontrollmodule innerhalb einer Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression aller in *E. coli* K-12 kodierten GGDEF/EAL-Gene untersucht.

Die GGDEF-Domäne, welche mit der Synthese von c-di-GMP verbunden ist (Abb. 1.3), wurde nach ihren konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum benannt [Galperin et al., 2001]. Damit c-di-GMP synthetisiert werden kann, muss ein Dimer aus zwei GGDEF-Domänen entstehen. Das aktive Zentrum (a-site) ist dann an der Schnittstelle zwischen den beiden Untereinheiten, die je ein GTP gebunden haben, lokalisiert [Chan et al., 2004]. Die Aktivität der DGC hängt strikt vom konservierten GGDEF- oder GGEEF-Motiv ab [Malone et al., 2007] und 90% der GGDEF- und 62% der aus GGDEF- und EAL-Domäne zusammengesetzten Proteine besitzen eine a-site [Jenal & Malone, 2006]. GGDEF-Domänen-Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen solche mit einer aktiven und zum anderen mit einer inaktiven a-site. Die inaktiven GGDEF-Domänen-Proteine können alternative regulatorische Funktionen in der Zelle zu übernehmen [Christen et al., 2005]. Die meisten aktiven DGCs sind Ziel einer allosterischen Produkthemmung, denn sie besitzen ein konserviertes RXXD-Motiv (inhibierendes Zentrum, i-site) in der Nähe der a-site. Durch die Bindung von c-di-GMP an diese Stelle wird die DGC-Aktivität gehemmt [Chan et al., 2004]. Die Produktinhibierung verhindert möglicherweise einen exzessiven GTP-Verbrauch und limitiert so den c-di-GMP-Gehalt in der Zelle [Christen et al., 2006]. Die Kombination aktiver und inaktiver a- und i-sites ermöglichen weitere Regulationsmechanismen. So können Proteine auftreten, welche eine geringe DGC-Aktivität aufweisen und keine i-site haben und zum anderen kann es Proteine geben, die eine hohe DGC-Aktivität und eine integrierte Autoregulation durch die i-site aufweisen. Degenerierte GGDEF-Proteine mit intaktem I-Zentrum könnten als Effektoren im c-di-GMP-Kreislauf in Frage kommen [Jenal & Malone, 2006]. GGDEF-Domänen treten oft in Verbindung mit EAL- oder HD-GYP-Domänen in einem Protein auf. Die Mehrheit der in vitro untersuchten Proteine zeigen entweder DGCoder **PDE-Aktivität** [Christen et al. 2005; Schmidt et al. 2005; Takahashi & Shimizu, 2006]. Doch aktuelle Daten weisen daraufhin, dass einige dieser zusammengesetzten Proteinen (wenn beide Domänen konserviert sind) in vitro bifunktional aktiv sind [Tarutina et al. 2006; Ferreira et al. 2008, Gupta et al., 2010]. Ob beide Aktivitäten eines Proteins gleichermaßen in vivo relevant sind und wie sie in den c-di-GMP-Kreislauf integriert werden, muss noch geklärt werden. Auch eine gegenseitige Kontrolle der Domänen ist möglich. So konnte für die Kombination einer GGDEF-Domäne mit einem inaktiven A-Zentrum mit einer EAL-Domäne gezeigt werden, PDE-Aktivität GTP-abhängig reguliert wird [Christen *et al.*, dass die 2005, Kazmierczak et al., 2006].

Der Abbau von c-di-GMP durch spezifische PDEs kann durch zwei Domänen, EAL und HD-GYP, realisiert werden (Abb. 1.3). Die HD-GYP-Domäne gehört zur Metall-abhängigen Phosphohydrolase-Superfamilie, zu der auch dGTPasen und die ppGpp-regulierenden Proteine SpoT und RelA gehören. In Xanthomonas campestris hydrolysiert der Response zu GMP Regulator RpfG, welcher eine HD-GYP-Domäne enthält, c-di-GMP [Ryan al., 2006]. Das Zwei-Komponenten-System RpfC/G kontrolliert in et Xanthomonas campestris die Synthese von Virulenzfaktoren und Exopolysacchariden [Jenal & Malone, 2006].

Die EAL- und die HD-GYP-Domäne erhielten ihren Namen aufgrund einer konservierten Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum [Galperin *et al.*, 2001]. Die Aktivität der EAL-Domäne als PDE ist strikt abhängig von Magnesium- oder Mangan-Ionen und kann durch Kalzium- und Zink-Ionen inhibiert werden [Rao *et al.*, 2008]. Die Aktivierung durch

Magnesium-Ionen und Inhibierung durch Kalzium-Ionen konnte auch für andere Phosphodiesterasen, wie die spezifischen cAMP-abhängigen PDEs, nachgewiesen werden. C-di-GMP-spezifische **PDEs** arbeiten sehr wahrscheinlich als Monomere [Schmidt et al., 2005]. In silico und in vitro Analysen von Schmidt et al. (2005) konnten des Weiteren zeigen, dass es auch hier aktive und inaktive PDE-Domänen gibt. Die degenerierten EAL-Domänen könnten wie die degenerierten GGDEF-Domänen eine Rolle als Regulatoren im c-di-GMP-Kreislauf einnehmen. Für einige degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Proteine konnte schon eine c-di-GMP-unabhängige Funktion nachgewiesen werden. Zu den regulierten Prozessen gehört beispielsweise der Abbau zweier regulatorischer RNAs (CsrB und CsrC durch CsrD) [Suzuki et al. 2006] oder die veränderte Transkription als Antwort auf blaues Licht das YcgF/YcgE-System [Tschowri et al. 2008].

#### 1.3.1.2 c-di-GMP-Effektoren

Über Synthese und Abbau des sekundären Botenstoffs c-di-GMP ist viel bekannt, aber um den c-di-GMP-Signalweg zu verstehen, muss man auch die Effektoren und Rezeptoren kennen. Aktuell sind vier Gruppen von Effektoren (Abb. 1.3) erwiesen, die c-di-GMP-abhängig zelluläre Funktionen auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene kontrollieren [Hengge, 2010].

Zum einen sind die degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine zu nennen (Abb. 1.3). Diese können c-di-GMP binden und die Signalweiterleitung übernehmen, ohne den Botenstoff selbst abzubauen. Ein Beispiel hierfür ist das membranständige GGDEF/EAL-Domänen-Protein LapD von *Pseudomonas fluorescens*. Beide Domänen dieses Proteins sind degeneriert und zeigen *in vitro* keine enzymatische Aktivität. Die EAL-Domäne ist aber noch in der Lage c-di-GMP zu binden und dies führt dazu, dass die periplasmatische Protease LapG durch LapD gebunden und so inaktiviert wird [Newell *et al.*, 2009, Navarro *et al.*, 2011].

Die zweite Gruppe umfasst die am besten untersuchten c-di-GMP-Effektoren – Proteine mit einer PilZ-Domäne (Abb. 1.3). Die PilZ-Domäne besteht aus ca. 100 Aminosäuren und ist als Dimer aktiv. Die Familie der PilZ-Proteine reguliert eine Reihe physiologischer Prozesse, wie Polysaccharid-Synthese, Motilität und Virulenz [Ryan *et al.*, 2012]. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist, neben der Cellulose-Synthase BcsA, das flagellare Regulatorprotein YcgR aus *E. coli* und *S. typhimurium* [Christen *et al.*, 2007]. Durch die Bindung von c-di-GMP kommt es zu einer Konformationsänderung in YcgR, die es diesem Effektor erlaubt mit dem flagellaren Motor über MotA und FliG zu interagieren [Boehm *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010]. Diese Interaktion reduziert die Drehkraft der Flagellen und induziert so den Taumel-Modus [Fang & Gomelsky, 2010]. YcgR wirkt also wie eine flagellare Bremse.

Eine weitere Gruppe stellen die drei direkt c-di-GMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren, Clp, FleQ und VpsT dar (Abb. 1.3). Diese Transkriptionsfaktoren weisen keine Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und Domänenstruktur auf. Der globaler Regulator Clp (cAMP receptor like protein) aus *Xanthomonas spp*. [Leduc & Roberts, 2009] und FleQ aus *Pseudomonas aeruginosa* [Hickman & Harwood, 2008] binden mit hoher Affinität an DNA und werden durch die Bindung an c-di-GMP inaktiviert. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von c-di-GMP an den Transkriptionsfaktor VpsT aus *Vibrio cholerae* zur Aktivierung der Expression [Krasteva *et al.*, 2011]. FleQ und VpsT sind an der Produktion von Exopolysacchariden der entsprechenden Organismen beteiligt, während Clp für die Reprimierung der Virulenz von *Xanthomonas* verantwortlich ist.

Die vierte Gruppe der c-di-GMP Effektoren sind die Riboschalter (Riboswitch), komplexe RNA-Strukturen, die kleine Metabolite binden können (Abb. 1.3). Die beiden Klassen der c-di-GMP-abhängigen Riboswitches, c-di-GMP-I und c-di-GMP-II, sind bei vielen verschiedenen Bakterien vertreten [Sudarsan *et al.*, 2008, Lee *et al.* 2010]. Diese Aptamere können sowohl die Transkription, als auch die Translation verschiedener Gene beeinflussen und sind oft in der untranslatierten Region von Genen zu finden, die für DGCs oder PDEs kodieren [Ryan *et al.*, 2012].

Der Sekundärbotenstoff c-di-GMP spielt bei der Umschaltung von der motilen in die sessile Phase, und *vise versa*, auf verschiedenen Ebenen der Regulation eine wichtige Rolle [Jenal & Malone, 2006].

# **1.3.2** Die Regulation von CsgD und sein Einfluss auf die Entwicklung von Biofilmen

Der Transkriptionsfaktor CsgD gehört zur Superfamilie der FixJ/LuxR/UhpA-Proteine [Römling et al. 2000, Brombacher et al., 2006]. Diese Familie ist durch eine C-terminale Domäne mit einem potentiellen DNA-Bindemotiv (Helix-turn-Helix) und einer Receiverdomäne in der N-terminalen Region gekennzeichnet [Volz, 1993]. Der Transkriptionsfaktor CsgD hat damit eine hohe Ähnlichkeit zu den Response-Regulatoren von Zwei-Komponenten-Systemen mit einem konservierten Aspartat an Position 59 (D59) als mögliche Phosphorylierungsstelle. Bisher konnte gezeigt werden, dass CsgD im unphosphorylierten Zustand an die Promotoren seiner Zielgene csgBAC und adrA (vaiC in E. coli) bindet [Zakikhany et al., 2010]. Bei dem Operon csgBAC handelt es sich um das Strukturoperon der adhäsiven Curli-Fimbrien (s. 1.3.2.1), die eine wichtige Funktion bei der irreversiblen Anheftung spielen. Das Gen yaiC kodiert für eine DGC. Über die transkriptionale Kontrolle auf yaiC kontrolliert CsgD indirekt die Cellulose-Synthese (s. 1.3.2.2). Auch das für eine PDE-kodierende Gen yoaD, dem ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Cellulose-Synthese zugeschrieben wird, steht unter der Kontrolle von CsgD. Des Weiteren moduliert dieser Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene, die für die Entwicklung eines Biofilms wichtig sind [Brombacher et al., 2006]. Zur weiteren Aufklärung des CsgD-Regulons in E. coli wurden im Rahmen dieser Arbeit gesamtgenomische Analysen durchgeführt.

Die Expression von *csgD* wird auf transkriptionaler Ebene durch diverse Faktoren reguliert. So gelten Umweltbedingungen wie Temperatur, Sauerstoffgehalt, Nährstoffmangel, Osmolarität, Eisengehalt und pH-Wert als wichtige Regulatoren der *csgD*-Expression [Gerstel & Römling, 2001]. Es ist bekannt, dass hohe Salzkonzentrationen die *csgD*-Expression reprimieren. Der Sauerstoffgehalt und das Nährstoffangebot spielen eine wichtige und komplexe Rolle. Ein Maximum an *csgD*-Expression in Komplexmedium kann nur unter mikroaerophilen Bedingungen erreicht werden. Unter aeroben Bedingungen kann die Expression von *csgD* nur in Minimalmedium maximiert werden [Gerstel & Römling, 2001].

Mehr als zehn Transkriptionsfaktoren (CpxR, Crl, CRP, CsgD, FlhDC, HNS, IHF, MlrA, OmpR, RcsB und RstA) und zwei Sigmafaktoren (RpoD und RpoS) üben eine wichtige Funktion bei der Regulation der *csgD*-Expression aus [Ogasawara *et al.*, 2011] (Abb. 1.4). Von den zehn Transkriptionsfaktoren konnte für fünf eine direkte Bindung an den *csgD*-

Promotor nachgewiesen werden: CpxR [Jubelin *et al.*, 2005], H-NS [Gerstel *et al.*, 2003], IHF [Gerstel *et al.*, 2003], OmpR [Vidal *et al.*, 1998] und RstA [Ogasawara *et al.*, 2007]. Jeder dieser Transkriptionsfaktoren reagiert auf einen spezifischen Faktor oder auf eine spezielle Umweltbedingung und ist so an der Biofilmbildung beteiligt. Die starke Regulation der Expression macht den *csgD*-Promotor zu einem der komplexesten in *E. coli*.

Auch der Sekundärbotenstoff c-di-GMP ist an der Regulation der csgD-Transkription beteiligt. So konnten Pesavento et al. (2008) zeigen, dass zwei unabhängige c-di-GMP-Kontrollmodule wichtig für die csgD-Transkription sind (Abb. 1.4). Das eine Modul enthält die aktivierende DGC YegE und die inhibierende PDE YhjH. Dieses System ist auch für die Inhibierung der Flagellenaktivität über den c-di-GMP-bindenden Effektor YcgR verantwortlich [Boehm et al., 2010]. Da dieses System über mehr als einen Effektor wirkt, kann man davon ausgehen, dass das produzierte c-di-GMP frei ist und diffundieren kann [Pesavento et al., 2008]. Das zweite c-di-GMP-Kontrollmodul besteht ebenfalls aus einer aktiven DGC, YdaM, und einer aktiven PDE, YciR. YdaM hat einen positiven Einfluss auf die csgD-Transkription und YciR wirkt antagonistisch dazu. Beide haben keinen Einfluss auf die Motilität in E. coli [Pesavento et al., 2008; Weber et al., 2006]. Dieses System wirkt anscheinend sehr spezifisch nur auf die csgD-Transkription, sodass davon ausgegangen dass hier werden kann. es sich um lokale c-di-GMP-Verarbeitung handelt [Pesavento et al., 2008]. In dieser Arbeit wird der Einfluss eines weiteren GGDEF/EAL-Domänen-Proteins, CsrD (YhdA) auf die csgD-Transkription näher untersucht.



#### Abb. 1.4: Regulation von CsgD auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene

Die *csgD*-Expression wird auf Ebene der Transkription durch viele verschiedene Regulatoren aktiviert oder reprimiert. Eine wichtige Funktion übernimmt der Stress-Sigmafaktor RpoS ( $\sigma^{s}$ ). RpoS aktiviert die Expression diverser GGDEF/EAL-Gene, des Transkriptionsfaktors *mlrA* und von *csgD*. Die c-di-GMP-Kontrollmodule YegE/YhjH und YdaM/YciR spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der *csgD*-Transkription. Aber nicht nur die *csgD*-Transkription untersteht einer massiven Kontrolle, sondern auch das entstandene Transkript selbst wird durch fünf kleine RNAs in seiner langen 5' UTR negativ reguliert. RprA, GcvB und McaS binden überlappend an derselben Position am Anfang des Transkripts und OmrA und OmrB binden in der Nähe der Shine Dalgano-Stelle (Bindestelle der Ribosomen). Wenn die Translation erfolgreich war, aktiviert CsgD direkt die Expression von Curli-Fimbrien und indirekt die Synthese von Cellulose. Rot: c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterase, blau: Diguanylatzyklasen, blau unterlegte Ellipsen: c-di-GMP, grau unterlegtes Viereck: sRNAs. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die transkriptionale Regulation wird mithilfe der posttranskriptionalen Kontrolle durch sRNAs abgerundet (Abb. 1.4). Bisher konnte gezeigt werden, dass fünf verschiedene kleine regulatorische RNAs (OmrA, OmrB, McaS, GcvB und RprA) an die lange 5' untranslatierte Region (5' UTR) des *csgD*-mRNA Transkript binden. Die Bindung einer der kleinen RNAs führt in jedem Fall zu einer Reprimierung des *csgD*-Transkripts [Boehm & Vogel, 2012].

Die Expression der kleinen RNA OmrA zeigt in LB eine Stationärphasen-Induktion bei 37°C [Argaman *et al.*, 2001]. Die Expression der sRNA OmrB erreicht in der post-exponentiellen Phase ihr Maximum [Vogel *et al.*, 2003]. Die 5' und die 3' Enden von OmrA und OmrB sind nahezu identisch, weswegen sie als intergenische Duplikation entdeckt wurden [Rudd, 1999], aber ihre zentralen Regionen unterscheiden sich. Mutationen in OmrA und OmrB führen zu einer veränderten Zusammensetzung der Außenmembranproteine [Guillier & Gottesmann,
2006]. Die Überexpression von OmrA oder OmrB verhindert die Ausbildung von Curli-Fimbrien durch Reprimierung der *csgD*-Expression durch Bindung an die 5' UTR des *csgD*-Transkripts [Holmqvist *et al.*, 2010].

Die Expression der 95 bp großen sRNA McaS (IsrA) erreicht ihr Maximum bei 37°C in LB beim Übergang von der frühen in die späte Stationärphase. Auch ein Mangel an Glukose führt zur Induktion dieser sRNA. McaS reprimiert ebenfalls die *csgD*-Translation [Thomason *et al.*, 2012]. Thomason *et al.* (2012) konnten auch zeigen, dass McaS nicht nur die *csgD*-Transkription reprimiert, sondern auch die Expression des flagellaren Masterregulators *flhDC* und die Produktion des Exopolysaccharids PGA aktiviert.

Die kleine RNA GcvB wird in der frühen logarithmischen Phase des Wachstums bei 37°C in LB exprimiert [Argaman *et al.*, 2001]. Auch GcvB bindet an die 5' UTR des *csgD*-Transkripts und die Bindung führt zur Reprimierung von CsgD [Jørgensen *et al.*, 2012].

Für die Expression der 105 bp großen sRNA RprA konnten Argaman *et al.* (2001) zeigen, dass sie bei 37°C in Komplexmedium (LB) Stationärphasen-induziert ist. Des Weiteren ist die Expression von RprA vom Rcs-Phosphorelay-System, welches wichtig für die Reifung eines Biofilms ist, abhängig [Majdalani *et al.*, 2002]. RprA wurde als positiver Regulator der RpoS-Translation unter osmotischen Stressbedingungen gefunden [Majdalani *et al.*, 2001]. Mika *et al.* (2012) konnten zeigen, dass RprA einen negativen Einfluss auf die *csgD*-Translation hat. Dieser Einfluss ist unabhängig von RpoS und wird durch Bindung von RprA an die 5' UTR vermittelt. Die Bindestellen von McaS, RprA und GcvB an die 5' UTR des *csgD*-Transkripts überschneiden sich.

Die kleinen RNAs sind also zu verschiedenen Bedingungen in der Zelle vorhanden und können im Zusammenspiel mit den transkriptionalen Regulatoren die Verfügbarkeit von CsgD und damit die Expression der Curli-Fimbrien und der Synthese von Cellulose steuern.

### 1.3.2.1 Curli-Fimbrien

Die Gene, die in der Curli-Fimbrien Produktion involviert sind, sind in zwei divergent transkribierten Operonen organisiert. Das Operon *csgBAC* (csg steht für curli structural genes) kodiert für die strukturellen Komponenten und das *csgDEFG*-Operon kodiert für den transkriptionalen Aktivator (CsgD) und für die Exportmaschinerie (CsgE-F) [Römling *et al.* 1998a].

Das Gen *csgA* kodiert für die Untereinheit der Curli-Fimbrien und *csgB* für ein Nukleator-Protein, welches die Verankerung der Curli-Fimbrien an die Außenmembran ermöglicht. CsgG ist in der Außenmembran lokalisiert und verhindert die Proteolyse der Proteine CsgA und CsgB. Es lagert sich zu einem oligomeren Komplex mit einer zentralen Pore zusammen und vermittelt die CsgA-Sekretion. CsgE und CsgF sind an der Komplexbildung von CsgG beteiligt [Römling *et al.* 1998a, Robinson *et al.*, 2006].

Curli-Fimbrien sind proteinöse, flexible Filamente und werden von Vertretern der *Enterobacteriaceae*, wie *Escherichia coli*, *Shigella*, *Citrobacter* und *Enterobacter* exprimiert [Smyth *et al.*, 1996]. Sie aggregieren an der Zelloberfläche zu Strukturen mit sechs bis zwölf nm Durchmesser und ihre Länge variiert von 0.5 bis 1µm. Curli-Fimbrien können eine Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix binden wie beispielsweise Plasminogen, Laminin und Fibronectin [Olsen *et al.*, 1989, Ben Nasr *et al.*, 1996], aber sie vermitteln auch die Anheftung von Bakterien an verschiedene humane Zellen. Zudem können Curli-Fimbrien auch an abiotische und biotische Oberflächen binden und ermöglichen so die Reifung des Biofilms [Römling & Rohde, 1999]. Curli-Fimbrien können auch an Cellulose binden. Die Co-Expression von Cellulose und Curli-Fimbrien führt zur Bildung einer inerten, hydrophoben extrazellulären Matrix [Zogaj *et al.*, 2003].

Neben den Curli-Fimbrien besitzt *E. coli* eine weitere Klasse von Fimbrien, um die Bakterien-Oberflächen-Interaktion während der irreversiblen Anheftung zu verstärken, die Typ 1 Fimbrien. Diese filamentösen, proteinösen Adhäsine kommen sowohl in kommensalen als auch in pathogenen *E. coli*-Isolaten vor [Sauer *et al.*, 2000]. Bakterien, die Pili exprimieren, präsentieren zwischen 100 bis 500 Pili auf ihrer Oberfläche und diese 0.2 bis 2 µm langen röhrenförmige Strukturen haben einen Durchmesser von fünf bis sieben nm [Beloin *et al.*, 2008]. Typ 1 Fimbrien können, Mannose-abhängig, an einer Vielzahl von Rezeptormolekülen auf der eukaryotischen Oberfläche adherieren [Duncan *et al.*, 2005] und sie gelten als wichtiger Virulenzfaktor pathogener *E. coli* [Kaper *et al.*, 2004].

#### 1.3.2.2 Cellulose

Für die Reifung des bakteriellen Biofilms werden Matrixkomponenten benötigt. Cellulose, der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, ist ein Homopolysaccharid, welches aus β-1-4-glykosidisch verbundenen D-Glucopyranose-Einheiten zusammengesetzt ist. Außerhalb des Pflanzenreiches kann Cellulose von vielen Vertretern der *Enterobacteriaceae*, wie *Salmonella ssp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., Gluconacetobacter xylinus* und *Escherichia coli*, produziert werden [Solano *et al.* 2002, Zogaj *et al.*, 2003]. Es wird vermutet, dass Cellulose bei Enterobakterien besonders auβerhalb des Wirtes eine große Rolle spielt, wie beispielsweise bei der Biofilmbildung oder Zell-Zell-Interaktion [Römling, 2002]. Das Polysaccharid Cellulose ermöglicht beispielsweise *Rhizobium spp.* die Adhärenz an die Wurzeln der Wirtspflanze [Smit *et al.*, 1992], kann aber auch wie im Fall von *G. xylinus* Schutz vor UV-Strahlung bieten [Brown, 2004]. Bei *S. enteritidis* wird durch Cellulose die Resistenz gegen Chlorine gesteigert [Solano *et al.*, 2002]. Welche konkrete Rolle die Cellulose-Bildung bei Enterobakterien im klinischen Bereich spielt, ist noch nicht eindeutig nachgewiesen. Die bisherigen Informationen lassen den Schluss zu, dass Cellulose keinen Effekt auf die Virulenz von Enterobakterien hat [Solano *et al.*, 2002].

Erste Untersuchungen zur bakteriellen Cellulose-Synthese fanden in G. xylinus statt [Ross et al., 1991]. Genetische Untersuchungen zeigen, dass bei S. Typhimurium und E. coli die Gene für die Cellulose-Synthese, homolog zu G. xylinus, in zwei divergent transkribierte Operonen *bcsOABZC* und *bcsEFG* (bcs steht für bacterial cellulose synthesis) organisiert sind. Bei BcsA handelt es sich um ein zytoplasmatisches Membranprotein, welches die katalytische Untereinheit des Cellulose-Synthese-Komplexes ist. Die Funktion des BcsB-Proteins ist unbekannt. Das BcsZ-Protein ist als Endo-1,4-B-Glucanase ebenfalls an der Cellulose-Biosynthese beteiligt [Zogaj et al., 2001]. Das Gen bcsC kodiert für eine putative Oxidoreduktase und ist wahrscheinlich an der Bildung eines Membran-gebundenen Protein-Komplexes beteiligt, der die Extrusion der Cellulose ermöglicht [Römling, 2002]. Die Funktion des *bcsEFG*-Operons bei der Cellulose-Biosynthese ist noch nicht eindeutig geklärt. Während das Protein BcsG als Endoglucanase und das Protein BcsE als Protease identifiziert wurden, ist die Funktion des Proteins BcsF noch nicht bekannt [Solano et al., 2002]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das direkt vor *bcsA* liegende Gen *bcsO* ebenfalls Teil der Cellulose-Produktion ist. Dieses Gen kodiert für ein MinD-Homolog (MinD ist an der korrekten Septumbildung während der Zellteilung beteiligt) und ist vermutlich für die polare Lokalisierung des Cellulose-Komplexes verantwortlich [Le Quéré & Ghigo, 2009].

Die Produkte der *bcs*-Gene sind allerdings *per se* nicht ausreichend für die Cellulose-Synthese. Dieser Prozess benötigt eine post-translationelle Aktivierung durch den sekundären Botenstoff c-di-GMP. Diese Regulation erfolgt über die transkriptionelle Aktivierung des Genes *adrA* (*yaiC* in *E. coli*) durch den Biofilmregulator CsgD (Abb. 1.4). Das Gen *yaiC* kodiert für ein GGDEF-Domänen-Protein. Durch die Bindung, des durch YaiC produzierten, c-di-GMP an die PilZ-Domäne von BcsA wird die Cellulose-Synthese aktiviert [Römling, 2002, Amikan & Galperin, 2006, Ryjenkov *et al.*, 2006].

## **1.4** kleine regulatorische RNAs

Wichtige Regulatoren bei der schnellen Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen sind kleine regulatorische RNA. Sie sind als posttranskriptionale Regulatoren ubiquitär in Bakterien und Eukaryoten verbreitet [Chapman & Carrington, 2007; Waters & Storz, 2009]. Eukaryotische mikro-RNAs (miRNAs) und die meisten bakteriellen kleinen RNAs (sRNAs, nicht-kodierende RNAs) binden über den Gegenstrang-Mechanismus (antisense) an ihre ZielmRNA.

In *E. coli* sind insgesamt mehr als 80 sRNAs experimentell bestätigt und viele benötigen für die Bindung an die Ziel-mRNA das RNA Chaperon Hfq. Dieses Chaperon bindet bevorzugt an AU-reiche Bereiche von RNA-Sequenzen. Durch die Bindung an Hfq werden die kleinen RNAs stabilisiert und die Bindung an die Ziel-mRNA unterstützt [Vogel & Luisi, 2011].

Kleine RNAs lassen sich aufgrund ihrer Lage im Genom in zwei Gruppen einteilen, *cis-* und *trans-*kodierte RNAs. Die *cis-*kodierten RNA sind auf dem Gegenstrang der Ziel-mRNA kodiert und basenpaaren meist komplett mit der Ziel-mRNA. Sie besitzen häufig nur ein Ziel und können zwischen 50 und 350 Nukleotiden lang sein. *Cis-*kodierte RNAs sind an der Regulation von Plasmiden und Transposons und an der Regulation von Stoffwechselprozessen und der Stressantwort beteiligt [Brantl, 2007]. Die *trans-*kodierten kleinen RNAs liegen an einer anderen Stelle im Genom, als ihre Ziel-mRNA. Sie sind 50 bis 250 Nukleotide lang und können mehr als ein Ziel regulieren. *Trans-*kodierte RNAs weisen meist nur eine geringe Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA auf [Storz *et al.*, 2011].

Die Bindung der kleinen RNA an die Ziel-mRNA hat meist den Abbau dieser oder die Verhinderung der Translation durch Maskierung der Ribosomenbindestelle zur Folge [Massé *et al.*, 2003]. In manchen Fällen führt die Bindung der kleinen RNA an die Ziel-mRNA aber auch zu einer verbesserten Ribosomenbindung oder zu einer erhöhten mRNA-Stabilität [Urban & Vogel, 2008]. Zusätzlich können kleine regulatorische RNAs auch auf

Proteinebene wirken und dabei die Aktivität ihres Ziel-Proteins beeinflussen. Die bekanntesten Vertreter der sRNAs mit Wirkung auf die Proteinaktivität sind CsrB und CsrC (s. 1.6). Weitere Vertreter sind 6S und GlmY [Gottesman & Storz, 2011].

Viele enterobakterielle *trans*-kodierte sRNAs reprogrammieren die Proteinexpression als Antwort auf spezifische Veränderungen der Umwelt und unter Stressbedingungen. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten *cis*-kodierten sRNAs, werden *trans*-kodierte sRNAs meist nur unter spezifischen Bedingungen exprimiert. In *E. coli* sind regulatorische RNAs beispielsweise bei Bedingungen mit limitierendem Eisenangebot (Fur reprimiert RyhB), bei oxidativem Stress (OxyR aktiviert OxyS), bei Außenmembranstress ( $\sigma^{E}$  induziert MicA and RybB), bei erhöhtem Glycingehalt (GcvA induziert GcvB), bei Veränderungen der Glukosekonzentration (CRP reprimiert Spot42 und CRP aktiviert CyaR) und bei erhöhten Glukose-Phosphat-Konzentrationen (SgrR aktiviert SgrS) reguliert [Görke & Vogel, 2008; Gottesman, 2005].

Mehrzahl der bisher gefundenen kleinen trans-kodierten RNAs regulieren Die Außenmembranproteine (MicA, MicC, MicF, RybB, CyaR, OmrA und OmrB) oder Transporter (SgrS, RydC, GcvB) [Waters & Storz, 2009]. Veränderungen in der Zusammensetzung der Außenmembranproteine können durch verschiedene ZKS, wie das Rcs-Phosphorelay-System (s. 1.5) oder das beispielsweise ArcAB-System, wahrgenommen werden und beeinflussen so viele Prozesse, unter anderem auch die Biofilmbildung. aerob/anaerob-wahrnehmende Zweikomponentensystem ArcAB Das reprimiert beispielsweise die Expression der 120 bp groß sRNA ArcZ. Die sRNA ArcZ wiederum hat einen aktivierenden Einfluss auf die rpoS-Translation [Mandin & Gottesmann, 2010]. Der Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS spielt eine wichtige Rolle bei der Curli-Expression und bei der Biofilmbildung [Pesavento et al, 2008, Weber et al., 2006].

# 1.5 das Rcs-Phosphorelay-System

Unter spezifischen Wachstums- und Umweltbedingungen bildet sich um die bakterielle Zelle eine schützende Kapsel (mukoider Phänotyp auf Agarplatten). Diese besteht aus einem negativ geladenen Polymer aus Glukose, Galaktose, Fruktose und Glukuronsäure und wird Kolansäure (colanic acid; CA) oder M Antigen genannt. Dieses Polysaccharid ist bei *E. coli*, aber auch bei anderen Spezies der *Enterobacteriaceae* weit verbreitet [Grant *et al.*, 1969]. Die Expression der Kapselsynthesegene (*wza*-Operon) wird in *E. coli* durch das Rcs-Phosphorelay-System kontrolliert. Dieses Zwei-Komponenten-System gehört zu den Signaltransduktionssystemen der bakteriellen Zelle.

## 1.5.1 Genregulation durch Zwei-Komponenten-Systeme

Die Zwei-Komponenten-Systeme (ZKS) ermöglichen es den Bakterien die ständig wechselnden Umwelteinflüsse der Umgebung, wie das Angebot verschiedener Nährstoffe, das Auftreten von toxischen Substanzen, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Osmolarität und zahlreiche andere Faktoren, wahrzunehmen und an das Innere der Zelle weiterzuleiten. Zwei-Komponenten-Systeme übernehmen eine wichtige Funktion bei Chemotaxis, Metabolismus, Transport, Pathogenität und Osmoregulation [West & Stock, 2001].

Typische ZKS enthalten ein Membran-gebundenes Sensorprotein (Sensorkinase), welches mit einem zytoplasmatischen Regulatorprotein (Response Regulator) über Phosphotransfer in Kommunikation steht. In *E. coli* sind circa 60 Sensorkinasen und Response Regulatoren bekannt. Die meisten von ihnen sind in zusammengehörigen Paaren organisiert [Mizuno, 1997].

Beim prototypischen Modell wird der Reiz mit dem N-Terminus der Sensorkinase wahrgenommen und führt zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung an einem spezifischen Histidin (H1). Die so aktivierte Kinasefunktion kann die Phosphatgruppe dann auf ein Aspartat (D1) im Response Regulator übertragen. Diese Phosphorylierung ermöglicht dem Regulatorprotein, welcher typischerweise eine DNA-bindende Domäne besitzt, die Transkription einer Reihe von Genen aktivieren, die spezifisch als Antwort auf den Reiz benötigt werden. Die Dephosphorylierung des Response Regulators durch eine spezifische Phosphatase führt zum Abschalten der Antwort. Die Funktion der Phosphatase wird häufig von der Sensorkinase selbst übernommen. Ein Beispiel für ein prototypisches Modell ist das BarA/UvrY-System (s. 1.6). Neben den klassischen (orthodoxen) Zweikomponentensystemen gibt es auch die unorthodoxen Multikomponentensysteme. Ein solches System besitzt neben den typischen Proteinen so genannte Hybridsensorproteine. Diese besitzen eine komplexere Architektur und Funktion, denn sie weisen neben ihrer Histidin-Transmitter-Domäne (H1) noch zwei weitere Domänen (D1 und H2 in der Hpt-Domäne) auf. In vielen Fällen ist die Receiverdomäne D1 an die Transmitter-Domäne (H1) der Sensorkinase fusioniert. Nach der initialen Autophosphorylierung am H1 wird die Phosphatgruppe über D1 auf ein weiteres Histidin (H2) in der Hpt-Domäne übertragen. Die Hpt-Domäne ist entweder als eigenständige Domäne oder als Teil der D1-Domäne der Sensorkinase nachfolgend am Phosphotransfer beteiligt. Erst jetzt erfolgt der Phosphotransfer auf den Response Regulator (D2). Durch Hybridsensoren wird eine zusätzliche Modulation der Signaltransduktion zum Response Regulator oder eine Möglichkeit für die Regulation weiterer Signalwege erreicht [Matsushika & Mizuno, 1998].

Die besondere Struktur der Phosphorelay-Systeme ermöglicht eine so genannte Kreuzregulation in der Zelle. Kreuzregulation ist definiert als die Phosphorylierung eines Responseregulators durch eine Nichtpartner-Sensorkinase mit physiologischer Relevanz *in vivo* [Wanner, 1992, Bijlsma & Groisman, 2003]. *E. coli* besitzt insgesamt fünf Phosphorelay-Systeme (ArcB/ArcA, EvgA/EvgS, TorS/TorR, BarA/UvrY und RcsC/D/B), die abhängig von den eintreffenden Umweltsignalen spezifische Antworten in der Zelle auslösen.

### 1.5.2 Die Komponenten des Rcs-Phosphorelay-Systems

Das Rcs-Phosphorelay-System spielt eine wichtige Rolle in der Adaptation der bakteriellen Zelloberfläche beim Wachstum auf Oberflächen [Ferrieres & Clarke, 2003] und neben der Aktivierung der CA-Synthesegene, erfüllt das Rcs-Phosphorelay-System noch viele weitere Aufgaben. Es reprimiert den Masterregulator der Flagellensynthese (*flhDC*), beeinflusst die Zellteilung (*ftsZ*), reguliert die Expression der kleinen RNA RprA und ist im wesentlichen an der Regulation der Biofilmbildung beteiligt [Majdalani und Gottesman, 2005] (Abb. 1.5). Dieses unorthodoxe ZKS setzt sich aus der Sensorkinase RcsC, dem Hpt-Protein RcsD (früher YojN) und dem Responseregulator RcsB zusammen.



Abb. 1.5: Modell für die Signaltransduktionskaskade für RcsB- und RcsAB-abhängige Gene. Der Phosphattransfer von RcsC zu RcsB ist dargestellt. Es gibt Hinweise dafür, dass die Phosphatgruppe auch wieder von RcsB über RcsD zurück auf RcsC übertragen werden kann. Das Rcs-Phosphorelay-System scheint Signale von der Zelloberfläche und aus dem Periplasma wahrzunehmen. Weitere Erläuterung siehe Text [Majdalani & Gottesman, 2005].

Die membranständige Sensorkinase RcsC ist aus folgenden Domänen aufgebaut: eine periplasmatische Domäne, 2 Transmembranhelices, eine zytoplasmatische PAS-Domäne, die und die charakteristische Transmitter-Domäne (H1) Receiverdomäne (D1) [Clarke et al., 2002]. Das Phosphat wird, nach der Autophosphorylierung, von RcsC auf das eigenständige Hpt-Protein RcsD übertragen (Abb. 1.5). Das ebenfalls membranständige RcsD besitzt zwei Transmembranhelices, eine N-terminale periplasmatische Domäne und die C-terminale Hpt (H2)-Domäne. Von RcsD wird das Phosphat auf RcsB übertragen (Abb. 1.5). Der Response Regulator RcsB zeichnet sich durch eine N-terminale Receiverdomäne (D2) und eine C-terminale DNA-bindende Domäne aus. Diese besitzt das Helix-turn-Helix Motiv, welches zur Bindung an die DNA notwendig ist und zur Familie der LuxR-Proteine gehört [Takeda et al., 2001].

Die Phosphorylierung des Responseregulators RcsB führt zu dessen Aktivierung als Transkriptionsfaktor. RcsB kann alleine oder mit dem zusätzlichen Faktor RcsA die Genexpression steuern (Abb. 1.5). RcsA besitzt, wie RcsB, eine Helix-turn-Helix Domäne der LuxR-Familie für die spezifische DNA-Bindung und unterliegt einer starken Kontrolle durch die Protease Lon [Stout *et al.*, 1991]. Durch diese Kombination zweier DNA-bindender Domänen können unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Ziele angesprochen werden. So wird die Expression der kleinen RNA RprA durch ein Homodimer aus RcsB aktiviert [Majdalani et al., 2002], wohingegen die Kapselsynthesegene (wza) vom Heteromer aus RcsAB aktiviert werden [Ebel & Trempy, 1999]. Stratmann et al. (2012) und Johnson et al. (2011) konnten zeigen, dass RcsB auch mit anderen Helix-turn-Helix-Proteinen Bindungen zur Regulierung der Transkription eingeht. Das Rcs-Phosphorelay-System kann durch die Kombinationen aus Phosphorelay-System und unterschiedlichen Heterodimerbildungen viele verschiedene Signale, aber auch unterschiedlichste Antworten vereinen. Obwohl die physiologischen Signale des Rcs-Phosphorelay-Systems noch unbekannt sind, konnte bisher gezeigt werden, dass die Fehllokalisierung von Lipoproteinen [Shiba et al., 2012], Peptidoglykanstress [Laubacher & Ades, 2008], niedrige Temperaturen und die Anwesenheit von Zink und Glukose in der Umgebung [Hagiwara et al., 2003] durch RcsC und ein weiteres, in der Außenmembran lokalisiertes Lipoprotein, RcsF, wahrgenommen werden können (Castanie-Cornet et al., 2006). Zusätzlich dazu führen auch Bedingungen wie hohe Osmolarität und das Wachstum auf einer feuchten Oberfläche zur Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems [Majdalani und Gottesman, 2005]. Dieses System spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung des Biofilms, denn es liefert die Komponente -CAreprimiert Faktoren wie Flagellen für die Struktur und und Curli-Fimbrien [Ferrieres & Clarke, 2003].

## **1.6 Das Csr-System**

Der ursprünglich als Repressor der Genexpression in der Stationärphase gefundene Regulator CsrA kontrolliert primäre und sekundäre Stoffwechselwege, Biofilmbildung, Motilität, Virulenz pathogener Organismen und Stressantwortsysteme [Romeo *et al.*, 2012]. Dieses RNA-bindende Protein CsrA beeinflusst die Stabilität und die Translation einer Reihe von mRNAs. Die Ziel-mRNA wird meist mehrfach durch Homodimere von CsrA an einem hoch konservierten Element, ein GGA innerhalb einer Schleife des Transkripts, gebunden [Dubey *et al.*, 2005, Mercante *et al.*, 2006]. CsrA bindet auch sein eigenes Transkript und reprimiert so dessen Translation (Abb. 1.6). Diese autoregulatorische Schleife fördert einen schnellen Mechanismus zur Reduktion von CsrA in der Zelle, wenn beispielsweise die Konzentration an freiem CsrA in der Zelle zu hoch ist [Yakhnin *et al.*, 2011].

CsrA aktiviert das ZKS BarA/UvrY [Suzuki *et al.*, 2002] (Abb. 1.6). Bei BarA handelt es sich um eine Hybridsensorkinase, bei UvrY um einen typischen Response Regulator der

FixJ-Familie. Allgemein ist das BarA/UvrY-System entscheidend für eine effiziente Adaptation an verschiedene Stoffwechselwege, und es erfüllt eine essentielle Funktion für die Anpassung an neue Umgebungen [Pernestig *et al.*, 2003]. Orthologe dieses Systems sind auch in anderen gramnegativen Bakterien bekannt. Dort sind sie an der Regulation von Virulenzfaktoren beteiligt [Fortune *et al.*, 2006]. Die Aktivierung des BarA/UvrY-ZKS scheint mit den Produkten des Kohlenstoff-Stoffwechsels, wie Acetat, kurze Carboxylsäuren und möglicherweise auch mit Zwischenprodukten des Krebs-Zyklus verbunden zu sein [Chavez *et al.*, 2010]. Als Zielgene des BarA/UvrY-ZKS sind unter anderem die Gene *rpoS*, *csrB* und *csrC* bekannt [Mika, 2006; Pernestig *et al.* 2003; Suzuki *et al.*, 2002].

Die Gene *csrB* und *csrC* kodieren für nicht-translatierte., kleine RNAs, die in der Lage sind CsrA zu binden. Bei CsrB handelt es sich um eine 369 bp und bei CsrC um eine 245 bp große sRNA. Diese beiden RNAs konkurrieren in der Zelle mit den mRNAs um CsrA und wirken als Antagonisten (Abb. 1.6). CsrB und CsrC sequestrieren CsrA [Liu *et al.*, 1997, Weilbacher *et al.*, 2003] und bilden zusammen einen inerten Komplex. Die beiden RNAs modulieren die Aktivität, nicht aber die Konzentration von CsrA [Gudapaty *et al.*, 2001].



#### Abb. 1.6: Der autoregulatorische Kreislauf des Csr-Systems.

CsrA bindet seine eigene mRNA und inhibiert so die Translationsinitiation. CsrA aktiviert auch indirekt seine eigene RpoS-abhängige Transkription über die Aktivierung der Translation vom rpoS Transkript. CsrA aktiviert die Expression seiner beiden RNA Antagonisten CsrB und CsrC, über das ZKS BarA/UvrY. Die kleinen RNAs besitzen mehrere CsrA-Bindestellen und sind so in der Lage mehrere CsrA-Dimere zu sequestrieren. CsrA reprimiert die Expression von CsrD ein wenig. CsrD ist ein Protein, welches für den Abbau der kleinen RNAs CsrB und CsrC durch RNase E und PNPase notwendig ist. [Yakhnin *et al.*, 2011]

Das membranständiges GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD (YhdA) ist ein weiterer Regulator dieses Systems. Eine Beteiligung dieses Proteins am c-di-GMP-Kreislauf kann aufgrund der degenerierten GGDEF- und EAL-Domänen ausgeschlossen werden. Interessanterweise weist dieses Protein eine N-terminalen RNA-Binde-Domäne auf und beeinflusst die Expression von *csrB* und *csrC* [Jonas *et al.*, 2006]. Suzuki *et al.* (2006) zeigten zusätzlich, dass CsrD, nicht als Ribonuklease, am Abbau der beiden kleinen RNAs beteiligt ist. Die Degradierung von CsrB und CsrC erfolgt durch die Hauptnuklease für den Abbau von mRNAs, RNase E. Durch die Bindung von CsrD an die beiden kleinen RNAs kommt es möglicherweise zu einer Konformationsänderung, so dass CsrB und CsrC vom Degradosom (Komplex aus der Endoribonuklease RNase E, der Phosphat-abhängigen Exoribonuklease Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) und der DEAD-box RNA Helikase B (RhIB)) als Substrate erkannt werden können (Abb. 1.6). Für die Aktivität von CsrD sind die GGDEFund EAL-Domäne notwendig. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss von CsrD auf weitere kleine RNAs und die Biofilmbildung näher untersucht und ist im Ergebnisteil dargestellt.

Das Csr-System ist, wie der sekundäre Botenstoff c-di-GMP, an der Umschaltung zwischen motilem und sessilem Stadium beteiligt. Möglicherweise handelt es sich um den "Gegenspieler" von c-di-GMP. Denn CsrA stabilisiert beispielsweise die *flhDC*-mRNA und fördert so die Motilität, während es die pgaABCD-mRNA destabilisiert und somit die Synthese der Matrixkomponente ß-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) verhindert. Dieses Polysaccharid, welches die Bindung an abiotische Oberflächen und interzelluläre Adhäsion während der Biofilmentwicklung vermittelt [Agladze et al., 2005], ist in vielen verschiedenen bakteriellen Spezies, wie E. coli, Salmonella spp., Yersinia pestis, Staphyloccocus aureus und Actinobacillus zu finden (als pgaABCD, icaADBC oder hmsHFRS bezeichnet) [Karatan & Watnick, 2009]. Für die Synthese von PGA wird die pgaABCD-Gengruppe benötigt. Dieser Lokus ist in die Synthese und Translokation von PGA involviert und bei der Oberflächenandockung in vielen Eubakterien beteiligt [Wang et al., 2004]. Das Gen pgaA (und sein Homolog hmsH) kodiert für ein Porin-ähnliches Protein, welches wahrscheinlich für die Sekretion von PGA benötigt wird. Die Deacetylierung des N-Acetylglucosamin-Polymers wird durch das Protein PgaB (und seine Homologe HmsF und IcaB) übernommen. Die Deacetylierung ist für den Export zur Zelloberfläche wichtig. Die Glykosyltransferase PgaC (und seine Homologe HmsR und IcaA) ist notwendig für die Katalyse des N-Acetylglucosamin-Polymers. Das letzte Gen des Operons pgaD (und sein Homolog hmsS)

kodiert für ein Innenmembranprotein, welches wichtig für die PGA-Synthese ist [Karatan & Watnick, 2009].

CsrA beeinflusst die Biofilmbildung aber nicht nur über die Matrixkomponente PGA, sondern es beeinflusst auch die Expression verschiedener GGDEF/EAL-Gene. So führt die Überproduktion von CsrA zur Induktion von *yddV* (GGDEF), *yliF* (GGDEF), *dos* (GGDEF-EAL), *yhjK* (GGDEF-EAL), *csrD* (GGDEF-EAL), *yliE* (EAL) and *yjcC* (EAL) und zur Repression der Gene *ycdT* and *ydeH* [Jonas *et al.*, 2008].

# 2. Zielsetzung

Ein Bakterium kann sich, als unmittelbare Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen, entscheiden, sich niederzulassen oder weiter zu schwimmen. Der Wechsel von der motilen in die sessile Lebensweise ist eng mit der verstärkten Synthese des sekundären Botenstoffes c-di-GMP verknüpft. Während ein hoher zellulärer Spiegel an c-di-GMP mit der Biofilmbildung assoziiert ist, geht niedriger der Motilität ein mit einher [Pesavento et al., 2008]. Das gramnegative Bakterium Escherichia coli (E. coli) besitzt 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine. Diguanylatzyklasen (DGC) besitzen eine GGDEF-Domäne und produzieren c-di-GMP aus 2 GTP. Den Abbau dieses Moleküls übernehmen spezifische Phosphodiesterase (PDE), die eine EAL-Domäne besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch Expressionsstudien, mit Hilfe von *lacZ*-Reportergenfusionen und durch Charakterisierung von Mutationen in GGDEF/EAL-Domänen-Proteinen, folgenden Fragestellungen geklärt werden:

1) welche GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in welcher Phase des Wachstums (exponentielle oder stationäre Phase), unter welcher Bedingung (flüssige oder feste Umgebung) und bei welcher Temperatur (37°C oder 28°C) exprimiert sind

2) welche der Promotoren der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Gene unter der Kontrolle des Stationärphasen-Sigmafaktors RpoS und damit unter der Kontrolle der generellen Stressantwort stehen und

3) welche GGDEF/EAL-Domänen-Proteine an der Regulation der Motilität und der Biofilmbildung beteiligt sind.

Ein wichtiger Kontrollpunkt bei der Umschaltung von der motilen in die sessile Phase ist der Biofilmregulator CsgD. Dieser wird auf Ebene der Transkription durch mehr als zehn Transkriptionsfaktoren (CpxR, Crl, CRP, CsgD, FlhDC, HNS, IHF, MlrA, OmpR, RcsB und RstA), zwei Sigmafaktoren (RpoD und RpoS) und den Sekundärbotenstoff c-di-GMP (über die Kontrollmodule YdaM/YciR und YegE/YhjH) kontrolliert [Ogasawara *et al.*, 2011, Pesavento *et al.*, 2008, Weber *et al.*, 2006] und auf posttranskriptionaler Ebene übernehmen fünf sRNAs (OmrA, OmrB, RprA, McaS und GcvB) die Regulation [Holmqvist *et al.*, 2010, Thomason *et al.*, 2012, Jørgensen *et al.*, 2012, Mika *et al.*, 2012]. Als Transkriptionsfaktor aktiviert CsgD unter anderem das Operon *csgBAC* und das Gen *adrA* (*yaiC* in *E. coli*). Bei dem Operon *csgBAC* handelt es sich um das Strukturoperon der adhäsiven Curli-Fimbrien, die eine wichtige Funktion bei der irreversiblen Anheftung in der Biofilmentwicklung spielen. Das Gen *yaiC* kodiert für eine DGC. Über die transkriptionale Kontrolle auf *yaiC* kontrolliert CsgD indirekt die Cellulose-Synthese, da hierfür die allosterische Bindung von c-di-GMP an die Cellulose-Synthase notwendig ist [Ryjenkov *et al.*, 2006].

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Wirkmechanismus eines speziellen GGDEF/EAL-Domänen-Proteins, CsrD, näher untersucht werden. Beide Domänen von CsrD sind degeneriert und eine Beteiligung an der c-di-GMP-Synthese oder am c-di-GMP-Abbau kann aufgrund dessen ausgeschlossen werden. Suzuki *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass CsrD den Abbau zweier kleiner RNAs CsrB und CsrC beeinflusst. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss von CsrD auf weitere kleine RNAs (OmrA, OmrB, RprA und ArcZ), die an der Regulation des Masterregulators der Curli-Fimbrien (CsgD) direkt oder indirekt beteiligt sind, näher untersucht. Im Laufe dieser Untersuchung konnte ein Einfluss von CsrD auf das Rcs-Phosphorelay-System gezeigt werden. Dieses Zweikomponentensystem spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung von Biofilmen [Clarke, 2010]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte schließlich geklärt werden, über welche Komponente das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD einen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System ausübt.

Parallel zur vorliegenden Arbeit zeigte sich in den Transkriptom-Studien von S. Busse (2009), dass die kleine RNA RprA ein wichtiger Regulator für *csgD*-Transkription ist. Mika *et al.* (2012) zeigten, dass RprA direkt an die *csgD*-mRNA bindet. Dadurch entstand die Hypothese, dass CsgD und RprA sich wechselseitig kontrollieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand nun darin mittels eines globalen Ansatzes das CsgD/RprA-Regulon aufzuklären.

Insgesamt sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Regulation und Funktion des GGDEF- und EAL-Netzwerkes in *E. coli* führen und die Rolle von CsgD im global regulatorischen Netzwerk der Biofilmbildung besser beleuchten.

# 3. Material und Methoden

# 3.1. Chemikalien, Materialien und Geräte

Die während dieser Arbeit benutzten Standard-Chemikalien und -Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem, Biorad, Biozym, Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D), Difco Laboratories, Fermentas, Merck, Millipore, New England Biolabs, Roboklon, Roche, Riedel de Haen, Qiagen, Serva, Sigma-Aldrich und VWR International.

Tab. 3.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Geräte

Produkt	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Antibiotika	Roth, Sigma-Aldrich
APS	Roth
Autoklav	Systec
BCIP	Roth
Blotmembranen für Proteine (Roti-PVDF)	Roth
Blotmembranen für RNA (positiv geladene Nylon Membran)	Roche
Blotpapier	Roth, Whatman
Bromphenolblau	Roth
Brutschrank	Memmert
Coomassie Brilliant Blau R-250	Appli-Chem
DNA-Längenmarker 100bp	New England Biolabs
λDNA-BstEII	New England Biolabs
DNA-Polymerasen (Opti-Taq, Phusion, Pfu)	New England Biolabs, Biozym, Fermentas
dNTP / dig-markierte dNTP Stammlösung	Qbiogene, Roche
Elektroporationsapparatur (Gene Pulser XCell)	BioRad
ELISA-Reader (Modell 550)	BioRad
Fotoentwicklermaschine	Protec
Gefrierschränke (-80°C)	Sanyo, New Brunswick
Geldokumentationsanlage	Alpha Innotech
Gelelektrophoreseanlage	Peqlab, Biozym
Inkubatoren	Infors HT
IPTG	Roth
Microarray Scanner: GenePix 4100A	Molecular devices (Axon)
Mikroskop	Axioskop 2. Zeiss
Milchpulver	Roth
NanoDrop	Peqlab
NBT	Appli-Chem
Oligonukleotide	Metabion
ONPG	Roth
PCR-Geräte (Thermocycler)	MWG Biotech, Peqlab
Photometer (Ultraspec 1000)	Pharmacia Biotech
Plasmidpräparationskit	Qiagen, Analytik Jena
Post-labeling Kit	GE Healthcare
Primäre Antikörper (GFP, anti-Dig)	Roche
Proteingrößenstandard	New England Biolabs
QIAquick Gel Extraction Kit/PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas
Sekundäre Antikörper	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Temed	Roth
Thermomixer	Eppendorf
X-Gal	Appli-Chem
Xylene Cyanole	Roth
Zentrifuges	Eppendorf, Heraeus, Thermo Scientific

# 3.2. Rezepte (Medien, Puffer)

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit Wasser angesetzt. Wasser wurde ausschließlich in deionisierter Form (zweifach destilliert) verwendet. Die Sterilisation erfolgte in der Regel mittels Autoklavieren. Hierfür wurden die Lösungen und Festbestandteile für 20 min bei 1 bar auf 121°C erhitzt (feucht autoklaviert). Wenn Lösungen nicht autoklaviert werden konnten, wurden sie mit Filtern der Firma Millipore mit einer Porengröße von 0,25 oder 0,45 µm sterilfiltriert.

### 3.2.1. Rezepte für Flüssigmedien

Luria-Bertani-Medium (LB):	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	7 g
	$H_2O$	ad 1 1
	Sterilisation durch Autoklavieren	
SOB-Medium:	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KC1	0,19 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 1
	Sterilisation durch Autoklavieren	
SOC-Medium:	SOB-Medium	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM
	Die Glukoselösung wurde sterilfiltri	ert die Salzlösungen autoklaviert
2 x TSS-Medium	LB-Medium	ert, die Buiziosungen automatiert.
	PEG-6000	20 % (w/v)
	MgSQ4	100  nM
	DMSO	10 %
10 x M9-Minimal-Basis	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x $H_2O$	75 2 σ
TO X MP Minimu Dusis	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
	NH <sub>2</sub> Cl	10 g
	NaCl	5 g
	H-O	Jg ad 11
	Sterilisation durch Autoklavieren	
	Stermsation durch Autokiavieren	
3.2.2. Rezente für Agarnl	atten	
LB-Agar	Trypton	10 σ
LD IIgui.	Hefeextrakt	5 σ
	NaCl	5 <u>β</u> 7 g
	Span-Agar	/ g 18 σ
	H-O	ad 1.1
	Sterilisation durch Autoklavieren	
X-Gal-Agarnlatten:	I B-A gar	
A-Oai-Agaipiatten.	LD-Agai X Gal	40 mg/l
	X Cal (5 Bromo 4 Chloro 3 Indovi	B D Calaktonyranosid) wurde in
	N N Dimethylformamid galöst	-b-D-Galaktopylanosid) wurde in
TOP A cor	A gar	7 α
10F-Agai.	Agai L D Modium	/ g
	LD-Medium Starilization durch Autoklawieron	au I I
Motilitätaplattap		5 a
Mountaispiatien:	I rypton NaCl	5 g
	INAUL Deata Ager	5 g 2 g
	Dacto-Agai	Jg od 11
	<u>π</u> <sub>2</sub> Ο	au 1 1
	Sterilisation durch Autoklavieren	

## 3.2.3 Zusätze

Die verwendeten Antibiotika wurden als Stammlösungen bei –20°C aufbewahrt und in den in Tab. 3.2 angegebenen Arbeitskonzentrationen eingesetzt.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	$100 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ml in 70 % Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin (Kan)	$50 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	5 mg/ml in 70 % Ethanol	5 µg/ml
IPTG	$1 \text{ M in H}_2 \text{O}$	1 mM
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	500 μg/ml

### Tab. 3.2. Übersicht der verwendeten Zusätze

3.2.3. §	Standard	puffer	und	Lösun	gen
----------	----------	--------	-----	-------	-----

TE-Puffer, pH 8:	Tris-Base	10 mM		
-	EDTA	1 mM		
	Der pH wurde mit HCl auf 8 eingest	de mit HCl auf 8 eingestellt.		
	Sterilisation erfolgte durch autoklavieren.			
Z-Puffer (ß-Galactosidase-Enzympuffer), pH 7:				
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	61 mM		
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	39 mM		
	KCl	10 mM		
	MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	10 mM		
	$H_2O$	ad 1 l		
	Sterilisation durch Filtration			
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyra	nosid (ONPG; nicht älter als 7 Tage)	:		
	ONPG	0,1 g		
	in Wasser aufnehmen; vor Licht sch	ützen; Aufbewahrung bei 4° C.		
6 x DNA-Auftragspuffer:	0,25 % Bromphenolblau			
	0,25 % Xylencyanol			
	30 % Glycerin			
	in 1 x TAE aufnehmen			
50 x TAE:	Tris-Base	242 g		
	Eisessig	57,1 ml		
	0,5 M EDTA	100 ml		
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l		
NaOH-Lösung:	NaOH	0,2 M		
-	SDS	1 %		
	Jedesmal frisch angesetzt			
Northern Blot				
RNA-Ladeputter (für denaturier	rende Formamid-Agarose-Gele):			
	Formamid	/5 ml		
	Formaldehyd-Losung (36%)	9 ml		
	10 x MOPS	15 ml		
	Ficoll 400	3 g		
	Xylen Cyanol	0,025%		
	Bromophenolblau	0,025%		
Ambion-Ladeputter II (fur PAA	/Urea-Gele):	0.5%		
	Formamid	95%		
	EDIA	18mM		
	SDS	0,025%		
	Aylen Cyanol	0,025%		
	Bromophenolblau	0,025%		

10 x TBE	Tris Borsäure 500 mM EDTA (pH 8.0) H <sub>2</sub> O	108 g 55 g 40 ml ad 11
10x MOPS buffer:	MOPS NaAcetat EDTA DEPC	0,4 M 0,05 M 0,01 M 0,1 %
Methylenblaulösung:	Methylenblau DEPC	0,02% 0.1%
Bleaching Puffer:	SSC NaAcetat (pH5,5) SDS DEPC	0,2x 0,3M 1% 0,1%
Blocking Reagenz:	10% Blocking Reagenz (Pulver, Ro	che) in Detektionspuffer 1
Blocking Lösung:	10% Blocking Reagenz mit Waschp	ouffer 3
$20 \times$ SSC:	NaCl	3 M
	NaCitrat	0,3 M
	pH 7,0 (20°C) und autoklavieren	
Waschpuffer 1:	SSC	2x
_	SDS	0,1%
Waschpuffer 2:	SSC	0,5x
	SDS	0,1%
Waschpuffer 3:	Maleinsäure	0,1 M
-	NaCl	0,15 M
	Tween 20	0,3% (v/v)
	mit 10 M NaOH auf pH 7,5 (RT) ei	nstellen
Detektion Buffer:	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	pH 9.5 (20°C)	
Strip-Lösung:	SSC	0,1x
	SDS	0,5%
Mikroarray-Analyse		2
waschputter 1:	22C	2X
	SDS	0,5%
Waschputter 2:	SSC	0,5x
	SDS	0,5%
Waschputter 3:	SSC	0,1x

Protein Analytik		
5x SDS-Probenpuffer:	Tris·HCl, pH 6.8 Glycerin SDS	0,225 M 50% 5%
	Bromphenolblau	0.05%
	DTT	0.25 M
LT buffer:	Tris	36,34 g
	SDS	0,8 g
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	pH 8,8	
UT buffer:	Tris	6,06 g
	SDS	0,8 g
		ad 100 ml
	рН 6,8	
4 % Polyacrylamide gel:	UT buffer	1.25 ml
	Rotiphorese Gel 30 (Roth:	
	Acrylamid:Bisacrylamid = 37.5:1)	0.65 ml
	H <sub>2</sub> O	3.07 ml
	TEMED	5 µl
	10 % APS	25 μl
12 % Polyacrylamide gel:	LT buffer	2.5 ml
	Rotiphorese Gel 30 (Roth:	
	Acrylamid:Bisacrylamid = 37.5:1)	4 ml
	HO	3.45 ml
	TEMED	5 ul
	10 % APS	50 ul
SDS-Laufpuffer:	Tris	25 mM
r i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	Glycerin	0.19 M
	SDS	0.1 %
Färbe-Lösung:	Isopropanol	25%
C	Essigsäure	10 %
	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,05 %
Transblot-Puffer:	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
TBST:	Tris (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0.05 %
TBSTM:	5 % Milchpulver in TBST	
AP-Puffer:	Tris (pH 9.5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM

# 3.3. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die während dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen sind in den Tabellen 3.3., 3.4. bzw. 3.5. aufgelistet. Sämtliche angegebene *lacZ*-Genfusionen sind in Einzelkopien an der  $\lambda$ -att-site integriert (mit Hilfe der integralen Phagen Lambda RS45 oder RS74; als IRS oder  $\lambda$ RS bezeichnet). Mit "DGen", " $\Delta$ Gen" oder "Gen::scar" ist die Deletion eines Gens bezeichnet.

Stamm	Genotyp	Herstellung	Bemerkung	
Stämme hergestellt in dieser Arbeit				
NS118	W3110 <i>Δlac::Tn10</i> yegE (-360,+22)::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS4 neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS119	W3110 Δlac::Tn10 ycdT (-582,+58) ::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS2 neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS120	W3110 Δlac::Tn10 yegE (-360,+22)::lacZ (hybr.) rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion von NS118 mit FS20	diese Arbeit	
NS121	W3110 Δlac::Tn10 ycdT (-582,+58) ::lacZ (hybr.), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion von NS119 mit FS20	diese Arbeit	
NS122	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ</i> (hybr.) yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB350 mit NS18	diese Arbeit	
NS123	W3110 Δlac::Tn10 ydaM (-307, +43)::lacZ (hybr)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS124	<i>W3110 ∆lac::Tn10 ycgF(-364,+46)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> )	Plasmid von N. Tschowri neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS125	W3110 ∆lac::Tn10 mlrA(-199,+91)::lacZ (hybr)	Plamid von H. Weber neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS126	W3110 Δlac::Tn10 yhdA (-245,+21)::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS5 neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS127	W3110 Δlac::Tn10 yddV (-391, +49)::lacZ (hybr)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS128	W3110 Dlac::Tn10 yedQ (-196, +58)::lacZ (hybr)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS129	W3110 ∆lac::Tn10 yliE(-319,+34)::lacZ (hybr)	Plasmid (lange Fusion) von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit	
NS130	W3110 ∆lac::Tn10 ydaM (-307, +43)::lacZ (hybr) rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS123 mit FS20	diese Arbeit	
NS131	W3110 Δlac::Tn10 ycgF(-364,+46)::lacZ (hybr.), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS124 mit FS20	diese Arbeit	
NS132	W3110 <i>Alac::Tn10 mlrA(-199,+91)::lacZ</i> (hybr), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS125 mit FS20	diese Arbeit	
NS133	W3110 <i>Alac::Tn10 yhdA</i> (-245,+21):: <i>lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ), <i>rpoS::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion NS126 mit FS20	diese Arbeit	
NS134	W3110 <i>Alac::Tn10</i> yddV (-391, +49)::lacZ (hybr), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS127 mit FS20	diese Arbeit	
NS135	W3110 <i>Alac::Tn10 yedQ</i> (-196, +58)::lacZ (hvbr), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS128 mit FS20	diese Arbeit	
NS136	W3110 <i>Alac::Tn10</i> yliE(-319,+34)::lacZ (hybr.) rpoS::kann	hergestellt durch P1-Transduktion NS129 mit FS20	diese Arbeit	
NS137	MC4100 ydaM(-307, +43)::lacZ (hybr), yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion CP2 mit NS18	diese Arbeit	
NS138	MC4100 yaiC(-213, +79)::lacZ (hybr), yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion CP6 mit NS18	diese Arbeit	
NS139	MC4100 mlrA(-199,+91)::lacZ (hybr), yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion HW129 mit NS18	diese Arbeit	

Tab. 3.3: Übersicht der verwendeten Stämme

NS140	W3110 <i>Alac::Tn10 mlrA(-199,+91)::lacZ</i> ( <i>hybr</i> ), <i>yhdA::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion NS125 mit NS18	diese Arbeit
NS141	W3110 <i>Alac::Tn10 ydaM (-307, +43)::lacZ</i> ( <i>hybr), yhdA::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion NS123 mit NS18	diese Arbeit
NS142	W3110 Δlac::Tn10 yaiC (-213, +79)::lacZ (hybr), yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS153 mit NS18	diese Arbeit
NS149	W3110 <i>Δlac::Tn10</i> yciR (-296, +64)::lacZ (hybr)	Plasmid von C. Pesavnto neu gekreuzt	diese Arbeit
NS150	W3110 Δlac::Tn10 yliF(-321,+40)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS151	W3110 <i>Δlac::Tn10</i> yciR (-296, +64)::lacZ (hybr) rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS149 mit FS20	diese Arbeit
NS152	W3110 <i>Δlac::Tn10</i> yliF(-321,+40)::lacZ (hybr.) rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS150 mit FS20	diese Arbeit
NS153	W3110 <i>Δlac::Tn10 yaiC</i> (-213, +79)::lacZ (hybr)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit
NS154	W3110 <i>Δlac::Tn10 yaiC</i> (-213, +79)::lacZ (hybr), rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS153 mit FS20	diese Arbeit
NS155	W3110 <i>Δlac::Tn10 yhjH(-279,+49)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ); <i>rpoS::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion AP34 mit FS20	diese Arbeit
NS156	MC4100 <i>yhjH</i> (-279, +49):: <i>lacZ</i> ( <i>hybr</i> .)	Plamid A. Mehlis (?) neu gekreuzt	diese Arbeit
NS157	MC4100 yhjH(-279,+49)::lacZ (hybr.); rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS156 mit FS20	diese Arbeit
NS158	W3110 yliE::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS159	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ), <i>DyegE</i> , <i>yciR::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion GB830 mit HW104	diese Arbeit
NS160	MC4100 yegE (-360,+22)::lacZ (hybr.) lsrA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS161	MC4100 yhdA (-245,+21)::lacZ (hybr.) lsrA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS162	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ); yliE::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB350 mit NS158	diese Arbeit
NS163	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yliE::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB250 mit NS158	diese Arbeit
NS164	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yeaI::cat	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit GB200	diese Arbeit
NS165	W3110 <i>Дlac::Tn10; yeaJ::kan</i>	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS166	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yeaJ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit NS166	diese Arbeit
NS168	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yeaP::kan	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit CP123	diese Arbeit
NS170	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ycgG::cat	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit CP122	diese Arbeit
NS173	W3110 Δlac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ylaB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB350 mit AP78	diese Arbeit
NS174	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ylaB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit AP78	diese Arbeit
NS175	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yfgF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB350 mit AP89	diese Arbeit
NS176	MC4100 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yfgF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion HW142 mit AP89	diese Arbeit
NS178	W3110 Δlac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yliE::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS162	diese Arbeit
NS179	MC4100 <i>csgB</i> (-190, +43):: <i>lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ), <i>DyliE</i>	Deletionsmutante mit pCP20 von NS163	diese Arbeit
NS180	W3110 Δlac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); DyhjH, ycgG::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GB813 mit CP122	diese Arbeit

NS181	W3110 <i>∆lac::Tn10</i> yliF::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS182	MC4100 yliF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
		MC4100 mit NS181	
NS183	W3110 Alac: $Tn10 csgR(-190 + 43)$ : $lac7$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
110100	(hyhr) yliF::kan	GB350 mit NS181	
NC104	MC4100 with the same same $MC4100 + 42$ with $T$	harragetallt dyrah D1 Transdulttion	diasa Arbait
NS164	$MC4100 \ yllF::kan \ csgB(-190, +45)::lacZ$	hergestent durch P1-1 ransduktion	diese Arbeit
	(hybr.)	HW142 mit NS181	
NS185	W3110 ∆lac::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), yliF::kan	AP94 mit NS181	
NS186	W3110 Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr) yhiH··cat yfgF··kan	GB351 mit AP89	
NS187	$W_{2110}$ Algorithm 10 $vd_{a}M(207 + 42)vlas7$	hargestellt durch P1 Transduktion	diese Arbeit
115107	(h,h) $(h,h)$ $(h,h)$	NS122 mit HW102	diese Arbeit
NG100	( <i>hybr</i> ), yaamca		1
NS188	W3110 Δlac::Tn10 mlrA(-	nergestellt durch P1-1 ransduktion	diese Arbeit
	199,+91)::lacZ(hybr), ydaM::cat	NS125 mit HW103	
NS189	W3110 <i>Дlac::Tn10 yaiC (-213, +79)::lacZ</i>	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), ydaM::cat	NS153 mit HW103	
NS190	W3110 Alac: $Tn10 vdaM(-307 + 43)$ $UacZ$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr) yeaP: kan	NS123 mit CP123	
NS101	$W_{2110}$ Algo: $T_n 10 m lr^{\Lambda}$	hergestellt durch D1 Transduktion	diese Arbait
113191	$W 5110 \Delta lac:: 1n10 mirA(-$	NS125 mit CD122	ulese Albeit
	199,+91)::lacZ(hybr), yeaP::kan	NS125 mit CP125	
NS192	W3110 <i>∆lac::Tn10</i> yaiC (-213, +79)::lacZ	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), yeaP::kan	NS153 mit CP123	
NS193	MC4100 IRS45 ydaM (-307, +43)::lacZ	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), yeaP::kan	CP2 mit CP123	
NS194	MC4100 mlrA(-199, +91)::lacZ(hybr).	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	veaP··kan	HW129 mit CP123	
NS195	$MC4100 vaiC(-213 + 79) \cdot lacZ(hybr)$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
113195	MC4100 yulc (-215, +75)ucz (hybr),	CD6 mit CD122	diese Arbeit
NG106	yearkun $M(207 + 42) = T(1 + 1)$		1
NS196	MC4100 yaam (-307, +43)::lacZ (hybr),	nergestellt durch P1-1 ransduktion	diese Arbeit
	yfgF::kan	CP2 mit AP89	
NS197	MC4100 mlrA(-199,+91)::lacZ(hybr),	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yfgF::kan	HW129 mit AP89	
NS198	MC4100 yaiC (-213, +79)::lacZ (hybr),	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yfgF::kan	CP6 mit AP89	
NS199	MC4100 ydaM (-307, +43)::lacZ (hybr),	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	veal::cat	CP2 mit GB200	
NS200	MC4100 mlrA(-199+91)::lacZ(hybr)	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
112200	veal::cat	HW129 mit GB200	
NS201	$MC4100 \text{ wai}C(213 \pm 70) \cdot \cdot \ln 72 (hybr)$	hargestallt durch D1 Transduktion	diasa Arbait
113201	WC4100 yulc (-215, +/9)ucz (hybr),	CD6 mit CD200	ulese Albeit
210202			1
INS202	W 3110 $\Delta lac::Tn10$ ydaM (-307, +43)::lacZ	nergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), ycgG::cat	NS123 mit CP122	
NS203	W3110 <i>∆lac::Tn10 mlrA(-</i>	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	199,+91)::lacZ(hybr), ycgG::cat	NS125 mit CP122	
NS204	W3110 Δlac::Tn10 yaiC (-213, +79)::lacZ	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), ycgG::cat	NS153 mit CP122	
NS205	MC4100 v daM (-307 + 43) :: lac7 (hvbr)	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
110203	weaG::cat	CP2 mit CP122	diese moen
NEOOC	$MC4100 = \pi^2 C (212 + 70) = 4\pi^2 (beckm)$	hannastallt daugh D1 Tuonadulation	diana Aubait
NS200	MC4100 yalc (-215, +/9)::lacZ (nybr),	nergestellt durch P1-1 ransduktion	diese Arbeit
NG20-	ycgG::cat		1
NS207	MC4100 <i>mlrA(-199,+91)::lacZ(hybr)</i> ,	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	ycgG::cat	HW129 mit CP122	
NS208	W3110 <i>Дlac::Tn10 ydaM (-307, +43)::lacZ</i>	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	(hybr), yciR::kan	NS123 mit HW104	
NS209	W3110 Alac: $Tn10 mlrA(-$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
1,5207	$100 \pm 01$ )··lac7(bybr) yei <b>P</b> ··ban	NS125 mit HW104	siese moen
NC210	$\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac$	horgestellt dyrach D1 Transdult's	diago Art-it
115210	w 5110 Диас::1n10 yaiC (-213, +79)::lacZ	NG152 - HUNLOA	ulese Arbeit
	(hybr), yciR::kan	INS153 mit HW104	

NS211	W3110 ∆lac::Tn10 yaiC (-213, +79)::lacZ (hybr), yegE::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS153 mit NS17	diese Arbeit
NS212	W3110 $\Delta lac::Tn10$ yaiC (-213, +79)::lacZ (hybr) yhiH::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS153 mit GB201	diese Arbeit
NGO10			1 1 .
NS213	W3110 <i>Δlac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ), <i>yciR::kan; clpP::cat</i>	GB356 mit HW162	diese Arbeit
NS214	W3110 Alac::Tn10 cheA::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
		(hergestellt im KK07/08)	
NS215	W2110 Algo: Tr 10 yea I: las7	Neu gekreuzt	diese Arbeit
NG216			
NS216	W3110 <i>Alac::Tn10</i> yeaJ::lacZ, rpoS::kan	NS215 mit FS20	diese Arbeit
NS239	W3110 $\Delta lac::Tn10 yoaD(-273,+58)::lacZ$ (hybr) cspD::kan	hergestellt durch P1-Transduktion AP60 mit GB297	diese Arbeit
NS240	$W_{2110} A_{1} = \sqrt{T_{10}} \frac{1}{10} = \sqrt{A_{10}} \frac{1}{10} \frac{1}{10$	hargestallt durch D1 Transduktion	diasa Arbait
115240	w 3110 Δlac::1n10 rprA(-140;+150)::lacZ	apasta in NG246	diese Arbeit
	csrB::cat	SB254 mit NS246	
NS241	W3110 <i>∆lac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ</i> csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion SB254 mit NS245	diese Arbeit
NS242	CP 1000 wahKukan	hargestallt durch D1 Transduktion	diasa Arbait
113242	GB1000 yankkun	GB1000 mit JB25	diese Arbeit
NS243	GB1000 yahO::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1000 mit JB18	diese Arbeit
NS244	W3110 Alac: $Tn10 csoR(-190 + 43)$ ···lac7	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
110211	(hyhr) csrB::cat yhdA::kan	NS246 mit NS32	alose i libelt
NG245	(hyb), csrbcu, yhu $h$ ku $h$	Nou horgestellte Mutente (OSI)	diasa Arbait
NS243	$W3110 \ \Delta lac::1n10 \ csgB(-190, +43)::lacZ$	Neu nergesterne Mutante (OSI)	diese Arbeit
	(hybr.), csrC::kan	(KK08)	
NS246	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
	(hybr.), csrB::cat	(KK08)	
NS247	GB1000 vaiC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
		GB1000 mit CP47	
NS248	$GB1000 csgB(-190 + 43) \cdot \cdot lac7 (transc)$	Plasmid von I. Berkholz neu	diese Arbeit
110240	GD1000 c3gD( 190, 145)uc2 (transc.)	gekreuzt	diese moen
NG240	$CP_{1000} = rh_{0} + l_{\pi} - 7 (l_{\pi} + l_{\pi})$	Discusidaria L. Devidencia accu	diana Aubait
INS249	GB1000 yanO::tac2 (nybr.)	riasinia von J. Berkholz neu	diese Arbeit
NG250	$CD1000   K   Z \langle l   l \rangle$		1 A .1
NS250	GB1000 yank::lacZ (nybr.)	Plasmid von J. Berkholz neu	diese Arbeit
		gekreuzt	
NS251	GB1000 yoaD(-273,+58)::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS3 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS252	GB1000 yaiC (-213,+79)::lacZ (hybr.)	Plasmid von C.Pesavento neu	diese Arbeit
		gekreuzt	
NS253	GB1000 yfiN(-321,+55)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu	diese Arbeit
NGOF 4	$CD1000 \dots (D(200 \dots (d) 1 \dots (d) 1))$	Discontinuer C Destant	
NS254	$GB1000 \ yciR(-290, +04):: lacZ(hybr.)$	Plasmid von C.Pesavento neu	diese Arbeit
		gekreuzt	
NS255	GB1000 ycdT(-582,+58) ::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS2 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS256	GB1000 yhjH(-279,+49)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Mehlis (?) neu gekreuzt	diese Arbeit
NS257	$GB1000 csg B(-190 + 43) \cdot lac 7 (hybr)$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
115257	vahO::kan	GB1100 mit JB18	diese Arben
NS258	$GB1000 csgB(-190 + 43) \cdot lac7 (hybr)$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
113230	SD1000 CSgD(-190, +45)ucZ (hyp),	CD1100 mit ID25	ulese Albeit
NGOSO	CD 1000 = D(100 + 42) + Z(1 + 1)		
NS259	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.),	GB1100 mit NS22	diese Arbeit
NGOCO	CD1000 = ac D(100 + 42) + 1 = 7(1 + 1)	bargastallt deret D1 Tree 1.14	diago Artesia
IN5260	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr.),	GB1100 mit NS33	uiese Arbeit
NG261	$CP1000 arg P(100 + 42) \cdot 4 arg 7 (b) + b$	borgostallt dyrab D1 Transdult's	diago Art -it
115201	UD1000 CSgD(-190,+45)::lacZ (hybr.),	CD1100 with CD201	ulese Arbeit
	ynjH::kann	GB1100 mit GB201	
NS262	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr.),	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yeaP::kann	GB1100 mit CP123	

NS263	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr.), ydaM::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit HW103	diese Arbeit
NS264	W3110 Δlac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ csrB::cat: vhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS240 mit NS32	diese Arbeit
NS265	GB1000 yahO::lacZ (hybr.) yahO::kan	hergestellt durch P1-Transduktion mit IB18	diese Arbeit
NS266	GB1000 yahO::lacZ (hybr.) rpoS::Tn10	hergestellt durch P1-Transduktion mit RH90	diese Arbeit
NS267	GB1000 yahO::lacZ (hybr.) yeaP::kan	hergestellt durch P1-Transduktion mit CP123	diese Arbeit
NS268	GB1000 ) yahK::lacZ (hybr.) yahK::kan	hergestellt durch P1-Transduktion mit JB25	diese Arbeit
NS269	GB1000 ) yahK::lacZ (hybr.) rpoS::Tn10	hergestellt durch P1-Transduktion mit RH90	diese Arbeit
NS270	GB1000 ) yahK::lacZ (hybr.) yeaP::kan	hergestellt durch P1-Transduktion mit CP123	diese Arbeit
NS271	GB1000 yahO::lacZ (hybr.) ycgG::cat	hergestellt durch P1-Transduktion mit CP122	diese Arbeit
NS272	GB1000 yahK::lacZ (hybr.) ycgG::cat	hergestellt durch P1-Transduktion mit CP122	diese Arbeit
NS273	GB1000 ycgF(-364,+46)::lacZ	Plasmid von N. Tschowri neu gekreuzt	diese Arbeit
NS274	GB1000 ycgG(-1813; +46)::lacZ	Plasmid von N. Tschowri neu gekreuzt	diese Arbeit
NS275	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ	Plasmid von S. Busse neu gekreuzt	diese Arbeit
NS276	W3110 csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion W3110 mit NS245	diese Arbeit
NS277	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr.), yciR::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit AR	diese Arbeit
NS278	W3110 csrC::kan, csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS276 mit NS246	diese Arbeit
NS281	W3110 <i>Δlac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ;</i> <i>csrB::cat; csrC::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion NS240 mit NS245	diese Arbeit
NS282	W3110 <i>Alac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ,</i> <i>yhdA::scar; csrC::kan</i>	hergestellt durch P1-Transduktion SB260 mit NS245	diese Arbeit
NS283	W3110 ∆lac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::scar; csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion SB260 mit NS246	diese Arbeit
NS284	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ ((transc.) yahO::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit JB18	diese Arbeit
NS285	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.), yahK::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit JB25	diese Arbeit
NS286	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.), yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit NS32	diese Arbeit
NS287	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.) yegE::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit NS33	diese Arbeit
NS288	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.) yhjH::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit GB201	diese Arbeit
NS289	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.) yeaP::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit CP123	diese Arbeit
NS290	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.) ydaM::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit HW103	diese Arbeit
NS292	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (transc.) yciR::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS248 mit HW104	diese Arbeit
NS293	GB1000 yhdA (-245,+21)::lacZ (hvbr.)	Plasmid pNS5 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS294	GB1000 ylaB(-300,+31)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS295	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion mit NS32	diese Arbeit

NS296	GB1000 <i>yeaP(-309,+40)::lacZ</i> (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu diese Arb	
NS297	GB1000 rtn(-298,+52)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS298	GB1000 ydeH(-321,+43)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS299	GB1000 yneF(-1697,+49)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS300	GB1000 yjcC(-287,+43)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS301	GB1000 yliF(-321,+40)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS302	GB1000 yfeA(-301,+58)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS303	GB1000 yddV(-391, +49)::lacZ (hybr.)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit
NS304	GB1000 yedQ (-196, +58)::lacZ (hybr.)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit
NS305	GB1000 yegE(-360,+22)::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS4 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS306	GB1000 yeal(-228, +31)::lacZ (hybr.)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit
NS307	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ (hybr.)	Plasmid von C. Pesavento neu gekreuzt	diese Arbeit
NS308	W3110 Δlac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ; csrB::cat, csrC::kan; yhdA::scar	hergestellt durch P1-Transduktion NS282 mit NS246	diese Arbeit
NS309	GB1000 yahO::lacZ (transc.)	Plasmid von J. Berkholz neu gekreuzt	diese Arbeit
NS310	GB1000 yfgF(-322,+49)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt	diese Arbeit
NS311	GB1000 yliE(-319,+34)::lacZ (hybr.)	Plasmid von A. Possling neu gekreuzt (lange Fusion)	diese Arbeit
NS312	GB1000 yhjK(-319,+34)::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS1 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS313	GB1000 yeaJ::lacZ (hybr.)	Plasmid pNS6 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS314	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS246	diese Arbeit
NS315	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS245	diese Arbeit
NS316	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB110 mit FM66	diese Arbeit
NS317	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); yhdA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS259	diese Arbeit
NS318	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); csrB::cat; csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS314 mit NS245	diese Arbeit
NS319	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); yhdA::scar; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS317 mit FM66	diese Arbeit
NS320	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); yhdA::scar; csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arb NS317 mit NS246	
NS321	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); yhdA::scar; csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Art NS317 mit NS245	
NS322	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ (hybr); yhdA::scar; csrB::cat; csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arb NS320 mit NS245	
NS323	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit NS246	diese Arbeit
NS324	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit NS245	diese Arbeit
NS325	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, csrB::cat, csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS323 mit NS245	diese Arbeit
NS326	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, yhdA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS295	diese Arbeit

NS327	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, yhdA::scar, csrC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arb NS326 mit NS245	
NS328	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, yhdA::scar, csrB::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS326 mit NS246	diese Arbeit
NS329	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ, yhdA::scar,	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
N\$330	$GB1000 csgB(-190 + 43) \cdots lac7 (hybr)$	NS32/ IIII NS240 hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
110550	yhdA::scar, yahA::cat	NS317 mit GB899	diese moen
NS331	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.),	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yhdA::kan, yahA::cat	NS259 mit GB899	
NS332	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ yahA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit GB899	diese Arbeit
NS333	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::kan, vahA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS295 mit GB899	diese Arbeit
NS334	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::scar,	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yahA::cat	NS326 mit GB899	
NS335	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS307 mit NS68	diese Arbeit
NS336	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ; yhdA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS335	diese Arbeit
NS337	W3110 Δlac::Tn10 ydaM(-307,+43)::lacZ, yhdA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS141	diese Arbeit
NS338	W3110 CRISPR::kan	OSI (Deletion des intergenen	diese Arbeit
		Bereichs zwischen iap und cas2)	
NS339	W3110 csgD::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von GB297	diese Arbeit
NS340	W3110 csgD::scar, rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS339 mit MP111	diese Arbeit
NS341	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; csgD::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit GB295	diese Arbeit
NS342	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; csgD::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS341	diese Arbeit
NS343	W3110 ylaB::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS344	W3110 ylaB::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS345	W3110 yhdA::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS346	W3110 yaiC::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS347	GB1000 rpoS742::lacZ	Plasmid von R. Lange neu	diese Arbeit
		gekreuzt (pRL44)	
NS348	GB1000 rpoS379::lacZ	Plasmid von R. Lange neu	diese Arbeit
		gekreuzt (pRL50)	
NS349	W3110 ydaM::scar	AR	diese Arbeit
NS350	W3110 yhjH::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
NS351	W3110 yegE::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
NS352	W3110 rprA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
		FM66	
NS353	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ, csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS307 mit FM71	diese Arbeit
NS354	W3110 ydaM::scar; csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbo NS349 mit FM71	
NS355	W3110 yhjH::scar, csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS350 mit FM71	diese Arbeit
NS356	W3110 yegE::scar; csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS357	W3110 rprA::scar, csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS352 mit FM71	diese Arbeit

NS358	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbe	
NS359	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit NS345	diese Arbeit
NS360	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ, yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS345	diese Arbeit
NS361	W3110 vdiV··cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS362	W3110 yoaD::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS363	W3110 yedT::cat	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS364	W3110 ngaA::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
N\$365	W3110 yeaF::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
N\$366	$CP1000 hdm (384 + 48) \cdots lac7 \cdot whdA \cdot \cdot kan$	horgestallt durch P1 Transduktion	diose Arbeit
113300	GB1000 bum (-304, +46)uc2, ynuAkun	DON3 mit NS32	diese Albeit
NS367	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS345	diese Arbeit
NS368	W3110 yfgF::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS369	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS307 mit NS32	diese Arbeit
NS370	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ, yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS371	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsC::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS372	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; rcsC::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS373	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsC::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit AP143	diese Arbeit
NS374	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; yhdA::cat; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS359 mit GB302	diese Arbeit
NS376	GB1000 rpoS379::lacZ; csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS348 mit FM71	diese Arbeit
NS377	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ; yhdA::cat; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit GB302	diese Arbeit
NS378	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; yhdA::cat; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit GB302	diese Arbeit
NS379	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit GB302	diese Arbeit
NS380	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit GB302	diese Arbeit
NS381	GB1000 rpoS742::lacZ; csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS347 mit FM71	diese Arbeit
NS382	GB1000 rprA(-146;+150)::lacZ; rcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS275 mit GB302	diese Arbeit
NS383	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ, yhdA::cat; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit MP111	diese Arbeit
NS384	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Art DON3 mit MP111	
NS385	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; yhdA::cat; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit MP111	diese Arbeit
NS386	GB1000 pgaA::lacZ	Plasmid pNS10 neu gekreuzt	diese Arbeit
NS387	W3110 rprA::scar, csgD2::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS357	diese Arbeit
NS388	GB1000 ydaM(-307,+43)::lacZ; rprA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS358	diese Arbeit
NS389	W3110 rprA::scar; csgD2::scar; yegE::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS387 mit AR	diese Arbeit
NS390	W3110 rprA::scar; csgD2::scar; ydaM::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS387 mit AR	diese Arbeit
NS391	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsC::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS371	diese Arbeit

NS392	GB1000 yaiC (-213,+79)::lacZ ; ydaM::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Ar von NS252 mit AR	
NS393	GB1000 rtn(-298,+52)::lacZ; ydaM::kan	hergestellt durch P1-Transduktion von NS297 mit AR	diese Arbeit
NS394	GB1000 pgaA::lacZ rpoS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion yon NS386 mit FM5	diese Arbeit
NS395	GB1000 pgaA::lacZ csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion yon NS386 mit FM71	diese Arbeit
NS396	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rcsB::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS379	diese Arbeit
NS397	GB1000 rpoS742::lacZ; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion von NS347 mit MP111	diese Arbeit
NS398	GB1000 rpoS742::lacZ; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion von NS347 mit NS345	diese Arbeit
NS399	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rprA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS384	diese Arbeit
NS400	GB1000 rpoS379::lacZ; rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS348 mit MP111	diese Arbeit
NS401	GB1000 rpoS379::lacZ; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion von NS348 mit NS345	diese Arbeit
NS402	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsC::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS371	diese Arbeit
NS403	GB1000 flhDC(-1956;+46)::lacZ	Plasmid von C. Barembruch neu gekreuzt	diese Arbeit
NS404	GB1000 flhDC(-1956;+46)::lacZ; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion von NS403 mit NS32	diese Arbeit
NS405	GB1000 flhDC(-1956;+46)::lacZ; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion von NS403 mit NS345	diese Arbeit
NS406	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsC::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion von NS402 mit NS345	diese Arbeit
NS407	GB1000 vdiV(-323, +67)::lacZ	Neu gekreuzt	diese Arbeit
NS408	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rprA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS316	diese Arbeit
NS409	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; csrB::scar; csrC::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS380	diese Arbeit
NS410	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsB::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS318	diese Arbeit
NS411	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rprA::scar; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS408 mit NS32	diese Arbeit
NS412	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rprA::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS408 mit NS345	diese Arbeit
NS413	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsB::scar; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS409 mit NS32	diese Arbeit
NS414	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsB::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS409 mit NS345	diese Arbeit
NS415	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; csrB::scar; csrC::scar; yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS410 mit NS32	diese Arbeit
NS416	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; csrB::scar; csrC::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS410 mit NS345	diese Arbeit
NS417	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; yliL::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von diese Arb NAT107	
NS418	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; yliL::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NAT107 mit NS345	diese Arbeit
NS419	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ycgZ::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NAT135 mit NS345	diese Arbeit
NS420	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ymgA::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Art NAT136 mit NS345	
NS421	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ymgB::scar; yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NAT137 mit NS345	diese Arbeit

NS425	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rcsB::scar,	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arb	
NS426	yhdA::kan CP1000 hdm ( 284: + 48)::lasZ resP::sear	NS396 mit NS32	diasa Arbait
115420	yhdA::cat	NS396 mit NS345	diese Arbeit
NS427	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rprA::scar,	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	yhdA::cat	NS399 mit NS345	
NS428	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rprA::scar, yhdA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS399 mit NS32	diese Arbeit
NS429	GB1000 csgD(-756, +549)::lacZ (long)	Plasmid von H. Weber neu	diese Arbeit
		gekreuzt	
NS430	GB10000 csgD(-756, +549)::lacZ csgD2::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS429 mit FM71	diese Arbeit
NS431	GB1000 csgD(-756, +549)::lacZ rprA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS429 mit FM66	diese Arbeit
NS432	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ; rcsF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS433	$GB1000 \ hdm (-384 + 48) \cdot \cdot lac7 \cdot resF \cdot \cdot scar$	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
115433	GD1000 bum (-504, +40)uc2, restscur	NS432	diese Arbeit
NS435	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; rcsF::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS434	diese Arbeit
NS437	GB1000 ydiV(-323, +67)::lacZ flhDC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS438	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ omrAB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit TK	diese Arbeit
NS439	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ arcZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit TK	diese Arbeit
NS440	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yhdA::cat omrAB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit TK	diese Arbeit
NS441	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ vhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
	arcZ::kan	NS360 mit TK	
NS442	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ omrAB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit TK	diese Arbeit
NS443	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ arcZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit TK	diese Arbeit
NS444	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat omrAB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit TK	diese Arbeit
NS445	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat arcZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit TK	diese Arbeit
NS451	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ arcZ::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS439	diese Arbeit
NS452	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yhdA::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
NS453	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ arcZ::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von	diese Arbeit
NGATA		NS443	1. 4.1.4
NS454	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat arcZ::scar	NS445	diese Arbeit
NS455	GK1000 flhDC::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GK1000 mit GB332	diese Arbeit
NS456	W3110 bcsA::flag::kan	Neu hergestellter FLAG-Tag	diese Arbeit
NS457	W3110 bcsA::flag::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS456	diese Arbeit
NS458	W3110 yhdA::Flag::kan	Neu hergestellter FLAG-Tag	diese Arbeit
NS459	W3110 yhdA::Flag::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS458	diese Arbeit
NS460	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ rydB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit EK	diese Arbeit
NS461	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS462	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ rydB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit EK	diese Arbeit

NS463	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbeit	
NGACA	rydB::kan	NS367 mit EK	1 A .1
NS464	W3110 omrA::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS405	W3110 omrB::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)	diese Arbeit
NS467	W3110 csaD::Elaa::kan	Neu hergestellter ELAG Tag	diese Arbeit
NS468	$GK1000 \ bdm (-384 + 48) \cdot \cdot lac7$	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
115400	GR1000 <i>bum</i> ( 507, 140)uc2	DON3 mit GK900	diese Moen
NS469	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ omrA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS464	diese Arbeit
NS470	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ yhdA::cat omrA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit NS464	diese Arbeit
NS471	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ omrA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS464	diese Arbeit
NS472	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat omrA::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit NS464	diese Arbeit
NS473	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ omrB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS465	diese Arbeit
NS474	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ yhdA::cat omrB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit NS465	diese Arbeit
NS475	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ omrB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS465	diese Arbeit
NS476	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat omrB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit NS465	diese Arbeit
NS477	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ glmZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS466	diese Arbeit
NS478	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ yhdA::cat glmZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit NS466	diese Arbeit
NS479	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ glmZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS466	diese Arbeit
NS480	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat glmZ::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese A NS367 mit NS466	
NS481	GK1000 yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion GK1000 mit NS345	diese Arbeit
NS482	GK1000 bdm (-384;+48)::lacZ	Deletionsmutante mit pCP20 von NS468	diese Arbeit
NS483	GK1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS482 mit NS345	diese Arbeit
NS484	W3110 yhdA::Flag::scar RcsB::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS459 mit GB	diese Arbeit
NS485	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ RcsD::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit MP	diese Arbeit
NS486	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhda::cat, RcsD::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS367 mit MP	diese Arbeit
NS492	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yhdA::cat, rcsF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit NAT	diese Arbeit
NS493	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhdA::cat, rcsF::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbe NS367 mit NAT	
NS496	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ RcsD::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von diese Arbei NS485	
NS497	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhda::cat, RcsD::scar	hergestellt durch P1-Transduktion NS496 mit 345	diese Arbeit
NS498	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yhda::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von diese Arbe NS360	
NS499	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ yhda::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS367	diese Arbeit
NS501	AR3110 bcsA::FLAG::kan	Neu hergestellter FLAG-Tag	diese Arbeit

NS502	AR3110 bcsA::FLAG::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von diese Arb	
NS503	W3110 RcsD1900::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)/schon in WT P1 transduziert	diese Arbeit
NS504	AR3110 RcsD1900::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)/ schon in WT P1 transduziert	diese Arbeit
NS505	W3110 RcsD1900::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS503	diese Arbeit
NS506	AR3110 RcsD1900::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS504	diese Arbeit
NS507	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ RcsD1900::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS503	diese Arbeit
NS508	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ RcsD1900::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS503	diese Arbeit
NS509	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ RcsD1900::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS507	diese Arbeit
NS510	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ RcsD1900::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS508	diese Arbeit
NS512	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ RcsD1900::scar, yhda::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS510 mit NS345	diese Arbeit
NS513	W3110 bcsA::FLAG::scar, clpP::cat	hergestellt durch P1-Transduktion	diese Arbeit
NS514	W3110 RcsD541::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)/ schon in WT P1 transduziert	diese Arbeit
NS515	AR3110 RcsD541::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)/ schon in WT P1 transduziert	diese Arbeit
NS516	W3110 <i>RcsD541::scar</i>	Deletionsmutante mit pCP20 von NS513	diese Arbeit
NS517	AR3110 RcsD541::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS514	diese Arbeit
NS518	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ RcsD541::kan	hergestellt durch P1-Transduktion GB1100 mit NS513	diese Arbeit
NS519	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ RcsD541::kan	hergestellt durch P1-Transduktion DON3 mit NS513	diese Arbeit
NS520	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ RcsD541::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS517	diese Arbeit
NS521	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ RcsD541::scar	Deletionsmutante mit pCP20 von NS518	diese Arbeit
NS522	GB1000 csgB(-190,+43)::lacZ RcsD541::scar, yhda::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS519 mit NS345	diese Arbeit
NS523	GB1000 bdm(-384;+48)::lacZ RcsD541::scar, yhda::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arb NS520 mit NS345	
NS524	AR3110 $\Delta$ lac(I-A) bcsA::lacZ (aus AR3110)	Plasmid pNS neu gekreuzt	diese Arbeit
NS525	AR3110 ∆lac(I-A) bcsA::lacZ (aus AR3110), yoaD::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS524 mit NS	diese Arbeit
NS526	AR3110 ∆lac(I-A) bcsA::lacZ (aus AR3110), yaiC::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbe	
NS527	AR3110 ∆lac(I-A) bcsA::lacZ (aus AR3110), yhjK::cat	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbe NS524 mit AR	
NS528	W3110 McaS::kan	Neu hergestellte Mutante (OSI)/ diese Arbei   schon in WT P1 transduziert	
NS529	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ McaS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion diese Arbei GB1100 mit NS528	
NS530	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ McaS::kan, yhda::cat	hergestellt durch P1-Transduktion NS360 mit NS528	diese Arbeit
NS531	GB1000 bdm (-384;+48)::lacZ McaS::kan	hergestellt durch P1-Transduktion Don3 mit NS528	diese Arbeit

e Arbeit
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
09
)09
)09
09
09
09
09
09
)09
)09
<u>109</u> 109
09
09
)09
09
09
09
109 109
09
009

AP92	W3110 ∆lacZ::Tn10 yfiR/N(-758,+55)::lacZ (hybr.).	Sommerfeldt et al., 2009
AP93	W3110 <i>∆lacZ::Tn10 yfiN(-321,+55)::lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ), <i>rpoS::kan</i> .	Sommerfeldt et al., 2009
AP94	W3110 <i>AlacZ</i> :: <i>Tn10:flhDC</i> (-1956,+46):: <i>lacZ</i> ( <i>hybr.</i> ).	Sommerfeldt et al., 2009
AP103	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ(hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	yaiC::kan.	
AP104	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ(hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
-	vcdT::cat.	
AP105	W3110 AlacZ::Tn10. flhDC(-1956.+46)::lacZ (hybr.).	Sommerfeldt et al., 2009
111 100	vdaM::cat.	2000
AP106	W3110 $\Lambda lac Z$ . Tn10 flhDC(-1956 +46). lacZ (hybr)	Sommerfeldt <i>et al</i> 2009
111 100	vddV··kan	Sommerreide er un, 2009
AP107	$W3110 \Lambda lac 7 \cdot Tn10 flbDC(1056 \pm 46) \cdot lac 7 (hybr)$	Sommerfeldt <i>et al.</i> 2009
AI 107	vdeH::kan	Sommerfeldt er ur., 2009
A D108	W2110 $\Lambda lac 7 \cdot Tr 10 flbDC(1056 + 46) \cdot \cdot lac 7 (hybr)$	Sommerfeldt et al. 2000
AF 108	w 5110 \(\(\mathcal{L}\).1110 \(\mathcal{J}\)(\mathcal{L}\)(-1950,+40)(\(\mathcal{U}\)C(\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)(\)(\(\mathcal{J}\)(\)\)(\(\mathcal{J}\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)(\)	Sommerfeldt et ut., 2009
A D100	W2110 A las 7 Tr 10 flbDC(1056 + 46) las 7 (bybr)	Sommerfeldt et al. 2000
AF 109	w 5110 ΔιαζΣ1π10 jinDC(-1950,+40)ιαζΣ (nyb1.),	Sommerfeldt et al., 2009
A D110	$W2110 \text{ Alg} = 7.77 \pm 10 \text{ (lbDC}(-1056 \pm 46) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 16 \pm 7.76 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 10 \pm 10 \pm 10 \pm 10 \text{ (lg} + 16) \pm 10 \pm 10 \pm 10 \pm 10 \pm 10 \pm 10 \pm 100 \text{ (lg} + 16) \pm 10 \pm 100 $	Sammarfallt et al. 2000
APIIO	W 5110 ΔlacZ::1n10 finDC(-1950,+40)::lacZ (nybr.),	Sommerieldt et al., 2009
A D111	year::kan.	<u>Samuel 11, 12000</u>
APIII	W 3110 ΔlacZ::1n10. KS45:JinDC(-1950,+40)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
4.0110	yedQ::cat.	
AP112	$W_{3110} \Delta lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),$	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
	yfiN::cat.	<u> </u>
AP113	W3110 $\Delta lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),$	Sommerfeldt et al., 2009
	yneF::kan.	
AP114	W3110 ∆ <i>lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.)</i> ,	Sommerfeldt et al., 2009
	yciR::kan.	
AP115	W3110 ∆ <i>lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.)</i> ,	Sommerfeldt et al., 2009
	yddU::cat.	
AP116	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	yegE::kan.	
AP117	W3110 ∆ <i>lacZ::Tn10 :flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.)</i> ,	Sommerfeldt et al., 2009
	yfeA::kan.	
AP118	W3110 ∆ <i>lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.)</i> ,	Sommerfeldt et al., 2009
	yfgF::kan.	
AP119	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	yhdA::kan.	
AP120	W3110 ∆lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	yhjK::kan.	
AP121	W3110 ∆lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	rtn::kan.	
AP122	W3110 ∆lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	vcgF::kan.	
AP123	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hvbr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	vcgG::cat.	,
AP124	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hvbr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	vdiV::kan.	,
AP125	W3110 AlacZ::Tn10 flhDC(-1956.+46)::lacZ (hybr.).	Sommerfeldt et al., 2009
	vhiH::kan.	~ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
AP126	W3110 $\Lambda lacZ$ ··Tn10 flhDC(-1956 +46)···lacZ (hybr)	Sommerfeldt <i>et al</i> 2009
11120	vicC··kan	Sommerreide er un, 2009
AP127	W3110 $\Lambda lacZ$ ::Tn10:flhDC(-1956 +46)···lacZ (hybr)	Sommerfeldt et al 2009
	vlaB::kan	2007
AP128	W3110 $\Lambda lacZ$ .: $Tn10$ flbDC(-1956 +46). $lacZ$ (hybr)	Sommerfeldt et al 2009
111 120	$viF \cdot kan$	50mmerreidt e <i>i ui.</i> , 2007
ΔΡ120	W3110 $\Lambda lac 7 \cdot T_n 10$ flbDC( 1056 $\pm 46$ ) $\cdot lac 7$ (hybr) with	Sommerfeldt <i>et al.</i> 2000
AI 127	2. Jan	50111110101 <i>et ut.</i> , 2009
AD120	$\frac{2nun}{W_{2110} \Lambda_{lac} 7T_{n} l_{0} fl_{b} DC(1056 \pm 46)L_{c} 7.(ll_{n})}$	Sommarfaldt at al. 2000
AF 150	$v_{0} = 100 \Delta u_{0} L_{1} = 100 J m D C (-1950, +40) H m C (NyOr.),$	Sommerielat <i>et al.</i> , 2009
AD121	$W2110 \Lambda las 7Tr 10 flbD(1504 + 21)las 7 (hh.r)$	Sommarfaldt at al. 2000
ALIJI	$(13) 110 \Delta (ucL1n10 j(nD(-1394,+31)lacL (nybr.).$	5011111e11e101 <i>et al.</i> , 2009

AP132	W3110 ΔlacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),	Sommerfeldt et al., 2009
	yliE-2::scar.	
AP133	W3110 $\Delta lacZ::Tn10 flhDC(-1956,+46)::lacZ (hybr.),$	Sommerfeldt et al., 2009
4.01.42	yfiN::scar.	
AP143	W3110 rcsC::cat	A. Possing unveroffentlicht
AP145	W 3110 $\Delta lac Z$ :: In10 csgB(-190, +43):: lac Z, ycgG:: cat.	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
AP140	W 3110 $\Delta lacZ$ :: In10 csgB(-190, +43)::lacZ, yeaP::kan.	Sommerfeldt et al., 2009
AP1/1	W 3110 $\Delta lacZ$ :: In10 yllE(-319,+34)::lacZ (hybr.).	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
AP172	W 5110 $\Delta lacZ$ :: Th10 yca1(-393,+34):: lacZ (hybr.).	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
AP173	W 5110 $\Delta lac Z$ :: Tn10 yllE(-519,+54):: lac Z (nybr.), rpos:: kan.	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
AP1/4	rpoS::kan.	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
AP206	GB1000 yddV::kan.	Sommerfeldt et al., 2009
AP217	W3110 yddV::scar.	A. Possling unveröffentlicht
AP225	W3110 yddU::kan	Sommerfeldt et al, 2009
AP244	W3110 yeaJ::kan.	Sommerfeldt et al., 2009
AP247	W3110 omrAB::kan.	A. Possling unveröffentlicht
AR3110	W3110 cellulose+	A. Richter unveröffentlicht
AR4	W3110 yegE::kan	A. Richter unveröffentlicht
AR5	W3110 ydaM::kan	A. Richter unveröffentlicht
AR6	W3110 yciR::kan	A. Richter unveröffentlicht
AR27	W3110 yliF::kan	A. Richter unveröffentlicht
AR28	W3110 yhjK::kan	A. Richter unveröffentlicht
CP122	W3110 ycgG::cat	Sommerfeldt et al, 2009
CP123	W3110 yeaP::kan	Sommerfeldt et al, 2009
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
DON3	GB1000 bdm (-384:+48)::lacZ	G. Klauck unveröffentlicht
EK	W3110 rydB::kan	E. Klauck unveröffentlicht
	· · · ·	
FM5	W3110 rpoS::kan	F. Mika unveröffentlicht
FM66	W3110 rprA::kan	Mika et al., 2012
FM71	W3110 csgD2::kan	Mika et al., 2012
FS20	MC4100 rpoS::kan	Mika & Hengge 2005
GB200	W3110 yeaI::cat	Sommerfeldt et al., 2009
GB201	W3110 yhjH::kan	Sommerfeldt et al, 2009,
		Pesavento et al., 2008
GB202	W3110 ydeH::kan	Sommerfeldt et al, 2009
GB203	W3110 yneF::kan	Sommerfeldt et al, 2009
GB204	W3110 yfiN::cat	Sommerfeldt et al, 2009
GB297	W3110 csgD::kan	Sommerfeldt et al, 2009
GB302	W3110 rcsB::kan	Mika et al., 2012
GB315	W3110 yedQ::cat	Sommerfeldt et al, 2009
GB350	W3110 <i>Δlac::Tn10. csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.)</i>	Pesavento et al., 2008
GB351	W3110 <i>∆lac::Tn10. csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.) yhjH::cat.</i>	Pesavento et al., 2008
GB356	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yciR::kan	Pesavento et al., 2008
GB357	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ydaM::cat</i>	Pesavento et al., 2008
GB358*	W3110 ∆lacTn10. csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.) ∆yfiN.	Sommerfeldt et al., 2009
GB360	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yaiC::kan	Sommerfeldt et al, 2009
GB361	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ycdT::cat</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB362	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yddU::cat</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB363	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yddV::Tn5</i>	Sommerfeldt et al, 2009

CD2C4	$W_{2110}$ $A_{1}$ T 10 $D(100 + 43) = T (1 + 1)$	Q
GB364	$W3110 \ \Delta lac::Tn10. \ csgB(-190, +43)::lacZ(hybr. yeaJ::kan.$	Sommerfeldt <i>et al</i> , 2009
GB365	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yedQ::cat</i>	Sommerfeldt <i>et al</i> , 2009
GB366	W3110 <i>Alac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yegE::kan</i>	Sommerfeldt <i>et al</i> , 2009
GB367	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); ydeH::kan	Sommerfeldt <i>et al</i> , 2009
GB368*	W3110 <i>∆lac::Tn10. csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.) yeaI::cat.</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB369	W3110 ∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yfiN::cat	Sommerfeldt et al, 2009
GB370	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yhjH::kan</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB371	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yneF::kan</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB378	W3110 <i>∆lac::Tn10 csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.); yeaI::cat</i>	Sommerfeldt et al, 2009
GB899	W3110 yahA::cat	G. Klauck unveröffentlicht
GB1000	E.coli K12 thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I, Dlac(I-A)	G. Klauck unveröffentlicht
GB1100	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ	G. Klauck unveröffentlicht
GK	W3110 kan::synP2::csgD (5'UTR)	G. Klauck unveröffentlicht
GK1000	E.coli K12 thyA36 deoC2 $IN(rrnD-rrnE)I$ , $Dlac(Z-A) lacI^q$	G. Klauck unveröffentlicht
HW103	MC4100 ydaM::cat	Weber <i>et al.</i> , 2006
HW104	MC4100 yciR::kan	Weber <i>et al.</i> , 2006
JB18	W3110 <i>∆lac::Tn10</i> yahO::kan	J. Berkholz unveröffentlicht
JB25	W3110 <i>∆lac::Tn10</i> yahK::kan	J. Berkholz unveröffentlicht
MC4100	E.coli K12 F- araD139 N(argF-lac)U169 deoC flbB5301	Peters et al. 2003
	relA1 rpsL150 ptsF25 rbsR	
100111		
MPIII	MC4100 rprA::kan	M. Pruteanu unveröffentlicht
MP44	MC4100 [IRZ5:f('pcm-nlpD+-rpoS379::lacZ)hybr.].	M. Pruteanu unveröffentlicht
	rcsB::kan	
NAT		
NAT	W3110 rcsF::kan	N. Ischowri unveroffentlicht
NAT131	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ yliL::kan.	Tschowri <i>et al</i> , 2008
NAT135	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ycgZ::scar	Tschowri <i>et al.</i> , 2008
NAT136	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ymgA::scar	Tschowri et al., 2008
NAT137	GB1000 csgB(-190, +43)::lacZ; ymgB::scar	Tschowri et al., 2008
NAT40	W3110 ycgF::kan.	Tschowri et al, 2008
SB260	W3110 <i>∆lac::Tn10 rprA(-146;+150)::lacZ</i>	S. Busse ; Mika et al., 2012
TK93	W3110 arcZ::kan.	T. Kolmsee unveröffentlicht
TK94	W3110 omrAB::kan.	T. Kolmsee unveröffentlicht
W3110	E.coli K12 thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I	Hayashi et al. 2006
W3110	W3110 D(argF-lacU)169 zaj-3053::Tn10	Nichols et al. 1998, Peters et
DlacU169		al. 2003
(auch		
W3110		
$\Delta lac::Tn10)$		

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCP20	Hilfsplasmid mit FLP-Rekombinase, Promotor Temperatur- induzierbar, temperatursensitives <i>ori</i> , AmpR, CmR	Datsenko & Wanner, 2000
pJL28	LacZ-Fusionsvektor, $hla^+(Amp^r)$	Lucht et al. 1994
pKD3	Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten <i>cat</i> -Kassette; <i>pir</i> abhängiges <i>ori</i> Ry, AmpR, CmR	Datsenko & Wanner, 2000
pKD4	Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> abhängiges <i>ori</i> Rγ, AmpR, KanR	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	Hilfsplasmid mit $\lambda$ -Red-Rekombinationssystem, Promotor Arabinose-induzierbar, (ParaB- $\gamma$ - $\beta$ -exo); temperatursensitives R101-ori, AmpR	Datsenko & Wanner, 2000
pSUB11	Template-Plasmid zum Amplifizieren der <i>FRT</i> -flankierten FLAG-Tag:: <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> abhängiges <i>ori</i> Rγ, AmpR, KanR	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pCAB18	IPTG-induzierbarer Niedrigkopien-Vektor; ptac Promoter, AmpR	Barembruch & Hengge, 2007
pCAB6	Vektor zur Herstellung von transkriptionalen LacZ-Fusionen, AmpR	Barembruch & Hengge, 2007
pQE60	Vektor zur Überexpression von Proteinen mit einem C-terminalen 6xHis-tag, AmpR	Qiagen
pREP4	Helferplasmid bei der Proteinüberexpression, exprimiertden Lac- Repressor konstitutiv auf hohen Niveau, KanR	Qiagen
mNC1	$P_{\rm H} = 10^{-1} + 24^{$	diago Arboit
pNS1	pJL28 ynJK(-519,+54)::lacZ	diese Arbeit
pNS2	$pJL28 \ ycal(-502, +50) \dots ucZ$ $pJL28 \ ycal(-502, +50) \dots ucZ$	diese Arbeit
pNS4	nII 28 veeF(-360 +22)··lacZ	diese Arbeit
pNS5	nII.28 yhdA(-245 +21)··lacZ	diese Arbeit
pNS6	pIL 28 yeaJ::lacZ	diese Arbeit
pNS7	pCAB6 vahO::lacZ	diese Arbeit
pNS8	pCAB18 mreBCD	diese Arbeit
pNS9	pCAB18 ycgG	diese Arbeit
pNS10	pJL28 pgaA::lacZ	diese Arbeit
pNS11	pCAB18 csrD (vollständig)	diese Arbeit
pNS12	pJL28 bcsA::lacZ (ausW3110)	diese Arbeit
pNS13	pQE60 csrD (ohne Transmembrandomänen)	diese Arbeit

### Tab. 3.4.: Übersicht der verwendeten Plasmide

# Tab. 3.5.: Übersicht der verwendeten Bakteriophagen

Lysat	Referenz
λRS45	Simons et al. 1987
$\lambda RS47$	Simons et al. 1987
P1 <sub>vir</sub>	Laborsammlung
# 3.4. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.4.1 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden bei 28°C oder 37°C in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern mit einer maximalen Füllhöhe von circa 20% inkubiert. Durch dieses Oberflächen/Volumen Verhältnis wird ein optimaler Sauerstoffaustausch ermöglicht. Kolben wurden im Wasserbad bei einer Rotation von 300 rpm und Röhrchen in einem Rollinkubator inkubiert. Die Inkubation von Bakterienstämmen auf Festmedien erfolgte in Bruträumen bzw. Brutschränken bei 37 °C bzw. 28 °C.

Für Experimente entlang der Wachstumkurve in Komplexmedium (LB) wurden die Bakterien auf eine Anfangs- $OD_{578nm}$  von 0,05 oder 0,07 eingestellt.

#### 3.4.2 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte einer Flüssigkultur wurde durch die Messung der optischen Dichte bei OD578 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz diente dabei das bakterienfreie Medium. Ab einer OD<sub>578nm</sub> von 0,3 wurde die zu untersuchende Probe der Bakterienkultur verdünnt, da eine Linearität der Bakterienkonzentration zur OD<sub>578nm</sub> ab dieser Dichte nicht mehr gegeben ist.

#### 3.4.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten

Für die Aufbewahrung von Bakterienstämmen über einen längeren Zeitraum wurden die entsprechenden Bakterien aus einer üN-Kultur (LB) mit DMSO (Dimethylsulfoxid, 7 % Endkonzentration) gemischt und bei –80°C eingelagert.

Bakterienstämme, welche sich auf Platte befanden, wurden maximal eine Woche bei 4 °C gelagert. Bakteriophagenlysate wurde mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

#### 3.4.4 Plattentests

#### 3.4.4.1 ß-Galaktosidase-Plattentest

Für diesen Test wurden X-Gal-Platten (Rezept siehe 3.2.2.) eingesetzt.

Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, kodiert durch das Gen *lacZ*, hydrolysiert X-Gal und dadurch entsteht ein unlöslicher Indigofarbstoff. Klone, welche intakte  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, färben sich daher bei diesem Test blau. Da dieser Test sehr sensitiv ist und schon auf sehr geringe Enzymaktivitäten reagiert, ist er nur eingeschränkt als quantitativer Test geeignet.

#### 3.4.4.2 Motilitäts-Assay

Stämme, deren Motilität untersucht werden sollte, wuchsen über Nacht bei 37°C in LB im Roller an. Anschließend wurde die OD<sub>578nm</sub> auf den gleichen Wert (OD<sub>578nm</sub> 5.0) eingestellt und jeweils 4  $\mu$ l Kultur wurden mit der Pipettenspitze in die Motilitätsplatten (Rezept siehe 3.2.2.) eingestochen. Bei 37°C oder 28°C konnte dann die Motilität über mehrere Stunden (5 - 8h) beobachtet werden.

#### 3.4.5 Herstellung eines P1-Lysates

5ml LB-Medium wurden mit dem zu lysierenden Bakterienstamm beimpft und bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von circa 0,7 bei 37 °C im Roller inkubiert. Nach Zugabe von einem Tropfen 1 M Calciumchlorid, welches die Anheftung der Phagen erleichtert und ein bis zwei Tropfen des Wildtyp P1<sub>vir</sub>-Lysates folgte eine erneute Inkubation im Roller bei 37 °C bis zur Lyse der Zellen. Diese ist erkennbar durch ein Aufklaren der Bakterienkultur (nach 3-8 Stunden). Daraufhin wurden 5-10 Tropfen Chlorform zum Abtöten der noch lebenden Zellen zugegeben und der gesamte Ansatz gevortext. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren bei 4000 g und 4 °C für 5 min vom Überstand getrennt. Der Überstand enthält P1-Phagen, die das gesamte Chromosom des Bakterienstammes neben ihrer eigenen DNA in

Phagenpartikeln verpackt enthalten. Dieses Phagenlysat wurde in ein steriles Schraubdeckelröhrchen überführt und mit zwei bis drei Tropfen Chloroform versetzt.

### 3.4.6 P1-Transduktion

Den Prozess der Übertragung von DNA einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle durch Bakteriophagen bezeichnet man als Transduktion. Diesen Prozess kann man sich molekularbiologisch zur Übertragung von Mutationen in einzelnen Genen von einem Bakterienstamm zum anderen zu Nutze machen (Miller *et al.*, 1972 und 1992).

Für diese Übertragung wurde, wie unter 3.4.5. beschrieben ein Lysat des Spenderstammes hergestellt. Mit diesem Lysat kann nun ein Empfängerstamm wie folgt infiziert werden.

Eine üN-Kultur des Empfängerstammes wurde bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1/10 ml 10 mM Magnesiumsulfat resuspendiert. Anschießend wurden 1/400 ml 1 M Calciumchlorid zugegeben. Nach Aliquotierung dieser Bakteriensuspension (200  $\mu$ l) wurden 50 – 100  $\mu$ l des entsprechenden Phagenlysats zu der Kultur gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l 1 M Natriumcitrat und 0,5 ml LB-Medium erfolgte eine aerobe Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Danach wurde die Kultur auf Festmedium, welches das notwendige Antibiotikum als Selektivmarker enthielt, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 3.4.7 Mikroskopie zur Ermittlung der Zelllänge

Nach einem abgewandelten Protokoll von Pfennig & Wagener (1986) wurden Agarose-überschichtete Objektträger angefertigt. Dafür wurden die sauberen und fusselfreien Objektträger mit 2ml 1,5% iger Agarose in H<sub>2</sub>O (2x gewaschen) überschichtet und mit einem zweiten Objektträger bedeckt. Nach dem Entfernen des oberen Objektträgers entsteht so eine planare Oberfläche. Der so gefertigte Agarose-überschichtete Objektträger wurde nach 30 min Trocknung bei RT am gleichen Tag benutzt. Zur Untersuchung der Zelllänge wurden jeweils 15µl der Flüssigkultur, eingestellt auf eine OD<sub>578nm</sub> 0,5 (eingestellt mit Saline; 0,9% NaCl), auf den Objektträger getropft. Die Mikroskopie erfolgte mittels eines Zeiss-Mikroskops (Axioskop 2. Zeiss) und die Auswertung fand mittels der Software AxioVision Rel 4.7 statt. Die Zelllänge eines Stammes wurde wenigstens dreimal unabhängig von einander bestimmt (n>50 pro gemessener OD<sub>578nm</sub>).

# 3.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 3.5.1 DNA-Analytik

#### 3.5.1.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Vermessung von DNA oder RNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (via Nanodrop oder Photometer) und die Konzentration wurde dann aufgrund folgender Grundlage berechnet:

DNA:  $E_{260nm}$  von 1 entspricht 50 µg/ml RNA:  $E_{260nm}$  von 1 entspricht 40 µg/ml

#### 3.5.1.2 Polymerasekettenreaktion (poly chain reaction - PCR)

Die Ansätze der PCR wurde nach den Standardvorschriften von Sambrook [Sambrook *et al.*, 1989] mit der DNA-Polymerase OptiTaq (Roboklon) durchgeführt. In Tabelle 3.5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. In der Regel wurde eine Annealingtemperatur gewählt, die unterhalb der errechneten  $T_{M}$  lag, da die nicht-komplementären Bereiche (wie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme) eine Hybridisierung erschweren können. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose) analysiert. PCR-Fragmente, die in nachfolgenden Arbeitsschritten weiterverarbeitet werden sollten (One Step Inaktivierung, FLAG-Tag, Klonierung, Sonden für Northern Blots), wurden mit dem QIAquick gel-extraction kit (Qiagen) aus dem Agarosegel gereinigt.

#### 3.5.1.3 DNA-Primer

Die verwendeten Primer für folgenden Mutationen sind schon vorher beschrieben worden: *rpoS359*::Tn10 (Lange & Hengge-Aronis, 1991); *yaiC::kan*, *ydaM::cat*, *yciR::kan*, *yedQ::cat*, *yddV*::Tn5, *csgD::cat* (Weber *et al.*, 2006); *yegE::kan*, *yeaJ:kan*, *yhjH::cat* (Pesavento *et al.*, 2008). Diese Mutationen wurden wie die Mutationen dieser Arbeit nach dem Protokoll von Datsenko und Wanner (2000) hergestellt. Die Primer für die lacZ-Reportergenfusionen zu folgenden GGDEF/EAL-Gene wurden ebenfalls eher beschrieben: *yaiC*, *ydaM*, *yddV*, *yedQ*, *yciR* (Weber *et al.*, 2006) and *yegE* and *yhjH* (Pesavento *et al.*, 2008).

#### Tab. 3.6: Liste der verwendeten Primer

Abkürzungen: OSI = Primer für die Herstellung von Insertionsmutanten; T = Testprimer für die Herstellung von Insertionsmutanten / chromosomalen FLAG-Tags; P = Primer für die Herstellung von lacZ-Genfusionen; FLAG = Primer für die Herstellung von chromsomalen FLAG-Tags; NB = Primer zur Herstellung von DNA-Sonden für Northern Blot-Analysen

Primer	Sequenz in 5' – 3' –Richtung	Funktion
bla	CGACACGGAAATGTTGAATACTC	Testprimer zum Nachweis des <i>bla</i> -Gen (AMPICILLIN)
c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	interner Testprimer bei Herstellung einer Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG	interner Testprimer bei Herstellung einer Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
FLAGbcsA H1	CGGCACAACCATCGGATCAGGCTTTGGCTCAAC AA	Herstellung eines chromosomalen bcsA::Flags via [Uzzau et al., 2000]
FLAGbcsA H2	AAATCCAGAATAGTTTTCTTTTCATCGCGTTATC A	Herstellung eines chromosomalen bcsA::Flags via [Uzzau et al., 2000]
FLAGcsgD H1	ACACAAGCGGTTTCCTGGGCAAACGATAACCTC AGGCGAGACTACAAAGACCATGACGG	Herstellung eines chromosomalen <i>csgD::Flags</i> via [Uzzau et al., 2000] (nach Holmqvist <i>et al.</i> , 2010)
FLAG <i>csgD</i> H2	TGCCGCCACAATCCAGCGTAAATAACGTTTCAT GGCTTTAC <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Herstellung eines chromosomalen <i>csgD::Flags</i> via [Uzzau et al., 2000] (nach Holmqvist <i>et al.</i> , 2010)
FLAGyhdA H2P2	CGCATTATTCTACGTGAAAACGGATTAAACGG CAGGTTACCTTAGTTCCTATCCCGAAGTTCC	Herstellung eines chromosomalen yhdA::Flags via [Uzzau et al., 2001]
FLAGyhdA- H1P1	TGATACTAACGTGAAAAAATATTCACAAAGAT ACTCGGTTGACTACAAAGACCATGACGG	Herstellung eines chromosomalen yhdA::Flags via [Uzzau et al., 2001]
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	interner Testprimer bei Herstellung einer Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	interner Testprimer bei Herstellung einer Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	interner Testprimer bei Herstellung einer Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
lacZ-u-110	CGCCAGCTGGCGAAAGGGGG	lacZ-Testprimer

mreBCD down	AGACCCAAGCTTACGTTCAAAGGTCACGCCAA GT	Herstellung eines pMreBCD in pCAB18
mreBCD up	CGGCCG <b>GAATTC</b> TTTCCGCCCCAGCTTTCAGGA TTA	Herstellung eines pMreBCD in pCAB18
NBarcZ for	GTGCGGCCTGAAAAACAGTGC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>arcZ</i> (T. Kolmsee)
Nb <i>arcZ</i> rev	GCGTGGGTGGCAAAAGCCAC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>arcZ</i> (T. Kolmsee)
NB <i>csrB</i> down	GCTTCCTGCTCACACCACC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>csrB</i>
NB <i>csrB</i> up	GACAACGAAGTGAACATCAGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>csrB</i>
NB <i>csrC</i> down	GACTCATAACCCTTAACGGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>csrC</i>
NBcsrC up	ATAGAGCGAGGACGCTAACAGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>csrC</i>
NBgcvB down	CCGCAATTAGGCGGTGCTAC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen gcvB
NBgcvB up	GCCGGAACGAAAAGTTTTATCG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen gcvB
NbmcaS down	CCGCCAGACTCTACAGTACAC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen mcaS
NbmcaS up	CTGTCACTGAAGAAAATTGGC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen mcaS
Nb <i>mreB</i> down	CACCGTTCAAGGAGATAACAGC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>mreB</i>
Nb <i>mreB</i> up	GGCAATATTGCTGCCATTCG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>mreB</i>
NbomrA for	CCCAGAGGTATTGATTGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>omrA</i> (T. Kolmsee)
NbomrA rev	CCTGCGCATCCGCGCAGG	Herstellung einer DANN-Sonde
NbomrB for	CCCAGAGGTATTGATAGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>omrB</i> (T. Kolmsee)
NbomrB rev	CCTGCGCATCTGCGCAGG	Herstellung einer DANN-Sonde gegen <i>omrB</i> (T. Kolmsee)
NbrrfA (5S) for	TGCCTGGCGGCAGTAG	Herstellung einer DANN-Sonde
NbrrfA (5S) rev	TGCCTGGCAGTTCCCTACT	Herstellung einer DANN-Sonde
NbyhdA down	GTCATCAACGAATGGAAATAGTTGC	Herstellung einer DANN-Sonde
NbyhdA up	GTTTAGTCATCGCGTTCAGGC	Herstellung einer DANN-Sonde gegen yhdA
OSI <i>CRISPR</i> H1P1	GCGGATAATGCTACCTCTGGTGAAGGAGTTGGC GAAGGCGTCT <b>TGATGGGTGTAGGCTGGAGCT</b> GCTTC	Herstellung einer <i>CRISPR</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>CRISPR</i> H2P2	CCCGGTAGATTTGGATGGTTTAAGGTTGGTGTC TTTTTACCTGTT <b>TGAACATATGAATATCCTCC</b> <b>TTAG</b>	Herstellung einer <i>CRISPR</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIdos H1P1	GAAAACCCGCGAGTGCGGGGCGAGAGGAATTTG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Herstellung einer <i>dos</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIdos H2P2	CTTTAGATGCGCCAGGATGCAGAGGTAATCCAT ATGAATATCCTCCTTAG	Herstellung einer <i>dos</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIgcvB H1P1	ATTATAAATTGTCCGTTGAGCTTCTACCAGCAA ATACCTATAGTGGCGGCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC	Herstellung einer <i>gcvB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]

OSIgcvB H2P2	TACCTTGCGATCGCGAATTACTGATCCAGTTCG ACCATCTCTTTCACGTCATATGAATATCCTCCT TAG	Herstellung einer <i>gcvB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIglmZ H1P1	ACAAGTGTTAAGGGATGTTATTTCCC0GATTCTC TGTGGCATAATAAACGA <b>GTGTAGGCTGGAGC TGCTTC</b>	Herstellung einer <i>glmZ</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIglmZ H2P4	GCCTTCCTGATACATAAAAAAACGCCTGCTCTT ATTACGGAGCAGGCGTT <b>ATTCCGGGGATCCGT</b> CGACC	Herstellung einer <i>glmZ</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSImcaS H1P1	TTATGCATGATTATTCATTCACGATATTAATAAT GTAACTTATATTTCG <b>GTGTAGGCTGGAGCTG</b> CTTC	Herstellung einer <i>mcaS</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSImcaS H2P4	TCATTAATCACGCAATTCCGGCGAGAATGCGGC TATCTGCAAAGTTAAAAA <b>ATTCCGGGGATCCGT</b> CGACC	Herstellung einer <i>mcaS</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIomrA H1P1	TTTGCGTTTTCTCGCTGGCGAAGAGTCGTCGTG CAGACCACAATCAAGATGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	Herstellung einer <i>omrA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIomrA H2P4	GAGGGAGATTACACGAGATAAAGAACGCGAGC GACAGTAAATTAGGTGCGATTCCGGGGATCCG TCGACC	Herstellung einer <i>omrA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIomrB H1P1	TTGCGATTGACCGCTGGTGGCGTTTGGCTTCAG GTTGCTAAAGTGGTGATGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC	Herstellung einer omrB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIomrB H2P4	TGCAACGAGGTGTGTAAATTGTCGGTTACTGTT ACAGATTGATGACCGGCATTCCGGGGATCCGT CGACC	Herstellung einer omrB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIpgaA H1P1	CTGTAATTAGATACAGAGAGAGAGATTTTGGCAAT ACATGGAGTAATACAGG <b>GTGTAGGCTGGAGC TGCTTC</b>	Herstellung einer <i>pgaA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>pgaA</i> H2P2	ACTCACCAGCATCAGGAGATATTTATTTCCATT ACGTAACATATTTATCCCATATGAATATCCTC CTTAG	Herstellung einer <i>pgaA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>RcsD</i> H2P4	CAGTTGATCGCTCAGCCAGAATGCCAGCGGGTC CGCCTTGCCATAGCGATATTCCGGGGATCCGT CGACC	Herstellung einer <i>RcsD</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>rtn</i> H1P1	GGTCATTGTTATCTTTTAAATGTTGTCGTAATTT CAGGAAATTAACGGAATC <b>GTGTAGGCTGGAG</b> CTGCTTC	Herstellung einer <i>rtn</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)
OSIrtn H2P2	TGTGGCTTCTTGCTCTTTCAACATATCGCGCTCG GTAATTTCCAGCAC AAT <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Herstellung einer <i>rtn</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)
OSI <i>rydB</i> H1P1	AAATAATACTAATCGCAGTTTGTGTTAAAACGG CGGGTTAGCTTTATGAG <b>GTGTAGGCTGGAGCT</b> GCTTC	Herstellung einer <i>rydB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>rydB</i> H2P4	TTCAGAAATAAGAAAACCCTTAAGTCTGTGCGA CACAGGCTTAAGGGTTT <b>ATTCCGGGGATCCGT</b> CGACC	Herstellung einer <i>rydB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIycdT H1P1	GAAAGGGATCTACAACCTACAGATTGGTGTAG CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Herstellung einer <i>ycdT</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (H. Weber)
OSIycdT H2P2	CCATATTACGTGGGTAGGATCAAAATGCCGCTC ATATGAATATCCTCCTTAG	Herstellung einer <i>ycdT</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (H. Weber)
OSIycgF H1P1	GATATGTCTGTTACCGTCTTACTCTCGCCTCACC CATTACCCTGGATTGGTGTAGGCTGGAGCTGC TTC	Herstellung einer <i>ycgF</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (N. Tschowri)
OSI <i>ycgF</i> H2P2	CCTGCGCCAAAATGATCAATTGCTACACTGATA CCAGCAGCCTTTAGCGCATATGAATATCCTCC TTAG	Herstellung einer <i>ycgF</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (N. Tschowri)

	•	
OSIycgG H1P1	GCGAATGAATGGCATTTTCATGTATTAAACCCT TTGGCCGGGACAAGCAAGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	Herstellung einer <i>ycgG</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (C. Pesavento)
OSIycgG H2P2	ATATAATTTTGGTTCAGATAGTCAAGTTGTTCTT TCGTTTCGACACCTTC <b>CATATGAATATCCTCCT</b> <b>TAG</b>	Herstellung einer <i>ycgG</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (C. Pesavento)
OSIydeH H1P1	GCTTTTCTCTCGTTAGAATAGCGCGCACAAGGA ACTGTGAA <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b> -	Herstellung einer <i>ydeH</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSI <i>ydeH</i> H2P4	CACAGTAGCATCAGTTTTCTCAATGAATGTTAA ACGGAGC <b>ATTCCGGGGGATCCGTCGACC</b> -	Herstellung einer <i>ydeH</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSIydiV H1P1	ATCCCTTTTAGCCGGATACTGAAAAACATCCTT CGAGAGGGACGGTTACC <b>GTGTAGGCTGGAGC</b> TGCTTC	Herstellung einer <i>ydiV</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIydiV H2P2	GTATAGGTTTCTGGCAATTCATCGCGCCAGCGG GTAACAAAAGACAGGGTCATATGAATATCCTC CTTAG	Herstellung einer <i>ydiV</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyeal H1P1	TATGACAGCATAACCTTTACATAATTTAGTTCC AGAAAACAATCATTCGG <b>GTGTAGGCTGGAGC TGCTTC</b>	Herstellung einer <i>yeal</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSI <i>yeal</i> H2P2	GTCATGACAAGCGAGATATTACGCGTGTCACCC GTTGAAAAAACCGTGCCCATATGAATATCCTC CTTAG	Herstellung einer <i>yeal</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSIyeaP H1P1	TCAACCTACCTGACCAAAGTGGATGTCGAAGC GCGCCTGCAGCATATTAT <b>GTGTAGGCTGGAG</b> CTGCTTC	Herstellung einer <i>yeaP</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (C.Pesavento)
OSIyeaP H2P2	TAATACCGATTCGCATGTTATCACCAATCAAA AGGATGTGAATACGCCCATATGAATATCCTC CTTAG	Herstellung einer <i>yeaP</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (C.Pesavento)
OSIyfeA H1P1	AACTTATTATTGTGTGCCTGAAAACCCCGATC AGTGAGAGTAGTGTACTCGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	Herstellung einer <i>yfeA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)
OSIyfeA H2P2	CAACCCTTAAGTTAGCGCTTATGGGATAATTCC CCGGTTTTTTACGCCTG <b>CATATGAATATCCTC</b> CTTAG	Herstellung einer <i>yfeA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)
OSI <i>yfgF</i> H1P1	CGTGATAAATGGTGGGGGGCTTCCGCTGTTCCTG CCTTC <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b>	Herstellung einer <i>yfgF</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>yfgF</i> H2P4	GTCGGCCCGCATTATTCAGGCACTTTCGCGAAT GGG <b>ATTCCGGGGATCCGTCGACC</b>	Herstellung einer <i>yfgF</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSI <i>yfiN</i> H1P1	GTCTTAATGCTCGCACGGAAGAAAAATGATGG ATAACGATAA <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b>	Herstellung einer <i>yfiN</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSI <i>yfiN</i> H2P2	GTATTAGTGAGGTGAAAACCAGGGGTGCTACC AGGTGCTTTAT <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Herstellung einer <i>yfiN</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
OSIyhdA H1P1	GCGAGATAAATCTGATTTGCTAGTATGCCCGCT TCC <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b>	Herstellung einer <i>yhdA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyhdA H2P2	CGCATTATTCTACGTGAAAACGGATTAAACGGC AGG <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Herstellung einer <i>yhdA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyhjK H1P1	TTCCGGGGGGGGAGACAATTTGCGCGTAAGTCGCT CGTTAACAATCAAGCAG <b>GTGTAGGCTGGAGC</b> TGCTTC	Herstellung einer <i>yhjK</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)
OSIyhjK H2P2	GGCTCGCACAAACCAGCACTTTTTAAAGTTTTG TAATCAGTTTGGGGTAGCATATGAATATCCTC CTTAG	Herstellung einer <i>yhjK</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)

GGGTTTTCACCTTGCAATGGCCGGGTATAAACAHerstellung einer y/c-Mutante via Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)GGTGTGGTTCGGCAATGAATGGGTGGGGCGGCGGGGGGGG			
CIGATIT      Fosting      Fosting        OSlyjcC H2P2      GATGTGTCCCCAATCATATGAATATCCTCCT      Herstellung einer ylcP-Mutante via        OSlylaB H1P1      CCTTATTCCGGGATACTGATTCTTCAGTATG      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlylaB H2P2      GAATACCCCGGTAACCGTGTAGGCTGGAGC      Datsenko & Wanner, 2000] (A.        OSlylaB H2P2      GAATACCCCGGTAACCAAAATCATCAGGTGAGGC      Datsenko & Wanner, 2000] (A.        OSlylaB H2P2      CGGTAAAGCGTCCCGGTACATATGAATATC      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlylaB H2P2      CGGAAAACGTGCCGGATAGCGGTGTAGGCTGGAGGAT      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyliE H1P1      CCGCAGTGTGTCAATATTGAGCATAGAATATCCTC      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyliE H2P2      CAACGTAAACTACTCTTTTACAATATTCCACT      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyliF H2P2      CAACGTAAAACTACTCTTTACTAATTTCCACT      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyliF H2P2      CAAGGCAAAAACTACTGTTACGTGTGGAGGCGGAGAATATACCTCC      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyliF H2P2      CAAGGCCGGGCAAAATCATTTGTGCCGGCGCGCGCG      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyneF H1P1      GCGCCGGCGCAAAATCATTGTGGGGGGGCGCGGCGCG      Herstellung einer ylaP-Mutante via        OSlyneF H2P4      TAAGGCAACCGCGGACACTACCATTCGGTCGAGGG      Herstellung einer y	OSI <i>yjcC</i> H1P1	GGGTTTTCACCTTGCAATGGCCGGGTATAAACA GGCAGGAAATTGATAGCA <b>GTGTAGGCTGGAG</b>	Herstellung einer <i>yjcC</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A.
CGTTTTTAACCCCAGGCTGTGGCCAGCTCGAT      Herstellung einer yic/C-Mutante via        OSlyic/C H2P2      GATGTGTTCCCCAACATATGAATATCCTCT      Distenko & Wanner, 2000] (A.        OSlyia/B H1P1      CTGCCTGTCGGGATACTGATTGAATATCATTCAGTATG      Herstellung einer yia/B-Mutante via        OSlyia/B H2P2      GAATACCCCGTACCAAAATCATCAAGATAAATT      Herstellung einer yia/B-Mutante via        OSlyia/B H2P2      GGATAACCTGCCGATCACGACATATGAATATTC      Hossing)        OSlyii/E H1P1      CGGCATGTGCCGATAGGCGCGTTGAGCTG      Herstellung einer yii/E-Mutante via        OSlyii/E H2P2      CGGAAAACGTTGCCGATAGGCAGATAGAATATCCT      Herstellung einer yii/E-Mutante via        OSlyii/E H2P2      CAACGTAAAACTACTCTTTACTAATTTTCCACT      Herstellung einer yii/E-Mutante via        OSlyii/E H2P2      CATAGGTAAAACTACTCTTTACTAATTTTCCACT      Herstellung einer yii/E-Mutante via        OSlyii/F H2P2      CATAGGTAAAACTACTCTTTACGTGGAGCT      Herstellung einer yii/F-Mutante via        OSlyii/F H2P2      ATACGCCGCGGAAAATCATTTGCGGCGTGCGAGA      Herstellung einer yii/F-Mutante via        OSlyii/F H2P2      AAAGAGTGTTAACGTGCAGCTACCGGCGCGCGCGAAATTACT      Herstellung einer yii/F-Mutante via        OSlyii/F H2P2      AATGAGTTACTGCGCAGCGGAGCTGCTCC      Herstellung einer yii/F-Mutante via        OSlyii/F H2P2      AATGAGTTACTGCGCGCGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGC		CIGCIIC	Possiing)
OSIsjeC H2P2      GATGTGTTCCGCAATCATATGAATATCCTCCT      Dateshto & Wanner, 2000] (A. Possling)        OSIylaB H1P1      CCTTATTTCGGGAGTACTGATTGTTTCAGTATG GTGCCTGCGCTAAGCCGGTGAGGCTGGAGC TGCCTCGCGTCACAATACGATCAATATC CTCCCTTAG      Herstellung einer ylaB-Mutante via Dateshto & Wanner, 2000] (A. Possling)        OSIylaB H1P1      GAATACCCCGGTACAATGCGATGAGCTGAGGCT CTCCTTAG      Dateshto & Wanner, 2000] (A. Possling)        OSIylaB H1P2      GATACCCCGGTACAATGCAATTAC CTCCTTAG      Dateshto & Wanner, 2000] (A. Possling)        OSIyliE H1P1      CGGTAAAACGTGCCGGATGAGCGTGGAGGCT TTAATCGCCGGCGACATATGAATTACT CTCCGCCTGGGGACAAAACGTGCGAGCATAGAATATCCT TTAATCCCCGGCGGGGGCATAAGAATAGTTCA ATTCTCCCGCCTGGGGACATAGGAATATCCT TTAG      Herstellung einer yliE-Mutante via Dateshto & Wanner, 2000]        OSIyliE H2P2      CATACGTAACTACTTTTTACGTGTGTAGGCTGGAGGCT TTAGCCCGGCGGACAAAAGTGGTAAGAGTGGAAATTACT TTAG      Herstellung einer yliF-Mutante via Dateshto & Wanner, 2000]        OSIyliF H2P2      CAGCCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA ATATGATTACTGTGTGGGGGGCGCGCGCC TTAG      Herstellung einer yliF-Mutante via Dateshto & Wanner, 2000]        OSIyliF H2P2      CGGCCGTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGG CGGCCCAATTGACTGGCGGGGCGCTCTC TTAGGTACCAATTTATTAAGTCATCTGCGCCACCACATGAGATGACG CGGCCCACATGTGGACGCCGCCCCCCCCCC		CGTTTTTAACCCCAGGCTGTGCGCCAGCTCGAT	Herstellung einer <i>yjcC</i> -Mutante via
TAG      Possing)        OSIylaB HIPI      CCTTATTTCGGGATACTGATCTATTGAGTATTG      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (A. Possing)        GAATACCCCGTACCGATATGAATCATCAAGATAATT      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (A. Possing)        OSIylaB H2P2      CGGTAAAACGTGCCGATAGCCGGTTGAAGCTGA TTCATGGCCCGCCTCCCGGTAGCCGGCTTGAACTTA GCTTAG      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliE H1P1      CGGTAAAACGTGCCGATAGCCGGCTTGAACTTA GCTTAG      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliE H2P2      CGAGTGTGTCAATATTGAATATGAATATCCA GCTTAG      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliE H2P2      CATACTAACTACTCTTTAGAATATCCACCGCCTGGGAAAATATCCT TTAG      Herstellung einer ylaF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliF H2P2      ATACTGATTACTGGTGTAGGCTGGAGCT TTAG      Herstellung einer ylaF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliF H2P1      CAGGCCGGCGAAAATCATTGGTGTAGGCTGGCGCG ATAATAGTATACTGCCACATAGCTACTCCTCC TAG      Herstellung einer ylaF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIylaF H2P2      CGGCCGTCAGCGGAACATGCTACCGGCACCGCCCC TAGGCTGGGCGAACACGCCGCCGCCCCCC CCGCCATCACATTATCTGGCCCAACGCTCCCCCCCCCC	OSI <i>yjcC</i> H2P2	GATGTGTTCCGCAATCATATGAATATCCTCCT	[Datsenko & Wanner, 2000] (A.
CTTATTTCGGGAGTACTGATTCTTTCAGTATTG TGCTTC      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (A. Possling)        GAATACCCCGTACCAAAATCATCAGAGATAAATT (CATGGCCGCGCTCCCGGTACCAAAATCATCAGATAAATT CATGGCCGCGCTCCCGGTACCAAATCATCAGATAATC CTCCTTAG      Herstellung einer ylaB-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (A. Possling)        OSIylaB H2P2      CGGTAAAACGTGCCGATAGCCGCTTTGAACTTA TTCAGAAAAACGTTGCGGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC      Herstellung einer yliE-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliE H2P2      CGAAGTGATAACTACTCTTTTACGAGATAAAAATTTCCA TTAATTCGCTCGGATCAACGGCATATGAATATCCTC      Herstellung einer yliE-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliE H2P2      CATACGTAAACTACTCTTTTACTAATTTGCGCGCGGGGAGAAATTGAT TAACGAGTAGTTACTGCGCGGGGAGAAATGAATTCCTC      Herstellung einer yliF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)        OSIyliF H2P2      CATACGTAAGTAGTTACTGCGGCGGGGGGGGGGGGGGGG		TAG	Possling
OSIylaB HIPI    CTOCTITCCGCCTAAGCGTGTGGGCTGGAGC    Passenko & Wanner, 2000] (A.      OSIylaB H2P2    CATACCCCGTACCAAAATCATCAAGATAATT    Ibrasenko & Wanner, 2000] (A.      OSIylaB H2P2    TCATGCCCCGCTCCCGGTACCATATGAATATC    Ibrasenko & Wanner, 2000] (A.      OSIylaB H2P2    TCATGCCCCGTCCCGGATAGCCGCTTTGAACTTA    Ibersenko & Wanner, 2000] (A.      OSIyliE H1P1    CGCTATAG    Ibrasenko & Wanner, 2000] (A.      OSIyliE H1P2    CGCAGTTGTTCAATATTGAGATAACACT    Ibrasenko & Wanner, 2000]      OSIyliE H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTAGAAATATCCT    Ibrasenko & Wanner, 2000]      OSIyliE H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTAGAATATCCTC    Ibrasenko & Wanner, 2000]      OSIyliF H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTAGTCAATATGAATATCCTC    Ibrasenko & Wanner, 2000]      OSIyliF H1P1    AAAGAGTAGTTTACGGCGAAAAAGTGGAAAATTAGT    Herstellung einer yliF-Mutante via      OSIyliF H2P2    CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA    Herstellung einer yliF-Mutante via      OSIyliF H2P3    CGGCCGTGTCAGCGAAACAGTGCTATCTTGGTCGGGGCGCGCGGA    Herstellung einer yliF-Mutante via      OSIyneF H1P1    GCCGCTGTCAGCGAACAGCGCTATCTGGTCGGGCGC    Herstellung einer yliF-Mutante via      OSIyneF H2P4    TAAGGACAACCGGCGCACATGCAGTGCAGCTGC    Herstellung einer yliF-Mutante via      OSIyneF H1P1    GCGCGGTGAGGCGAACAGT			Herstellung einer ulg D Mutente vie
OSIylaB HIP    CIGCUTOTCOCOTTACCAAATCCTCAGGAC    [Datsenko & Wanner, 2000] (A.      OSIylaB H2P2    GAATACCCCGTACCAAAATCATCAGATAAATT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIylaB H2P2    CGGTAAAACGTGCCGATAGCGCGTTGAAGCTGAATATC    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIylaB H2P2    CGGTAAAACGTGCCGATAGGCGGTGTAAGGCTGGAGCT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliE H1P1    CGGTAAAACGTGCCGATAGGGCGGTGTAAGGCTGGAGCT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliE H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTACAATATTCCACT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliE H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTACTAATTTCCACT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    CATACGTAAACTACTCTTTTACTAGATTACTGCGGCTGGAGCT    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    ATACGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    ATAGATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    ATAGATGATTACTGCCACATGCTATCTTGGTCGGACGCG    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyliF H2P2    ATAGATGATTACTGCCACATGCTATCTGGTCGAGCG    Herstellung einer ylaB-Mutante via      OSIyneF H1P1    GCCGCTGCAGCCGACATGCATCTGGGACGTCGTCG    Herstellung eine			Herstenung einer ylab-wutante via
TGCTTCPossiling)OSIylaB H2P2GAATACCCCGTACCAAAATCATCAAGATAATTHerstellung einer ylaB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possiling)OSIylaB H2P2CGGTAAAACGTGCGCGATAGCCGCTTGAACTAT GCTTCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H1P1CGCAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTCC GCTTCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CATACGTAAACTACTCTTTACTAATATTGCAGATAAAAATGCGTC TTAATTCGCCCGCGGAGCATATGAATATCCTC TTAGCCCCGGGGAGCATATGAATATCCTC TTAGCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CATACGTAAACTACTCTTTACTAATTTCCACCT TTAGCCCCAGGCGGAGCATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1AAAGAGTAGTTTACTGCTGTGTAGGCTGGAGCT TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA AAAGAGTAGTTTACTGCCACATATGATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCCCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGCAGCGCGCCCATAGGCTGCTCC TTAGGTCACCATTGTGTCGCCCATACGCTTCCCGGAGCCGCCTGCAGCG ATTCCGGGGATCGTCGCGCCCATACGCTTCCCGGAGCCGCGCAGGCGCGCCGCAGGGCGCGCGC	OSIylaB H1P1	CTGCCTGTCGGCTTAAGCGTGTAGGCTGGAGC	[Datsenko & Wanner, 2000] (A.
OSIylaB H2P2GAATACCCCGTACCAAAATCATCACAAAAATT TCATGGCCCGCTCCCGGTACCACATAGAAAATT CTGGTAAAACGTGCCGATAGCCGGTAGACACTTA OSIyliE H1P1Herstellung einer ylaE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possling)OSIyliE H1P1CGGTAAAAACGTTGCCGATAGCCGCTGTAGACTTGAACTTA GCTTC CGTAAAAACGTTGCCGATAGCGCGTGTAGGCTGGAGCGC TTACGGAAAAACGTTCCACGGCATATGAAATATCCTC CCTTAG CGCAGTGTTCAACTACTCTTTACAATATTCAAAAAGTGTCA TTATCCCCAGGCGGGAGAAAAAGTGGAAAATTGCT CCTTAG CATACGTCACGGGAAAACGTGGAAAAATGCCTCC TTAGC CATACGTACAGGCGGGAAAAAGTGGAAAATTGCT CATACGTCCCCGGGAAAACGTGTAGACTAGCGGGGAAAAACGTGGAAAATTGCT CATACGTCCCCGGGCAAAACGTTTTGCCGGCGCGGCA ATAAGATACTGCCCACATATGAATATCCTCC TTAG CAGGCCGGGCAAAATCATTTGCCGGCCTGCGA AAAAGAGTAGTTACTGCCCACATATGAATATCCTCC TTAG CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA AAAAGAGTAGTTACTGCCCACATATGAATATCCTCC TTAG CCGGCGTGTCAGCGGAAAACGCTATCTTGGTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCC TTAGGTAC CCGTCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCC CCGTCAGTTGGTAGGCTGGAGCTGCTCC CCGTACGTTACGTGGCCATACGCTACCGGTACACGG CCGGTCGGCGCACAATGCGCTACCGGCGCACGATGGTAACGCTCACGCTACCGGCG CCGGTCGGCGCACGACGGCGCACGATGAGGATGAGGT GCGTCAGGCGTTGGCCATACGCTTACCGGGG GCGTCAGGCGTTGGCCATACGCTTACCGGG GCGTCAGGCGTTGGCCATACGCTTACCGGG GCGTCAGGCGTTGGCCATACGCTTACCAGGG GCGTCAGGCGTGGAGCCGCGCACGATGAGAATGAGT GCGTCAGGCGTAGGCGCGCACGATGAGAAATATCCTCCTAG GCGTCAGGCGTAGGCGCGCACGATGAGAAATATCCTCTAG GCGTCAGGCGCAGCAGGAGGAGAAGGGG GCGTAGGCGCAGAATGCGCCACGATGAGGATAACGG CATGCGCGCACAATGCGCTTGACC GCGTCAGGCGCAGCAGGCGCGCGCGCACGATGGAGAAACGG GCGGAATCCCCCATAATGAATATCCACGCTTACAGGGT CCGGCAACACGCCGCMC C Cassina CaC-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATGGAACCGCAGAGAGAGAGAGGCG GGGGAAGCACCCCGCMC C CGGCAATCCCCAAAATGAGCAACCACCGGGGCC CGGAATTCCCCAATAGCATGGATAACCG CGGAATCCCCCAAAAGCAGCACCACCGGGGCC GCGAATTCCCCCATAATGAAGCAACCACCGGGGCC CACGCGAACACCA		TGCTTC	Possling)
OSIylaB H2P2TEATGGCCCGCTCCCGGTACATGATTAGATTAGTInstants in Datsenko & Wanner, 2000] (A. Possing)OSIylaB H2P2CGGTAAAACGTGCCGGTCCGGTGAGGCTGGAGGCT GCTTCHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CGACAGTGTCAATATTGAGATAATCCTC CCTTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CAAAGTAAACAGTGCGGAGCATATGAATATCCTC TTAATTCGCTCGGGATAAAAGTGGAAAATATCCTC TTAACCCAGGCGGGAGCATATGAATATCCTCC TTACHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAAAGTAAGTGTAACTACTCTTTAACTAATGTGCGGCTGGGGAG TTACGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCGGCGCGGGGG GCGCCGCGCCGCGGGAGAAATCATTTGTCGGCGCGGGGC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCGGCGCGGCGG GCGCCGCGCGCACAATGGCTATCTTGGTCGG TCAGGTATGGTGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGCG TTAGHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCCCTGTCAGCGAACATGCTATCTGGTCGG TCAGTATGGTGGGCGTGGGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC		GAATACCCCGTACCAAAATCATCAAGATAAATT	Herstellung einer vlaR-Mutante via
OSIyab H2P2    ICARGECCECCECCEGACATATICATATEC    Datesho & Wanner, 2000] (A.      OSIyliE H1P1    CCCCTAG    Possing)      OSIyliE H1P2    CGCAGTTGTTCAATATIGAGCTGTAGCCGCTTTGAACTTA TTAAGAAAACGTGCCGATAGCCGCTTTGAATTCCT    Herstellung einer yliE-Mutante via (Datesho & Wanner, 2000]      OSIyliE H2P2    CATACCACACATCCTCTTTACATATTGAAATATCCTCC CCTTAG    Herstellung einer yliE-Mutante via (Datesho & Wanner, 2000]      OSIyliE H2P2    CATACCCAGCCGATACATGAATATCCTCC TTAG    Herstellung einer yliE-Mutante via (Datesho & Wanner, 2000]      OSIyliF H2P2    CATACCCGCCTGGGAAAATCATTGTGCGGCGGGGCCTGGGAGCAATGATATACCTCCC GCTTC    Herstellung einer yliE-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)      OSIyliF H2P2    CAGGCCGGGCAAAATCATTGTGCCGGCAGCTGGTCGG ATAATAGATACTGCCACATAGAATATCCTCC    Herstellung einer yliF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)      OSIyliF H2P2    CGACCATCAGCTATCATGGTCAGCG TTAGGTAC    Herstellung einer yliF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]      OSIyneF H1P1    GCCGCTGACAGCAACATGCTACCGGTCAGCG TCAGGCATATGAATATCCTCCC    Herstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]      OSIyoaD H1P1    GCGCACCACAGCGGCACCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			Determine Chief yith - With and Cool (A
CTCCTTAGPosking)OSIyliE H1P1CGGTAAAACGTGCCGCATAGCCGCTTTGAACTT GCTTCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CCCAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTTCC TTAATTCGCTCGATCACGCGCATATGAATATCCTCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CCTACGTAACTACTCTTTACTAATTTGCAATATTCCACT TTAGCCTGGGGGAGCATATGAATATCCTCCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CATACGTAAACTACTCTTTACTAATTTTCCACT TTATCCCCGGGGGCAAAACTAGTGTGGGAGCAT AAAAGAGATGTTTACGTGTGTGGGCGGGCGAAAATTGGT GCTTCCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTGTCGGCCGGCGA CAGGCCGGGCCAAAACTACTTTGTCCGGCCTGCGG TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIylnF H2P2CAGGCCGGGCAAAACACGTTACTTGGTCGGC TTAGTTACTGCTCAGCGAGCTGCTTC TTAGGTACHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H1P1CCGCCTGTCAGCGAACATGCTTCCTC TGGGTCAGCCGCTTGGTCCGCCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTGGTGCGCC TGGGTCAGCCACGCGCGCGGCTTGGAAGATGAGT AAGGCAACCGGCGCGGTTGGATCHerstellung einer ynaF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTGGATC TGGGTCAGGCAACATCAGCCTTAGGAAGATGAGG AAGCGCACAGCGCGGGGTTGGATCHerstellung einer ynaF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P2TTTAATATATGATATTGATATTATATCATTTTACGGTT TGGGTCAGGCAACAGCGCGCGGAGAGATGAGGT AAGGCAACCAGCGGCGGGTTGGATCHerstellung einer ynaF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P3ACTCGTCGCGGAACCACGCGCGCGAGAGATGAGGT<	OSIylaB H2P2	ICAIGGEECGEEICEGGIACAIAIGAAIAIC	[Datsenko & Wanner, 2000] (A.
OSIyliE H1P1CGGTAAAACGTTGGCGATAGCCGCTTGAACTTA GCTTCHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CCCAGTTGTTCAATATTGAGCTGAACATATGCA TTAATTCGCTCGATCACGCGATATGAATATCCT CATACGTAAACTACTCTTTACTAATTGAAATATCCTCC TTAGTHerstellung einer yliE-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2CATACGCTGAAACTACTCTTTACTAATTGAAATATCCTCC TTAGC ATTCTCCCGGCGGGACAATATGAAGTGGAAAATTAG TTAGTATCCCCGGGGGAAAATTAGTGTGAAGATAGGAAAATTAG TTAGTATCCCCGGGGGCAAAATCATTGTGCCGGCCTGGGAG AAAAGAGTAGTTTACGGCTGGAGCTGAGCG ATAATGATTACTGCCACAATTGAATATCCTCCHerstellung einer yliF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P2CAGGCCGGGCAAAATCATTGTGCCGGCCTGGGAG ATAATGATTACTGCCACAATTGAATTCTGGGTCG TCAGTATGTTAGGCTGGAGCTGCTTC CGACCATCAATTATTATAAGGCATGCGCC TTAGGTACHerstellung einer yliF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4GCAGCCATCAATTTATTAAAGTCATCGGGCAGCGT TGAGTATGTGTAGGCGGCACCATCACGCTACAGGCT TTAGGTAC CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTACCGGCGACCATCACGCTACAGCTTACAGGG OSIyoaD H1P1Herstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGGCGCACAAGACTAGCTTACAGGGT TGGTCAGCCGACCAATTGAATTTCATCATTTACGTTT TCGGTCAGGCGACCACCGCGCGCACAAGAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGTestprimer bei Herstellung einer vonD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]P3ACTCGTCGCGAACCAGCGCMCFestprimer bei Herstellung einer chromsomalen laC2-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCATACGGATAAGGAACACCACCGGGGT AGGHerstellung einer becsA-lac2-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer becsA-lac2-Fusion (Powell et al		CTCCTTAG	Possling)
OSIy/IE H1P1TTCAGAAAAACCTTGGCGTGTAGGCTGGAGCT GCTTCHerstellung einer y/IE-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIy/IE H2P2CCCAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTTCA CCTTAGHerstellung einer y/IE-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIy/IE H2P2CATACGTAAACTACTCTTTTACTAATTTCCACT TTAGCHerstellung einer y/IE-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIy/IF H2P2ATTCTCCGCGCGGGACAATGGAAAATGGTGAGCTGGGAGCT AAAAGGTAGTTTACTGTGTGTGGGCGCTGGGAGC ATAATGATTACTGCTAGCTGGAGCTGGGAGCT ATAATGATTACTGCTAGCTGGAGCTGGGAGCT TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC CGCTCAGCGACAACCACTGCATCTTGGTCGGG CGACCATCATTATTAAAGTCATCGGCCGCAGAGAATGCTTC TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC CGACCATCAATTATTAAAGTCATCGGCTAACGGTAGAGCT GCGCCAGGGGTTTGTGGCCATACGCTACGGTACGCT TAAGGGCAACATGCTTGCGCCATACGCTACGGCTGACG TTAGGTGCGACATATGCGTGGCCATACGCTACGGCTACGGCTGCAGG CGACCATCAGTTGTCGCCATACGCTACGGCTACGGCTACGGCTGCAGG CGGCTGAGGGGTTTGTCGCCATACGCTACGGCTACGGCTGACG TGAGGTGCAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT P1GAGGTACCAGCGGCGCTTGCCCATAGGCTACGGCTGACG GGCGTAGGGCGTTGGACGCACGGCGCACGAGAGAGAGGAG TGAGGTACCAGCGGCGCTTGGCCAACAGCTGCAGGT TGAGGTACCAGCGCGCGCGCGCGCGCAGAGAGAGAGGAG TGGGTCAGGCGCTTGGCCATATGCCTACGCTTACGGCG TGAGCTGCGCAACACCGCGCGCACGAGAGAGAGAGGAG TGGGTCAGGCGCGCTGGGCGCACGAGAGAGAGAGAGGAGAGGAG TGGGTCAGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGAGAGAGA		CGGTAAAACGTGCCGATAGCCGCTTTGAACTTA	
OSJME III 1CICRAFACTOR CONSIGNATION CONSIGNAT	OSIVIE H1P1	TTCAGAAAAACGTTGGCGTGTAGGCGTGGAGCT	Herstellung einer <i>yliE</i> -Mutante via
CircleCircleOSIyliE H2P2CACAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTTCA TTAATTCGCTCGATCACGGCATATGAATATCCT CCTTAGHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2 (ATACGTAAGTAACTACTCTTTACTAATTTCCACT TTAGHerstellung einer yliE-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1 AAAAGAGTAGTTTACCTGGTAGGCTGAGACT TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2 OSIyliF H2P2CAGGCCGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGGCAA ATATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2 OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGG CGCCCATCAATTGAGCTGGAGCTGCTTC TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCACGTGAGCTGCGCCCCCCCCCCCCCACGCGCACGCTGCGCCCCCCCC	OSIYUL IIII I		[Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyliE H2P2CGCAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTCA TTAATTCGCTCGATCACGGCATATGAATATCCT CCTTAGHerstellung einer yliE-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2 (ATG yliF)CATACGTAAACTACTCTTTTACTAATTTTCCACT TTATACCCAGGCGGACAAATGGAAAATTAGT AAAAGAGTAGTTACCTGGCTGGAGCATATGAAAATCGTCC TAAGHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1AAAAGAGTAGTTACCTGCTGAGGCATGGAAAATTAGT AAAAGAGTAGTTACTGCCACATATGACGCTGGGAGCAAATCACTC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGCAAAATCATTGTCCGGCGCGCCGCG CAGGCAGGCAAATCACTGCCACATATGATAGATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIymeF H1P1GCCCCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCC TAAGGTACHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIymeF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAAGGTAC TAAGGAGAACCGGCGGCACCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGCAGCC TGGGTGTAGGCTGCAGCGCACCATACGCTTACAGGG HCTStellung einer yoaD-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H1P1GAGGTACCAGCGGGGCGCGCACGATGAGAGAGAGGAT AACCGCATATGAATATCCTCCTTAG TGGGTGTAGGCGCGCACGATGAGAGAGAGAGGAT AACCGCATATGAATATCCTCCTTAG HCTGTCCHerstellung einer yoaD-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTGATC CGGGTACCAGCGGGGTTGATCTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATGATATTGAATTTTATATCATTTACGTTT CTCGTCTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATGATATCGCCATAAGGAACACACCGGGGT CGCCAGAAGCTTGGAACAACAGCAACCACCGGGGC (Powell et al., 1994)PicsA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)		GUTIC	
OSIyliE H2P2TTAATTCGCTCGATCACGGCATATGAATATCCT CCTTAGHerstellung einer yilf-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliE H2P2 (ATG yliF)CATACGTAAACTACTCTTTACTAATTTCCACT TTAGHerstellung einer yilf-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1 OSIyliF H1P1AAAAGAGTGGTTAACGTGTGAGGCTGGAGCT AAAAGAGTAGTTAACTGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yilf-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2 OSIyneF H2P4CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer yilf-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H2P4 TGGCTCCGGCACACATGTACGCTGAGCGACCTGCTCC TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H2P4 TGGGTGTAGGCGTTGGTGGCGCCCACAGCGCCCC TCAGGACATCGTCGCGCCCCCACGCCCCCCCCCCC CKlauck)Herstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H1P1 CGGCGCAGGCGCCGCGCGCCCCGCCCCGATGAAGATGAGT TGGGTGTAGGCGCGCCGCGCGCGAGTGAAGATGAGT AAGCGCATCAGGCGCGCCGCGCGCAGTGAAGATGAGT AAGCGCATCAGGCGCGCGCGCGCGAGTAGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATC CGGTCCCEdaGGTACCAGCGCGGGTTGATC (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [ac2-Fusion] (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [ac2-Fusion] (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATAGAGAACCACCGGGCT AGHerstellung einer bcsA-lac2- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATAGTGC		CGCAGTTGTTCAATATTGAGATAAAAATGTTCA	Haustalling a since all'E Matanta aire
OSIMULTICData and the construction of the	OSIvliE H2P2	TTAATTCGCTCGATCACGGCATATGAATATCCT	Herstellung einer yllE-Mutante via
OSILylie H2P2 (ATG ylie)CATACGTAACTACTCTTTTACTAATTTTCCACT TTATCCCAGGCGGAGCATATGAATAGCTCCC TTAGHerstellung einer ylie-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000]OSILylie H1P1AAAAGAGTAGTTTACGTGTGTGGGAGCTGGAGCT GCTTCHerstellung einer ylie-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSILylie H1P1CAGGCCGGGCAAAATCATTGTCCGGCCTGCGA ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer ylie-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSILyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCC Klauck)Herstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSILyneF H2P4GCGCCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC TAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGCCACCC ATTCCGGGGATCCGCGCCACGCC ATGCAGCACCCCC ATGCAGCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	0019///2 1121 2	CCTTAC	[Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyliE H2P2 (ATG yilF)CATACGTAAACTACTCCITTTACTAATTATCCCCG TTAGHerstellung einer yilE-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyliF H1P1AAAAGGTAGTTTACGTGGTGTAGGCTGGAGCT GCTTCHerstellung einer yilF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA ATAATGATTATCATGTCAGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yilF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyliF H2P2GCGCGGTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGGG TTAGHerstellung einer yilF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTACTGGTGCGG CGGTCAGGCGGTTTGTGGCGGGGCGCCCHerstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyneF H2P4GCGCCATCAATTTATAAGGTCATCGGTCAGCG TCAGTACGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG Herstellung einer yoaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGGCGCCCGCGCACGATGAAGATGAGT TGAGTCAGGCGATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer vaACGCGATATGAATTCTCCTTAGTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer vansomalen (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer bei Act-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGAACCACCGGGTC AGHerstellung einer besA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer besA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P			
OSJMETH2TTTATCCCAGGCGAGCATATGAATATCCTCCInstacting introduction(ATG yliF)TTAGIntroductionIntroductionOSlyliF H1P1AAAAGAGTAGTTACGTGTGTGGGGAAAATTAGT AAAAGAGTAGTTACGTGTGTGGGGGGCAAAATCATTGTCGGGCGGG	OSINGE H2P2	CATACGTAAACTACTCTTTTACTAATTTTCCACT	Herstellung einer wliF Mutante via
Trag[Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H1P1ATCTCCGCCTGGGATAAAAGTGGAAAATTAGT AAAAGATAGTTACGTGTGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	(ATTC I'TC)	TTTATCCCAGGCGGAGCATATGAATATCCTCC	The stering effect yith with a
ATTCOSIyliF H1P1AAAAGAGTAGTTTACGTGTGTAGGCTGAGGCT GCTTCHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC ATAATGGTTACGTCAGCGAACATGCTATCTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4GCGCCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGGC TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGCTCAGGCGTTGTCGCCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer ynaF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H1P1GAGGTACCAGCGGCACCATACGCTTACGGCTACAGGC TGGGGTAGGCACCGCGCGCACCATAGAATATCCTCCTTAG TAAGGGAACCAGCGGCGCACCATAGAATATCCTCCTTAG AGGGTACCAGCGCGGGTTTGATCHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATATGATATTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATAGTGACACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer mm-lacZ-Fusion (A. Possline) </td <td>(AIG yliF)</td> <td>TTAG</td> <td>[Datsenko &amp; Wanner, 2000]</td>	(AIG yliF)	TTAG	[Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyliF H1P1AAAAGGAGTAGTTACGTGTGTAGGCTGGAGCT GCTTCHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCCHerstellung einer yliF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer yneF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TCAGTATGTGTGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TAGGTACHerstellung einer yneF-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTGGGAGCTGCTGCGCACC AATCCGGCGCACCGATGAAGATGGCT AAGGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGCT Herstellung einer ynaD-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer bicAr-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATAGTGAAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATAGTGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCGCCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer mm-lacZ-			
OSIyliF H1P1AAAAGAGTAGTTTACGTGTGTAGGCTGGAGCTIntractional constraints in transitional constraints in transiti		ATTCTCCGCCTGGGATAAAAGTGGAAAATTAGT	Herstellung einer <i>vliF</i> -Mutante via
GCTTCDatasenko & wannet, 2000]OSIyliF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTGTCCGGCCTGCGA ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTACHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TGGGTGTAGGCGGCTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGCTGGAGCTGCTCC TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACGGCGCACGATGAAGATGACT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGCACGATGATGAT TGTGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer bicsA-lacZ- FusionPbcsA EcoRIGCGAATTCCTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bicsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bicsA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)Prm-EcoRICGGAATTCCTGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer piaZ-Fuzion (Powell et al., 1994)	OSI <i>yliF</i> H1P1	AAAAGAGTAGTTTACGTGTGTAGGCTGGAGCT	Deteening & Wennen 2000]
OSIytiF H2P2CAGGCCGGGCAAAATCATTGTCCGGCCTGCGA ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TCAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTGGCGCACTACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGACCATCCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGACCATCCGCCACAGAGAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATATGATATTGATATTTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCTGATAGGATAAGCAACCACCGGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer th-lacZ-Fusion (A. Possline)		GCTTC	[Datseliko & Walliel, 2000]
OSIJvliF H2P2ATAATGATTACTGACACATATGAATATCCT TTAGHerstellung einer yliF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIJvneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGAGCGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGAT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGAT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTCCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCATAACGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATAAGCAACCACCGGGGTC ACGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCAGCACAACAACAGTTGGTCCHerstellung einer rh-lacZ-Fusion (A. Possline)		CAGGCCGGGCAAAATCATTTGTCCGGCCTGCGA	
OSIyut H2P2ATAATGATTACTGCCACATATGAATATCCTCC[Datsenko & Wanner, 2000]OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGCCACCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTGGCGCACCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCGTCCHerstellung einer ynaF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATATGATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRIGCGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer bcsA-lacZ- Fusion			Herstellung einer yliF-Mutante via
TTAGIndustry constraintsOSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTACHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGCGT TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIynaD H2P2GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGCGT TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIynaD H2P2TAAGAGCAAACCGCCGCACGATGAAGATGAGAT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer vonD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P2TTTAATATATATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [lacZ-Fusion] (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [lacZ-Fusion] (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGAAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PpgaA EcoRIGCGGAATTCATACCGATGATGATAGTAGTTGCHerstellung einer rn-lacZ-Fusion (Posline)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAG	OSIyliF H2P2	ATAATGATTACIGCCACATATGAATATCCTCC	[Datsenko & Wanner 2000]
OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCHerstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (G. Klauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000) (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGATCCGTCGACCHerstellung einer ynaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)P1GAGGTACCAGCGCGGCGCGCGCGCGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsmalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCFestprimer bei Herstellung einer chromsmalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)		TTAG	[Dubenko & Wanner, 2000]
OSIyneF H1P1GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC[Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyneF H2P4TTAGGTAC TAGGTAC ATTCCGGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTAGGCGGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer vhanner, 2000]P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCG AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIIGCTCAGGAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCCTGGCAACATGATGATAAGTAGCG AGHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)			Herstellung einer <i>vneF</i> -Mutante via
OSIMPT HITTTCAGTATGTGTAGGCTGAGCTGCAGCTGCDatactics of Walled, 2000 [40. Klauck)OSIMPT HITTCGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCGHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIMPT HITTCGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCGHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIMPT HITTGCGTCAGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIMPT HITTGCGTCAGGCGCTGGAGCTGCTCCHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIMPT HITTGCGTCAGGCGCGCCCGCGCCCGCACGATGAAGATGAGCT AGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIMPT HITTGCGGTACCAGCGCGCGCCCGCGCCCCGCTCCCTTACGGCGCACGATGAAGATGAGCT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ymeF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGCGCCGCGCCCGCGCCCCCCCCCCC	OSIvnoF H1P1	GCCGCTGTCAGCGAACATGCTATCTTGGTTCGG	[Datsenko & Wanner 2000] (G
Nauck)OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATAAAGTCATCGGTCAGCG TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIynaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGGAGCTGCATCCHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIynaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCAGTATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGGCGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer ynaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P2TTTAATATATGATATTGATATTTATATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen [lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCG AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATAGTAGTGC AGHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possline)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possline)	OSIYNET IIII I	TCAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
OSIyneF H2P4CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG TAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACCHerstellung einer yneF-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCGTCHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoR1GCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoR1GCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGATGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possline)Prm-EcoR1CGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possline)			Klauck)
OSIyneF H2P4TTAGGTAC ATTCCGGGGATCCGTCGACC[Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCGCATACGCTTC GGGTGTAGGCGCAGCGGCACGATGAAGATGAGG AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCCGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possline)		CGACCATCAATTTATTAAAGTCATCGGTCAGCG	Herstellung einer <i>yneF</i> -Mutante via
ATTCCGGGGATCCGTCGACCKlauck)OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTTGTCGCCATACGCTTACAGGG TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCGTCCHerstellung einer yoaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGAT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via (Datsenko & Wanner, 2000)P1GAGGTACCAGCGCGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTGATATTTATCATTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGATGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possline)Prtm-EcoRICGGAATTCCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possline)	OSIyneF H2P4	TTAGGTAC	[Datsenko & Wanner, 2000] (G.
OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTTGGTCGCCATACGCTTACGCGTACGGCGGGGGTGGGAGCTGCGCCATACGCTTACGGCTTACGGCTGCGCGCATACGGCGCGCATACGGGGGGGG		ATTCCGGGGATCCGTCGACC	Klauck
OSIyoaD H1P1GCGTCAGGCGTGTGCGGAGCTGCAGCCATACGCTTACCGGG TGGGGGGTGTAGGGCTGGAGCTGCAGCCGTACGGGTGCAGCGGGGGGGG			Hanstellen z einen von D. Metente ein
OSISYONDTGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC[Datsenko & Wanner, 2000]OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCG AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRICGGAATTCCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)	OSIvoaD H1P1	GUGICAGGUGITIGIUGUCATACULITACAGGG	Herstellung einer yoaD-Mutante via
OSIyoaD H2P2TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGHerstellung einer yoaD-Mutante via IDatsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTAATACATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen glacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen glacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPgaA EcoRIGCGAATTCCAGAGGTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possling)	0.01/042 1111 1	TGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	[Datsenko & Wanner, 2000]
OSIyoaD H2P2AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAGIDatsenko & Wanner, 2000]P1GAGGTACCAGCGCGGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATATGATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbgaA EcoRIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCCTATACCGATGATGATGATGATGATGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (AGPrtn-EcoRICGGAATTCCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A, Possling)		TAAAGAGCAACCGGCGCACGATGAAGATGAGT	Herstellung einer <i>voaD</i> -Mutante via
P1GAGGTACCAGCGCGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3GCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possling)	OSIyoaD H2P2	AAGCGCATATGAATATCCTCCTTAG	[Datsenko & Wanner 2000]
P1GAGGTACCAGCGCGGTTTGATCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen 1994)P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bei AcsA-lacZ- FusionPbgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGHerstellung einer bei AcsA-lacZ- FusionPrm-EcoRICGGAATTCCCGGCAACCATCAGTTGCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possline)		AAOCOCATATOAATATCCTCCTTAO	[Datsenko & Wanner, 2000]
P1GAGGTACCAGCGCGGTTTGATCInformation formation formation formation formation formation for the stelling of the chromsomalen formation for the stelling of the chromsomalen formation for the stelling enter chromsomalen for the stelling enter chromsoma			Testprimer bei Herstellung einer
P1GAGGTACCAGCGGGGTTTGATCChronisonalen (Powell et al., 1994)P2TTTAATATATTGATATTTGATATTTATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)	D1		abromacionalen lag Eusion
P2TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)	P1	GAGGIACCAGCGCGGIIIGAIC	chromsonnalen lacz-Fusion
P2TTTAATATATATGATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTTestprimer bei Herstellung einer chromssomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromssomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGATGHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			(Powell et al., 1994)
P2TTAATATATTGATATTGATATTTATATCATTTACGTTTTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGACHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrm-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rm-lacZ-Fusion (A. Possling)			
P2TTTAATATATTGATATTTGATATTTATCATTTTACGTTT CTCGTTCTestprimer ber Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)			Testprimer bei Herstellung einer
P2CTCGTTCChromsomalen (Powell et al., 1994)IacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATGATGATGCHerstellung FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung Fusion	<b>D</b> 2	TTTAATATATTGATATTTATATCATTTTACGTTT	Testprimer ber Herstehung einer
P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)P3ACTCGTCGCGAACCGCMCHerstellung einer lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	P2	CTCGTTC	chromsomalen lacZ-Fusion
P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)		ciconc	(Powell et al., 1994)
P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer bei Herstellung einer chromsomalen 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTCHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			
P3ACTCGTCGCGAACCGCMCTestprimer ber Herstellung einer chromsomalen [lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ- bcsA-lacZ-PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			Testaningen hei Henstellene einen
P3ACTCGTCGCGAACCGCMCchromsomalen (Powell et al., 1994)lacZ-Fusion (Powell et al., 1994)PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			restprimer bei Herstenung einer
Image: constraint of the stellung of the stell	P3	ACTCGTCGCGAACCGCMC	chromsomalen lacZ-Fusion
PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			(Powell et al., 1994)
PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ-PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			
PbcsA EcoRIGCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ- bcsA-lacZ-PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung Fusioneiner bcsA-lacZ- bcsA-lacZ-PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			
PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-Fusion (A. Possling)Prtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	PhesA EcoRI	GCGAATTCCCCATAATGATGAGATACCG	Herstellung einer bcsA-lacZ-
PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGTC AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	1 Desit Leona	de dimini de ce cantanti di transmitte e d	Fusion
PbcsA HindIIIGCTCAGAAGCTTGGATAAGCAACCACCGGGT AGHerstellung einer bcsA-lacZ- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			
PbcsA HindIIIOCTOAGAAGCETTGGATAAGCEACCAGCGGGTCHeistellungenterbcsA-tac2- FusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)		GCTCAGAACCTTCCATAACCAACCACCCCCTC	Herstellung einer bost las7
AGFusionPpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	PbcsA HindIII		The stemung enter DCSA-lacz-
PpgaA EcoRI    GCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGC    Herstellung einer pgaA-lacZ-Fusion      Prtn-EcoRI    CGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCC    Herstellung einer rtn-lacZ-Fusion		AU	Fusion
PpgaA EcoRIGCGAATTCATACCGATGATGATGATAGTTGCHerstellung einer pgaA-lacZ-FusionPrtn-EcoRICGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCCHerstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)			
Prtn-EcoRI  CGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCC  Herstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	PpgaA EcoRI	GCGAATTCATACCGATGATGATAGTTGC	Herstellung einer <i>ngaA-lacZ</i> -Fusion
Prtn-EcoRI    CGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCC    Herstellung einer rtn-lacZ-Fusion (A. Possling)	-rour Boord		
Prin-Ecoki CGGAATTCCGGCAACAATCAGTTTGTCC (A. Possling)			Herstellung einer rtn-lacZ-Fusion
	Prm-EcoKI		(A. Possling)

Prtn-HindIII	CCCAAGCTTCAATGCAGGTAAGCAGGAGC	Herstellung einer <i>rtn-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PycdT-EcoRI	GCGAATTCCCTGTATTACTCCATGTATTGCC	Herstellung einer <i>ycdT-lacZ</i> -Fusion
PycdT-HindIII	GCTCAGAAGCTTCAAACAATAAGCTCACTAAT AC	Herstellung einer <i>ycdT-lacZ</i> -Fusion
PycgF-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GTAACGAGTGATTGCTCCCGCAGA ATC	Herstellung einer <i>ycgF-lacZ</i> - Fusion (N. Tschowri)
PycgF-HindIII	CGTGAC <b>AAGCTT</b> CAGGTTCGTCGTCACGTATA TGGC	Herstellung einer <i>ycgF-lacZ</i> - Fusion (N. Tschowri)
PycgG-EcoRI	CGGAATTCCGTCGTCACGTATATGGCTACG	Herstellung einer <i>ycgG-lacZ</i> - Fusion (N. Tschowri)
PycgG-HindIII	GTGACAAGCTTGCATTTGCTTGTCCCGGCCAA AGG	Herstellung einer <i>ycgG-lacZ</i> - Fusion (N. Tschowri)
PydeH-EcoRI	CGGAATTCCATTAGTGGCAGTCTGGATAAG	Herstellung einer <i>ydeH-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PydeH-HindIII	CCC <b>AAGCTT</b> GATTTAACAAGATGGCATCAATTT C	Herstellung einer <i>ydeH-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyeaJ-BamHI	CAAT <b>GGATCC</b> GCGGCGATAAAATGCCG	Herstellung einer <i>yeaJ-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyeaJ-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GTCGCGACCTGTTGTTAAGGAC	Herstellung einer <i>yeaJ-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyeaP-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GCTGGCAATAGACCGACGC	Herstellung einer <i>yeaP-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyeaP-HindIII	CCCAAGCTTCAAGGGATTGCGAGACGCG	Herstellung einer <i>yeaP-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfeA-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GTACGTAAACGCATCGTGGG	Herstellung einer <i>yfeA-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfeA-HindIII	CCCAAGCTTGCGTAAACGCTAGTGTGAATATC	Herstellung einer <i>yfeA-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfgF-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GTGGACGGTACTTACATTAAGG	Herstellung einer <i>yfgF-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfgF-HindIII	CCCAAGCTTGCCCCCACCATTTATCACG	Herstellung einer <i>yfgF-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfiN-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GCTTTCCTGCCAGCTGCAAC	Herstellung einer <i>yfiN-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyfiN-HindIII	CCCAAGCTTGTAATGCTCTTTTAAACGTGGGG	Herstellung einer <i>yfiN-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyhdA-EcoRI	GCGAATTCACCGTGACATCGCCCTCCGGC	Herstellung einer <i>yhdA-lacZ</i> - Fusion
PyhdA-HindIII	GCTCAGAAGCTTCAAAGGCCGAAAATTTCGTC G	Herstellung einer <i>yhdA-lacZ-</i> Fusion
PyhjK-EcoRI	GCGAATTCAATCTGATCCCGACCGACTGGC	Herstellung einer <i>yhjK-lacZ</i> -Fusion
PyhjK-HindIII	GCTCAGAAGCTTCGGCTGCCACCATTGCCATC TGC	Herstellung einer <i>yhjK-lacZ</i> -Fusion
PyjcC-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> CACAATTGATTGTTTGTTAGCC	Herstellung einer <i>yjcC-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyjcC-HindIII	CCCAAGCTTCCGGCAACGCCAGTAATTGG	Herstellung einer <i>yjcC-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PylaB-EcoRI	CGGAATTCCTGCCGCGCTGGTTGAAG	Herstellung einer <i>ylaB-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PylaB-HindIII	CCCAAGCTTGGCCGACCAGATGTCGTG	Herstellung einer <i>ylaB-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyliE-EcoRI	CGGAATTCGCTCAATGAGGCTCGAGCG	Herstellung einer <i>yliE-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyliE-HindIII	CCCAAGCTTGACCAATAAATGACAGTGCTGC	Herstellung einer <i>yliE-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)

PyliF-EcoRI	CG <b>GAATTC</b> GGGTACGGATATCGATTGATG	Herstellung einer <i>yliF-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyliF-HindIII	CCCAAGCTTGCAGACTGACTGTAAGTACG	Herstellung einer <i>yliF-lacZ</i> -Fusion (A. Possling)
PyneF-BamHI	CG <b>GGATCC</b> CTGGCTAATGATAGTGAGTTCG	Herstellung einer <i>yneF-lacZ</i> - Fusion (A. Possling)
PyneF-HindIII	CCCAAGCTTCGATCAACACGCCCGTTGAG	Herstellung einer <i>yneF-lacZ</i> - Fusion (A. Possling
PyoaD-EcoRI	GCGAATTCCGGATGGCTCTGCGCCGCACC	Herstellung einer <i>yoaD-lacZ</i> - Fusion
PyoaD-HindIII	GCTCAGAAGCTTTACAAACAATCATTCGATTA CG	Herstellung einer <i>yoaD-lacZ</i> - Fusion
RcsD H1	CTGCCCTATCACTTCGCGAAGTTTTAACAGGTC ATAAACA	M. Pruteanu
RcsD541 for	GAATTTCACACTGTACCCTTTATACTGCCCTATC ACTTCGCGAAGTTTTAGTGTAGGCTGGAGCTGC TTCG	Majdalani <b>et al</b> ., 2005, zur Herstellung einer <b>RcsD</b> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
RcsD541 rev	GTTGGCCTGTTGCAACATCTCTGCACGACGTGA ATCAACAATGTCGCTGAATTCCGGGGGATCCGTC GACC	Majdalani <b>et al</b> ., 2005, zur Herstellung einer <b>RcsD</b> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TbcsA-up (T1)	GCAAAGCCAGCGCCGATTACTGC	Testprimer bei Herstellung einer bcsA-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TbscA down (T2)	CATCACGCGAAGGACCGTTCTGC	Testprimer bei Herstellung einer bcsA-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TCRISPR T1	GCGCGCAGTCACGGAATAGCC	Testprimer bei Herstellung einer <i>CRISPR</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TCRISPR T2	CCTCCGCGCTTACGAGGCAGATTAG	Testprimer bei Herstellung einer <i>CRISPR</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TcsgD (T1)	CGTATCGGCGCGTCTAATAACG	Testprimer bei Herstellung eines csgD-Flags via [Uzzau et al., 2000]
T <i>csgD</i> down (T2)	CACACAGCAGTGCAACATCTGTC	Testprimer bei Herstellung eines <i>csgD</i> -Flags via [Uzzau et al., 2000] und einer <i>csgD</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (Weber <i>et al.</i> , 2006)
T <i>csgD</i> up (T1)	GATCCAGCTTCCCCATCGTGCACTG	Testprimer bei Herstellung einer <i>csgD</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (Weber <i>et al.</i> , 2006)
Tdos down (T2)	CCGATGAAGCTCTGTATATCGC	Testprimer bei Herstellung einer dos-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
Tdos up (T1)	GGAAGGAATCTCCCGGAATCG	Testprimer bei Herstellung einer dos-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TgcvB T1	GAATTTAACAATTAGATCACACTATG	Testprimer bei Herstellung einer <i>gcvB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TgcvB T2	TACCGGTATGATTTCGTATAAAG	Testprimer bei Herstellung einer gcvB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TglmZ (T2)	CGACGCGCTGGACAGACTGC	Testprimer bei Herstellung einer glmZ-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]

TglmZ up (T1)	CAGGTTAAATATTCACTCAGG	Testprimer bei Herstellung einer glmZ-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
Tlac down (T2)	GCCGCTTATCCTTTCACCGGG	Testprimer bei Herstellung einer <i>lac</i> ( <i>Z</i> - <i>A</i> )-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
Tlac-up (T1)	GCGCGCAGTACAGCGGTTCC	Testprimer bei Herstellung einer <i>lac</i> ( <i>Z</i> - <i>A</i> )-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (G. Klauck)
TmcaS T1	TATGATAACCAGACCGGG	Testprimer bei Herstellung einer McaS-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TmcaS T2	GGCCTATTATTTGATTCAGC	Testprimer bei Herstellung einer McaS-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TomrA T1	CGTTGCATTTCCCTTCATTCC	Testprimer bei Herstellung einer omrA-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TomrA T2	CGCGCTCGCCCTTCAGTG	Testprimer bei Herstellung einer omrA-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TomrB T1	GTTACGGAAAACGCCCGTTGG	Testprimer bei Herstellung einer omrB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TomrB T2	GGTGCAAGAGACAGGGTACG	Testprimer bei Herstellung einer omrB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
T <i>pgaA</i> down (T2)	CGTCATCAAAAGTCAGCACTAC	Testprimer bei Herstellung einer <i>pgaA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TpgaA up (T1)	TAATAACGGATTATGAGGTGC	Testprimer bei Herstellung einer <i>pgaA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TrcsD T1	CACAAATAATTAACATCCGC	Testprimer bei Herstellung einer <i>RcsD</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TrydB (T2)	GCATAGACCCTGATGTGTGG	Testprimer bei Herstellung einer <i>rydB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
T <i>rydB</i> up (T1)	GTCTGGGCGTGCATTGATCC	Testprimer bei Herstellung einer <i>rydB</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
T <i>ycdT</i> down (T2)	GTCCGGAACAATTTGAAAAC	Testprimer bei Herstellung einer <i>ycdT</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (H. Weber)
TycdT up (T1)	GGAATTTCATATTGACAACAGTAC	Testprimer bei Herstellung einer <i>ycdT</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (H. Weber)
TydiV down (T2)	CTCAGCGTGTTAGCCAGTTCGG	Testprimer bei Herstellung einer ydiV-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TydiV up (T1)	GGACGGCGATGATCATCGCCGTC	Testprimer bei Herstellung einer ydiV-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TyhdA down (T2)	GCAAAAATCATCTGCTACG	Testprimer bei Herstellung einer yhdA-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (S. Busse)
TyhdA up (T1)	CTGTTCTAAAAGTAACGCCTGC	Testprimer bei Herstellung einer <i>yhdA</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000] (S. Busse)

TylaB down (T2)	CGAGTCAATCATCGACGAATAGG	Testprimer bei Herstellung einer ylaB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TylaB up (T2)	GGATATGCTGGTGAGAACACG	Testprimer bei Herstellung einer ylaB-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TyliE down (T2)	CCCCTGAGCCTGAACACATC	Herstellung einer <i>yliE</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TyliE up (T1)	GCGGTAAAACGTGCCGATAGC	Herstellung einer <i>yliE</i> -Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TyoaD down (T2)	GGGAGCTTTGTTATCGTGACC	Testprimer bei Herstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
TyoaD up (T1)	GGTAGCCCGGAACAGGTTTGC	Testprimer bei Herstellung einer yoaD-Mutante via [Datsenko & Wanner, 2000]
<i>ycgG</i> -HindIII down	CGGCCGAAGCTTTCACTCAACCACAACCTTCAC C	Herstellung eines pYcgG in pCAB18
<i>ycgG</i> -KpnI up	CGGCCGGGTACCGGCATTTTCATGTATTAAACC C	Herstellung eines pYcgG in pCAB18
yhdA down	GCTGCAACAATCTGGCGAG	Herstellung eines pYhdA in pCAB18
yhdA up	GCCCGCTTCCTCACTATCGG	Herstellung eines pYhdA in pCAB18
yhdA(+150)- NcoI	TCATTGCCATGGTCTTCCTGGCGGTACGC	Herstellung eines pYhdA in pQE60 (ohne Tranmembrandomänen)
<i>yhdA</i> (+1918)- BglII	CAGGTTAAGATCTAACCGAGTATCTTTGTGAAT A	Herstellung eines pYhdA in pQE60 (ohne Tranmembrandomänen)
yojN (P4)	GATTTGCGAATACCGAACAA	M. Pruteanu

#### 3.5.1.4 Präparation chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder durch InnuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena).

#### 3.5.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben aus Restriktionsanalysen bzw. aus PCR-Ansätzen wurden mit 6-fach konzentriertem DNA-Auftragspuffer gemischt und auf ein 1 % iges Agarosegel (Gel- und Laufpuffer: 1 x TAE, Rezept siehe 3.2.4.) aufgetragen. Die Fragmentgrößen wurden mit Standard-DNA (BstII-verdaute  $\lambda$ DNA oder 100 bp Marker, New England Biolabs) verglichen und bestimmt. Die DNA wurde bei 90 – 100 V für 60 bis 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend für etwa 10 Minuten mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml gefärbt. Diese Chemikalie interkaliert in Doppelstrang-DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 3.5.1.6 Plasmidkonstruktion

Die konstruierten Plasmide dieser Arbeit sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

#### Restriktionsanalysen und Ligation

Restriktionsanalysen wurden durchgeführt, um passende Überhänge für die Klonierung eines DNAoder PCR-Fragments in einen Vektor zu schaffen und zur Überprüfung von Klonierungen. Für die Analyse wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme nach der Angabe des Herstellers (New England Biolabs) verwendet. Um die Religierung von Vektoren zu verhindern, wurden diese zusätzlich zur Restriktion mit einer Phosphatase (CIP, New England Biolabs) für 30 Minuten bei 37°C behandelt. Geschnittene DNA-Fragment wurden mittels Gelelektrophorese analysiert und dann mit dem QIAquick gelextraction Kit (Qiagen) oder mit dem QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Ligation fand dann zusammen mit der Plasmid-DNA mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) bei 1 h bei RT, über Nacht bei 16°C oder für zwei Tage bei 4°C statt.

#### **Transformation**

Als Transformation bezeichnet man die Genübertragung durch freie, lösliche DNA, die aus einem Spenderbakterium freigesetzt oder daraus extrahiert worden ist, auf ein Empfängerbakterium. Die Transformation von gereinigten Plasmiden erfolgte mittels TSS-Transformation (Chung *et al.*, 1989) und die Transformation von DNA-Fragmenten oder Ligationsansätzen erfolgte durch Elektroporation (Calvin und Hanawalt 1988). Die Herstellung von elektrokompetente Zellen erfolgte nach der Methode von Sambroock (Sambroock *et al.* 1989).

#### Sequenzierung

Aus den nach der Elektroporation erhaltenen Klonen wurden die Plasmide isoliert und die korrekte Größe des eingebrachten DNA-Fragments (Insert) wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft. Zur Sequenzierung des Fragments und der adjazenten Plasmidregionen wurde das Plasmid zu GATC (Konstanz) geschickt.

#### 3.5.1.7 Herstellung chromosomaler *lacZ*-Fusionen

Zur Herstellung von *lacZ*-Genfusionen wurden Fragmente, welche die vorhergesagte Promotorregion und Nukleotide (von 30 Nukleotiden des zu untersuchenden Gens bis zu dem Gen, das vor einem untersuchten Gen liegt, ca. 300bp stromaufwärts) stromabwärts vom Startcodon des untersuchten Gens enthielten als *lacZ*-Fusion in den Vektor pJL28 (translationaler *lacZ*-Fusionvektor, Lucht *et al.* 1994) oder in den Vektor pCAB18 (transkriptionaler *lacZ*-Fusionsvektor, Barembruch *et al.*, 2007) kloniert (Primer zur Herstellung von *lacZ*-Fusionen siehe Tabelle 3.6; Plasmide, die zur Kreuzung ins Chromsom genutzt wurden, siehe Tabelle 3.4).

Um das Vorliegen der *lacZ*-Fusion als Einzelkopie in der Zelle zu erreichen, wurde diese in das Chromosom von *E. coli* gekreuzt. Dazu wurden die in das Plasmid klonierten Fusionskonstrukte durch in vitro-Rekombination auf den Phagen  $\lambda$ RS45 oder  $\lambda$ RS47 übertragen (Simons *et al.*, 1987). Das Prinzip des Transfers beruht auf der doppelten homologen Rekombination des Genes *lacZ*' (ß-Galaktosidase) und *bla*' (ß-Lactamase) des Phagen mit den auf dem Fusionsplasmid divergent orientierten Genen *lacZ* und *bla*. Über die Integration des Phagen an der attB-site des Bakteriums wurde die Fusion stabil in das Chromosom gekreuzt.

Um eine mehrfache Integration des Phagen an auszuschließen, wurden die erhaltenen Klone mittels Test-PCR auf Einzellysogenie untersucht (Powell *et al.* 1994).

# 3.5.1.8 Inaktivierung chromosomaler Gene und chromosomale Markierung einzelner Gene mittels PCR-Produkten

Insertions- und Deletionsmutanten wurden nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000, One Step inactivation, OSI) hergestellt (Primer zur Herstellung und Kontrolle von Insertions-/ Deletionsmutanten siehe Tabelle 3.6).

Die Markierung eines chromosomalen Gens mit einem FLAG-Tag erfolgte nach einer der Methode von Uzzau *et al.* (2001). Hierbei handelt es sich um eine veränderte Methode von Datsenko und Wanner (2000). Die Primer zur Herstellung und Kontrolle eines chromosomalen FLAG-Tags sind in Tabelle 3.6 zu finden.

#### 3.5.1.9 Messung der Genexpression: β - Galaktosidasetest

Mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung kann man den Grad der Expression eines Gens bestimmen [Miller, 1972].

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde nach Miller (1972/1992) bestimmt und in  $\mu$ mol gespaltenes Substrat (ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben.

Abweichend von diesem Protokoll wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei 578nm und die Absorption des Produktes o-Nitrophenol bei 405 nm gemessen. Zur Bestimmung der ß-Galaktosidase-Aktivität wurden Aliquots der Kultur entnommen und nach Abzentrifugieren mit geeigneten Teilmengen 1 x Z-Puffers (Rezept siehe 3.2.4.) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von einem Tropfen 0,1 % SDS und zwei Tropfen Chloroform aufgeschlossen. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG (4 mg / ml) gestartet. Bei Erreichen einer geeigneten Gelbfärbung bzw. nach maximal 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M Natriumcarbonat abgestoppt. Reaktionsansätze wurden für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde die Absorption im Überstand bei 405 nm bestimmt. Als Referenz diente ein Testansatz, der anstelle einer Bakteriensuspension 1 x Z-Puffer enthielt.

Die spezifische Aktivität a eines Enzyms ist definiert als umgesetzte Stoffmenge pro Zeit und Menge an Protein. Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ( $\Delta E = \Delta c * d * \varepsilon$ ) lässt sich die Formel der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität herleiten, wenn 1 ml Bakteriensuspension bei einer OD<sub>578</sub> von

1 0,107 mg Protein enthält. Daraus ergibt sich:

# Spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität = $\Delta n / (\Delta t / m_{Protein})$ = $V / (\epsilon * c_p) * [\Delta E_{405} / (\Delta t * V_B * OD_{578})]$ = 3,38 \* $E_{405} / (\Delta t * V_B * OD_{578})$

in  $[\mu mol * min^{-1} * mg^{-1} * Protein]$ 

 $\Delta c = Konzentrationsänderung d = Breite der Küvette$ 

 $\Delta n = \ddot{A}nderung der Stoffmenge m_{Protein} = Proteingehalt [mg]$ 

V = Endvolumen des Ansatzes (1,7ml)  $\Delta E_{405}$  = Extinktionsänderung (405nm)

 $\Delta t$  = Reaktionszeit [min] cp = Gesamtproteingehalt

 $\epsilon$  = Extiktionskoeffizient; von o-Nitrophenol bei 405 nm:  $\epsilon$  = 4860 M<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>

## 3.5.2 RNA-Analytik

#### 3.5.2.1 Präparation von Gesamt-RNA und Qualitätskontrolle

Für Northern Blot- und Mikroarray-Analysen wurde Gesamt-RNA mittels der heißen Phenol-Chloroform Methode präpariert.

Dazu wurden Proben zu definierten Zeitpunkten der Wachstumskurve von aerob gewachsenen Bakterienkulturen abgenommen (meist 5 ml) und mit Stopp-Lösung (eiskaltes 5% iges Wassergesättigtes Phenol in Ethanol) gemischt (Bernstein *et al.*, 2002). Diese Behandlung verhindert sofort die Synthese und den Abbau von RNA und ist wichtig für die Analyse von bakterieller RNA, weil die mittlere Halbwertszeit der RNA bei ca. 2 Minuten liegt. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Proben für 10 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden bei -30 °C aufbewahrt oder gleich weiter verarbeitet.

Die Zelllyse und RNA Isolation erfolgte unter Verwendung von Phase-lock-tubes (5' Prime) nach dem Protokoll von Tani *et al.*, (2002). Die Chromosomale DNA wurde mit 3 – 10µl RNase-freier DNaseI (10 u/µl, Roche) bei 28°C für 30 Minuten entfernt. Im Anschluss erfolgte die RNA-Isolierung ebenfalls unter Verwendung von Phase-lock-tubes mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und einer Alkoholfällung [Sambrook *et al.* 1989]. Die gefällte RNA wurde dann in 40 µl RNase freiem Wasser (DEPC-behandelt) bei 64°C für zehn Minuten gelöst.

Die Reinheit der Proben wurde durch Messung des 260/280nm Absorptionsverhältnisses bestimmt. Ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,1 gibt an, dass die Proben rein genug sind für die weitere Analyse. Eine weitere Qualitätskontrolle erfolgte mittels Gelektrophorese auf einem 1% igen Agarosegel. Nach Färbung der RNA (sichtbar gemacht werden kann die 23S und die 16S rRNA) mit Ethidiumbromid konnten Aussagen über DNA-Kontaminationen und Abbau getroffen werden.

#### 3.5.2.2 Northern Blot-Analyse

#### A) mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Diese Art der Auftrennung wurde für den Nachweis größerer RNA-Fragmente (> 1000 bp) genutzt (beispielsweise: *mreB, csgD, csrD*). Dazu wurden 10 - 20  $\mu$ g der zuvor isolierten Gesamt-RNA in einem Volumen von 10  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l RNA-Ladepuffer versetzt und 15 Minuten bei 65°C erhitzt. Nach einminütiger Inkubation der Proben auf Eis wurden das Formaldehyd-Agarosegel (1.2 g Agarose, 72 ml DEPC-water, 10 ml 10x MOPS buffer, 18 ml 37 % Formaldehyd) beladen. Die Proben wurden bei 80V in 1 x MOPS-Puffer für drei bis vier Stunden aufgetrennt.

Nach der Auftrennung der RNA erfolgten mehrere Waschschritte mit DEPC-behandeltem Wasser. Dieser Schritt entfernt das enthaltene Formaldehyd aus dem Gel, da es beim anschließendem Blotten hinderlich ist. Zur optimalen Vorbereitung des Gels für den folgenden Blotvorgang folgten zwei Inkubationsschritte in 20 x SSC (je 15 min). Die RNA wurde mit einem Vakuum Blotgerät (Semi Dry, Biorad) für 1,5 Stunden bei 5 Hg auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) transferiert. Durch eine zehn minütige Bestrahlung der Membran mit UV erfolgte die Fixierung der RNA (UV-crosslinking).

Der Transfer wurde durch Anfärben der Membran mittels einer Methylenblau-Lösung überprüft. Die anschließende Entfärbung wurde mit Bleaching-Puffer vollzogen (2 x 15 min) und daraufhin folgte die Inkubation mit 2 x SSC für 5 Minuten (2x).

#### B) mittels denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Diese Art der Auftrennung eignet sich besonders für den Nachweis kleiner RNA-Fragmente (> 100 – 1000 bp, beispielsweise: kleine RNAs, csgD).

Hierfür wurde die RNA  $(3 - 5 \mu g)$  in einem 4,5 - 12 % igem Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff (42 g urea, 10 ml 10x TBE, 11.25 ml Rotiphorese Gel40 (Roth; Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1), 50  $\mu$ l TEMED, 500  $\mu$ l 10 % APS in a total volume of 100 ml) aufgetrennt. Nachdem die RNA mit dem Ambion-Ladepuffer II gemischt wurde, wurde sie auf 75 °C für zehn Minuten inkubiert. Nach erfolgreichem Beladen wurde das Gel für 1 – 2 Stunden bei 200 V (Gerät von C.B.S. Scientific CO., Biorad oder Peqlab) laufen gelassen. Der Transfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Roche) erfolgte bei 20V für eine Stunde in einem Elektroblotter (Biorad, Peqlab) in TBE-Puffer und die anschließende Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte für 4 Minuten mit UV-Licht.

#### Detektion von spezifischen RNA-Fragmenten

Für die Detektion von spezifischen RNA-Fragmenten wurden DIG-markierte DNA-Sonden benutzt. Die Sonden wurden mittels PCR unter Verwendung eines PCR-DIG labelling mix (Roche) hergestellt (Primer siehe Tabelle 3.6).

Nach der Überführung der jeweiligen Membran in ein Hybridisierungsröhrchen wurde diese für 30 Minuten bei 50 °C unter ständiger Rotation präinkubiert. Danach wurden 5  $\mu$ l der Sonde (kleines Gel) in 50  $\mu$ l Wasser, welche bei 95 °C denaturiert und 5 Minuten auf Eis abgekühlt wurde, zu der Membran gegeben und über Nacht bei 50°C inkubiert.

Um ungebundene Sonde zu entfernen, erfolgten am nächsten Tag mehrere Waschschritte (2 x 5 min Waschpuffer 1 (50°C) und dann 2 x Waschpuffer 2 (normale Stringenz: 30 min, 50°C; hohe Stringenz: 15 min, 68°C). Nachdem die Membran kurz mit Detektionpuffer 1 equilibriert wurde, erfolgte die Blockierung der Membran in Blocking-Lösung für 30 Minuten. Nach Zugabe des Anti-Digoxigeninalkalische Phosphatase Antikörpers (Roche, 1:10.000) wurde die Membran eine weitere Stunde inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde nun durch 2 Waschritte für je 15 Minuten mit Detektionspuffer 1 entfernt und danach wurde die Membran mit Detektionspuffer 2 equilibriert. Für die Detektion wurde die Membran mit einer CDP-Star-Lösung (Roche) im Dunkeln benetzt. Bei CDP-Star handelt es sich um ein chemilumineszentes Substrat für die alkalische Phosphatase. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Lösung entfernt, die Membran mit einer Klarsichtfolie (Beutel von Roth) bedeckt und das Signal mittels eines chemilumineszenz-sensitiven Röntgenfilms (Roche) sichtbar gemacht. Die Expositionszeiten lagen zwischen 5 und 60 Minuten. Bei Polyacrylamidgelen besteht nach der Detektion der ersten Sonde die Möglichkeit weitere Sonden zu hybridisieren. Wichtig für diesen Prozess ist, dass die Membran nach der ersten Hybridisierung nicht trocken wird, da sich dadurch der Hintergrund verstärkt. Das Entfernen der Sonde erfolgte durch Inkubation mit 100 °C heißer Strip-Lösung (2x, abkühlen lassen auf RT). Nachdem die Membran noch zweimal mit 2 x SSC gewaschen wurde, konnte die Membran erneut prähybridisiert werden.

#### 3.5.2.3 RNA-Stabilitätsanalysen (Rifampicin-Abbau)

Rifampicin ist ein Antibiotikum, welches bei Bakterien die DNA-abhängige RNA Polymerase hemmt und somit spezifisch die Transkription unterbindet.

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten einer RNA wurden die zu untersuchenden Bakterien bis zu einem definierten Zeitpunkt wachsen gelassen. Es wurde eine Probe direkt vor Rifampicin-Gabe genommen (Zeitpunkt 0) und danach erfolgte die Probennahme 2, 4, 8, 10, 15 und 30 Minuten nach Rifampicin-Gabe. Die Verarbeitung der RNA-Proben erfolgte wie oben beschrieben (siehe 3.5.2.1.) und mittels Northern Blot-Analyse untersucht (siehe 3.5.2.2.).

#### 3.5.2.4 Transkriptom-Analysen / Mikroarrayanalysen

Die Mikroarrays wurden durch Ocimum Biosolutions (Indien) gespottet. Es handelt sich um kundenspezifische Anfertigungen mit 4288 genspezifischen 50mer Oligonukleotide, die Ocimum Biosolution von der Firma MWG (Ebersberg) erhalten hat. Diese Mikroarrays repräsentieren das gesamte *E.coli* Genom.

Für die Mikroarray-Experimente wurden dir zu untersuchenden Bakterienstämme bis zu einem definierten Zeitpunkt kultiviert und der Aufschluss und die Präparation der RNA erfolgte wie oben beschrieben (siehe 3.5.2.1.).

Für die Markierung der beiden zu vergleichenden Gesamt-RNA (beispielsweise Wildtyp und Mutante) wurde nach der Anleitung des CyScribe Post-Labeling Kit (GE Healthcare) vorgegangen. Nachdem die beiden Proben markiert waren, wurden sie vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 6 µl reduziert und mit 35 µl auf 68°C vorgeheiztem SlideHybTM-buffer (Ambion) versetzt. Diese Mischung wurde auf den Mikroarray-Objektträger, der mit einem Lifterslip (Implen) vorbereitet wurde, gegeben und die anschließende Hybridisierung über Nacht erfolgte in einer Hybridisierungskammer (Biorad) bei 42 °C. Um ungebundene RNA-Fragmente zu entfernen erfolgten mehrere Waschschritte bei verschiedenen Temperaturen in Falkonröhrchen auf einem Rollinkubator (Waschpuffer 1: 50°C-10min, 42°C-10min; Waschpuffer 2: 42°C-10min, 37°C-10min, Waschpuffer 3: 2x 10min RT). Vor dem Scannen wurde der Mikroarray für 3 Minuren bei 500 g trockenzentrifugiert. Die Fluoreszenz-Detektion auf dem Mikroarray bei 532 nm (für Cy3) und 635 nm (für Cy5) erfolgte mit dem GenePix 4100 (Axon) Laserscanner und der dazugehörigen Software GenePix Pro 4.1. Für weitere Auswertungen bzw. Vergleiche mehrerer Mikroarrays untereinander wurde zum Teil das Programm Acuity (Axon) verwendet.

Die Mikroarray-Experimente wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander (biologische Replikate) mit Dye-Swap durchgeführt. Als differentiell regulierte Gene wurden solche betrachtet, die die nachfolgenden Auswertekriterien erfüllen:

a) Signal-Rausch-Abstand (Signal to noise Ratio) > 3

b) Summe der Mediane (Sum of Medians) > 200

c) RNA-Mengen Verhältnis (Ratio) > 2,0 bzw. < 0,5.

Signifikant unterschiedliche Genexpressionssignale (Mittelwert der Ratios, die bei den unabhängigen Experimenten beobachtet wurden, s. Anhang) wurden nach ihrer Intensität sortiert. Diese sortierten Daten wurden anschließendi in eine sogenannte Heatmap, mit Hilfe des Programms Mayday 2.9, transformiert. Mayday ist ein Programm zur Visualisierung, Analyse und Speicherung von Microarray-Daten [Dietzsch *et al.*, 2006]. Für die Visualisierung wurden der dekadische Logarithmus (Abb. 4.16) oder der Logarithmus zur Basis 2 (log2) (Abb. 4.17) der entsprechenden Signale verwendet.

#### 3.5.3 Protein-Analytik

#### 3.5.3.1 Proteinextraktion aus E. coli Zellen

Um Proteine aus einer bakteriellen Kultur zu gewinnen, wurde das Medium durch Zentrifugation entfernt und die Zellen wurden in 1 x M9-Medium, welches 10 % TCA enthielt, resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Proteine pelletiert und anschließend mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das erhaltene Proteinpellet wurde nach einem Trocknungsschritt bei RT mit 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden vor der Weiterverarbeitung zehn Minuten aufgekocht und auf Eis abgekühlt.

Um die Proteinkonzentration zu standardisieren wurde folgende Korrelation genutzt: 1 ml einer bakteriellen Kultur bei OD<sub>578nm</sub> 1.0 besitzt 107 µg Gesamtprotein (R. Hengge, unveröffentlicht). Das Proteinpellet wurde dann so in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, dass die Endkonzentration 1 µg Gesamtprotein / µl beträgt.

#### 3.5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe wurde eine Polyacrylamid-Matrix genutzt. Durch die Bindung des anionischen Detergenz SDS denaturieren die Proteine und ihre Ladung wird dadurch überdeckt, sodass die ursprüngliche Ladung der Proteine in diesem Assay keine Rolle mehr spielt.

Die SDS-PAGE wurde nach Standardprotokollen (Laemmli, 1970; Sambrook *et al.* 1989) in einer Mini-Protean II-Apperatur (Biorad) durchgeführt. Der Aufbau des SDS-PA-Gels ist zweischichtig. Beim oberen Teil handelt es sich um ein 4 % iges Sammelgel (ermöglicht die optimale Auftrennung von Proteinen der Größe 50 – 250 kDa) und beim unteren Teil handelt es sich um das 12 % Trenngel (ermöglicht eine optimale Auftrennung von Proteinen der Größe 15 – 60 kDa). Die aufgetragene Proteinmenge lag zwischen 5 und 10  $\mu$ g Gesamtprotein. Nach der Auftrennung der Proteine bei 25 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer wurde das Gel entweder die Proteine mit Coomassie-Brilliant Blue sichtbar gemacht oder es folgte zur Immunoblot-Analyse die Übertragung auf eine PVDF-Membran (Blotten).

#### 3.5.3.3 Coomassie-Färbung

Um Proteine, die mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels aufgetrennt wurden, zu visualisieren, wurde die Coomassie Brilliant Blue R-250 (AppliChem) benutzt. Dazu wurde das Gel in der Färbe-Lösung gekocht (Mikrowelle) und dann für fünf Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte nun mittels 10 % iger Essigsäure bis die Proteinbande eindeutig ersichtlich waren.

#### 3.5.3.4 Immunoblot-Analyse (Western blot)

Für den Nachweis spezieller Proteine wurde die Immunoblot-Analyse benutzt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Mini Transblot-Zelle (Biorad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Bevor der Tranfer auf die Membran vollzogen werden kann, muss diese in Methanol, Wasser und Transblot-Puffer eqilibiriert werden. Für den Transfer wurden das PA-Gel und die Membran zwischen Whatman-Papiere und Schwämmen gelagert. Der Transfer fand dann für 1 h bei 100 V in eiskaltem Transblot-Puffer statt.

Nach dem Tranfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in TBSTM geblockt, um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu verhindern. Der erste Antikörper (alle Antikörper wurden in Hasen produziert, außer der monoklonale ANTI-FLAG M2-Alkaline Phosphatase Clone M2 Antikörper [Sigma] in Maus) wurde hinzugefügt (alle 1:10.000, außer der monoklonale ANTI-FLAG M2-Alkaline Phosphatase Clone M2 Antikörper, der 1:1000 (bis 5000) eingesetzt wurde) und für 2 h unter ständiger Bewegung inkubiert. Nachdem die Membran 3 x in TBST gewaschen wurde, wurde der zweite Antikörper (Ziege-Anti-Hase / Maus-alkalische Phosphatase Konjugat, Sigma-Aldrich 1:10.000 in TBSTM) hinzugegeben und für 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST, wurde die Membran mit AP-Puffer equilibriert. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte dann mit Hilfe der chromogene alkalischen Phosphatase-Substrate NBT (66  $\mu$ l, 50 mg/ml in 70 % DMF) und BCIP (33  $\mu$ l, 50 mg/ml in DMF) in 10 ml AP-Puffer. Die Katalyse der farbgebenden Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit Wasser erreicht. Anschließend wurde die Membran

zwischen Whatman-Papieren getrocknet. Für die weitere Verarbeitung wurde die Membran eingescannt und mittels der Quantifizierungssoftware Image Gauge quantifiziert.

#### 3.5.3.5 Antikörperreinigung

Bei der Herstellung eines Antikörpers kann es vorkommen, dass nicht nur die gewünschten Proteine detektiert werden. Für die Aufreinigung solcher "verunreinigter" Antikörper wurde ein Acetonpulver einer Mutante (Deletion des Proteins gegen welches der Antikörper hergestellt wurde), wie von Harlow und Lane (1999) beschrieben, hergestellt. Dazu wurde eine 40 ml über Nacht-Kultur pelletiert und resupendiert in 1 ml Saline. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden 4 ml eiskaltes Aceton hinzugefügt, gevortext und weitere 30 Minuten auf Eis mit gelegentlichem Vortexen inkubiert. Nach erneuter Pelletierung wurde das Prezipitat mit frischem Aceton resuspendiert, gevortext und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet auf ein Filterpapier übertragen und bei rT getrocknet. Das erhaltene Acetonpulver wurde dann in einer 1 % igen Konzentration mit dem jeweiligen Antikörper-Serum gemischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung. Das Aceton-Pulver und die darin gebundenen Proteine wurden mittels Zentrifugation entfernt.

# 3.6 Computerprogramme und Internetadressen

Als Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich MS Office 2002; Serial Cloner, Kaleidagraph 3.6, Image Gauge V3.1, AxioVision Rel.5.8, Mayday 2.9, GenePix Pro 4.1 und Acuity (Axon) genutzt.

Die Informationen zu einzelnen Genen, RNAs und Proteinen wurden mit den folgenden Datenbanken ermittelt:

www.ncbi.nlm.nih.gov/: www.expasy.ch/tools/: www.sanger.ac.uk/: www.embl-heidelberg.de/: www.ecocyc.org/: www.ecogene.org/:

NCBI; National Center for Biotechnological Information Expasy - Swiss Institute of Bioinformatics Sanger Center UK Europian Molecular Biology Laboratory Escherichia coli Genbank Escherichia coli Genbank

# 4. Ergebnisse

# 4.1 Expressionsanalyse und phänotypische Charakterisierung der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in *Escherichia coli*

Abhängig von den Umweltbedingungen können Bakterien verschiedenste Lebensstile ausprägen. Sie können sowohl als motile Einzelzellen (planktonisches Stadium), aber auch als multizellulärer Biofilm (sessiles Stadium) vorkommen [Beloin et al., 2008]. Wenn das gramnegative Bakterium Escherichia coli in komplexem Medium, wie beispielsweise LB, wächst, können in der post-exponentiellen Wachstumsphase motile Zellen beobachtet werden [Adler & Templeton 1967; Amsler et al. 1993, Pesavento et al., 2008]. Dieser hochmotilen Phase folgt die Induktion adhäsiver Komponenten, wie Curli-Fimbrien, beim Eintritt in die Stationärphase [Olsén et al. 1989]. Eine Schlüsselfunktion beim Übergang von der motilen in die sessile Phase nimmt der sekundäre Botenstoff Bis-(3'-5')-zyklisches-Diguanosin-Monophosphat (c-di-GMP) ein. C-di-GMP wird durch Proteine mit GGDEF-Domänen, welche als Diguanylatzyklasen (DGC) wirken, aus 2 GTP synthetisiert und durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE), Proteine mit EAL-Domänen (oder auch HD-GYP-Domänen, diese sind in *E. coli* nicht vorhanden) zu pGpG abgebaut [Hengge, 2009]. Über den generellen Mechanismus zur Kontrolle des sekundären Botenstoffs c-di-GMP ist viel bekannt [Mills et al., 2011]. Die Frage ist nun, warum gibt es unter den Proteobakterien eine Vielzahl dieser Proteine.

Im Genom von *E. coli* K-12 sind 29 GGDEF/EAL Gene kodiert. Von diesen 29 Genen kodieren zwölf für GGDEF-Domänen-Proteine, zehn für EAL-Domänen-Proteine und sieben für Proteine mit beiden Domänen. Weber *et al.* (2005) konnten durch gesamtgenomische Mikroarray-Analysen zeigen, dass sieben der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine (*ycgG, yciR, ydaM, yddV, ydiV, yeaI yedQ*) unter der Kontrolle des Sigmafaktors RpoS stehen.

RpoS ( $\sigma^{S}$ ), der Stress- und Stationärphasen-Sigmafaktor, reguliert ungefähr 10 % des *E. coli* Genoms. Die Ausbildung diverser protektiver Stressresistenzen, die Akkumulierung von Speicher- und Schutzsubstanzen, Veränderungen im Energiestoffwechsel und morphologische Veränderungen gehören zu den RpoS-kontrollierten Prozessen [Weber *et al.*, 2005]. RpoS selbst wird unter Stressbedingungen auf transkriptionaler und translationaler Ebene

sowie durch Proteolyse reguliert [Hengge-Aronis, 2002].

Weber et al. (2006) konnten des Weiteren zeigen, dass fünf GGDEF/EAL-Gene (ydaM, yddV, yedQ, yaiC, yciR) nicht nur Stationärphasen-induziert unter der Kontrolle von  $\sigma^{s}$  stehen, sondern auch der Kontrolle von zusätzlichen Umweltparametern und Wachstumsabhängigen Signalen unterliegen. Für das GGDEF-Domänen-Protein YdaM (als DGC, positive Wirkung) und das GGDEF/EAL-Domänen-Protein YciR (als PDE, negative Wirkung) konnte diese Arbeitsgruppe einen antagonistischen Einfluss auf die Expression von Curli-Fimbrien nachweisen. Diese Regulation fokussiert sich auf der Expression des Transkriptionsregulators CsgD [Weber et al., 2006]. Aber nicht nur, das durch YdaM und YciR regulierte, c-di-GMP hat einen Einfluss auf die CsgD-Transkription, sondern auch zwei weitere GGDEF/EAL-Domänen-Proteine, YegE und YhjH, spielen hier eine wichtige Rolle. So konnten Pesavento et al., (2008) zeigen, dass YegE, ein GGDEF/EAL-Domänen-Protein die Curli-Synthese positiv und die Motilität negativ über die Bildung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP beeinflusst. Antagonistisch zu YegE wirkt das EAL-Domänen-Protein YhjH, welches den sekundären Botenstoff c-di-GMP abbaut. Die Expression von YhjH ist vom flagellaren Sigmafaktor FliA abhängig. YhjH hält den zellulären c-di-GMP-Spiegel niedrig, so lange wie Flagellen gebildet und benötigt werden (Pesavento et al., 2008).

Diese Studien zeigen, dass der Stationärphasen-Sigmafaktor im Zusammenhang mit dem sekundären Botenstoff c-di-GMP steht. In dieser Arbeit soll nun geklärt werden,

- (I) ob die GGDEF/EAL-Domänen-Proteine eine unterschiedliche Expression zeigen,
- (II) ob die Expression weiterer GGDEF/EAL Gene vom Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS kontrolliert sind und
- (III) ob die verschiedenen GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in *E. coli* unabhängig von einander arbeiten können oder ob alle an einem gemeinsamen c-di-GMP-Reservoir beteiligt sind.

#### 4.1.1 Expressionsanalyse

Um die Regulation der Expression der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in E. coli zu untersuchen, wurden 28 lacZ-Reportergenfusionen kloniert und als Einzelkopie ins Genom von E. coli integriert. Diese Reportergenfusionen repräsentieren hauptsächlich die Transkription. Sie enthalten aber auch den Translationsstart und ungefähr zehn Codons des entsprechenden Gens fusioniert an lacZ. So können auch eventuelle Unterschiede in der Translationseffizienz des entsprechenden Proteins widergespiegelt werden. Alle Fusionen sind auf die gleiche Art und Weise hergestellt worden. Die Messung der spezifischen ß-Galaktosidase-Aktivität ermöglicht so das Expressionsmuster eines spezifischen GGDEF/EAL Gens zu verfolgen und gleichzeitig wird auch einen Vergleich der Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Genen ermöglicht. Es handelt sich um 28 Reportergenfusionen, da Méndez-Ortiz et al. (2006) gezeigt haben, dass yddV-yddU (auch dosC-dosP genannt) in einem Operon kodiert sind. Dieses Operon ist in dieser Arbeit durch yddV::lacZ repräsentiert. Die Ergebnisse für das Gen yahA sind hier nicht repräsentiert, da der für diese Studie verwendete Laborstamm W3110 AU169 eine Deletion im Bereich, in dem yahA kodiert ist, besitzt. Die Reportergenfusion zu yahA wurde von G. Klauck vermessen und die Ergebnisse werden in dieser Arbeit mit ihrem Einverständnis der Vollständigkeit halber genannt.

# 4.1.1.1 Expression der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine bei 37°C und 28°C in Komplexmedium

Die Expression aller GGDEF/EAL-Domänen-Proteine wurde entlang der Wachstumskurve und bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C und 28°C; in Abb. 4.1 - 4.3 jeweils durch schwarze und rote Kurven dargestellt) bestimmt. Durch diese unterschiedlichen Bedingungen können mögliche Verbindungen zur Motilität und Biofilmbildung aufgedeckt werden. In der post-expontiellen Phase des Wachstums werden vermehrt Flagellen exprimiert und beim Übergang in die Stationärphase kommt es zur Induktion der Expression der adhäsiven Curli-Fimbrien. Für die Expression der Curli-Fimbrien ist bekannt, dass sie von Stress-Sigmafaktor RpoS und vom Masterregulator der Biofilmbildung CsgD abhängig sind und nur bei Temperaturen unter 30°C exprimiert werden [Römling, 2005]. Um die Rolle des Stationärphasen-Sigmafaktors RpoS im c-di-GMP-Kreislauf zu klären, wurde auch die Expression jedes GGDEF/EAL-Genes in einem **RpoS-defizienten** Hintergrund (in Abb. 4.1 bis 4.3 als Kreise dargestellt) getestet.

Die 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine können aufgrund ihrer Domänen in drei Gruppen eingeteilt werden:(1) Proteine, die eine GGDEF-Domäne besitzen (Abb. 4.1), (2) Proteine mit GGDEF- und EAL-Domäne (Abb. 4.2) und (3) Proteine die eine EAL-Domäne besitzen (Abb. 4.3). Diese Einteilung stellt die Grundlage für die folgenden Darstellungen der Expressionsstudien dar.



Abb. 4.1: Expression der GGDEF-Gene von *E. coli* während des Wachstumszyklus in reichem Medium (LB) bei 37°C (schwarz) oder 28°C (rot). Die Derivate des Stammes W3110 tragen eine in das Genom integrierte *lacZ*-Reportergenfusion in dem GGDEF-Gen, wie es in der entsprechenden Grafik angegeben ist. Alle Fusionen wurden in isogenischem *rpoS*+ (Quadrate) und *rpoS::Tn10* (Kreise) Hintergrund vermessen. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die entsprechenden *lacZ*-Reportergenfusionen zu den einzelnen GGDEF-Genen wurden in Kooperation mit anderen Mitgliedern der AG Hengge isoliert (Tab. 3.3).

Die Expressionsanalyse in Komplexmedium (LB) ergab, dass neun der zwölf GGDEF-Gene exprimiert sind. Die Gene *yeaI*, *yne*F und *yliF* zeigen unter den getesteten Bedingungen keine Expression. Dabei werden die Gene *ycdT*, *ydaM*, *yddV*, *ydeH*, *yeaJ*, *yeaP*, *yedQ*, und *yfiN* bei beiden Temperaturen exprimiert und das Gen *yaiC* zeigt nur bei 28°C eine Expression (s. Abb. 4.1, Vergleich rote und schwarze Kurven). Die Gene *ycdT*, *ydeH*, *yeaJ*, *yeaP*, *yfiN* werden in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert und die Gene *yaiC*, *ydaM*, *yddV*, *yedQ* sind Stationärphasen-induziert. Die vier Stationärphasen-induzierten Gene zeigen auch eine positive RpoS-Abhängigkeit (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten). Das Gen *ydeH* wird unter den getesteten Bedingungen negativ durch RpoS reguliert (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten).



Abb. 4.2: Expression der GGDEF- und EAL-Gene von *E. coli* während des Wachstumszyklus in reichem Medium (LB) bei 37°C (schwarz) oder 28°C (rot). Die Derivate des Stammes W3110 tragen eine in das Genom integrierte *lacZ*-Reportergenfusion in dem GGDEF-Gen, wie es in der entsprechenden Grafik angegeben ist. Alle Fusionen wurden in isogenischem *rpoS*+ (Quadrate) und *rpoS::Tn10* (Kreise) Hintergrund vermessen. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die entsprechenden *lacZ*-Reportergenfusionen zu den einzelnen GGDEF und EAL-Genen wurden in Kooperation mit anderen Mitgliedern der AG Hengge isoliert (Tab. 3.3).

Die Expressionsstudie zu den GGDEF/EAL-Genen ergab, dass sechs der sieben Gene (inklusive yddU, dargestellt in Abb. 4.1 durch yddV::lacZ) in Komplexmedium (LB) exprimiert werden (außer yfgF, siehe Abb. 4.2). Fünf dieser sechs Gene [yciR, yegE, yfeA, csrD (Abb. 4.2) sowie yddU (aufgrund der Daten von yddV::lacZ in Abb. 4.1)] sind bei beiden Temperaturen exprimiert. Das Gen yhjK ist nur bei der niedrigeren Temperatur

exprimiert (Abb. 4.2, Vergleich roter und schwarzer Kurven). Auch in dieser Gruppe kann die Einteilung der wachstumsabhängigen Expression vorgenommen werden. Die Gene, deren Expression bei exponentiellem Wachstum induziert ist, sind *yfeA* und *csrD* und die Gene, die Stationärphasen-Induktion zeigen, sind *yddU* (basierend auf den Daten von *yddV::lacZ*, Abb. 4.1), *yegE* und *yhjK*. Das Gen *yciR* zeigt ein Temperatur-abhängiges Expressionsmuster. Bei 37°C gehört *yciR* zur Gruppe der Gene, die bei exponentiellem Wachstum induziert sind und bei 28°C gehört dieses Gen zu den Stationärphasen-induzierten Genen. Drei der Stationärphasen-induzierten Gene [*yddU* (basierend auf den Daten von *yddV::lacZ*, Abb. 4.1), *yegE* und *yciR*] zeigen auch eine positive Abhängigkeit von Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS (Abb. 4.2, Vergleich Kreise mit Quadraten). Das Gen *yfeA* wird bei 37°C negativ durch RpoS reguliert (Abb. 4.2, schwarze Kurve, Vergleich Kreise mit Quadraten).



**Abb. 4.3: Expression der EAL-Gene** von *E. coli* während des Wachstumszyklus in reichem Medium (LB) bei 37°C (schwarz) oder 28°C (rot). Die Derivate des Stammes W3110 tragen eine in das Genom integrierte *lacZ*-Reportergenfusion in dem GGDEF-Gen, wie es in der entsprechenden Grafik angegeben ist. Alle Fusionen wurden in isogenischem *rpoS*+ (Quadrate) und *rpoS::Tn10* (Kreise) Hintergrund vermessen. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die entsprechenden *lacZ*-Reportergenfusionen zu den einzelnen EAL-Genen wurden in Kooperation mit anderen Mitgliedern der AG Hengge isoliert (Tab. 3.3).

Die in Abbildung 4.3 dargestellte Expressionsstudie in Komplexmedium (LB) ergab, dass sechs der neun EAL-Gene (*rtn, ycgF, yhjH, yjcC, ylaB, yoaD*) exprimiert sind. Auch das hier nicht dargestellte EAL-Gen *yahA* (Daten nicht gezeigt; persönliche Kommunikation mit G. Klauck) wird in Komplexmedium exprimiert. Diese insgesamt sieben Gene sind, bis auf *ycgF* (hier nur bei 28°C) bei beiden Temperaturen exprimiert (Abb. 4.3, Vergleich rote und schwarze Kurven, Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit G. Klauck). Die Gene *rtn, ycgF, yhjH* und *yahA* (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit G. Klauck) werden hauptsächlich während des exponentiellen Wachstums exprimiert und die Gene *yjcC* und *yoaD* sind in der Stationärphase exprimiert. Das Gen *ylaB* zeigt, wie *yciR* ein Temperatur-abhängiges Expressionsmuster (Vergleich Abb. 4.2 und Abb. 4.3). Bei 37°C ist das Gen *ylaB* während des exponentiellen Wachstums exprimiert und bei 28°C zeigt *ylaB* eine Stationärphasen-induzierte Expression (Abb. 4.3, Vergleich rote und schwarze Kurven). Die Stationärphasen-induzierten Gene *yjcC, yoaD* und *ylaB* werden positiv durch den Stress-Sigmafaktor RpoS reguliert. Die Gene *yhjH* und *rtn* werden bei 37°C negativ durch RpoS reguliert (Abb. 4.3, Vergleich Kreise mit Quadraten).

Zusammenfassend für die Expressionsanalyse in Komplexmedium (LB) (Abb. 4.1 bis 4.3) lässt sich festhalten, dass die Mehrheit der GGDEF/EAL-Gene in *E. coli* (22 der 28 GGDEF/EAL-Gene) exprimiert wird. Nur sieben Gene, *yeaI*, *yliF*, *yneF*, *yfgF*, *ycgG*, *ydiV* und *yliE* zeigen eine basale spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (0,001-0,002 µmol/min/mg gesamtes zelluläres Protein).

Das Expressionsmuster der GGDEF/EAL-Gene entlang der Wachstumskurve kann in zwei Haupttypen eingeteilt werden:

- (1) Gene, die hauptsächlich während der logarithmischen oder postexponentiellen
  Phase exprimiert sind und
- (2) Gene, die eine Induktion der Expression beim Übergang in die Stationärphase zeigen.

Die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität der ersten Gruppe ist konstant oder ansteigend während die Zellen noch wachsen und repräsentative Vertreter sind *yeaJ* (Abb. 4.1), *yfeA* (Abb. 4.2) oder *yhjH* (Abb. 4.3). Unter den Genen der ersten Gruppe (exponentielle oder postexponentielle Expression) zeigen sieben eine negative Regulation durch den Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS (repräsentatives Beispiel: *ydeH*, Abb. 4.1, Vergleich Kreise und Quadrate).

Die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität der zweiten Gruppe steigt erst an, wenn das Wachstum der Kultur sich verlangsamt oder endet und repräsentative Vertreter dieser Gruppe sind ydaM (Abb. 4.1), yciR (Abb. 4.2) und yoaD (Abb. 4.3). Gene, die dieser Gruppe (Stationärphasen-induzierte Expression) angehören, weisen unter den getesteten Bedingungen meist auch eine positive Kontrolle durch den Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS auf. Dies ist der Fall für yaiC (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten), ydaM (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten), yddV/yddU (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten), yedQ (Abb. 4.1, Vergleich Kreise mit Quadraten), yciR (Abb. 4.2, Vergleich Kreise mit Quadraten), yegE (Abb. 4.2, Vergleich Kreise mit Quadraten), *yjcC* (Abb. 4.3, Vergleich Kreise mit Quadraten), ylaB (Abb. 4.3, Vergleich Kreise mit Quadraten) und yoaD (Abb. 4.3, Vergleich Kreise mit Quadraten). Die einzige Ausnahme stellt das Gen vhiK dar. Hier ist die Expression beim Übergang in die Stationärphase zwar induziert, aber unter den getesteten Bedingungen konnte keine RpoS-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Abb. 4.2; Vergleich Kreise mit Quadraten). Von den 22 exprimierten Gene zeigen acht eine eindeutige Temperaturregulation. Die Gene yaiC, yhjK und ycgF zeigen eine ausschließliche, die Gene ydaM und yoaD eine deutlich erhöhte Expression bei 28°C (s. Abb. 4.1 bis 4.3, Vergleich rote und schwarze Kurven) während das Gen *yeaJ* präferentiell bei 37°C (Abb. 4.1, Vergleich rote und schwarze Kurven) exprimiert wird.

# 4.1.1.2 Expression der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine bei 37°C und 28°C auf Festmedium

Eine bakterielle Kolonie auf einer Agaroberfläche repräsentiert einen multizellulären Biofilm an einer festen und feuchten Oberfläche/Luft-Schnittstelle. Für die Strukturmorphologie eines solchen Koloniebiofilms ist die Expression von Curli-Fimbrien und Cellulose notwendig, Die Synthese solcher Komponenten wird durch einen hohen zellulären c-di-GMP-Gehalt stimuliert (Römling, 2005). Um den Einfluss der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine unter diesen Bedingungen zu klären, wurden die vorhandenen, oben schon besprochenen *lacZ*-Reportergenfusionen zu den verschiedenen GGDEF/EAL-Genen auch nach Langzeit-Wachstum (24h) auf Festmedium untersucht. In dieser Expressionsstudie wurden ebenfalls die Temperaturen 37°C und 28°C bearbeitet.



**Abb. 4.4**: **Expression aller GGDEF/EAL-Gene von** *E. coli* nachdem sie über Nacht auf LB-Agarplatten gewachsen sind. Dieselben Reportergenfusionsstämme wie in Abb. 4.1, 4.2 und 4.3 wurden über Nacht in einem Patch auf LB-Agarplatten bei 37°C (weiß) oder 28°C (schwarz) wachsen gelassen. Zellen aus der Mitte des Patches wurden resuspendiert, ihre optische Dichte (OD<sub>578nm</sub>) und ihre spezifische β-Galaktosidase-Aktivität (in den vertikalen Balken repräsentiert) wurden bestimmt. Das gesamte Experiment wurde dreimal unabhängig von einander wiederholt und der Mittelwert und die Standardabweichung der spezifischen β-Galaktosidase-Aktivität sind angegeben.

Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, werden von den 28 (*yddU* dargestellt durch *yddV::lacZ*, *yahA* nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit G.Klauck) hier untersuchten GGDEF/EAL-Genen acht auf Festmedium nicht exprimiert (*yeaI*, *yliF*, *yneF*, *yfgF*, *yhjK*, *ycgG*, *ydiV* und *yliE*). Sieben dieser acht zeigen auch in Flüssigkultur keine Expression (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Die Ausnahme stellt das Gen *yhjK* dar, denn hier kann bei 28°C in flüssiger Umgebung eine Stationärphasen-induzierte Expression beobachtet werden (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.2 rote Kurve). Bei der Expressionsstudie auf Festmedium kann ebenfalls eine Temperaturregulation beobachtet werden. Die Gene *yaiC*, *ycdT*, *ydaM*, *yedQ*, *ycgF* und *yoaD* zeigen eine erhöhte Expression bei 28°C. Die Gene *yaiC*, *ydaM*, *yedQ*, *ycgF* und *yoaD* zeigen diese deutliche Präferenz für die niedrigere Temperatur auch in Flüssigkultur (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Eine Temperatur-regulierte Expression kann bei den Genen *yddV/yddU*, *ydeH*, *yeaJ*, *yeaP*, *yfiN*, *yegE*, *csrD*, *yhjH*, *ylaB* und *yjcC* nicht beobachtet werden.

Das Wachstum auf Festmedium scheint die Expression einiger Gene zu verstärken. Die Expression des Gens *yaiC* bei der Biofilm-fördernden Temperatur (28°C) ist auf Festmedium sechsmal höher als in Flüssigkultur. Bei 37°C scheint jedoch bei diesem Gen die Umgebung

keine Rolle zu spielen (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.1). Dies ist auch für das Gen *yciR* zu beobachten. Hier tritt bei 28°C eine zweifach erhöhte Expression auf und bei 37°C ist kein Unterschied feststellbar (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.2). Die Gene *ydaM* und *yoaD* zeigen auf Festmedium sowohl bei 37°C als auch bei 28°C eine veränderte Expressionsstärke. Eine zehnfach erhöhte Expression bei 37°C auf Festmedium im Vergleich zur Flüssigkultur kann bei dem Gen *ydaM* beobachtet werden. Auch bei 28°C kommt es bei diesem Gen zu einer zweifachen Induktion der Expression auf Festmedium (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.1). Die Biofilm-fördernde Temperatur (28°C) führt bei *yoaD* zu einer fünffachen Erhöhung der Expression auf Festmedium in Vergleich zur Flüssigkultur. Bei 37°C ist eine Verdopplung der Expression auf Festmedium zu beobachten (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.3). Das flagellare Gen *yhjH* zeigt eine vierfach reduzierte Expression bei beiden Temperaturen auf Festmedium im Vergleich zur Flüssigkultur (Vergleich Abb. 4.4 mit Abb. 4.3).

Zusammenfassend kann für gesamte Expressionsstudien festgehalten werden, dass die Mehrheit aller 29 GGDEF/EAL-Gene in *E. coli* sowohl in Flüssigkultur als auch auf Festmedium exprimiert wird. Auf der einen Seite gibt es RpoS-abhängige und Stationäphasen-induzierte Gene (*yaiC*, *ydaM*, *yciR* und *yoaD*), die auf Festmedium verstärkt exprimiert werden und auf der anderen Seite gibt es beispielsweise die Gene *yhjK* und *yhjH*, deren Expression in Flüssigkultur, unabhängig von RpoS, im Vergleich zum Festmedium induziert ist.

Die Abbildungen 4.1 bis 4.4 zeigen, dass für die Expression der GGDEF/EAL-Gene und damit für die Synthese und den Abbau des Sekundärbotenstoffs c-di-GMP, die Temperatur, die Umgebung und der Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS eine wichtige Rolle spielen.

#### 4.1.2 Phänotypische Charakterisierung

Die Expressionsstudie ergab, dass unter den verschiedenen Bedingungen unterschiedliche GGDEF/EAL-Gene exprimiert werden. Die Suche nach den physiologischen Funktionen der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine beginnt mit der phänotypischen Untersuchung aller GGDEF/EAL-Domänen-Protein. Für diese Studie wurden von allen GGDEF/EAL-Genen Insertionsmutationen mit Hilfe der Methode von Datsenko und Wanner (2000) isoliert (s. 3.5.1.8.).

In der folgenden Untersuchung der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine soll nun geklärt werden, ob sie am Wechsel der Lebensstile beteiligt sind. Dazu wurden Situationen welche mit einem hohen (Curli-Fimbrien Expression) oder niedrigen (Motilität) zellulären c-di-GMP-Spiegel verbunden sind, ausgewählt.

Die Motilität wurde auf Schwimmplatten und durch die Expression von *flhDC*, mittels einer *lacZ*-Reportergenfusion, in den unterschiedlichen Mutantenhintergründen untersucht. Die Gene des Operons *flhDC* kodieren für den Masterregulator der Flagellen. Die Expression der Curli-Fimbrien mit einer *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, dem ersten Gen des Strukturoperons der Curli-Fimbrien, in den verschiedenen Mutantenhintergründen analysiert.

#### 4.1.2.1 In silico Analyse der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in E. coli

*In silico* Sequenzanalysen geben erste Hinweise auf die Funktionalität eines Proteins. Für die GGDEF/EAL-Domänen-Proteine können diese Untersuchungen genutzt werden, um eine Aussage über die Aktivität der Proteine treffen zu können. So kann DGC nur mit einem vollständigen GGD(E)EF-Motiv (A-Zentrum) aktiv sein. Christen *et al.* (2005) konnten zeigen, dass häufig neben dem A-Zentrum auch noch ein weiteres Zentrum (I-Zentrum, RXXD) auftritt, welches eine Produktinhibierung durch c-di-GMP ermöglicht. Für die GGDEF-Domänen können also in folgenden Kombinationen auftreten:

- (1) aktives A- und I-Zentrum,
- (2) aktives A-Zentrum, degeneriertes I-Zentrum
- (3) degeneriertes A-Zentrum, aktives I-Zentrum und
- (4) degeneriertes A- und I-Zentrum [Jenal & Malone, 2006].

Die Sequenzanalyse der GGDEF-Domänen-Proteine in *E. coli* ergab, dass elf der zwölf GGDEF-Domänen-Proteine ein aktives Zentrum aufweisen (YaiC, YcdT, YdaM, YddV, YdeH, YeaJ, YeaP, YedQ, YfiN, YliF, YneF). Von diesen elf möglicherweise aktiven DGCs besitzen sechs neben dem A-Zentrum auch das I-Zentrum (YaiC, YcdT, YdaM, YddV, YeaJ, YedQ) und könnten somit durch den zellulären Gehalt an c-di-GMP reguliert werden. Das GGDEF-Domänen-Protein YeaI weist ein degeneriertes A-Zentrum, aber ein aktives I-Zentrum auf. Dieses Protein scheint nicht am Umsatz von c-di-GMP beteiligt zu sein, wird aber eventuell durch c-di-GMP in seiner Aktivität reguliert.

Auch die EAL-Domänen-Proteine können durch Sequenzanalysen in aktive und inaktive PDEs eingeteilt werden [Schmidt *et al.*, 2005]. Die *in silico* Sequenzanalyse zu den zusammengesetzten Proteinen ergab, dass in *E. coli* sechs der sieben GGDEF/EAL-Domänen-Proteine (YciR, YddU, YegE, YfeA, YfgF, YhjK) für mindestens eine der beiden Domänen eine aktive Enzymaktivität aufweisen. Das Protein YciR besitzt aufgrund der Sequenzanalyse sowohl eine aktive GGDEF-Domäne (nur A-Zentrum), als auch eine aktive EAL-Domäne. Das Protein YegE besitzt eine aktive GGDEF-Domäne mit einem A- und I-Zentrum und eine degenerierte EAL-Domäne. Die Proteine YddU, YfeA, YfgF und YhjK besitzen eine degenerierte GGDEF-Domäne und eine aktive EAL-Domäne. CsrD (YhdA) zeigt in beiden Domänen eine Degenerierung der konservierten Motive auf.

Die *in silico* Sequenzanalyse der EAL-Domänen-Proteine ergab, dass zwei der zehn EAL-Domänen-Proteine (YcgF und YdiV) eine degenerierte Domänensequenz aufweisen Die anderen acht EAL-Domänen-Proteine (Rtn, YcgG, YhjH, YjcC, YlaB, YliE, YoaD) zeigen konservierte Sequenzmotive und könnten somit am Abbau des Sekundärbotenstoff c-di-GMP beteiligt sein.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass in *E. coli* ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen DGCs und PDEs vorliegt (12:12). Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass jede DGC eine Partner-PDE hat.

#### 4.1.2.2 Einfluss der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf die Motilität

Motilität ist ein wichtiger Faktor für die Biofilmbildung in *E. coli*. [Pratt & Kolter, 1998]. Die Flagellen-basierte Motilität ermöglicht das Erreichen der Oberfläche und anderer Bakterien und hilft bei der Überwindung der auftretenden hydrodynamischen Kräfte. Die Flagellen ermöglichen den Bakterien auch auf der Oberfläche entlang zu gleiten [Genevaux *et al.*, 1996]. Wood *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Kapazitäten der Biofilmbildung in *E. coli* K-12 direkt mit der Möglichkeit zu Schwimmen korrelieren.

Die 28 untersuchten GGDEF/EAL-Domänen-Proteine zeigen nach 24h Wachstum in Komplexmedium keinen Einfluss auf die Expression des Masterregulators der Flagellen, *flhDC* (Daten nicht gezeigt). Auf Schwimmplatten konnte gezeigt werden, dass sowohl bei 37°C als auch bei 28°C nur das EAL-Domänen-Protein YhjH einen positiven Effekt auf die Motilität hat. Dieser Effekt wurde schon von Ko und Park (2000) gezeigt. Die anderen GGDEF/EAL-Domänen-Proteine (inklusive YahA, persönliche Kommunikation mit G. Klauck) haben unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Motilität (Daten nicht gezeigt).

# 4.1.2.3 Einfluss der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf CsgD und die Curli-Expression

Der Biofilmregulator CsgD nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Biofilmbildung ein und die Expression dieses Regulators wird durch c-di-GMP reguliert [Pesavento *et al.*, 2008, Weber *et al.*, 2006]. Mit der folgenden Studie soll nun geklärt werden, ob, neben YdaM, YciR, YegE und YhjH, weitere GGDEF/EAL-Domänen-Proteine einen Einfluss auf die *csgD*-Transkription und damit auf die Curli-Expression haben.



Abb. 4.5: Insertionsmutationen in verschiedenen *E. coli* GGDEF/EAL-Genen verändern die Expression der Curli-Gene und den CsgD-Proteingehalt.

(A) Ein W3110 Derivat mit einer ins Genom integrierten *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, als auch Derivate dieses Stammes mit Insertionsmutationen in *ydaM*, *yciR*, *yegE*, *yhjH* und *csrD* wurden bei 28°C in reichem Medium (LB) wachsen gelassen. Die optische Dichte ( $OD_{578nm}$ ) (offenen Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die Symbole der verschiedenen Mutanten sind der entsprechenden Grafik zu entnehmen. ON, über Nacht Kultur (24h nach Inokulation der Kultur). (B) Immunoblot-Analyse von CsgD in W3110 Derivaten mit Mutationen in den oben genannten GGDEF/EAL-Genen wurde bei 28°C in LB wachsen gelassen. Zwölf Stunden nach Inokulation (Start-OD<sub>578nm</sub> = 0,05) wurden Proben für die Immunoblot-Analyse von CsgD genommen. Die densitometrische Quantifizierung ist über dem Blot dargestellt. 5µg Protein wurden auf ein 12% iges Polyacrylamidgel aufgetragen. CsgD wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen CsgD detektiert. Die entsprechenden Mutationen in den einzelnen GGDEF/EAL-Genen wurden in Kooperation mit anderen Mitgliedern der AG Hengge isoliert (Tab. 3.3).

Die Untersuchung der Wirkung der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf die Expression der Curli-Fimbrien ergab, dass fünf der 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine einen Einfluss haben. Die restlichen 24 zeigen unter den getesteten Bedingungen keine veränderte Regulation der Curli-Fimbrien-Expression (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 4.5 A ist zu erkennen, dass eine reduzierte *csgB*-Expression in Stämmen mit Mutationen in den Genen *ydaM* (Kreise), *yegE* (Dreieck mit Spitze nach unten) und *csrD* (*yhdA*) (Quadrat halb gefüllt) beobachtet werden. Eine erhöhte Expression der Curli-Fimbrien haben Mutationen in den Genen *yhjH* und *yciR* zur Folge (Abb. 4.5 A, Rauten und Dreiecke mit Spitzen nach oben). Die vier Mutationen *yegE*, *ydaM*, *yhjH* und *yciR* zeigen die schon bekannten Effekte auf die Curli-Expression [Pesavento *et al.*, 2008, Weber *et al.*, 2006].

Die Expressionsstudie zeigt, dass die Mutationen in *ydaM*, *yciR*, *yhjH*, *yegE* und *csrD* die Kinetik der *csgB*-Expression verändern. So beginnt die Expression ungefähr eine Stunde eher, wenn die Gene *yciR* oder *yhjH* deletiert sind (Abb. 4.5A, Rauten und Dreiecke mit Spitzen

nach oben). Wenn allerdings die Gene *ydaM* (Kreise), *yegE* (Dreieck mit Spitze nach unten) und *csrD* (*yhdA*) (Quadrat halb gefüllt) deletiert sind, dann beginnt die *csgB*-Expression später als im Wildtyp (gefüllte Quadrate) (Abb. 4.5A).

Der Einfluss aller GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf den RpoS- und CsgD-Proteingehalt in der Zelle wurde ebenfalls getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass keines dieser Protein einen Einfluss auf den Gehalt an RpoS-Protein hat (Daten nicht gezeigt). Die Immunoblot-Analyse für den Curli-Aktivator CsgD zeigt, dass nur die Mutationen in den Genen *ydaM*, *yciR*, *yhjH*, *yegE* (wie von Pesavento *et. al*, 2008 beschrieben) und *csrD* ein veränderten CsgD-Gehalt zur Folge haben (Abb. 4.5 B, Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des Immunoblots zum CsgD-Protein bestätigen die Studie zur Curli-Fimbrien-Expression (Vergleich Abb. 4.5 A und B).

Die phänotypische Untersuchung aller GGDEF/EAL-Domänen-Proteine weist daraufhin, dass eine einzelne Deletion eines GGDEF/EAL-Domänen-Proteins möglicherweise durch die anderen noch in der Zelle vorhandenen GGDEF/EAL-Domänen-Proteine ausgeglichen werden kann. Denn diese Studie ergab, dass nur das schon bekannte EAL-Domänen-Protein YhjH einen Einfluss auf die Motilität ausübt (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte gezeigt werden, dass von den 22 exprimierten GGDEF/EAL-Gene (Abb. 4.1 bis 4.3) nur die vier bereits bekannten YdaM, YegE, YciR und YhjH, sowie CsrD (YhdA) unter den getesteten Bedingungen einen Einfluss auf die Biofilmbildung haben (Abb. 4.5).

# 4.2 Einfluss des degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteins CsrD auf die Expression von CsgD und Curli-Fimbrien

Die Expressionsanalyse von *csrD* ergab, dass es zu den schwach exprimierten Genen gehört (Abb. 4.2 und Abb. 4.4). Unter den getesteten Bedingungen ist die Expression von *csrD* unabhängig von der Umgebung und der Temperatur (Abb. 4.2 und Abb. 4.4). Auch das Protein CsrD scheint unabhängig von der Temperatur reguliert zu sein (Nachweis mittels Immunoblot-Analyse mit einen FLAG-Tag-spezifischen Antikörper gegen das chromosomal FLAG-Tag-markierte CsrD; Daten nicht gezeigt). Eine Mutation in diesem Gen hat eine Reduktion der *csgB*-Expression und des CsgD-Proteingehalts (Abb. 4.5) zur Folge.

#### 4.2.1 CsrD wirkt unabhängig vom Csr-System auf die Curli Expression

Das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD ist in der Lage kleine RNAs zu binden und diese durch einen unbekannten Mechanismus dem Abbau zuzuführen. Möglicherweise kann der Einfluss einer *csrD*-Mutation auf die Curli-Expression durch kleine RNAs, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die *csgD*-Expression haben, erklärt werden. Möglicherweise hat auch das Csr-System über das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD einen Einfluss auf den in *E. coli* und *Salmonella* wichtigen Biofilmregulator CsgD. Zur Klärung diese Frage wurden der Einfluss der kleinen RNAs CsrB und CsrC, RprA, McaS, ArcZ und OmrA und OmrB auf die Expression der Curli-Fimbrien getestet.



Abb. 4.6: Einfluss kleiner RNAs auf die Curli-Expression und den zellulären CsgD Proteingehalt. (A-E) Ein W3110-Derivat mit einer in das Genom integrierten *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, als auch Derivate dieses Stammes mit Insertionsmutationen in *rprA* (A), *csrB* und *csrC* (B), *omrAB* (C), *arcZ* (D) und *mcaS* (E) wurden bei 28°C in reichem Medium (LB) inkubiert. Alle Einzelmutanten in den kleinen RNAs wurden zusätzlich auch mit einer Mutation in *csrD* (*csrD::cat*) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität der *csgB::lacZ*-Fusion (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die Symbole der verschiedenen Mutanten sind der entsprechenden Grafik zu entnehmen. oN, über-Nacht-Kultur (24 Stunden nach Inokulation). (F) Immunoblot-Analyse von CsgD in W3110 Derivaten mit Mutationen in den oben genannten sRNA-Genen (Spalten: 1, W3110; 2, *csrD*; 3, *rprA*; 4, *rprA csrD*; 5, *csrB csrC*; 6 *csrB csrC csrD*; 7 *omrAB*; 8, *omrAB csrD*; 9, *arcZ*; 10, *arcZ csrD*; 11, *mcaS*; 12, *mcaS csrD*) wurde bei 28°C in LB wachsen gelassen. Zwölf Stunden nach Inokulation (Start-OD<sub>578</sub> = 0,05) wurden Proben für die Immunoblot-Analyse von CsgD genommen. Die densitometrische Quantifizierung ist unter dem Blot dargestellt. 5µg Protein wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. CsgD wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen CsgD detektiert.

Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, ergab die Untersuchung der Curli-Expression mit Hilfe einer *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, dass die kleinen RNAs RprA (A), OmrAB (C) und McaS (E) eine negative Rolle spielen. Der Einfluss dieser regulatorischen RNAs ist bisher nur durch Überexpression oder bei 37°C gezeigt worden [Mika *et al.*, 2012, Holmqvist *et al.*, 2010, Thomason *et al.*, 2012]. Die kleine RNA ArcZ (D) hat eine positive Wirkung auf die Curli-Expression, während die sRNAs CsrBC einen marginalen (positiven) Einfluss (B) zeigen. Wie schon in Abbildung 4.5 (Quadrat halb gefüllt) dargestellt, hat CsrD einen positiven Einfluss auf die Curli-Expression (Abb. 4.6, Dreiecke). Die *csrD*-Mutation führt zu einer Reduktion der *csgB*-Expression von 30% bis 70% im Vergleich zum Wildtyp und die *csgB*-Expression ist zeitlich verzögert (Abb. 4.6, A - E).

Eine sekundäre Mutation in *rprA* kann den Effekt einer *csrD*-Mutation supprimieren und die zeitliche Verzögerung der *csgB*-Expression in einer *csrD*-Mutante wird hier aufgehoben. Die *rprA*-Mutation führt zu einer 60% erhöhten *csgB*-Expression im Vergleich zum Wildtyp und die *csgB*-Expression beginnt in diesem Mutantenhintergrund etwa eine Stunde eher (Abb. 4.6 A).

Die Mutation der sRNAs *omrAB* resultiert in einer erhöhten *csgB*-Expression (60%) im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier ist, wie bei einer *rprA*-Mutation, eine zeitlich nach vorne verschobene *csgB*-Expression zu beobachten. Eine zusätzliche Mutation von *omrAB* kann die Effekte (zeitliche Verzögerung und Reprimierung der *csgB*-Expression) einer *csrD*-Mutation supprimieren (Abb. 4.6 C).

Eine zusätzliche Mutation in *mcaS* kann den reprimierenden Effekt auf die *csgB*-Expression einer *csrD*-Mutation nicht vollständig supprimieren (50% Reduktion durch die Doppelmutation, *csrD*-Mutation hier 70% Reduktion im Vergleich zum Wildtyp). Die *mcaS*-Mutation führt zu einer 60% erhöhten *csgB*-Expression im Vergleich zum Wildtyp und die *csgB*-Expression beginnt in diesem Mutantenhintergrund etwa eine Stunde eher (Abb. 4.6 E).

Eine Mutation der kleinen RNA ArcZ hat eine Reduktion der *csgB*-Expression um 70% im Vergleich zum Wildtyp zur Folge. Die Doppelmutation *arcZ csrD* zeigt den gleichen Effekt wie die *arcZ*-Mutation alleine. Es kommt in diesem Fall zu einer Reduktion der *csgB*-Expression um 90% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.6 D).

Der Einfluss des Csr-Systems auf die Curli-Fimbrien-Expression wurde mittels Mutationen in CsrB und CsrC untersucht. Es wurde mit einer *csrBC*-Doppelmutante gearbeitet, da eine *csrC*-Mutation zu einer erhöhten *csrB*-Transkription führt und *vise versa* [Weilbacher *et al.*, 2003]. Die zusätzlichen Mutationen in den Genen *csrB* und *csrC* können

die *csrD*-Mutation in Bezug auf die Curli-Expression nicht supprimieren. Die *csrBC*-Mutationen führen zu einer leicht erhöhten Expression von *csgB* (Abb. 4.6 B).

Die in Abbildung 4.6 F dargestellte Immunoblot-Analyse des zellulären CsgD-Proteins korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchung der csgB-Expression, d.h. wenn bedingt durch eine Mutation die csgB-Expression erniedrigt ist, dann ist auch der CsgD-Protein-Gehalt in dieser Mutante verringert (Vergleich Abb. 4.6 A – E mit Abb. 4.6 F, beispielsweise Vergleiche Abb. 4.6 E mit 4.6 F Balken 1, 2, 11 und 12).

Zusammenfassend wurde durch diese Studie gezeigt, dass neben den schon bekannten sRNA OmrA, OmrB, RprA und McaS auch weitere kleine RNAs (ArcZ und marginal CsrBC) einen Einfluss auf die Curli-Expression ausüben. Die sRNAs spielen dabei eine wichtige Rolle bei der zeitlichen Regulation der Curli-Expression. Eine zusätzliche Mutation in *rprA* oder *omrAB* kann die Effekte einer *csrD*-Mutation supprimieren, wohingegen sekundäre Mutationen in *csrBC* keinen Einfluss auf die Effekte der *csrD*-Mutation ausüben. Die Effekte der *csrD*-Mutation werden durch eine sekundäre Mutation in *arcZ* noch verstärkt und durch eine Mutation in *mcaS* zum Teil aufgehoben.

Das degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD wirkt also additiv mit den kleinen RNAs RprA, OmrA, OmrB und McaS und unabhängig von Csr-System auf die Expression der Curli-Fimbrien.
### 4.2.2 CsrD beeinflusst weitere kleine RNAs, neben CsrB

Bei CsrD handelt es sich um membrangebundenes Protein, welches an der Destabilisierung von CsrB und CsrC durch die RNase E beteiligt ist [Suzuki *et al.*, 2006]. Nachdem gezeigt wurde, dass CsrD unabhängig von CsrB und CsrC einen Einfluss auf die Curli-Expression hat, ist nun die Frage, ob CsrD auch die Stabilität oder Expression weiterer kleiner RNAs beeinflusst.

# 4.2.2.1 Die CsrD-Mutation führt zu veränderten zellulären Konzentrationen diverser sRNAs

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden RNA-Proben entlang der Wachstumskurve in Komplexmedium (LB) bei 28°C vom WT und einem *csrD*-defizienten Derivat genommen. Für diese Untersuchung wurden zwei Varianten der *csrD*-Mutation verwendet. In beiden Fällen ist der gleiche Bereich von *csrD* durch eine Antibiotika-Kassette ersetzt worden. In dem einen Fall handelt es sich um eine Kanamycin-Kassette und im anderen Fall um eine Chloramphenicol-Kassette. Das Gen für die Kanamycin-Resistenz hat die gleiche Orientierung wie das *csrD*-Gen selbst und das Gen für die Chloramphenicol-Resistenz hat die entgegengesetzte Orientierung. In diesem Fall wurden beide *csrD*-Mutationen untersucht, um eventuelle Unterschiede durch die beiden Mutationen darzustellen (siehe auch 4.2.4).

Um den Einfluss von CsrD auf kleine RNAs zu klären, wurde eine Reihe von Sonden gegen verschiedenste RNAs konstruiert. Dabei konnte bei folgenden sRNAs YliL, SgrS, 6S, RyeB, DsrA, RybB, RybA, RyeB, RydB, MicA, GlmZ und McaS entweder keine Veränderung im *csrD*-defizienten Hintergrund nachgewiesen werden oder die sRNA selbst konnte nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei den ausgewählten sRNAs handelt es sich zum Teil um RNAs, die unter bestimmten Bedingungen RpoS-abhängig sind [Kolmsee, 2011].

Die sRNAs ArcZ, OmrA, OmrB, CsrB und RprA konnten unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden und sie zeigen entlang der Wachstumskurve eine veränderte RNA-Konzentration im *csrD*-Mutanten-Hintergrund (Abb. 4.7). Die Analyse der RNA-Konzentrationen von CsrB, OmrA, OmrB, RprA und ArcZ zeigt, dass kein Unterschied zwischen den beiden *csrD*-Mutationen auftritt.



Abb. 4.7: Einfluss von CsrD auf die RNA-Konzentration verschiedener kleiner RNAs entlang der Wachstumskurve.

Der Wildtypstamm W3110, sowie Derivate mit einer Insertionsmutation in *csrD* [zum einen mit einer Kanamycin-Kassette (*csrD::kan*), zum anderen mit einer Chloramphenicol-Kassette (*csrD::cat*)] wurden bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei einer definierten und oben angegebenen optischen Dichte (bei 578 nm) wurden Proben für die anschließende Northernblotanalyse entnommen. 5  $\mu$ g RNA wurden auf ein 6% (für CsrB), 8% (für ArcZ, GlmZ, RprA) oder 12% (OmrA, OmrB) -iges PAA/Urea-Gel aufgetragen und bei 10 mA laufen gelassen. Nach dem Blotten bei 20V für 1h wurde die positiv-geladene Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen die entsprechende sRNA bei 50°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion, die mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte. Nach der Detektion wurde die Sonde mit heißem Stripping Puffer abgewaschen und die Membran wurde erneut mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen die 5S RNA (als Ladekontrolle) bei 50°C inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter behandelt.

Im Wildtyp ist die ArcZ-RNA-Konzentration gleich bleibend entlang der Wachstumskurve. In den beiden *csrD*-Mutanten-Hintergründen zeigt sich eine Reduktion der Konzentration bei  $OD_{578nm}$  4.0. Auch scheint in der exponentiellen und post-exponentiellen Phase weniger ArcZ in der Zelle vorhanden zu sein, wenn *csrD* deletiert ist (Abb. 4.7, oben). Die von Mandin und Gottesmann (2010) beobachtete stationärphasen-induzierte Expression von ArcZ in Komplexmedium konnte hier nicht bestätigt werden. Im Wildtyp ist bei der sRNA OmrA ein gleichmäßiger Anstieg der RNA-Konzentration von  $OD_{578nm}$  1 bis  $OD_{578nm}$  4 feststellbar. Bei  $OD_{578nm}$  4 ist im Wildtyp das Maximum der OmrA-RNA-Konzentration erreicht. In dem *csrD*-Mutanten-Hintergrund kann dieser gleichmäßige Anstieg der RNA-Konzentration nicht beobachtet werden. Hier ist eher ein Stufen-artiger Anstieg der RNA-Konzentration sichtbar, dass heißt bei  $OD_{578nm}$  1 und  $OD_{578nm}$  2 und bei OD3 und OD4 ist die OmrA-RNA-Konzentration jeweils gleich (in beiden Fällen höhere Konzentrationen als im Wildtyp) (Abb. 4.7, zweite von oben). Eine Stationärphasen-induzierte RNA-Konzentration von OmrA kann auch bei 37°C in LB beobachtet werden [Argaman *et al.*, 2001].

Bei der sRNA CsrB kann eine Erhöhung der RNA-Konzentration in den *csrD*-Mutanten-Hintergründen beobachtet werden. Dieser ist von Suzuki *et al.* (2006) bei 37°C in LB schon gezeigt worden. Im Wildtyp ist ein marginaler Anstieg der CsrB-RNA-Konzentration entlang der Wachstumskurve zu verzeichnen. Dieser Wachstums-abhängige Anstieg ist in den *csrD*-Mutanten-Hintergründen ebenfalls vorhanden (Abb. 4.7, Mitte).

Für die sRNA OmrB haben Vogel *et al.* (2003) bei 37°C in Komplexmedium (LB) gezeigt, dass die RNA-Konzentration in der post-exponentiellen Phase sein Maximum erreicht und danach wieder absinkt. Dieser Verlauf kann bei 28°C in LB für den Wildtyp hier ebenfalls beobachtet werden. In den *csrD*-Mutanten-Hintergründen ist dieser glockenförmige Anstieg und Abfall der RNA-Konzentration nicht zu verzeichnen. Hier ist die OmrB-RNA-Konzentration ungefähr gleich bleibend entlang der Wachstumskurve (Abb. 4.7, zweite von unten).

Argaman *et al.* (2001) haben einen stationärphasen-induzierten Anstieg der RprA-RNA-Konzentration bei 37°C in Komplexmedium (LB) gezeigt. Bei 28°C scheint dies nicht der Fall zu sein, denn die RprA-RNA-Konzentration ist entlang der Wachstumskurve beim Wildtyp gleich bleibend. In den *csrD*-Mutanten-Hintergründen ist auch kein Anstieg zu verzeichnen. Hier ist auffällig, dass die RprA-RNA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Abb. 4.7, unten).

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass CsrD nicht nur als Teil des Csr-Systems aktiv ist, sondern anscheinend auch weitere RNAs in ihrer zellulären Konzentration beeinflusst. Unter den getesteten Bedingungen sind die erhöhten Konzentrationen von CsrB und RprA am auffälligsten.

Suzuki *et al.* (2006) haben gezeigt, dass CsrD die RNA-Stabilität von CsrB und CsrC beeinflusst. Ob die in Abbildung 4.7 dargestellten veränderten sRNA-Mengen im *csrD*-defizienten Hintergrund auf den Einfluss von CsrD auf die Stabilität des entsprechenden Transkripts zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe der Bestimmung der Abbauraten der einzelnen sRNAs genauer untersucht. In Abbildung 4.7 ist die Transkriptkonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt im Wildtyp und in Derivaten mit einer *csrD*-Mutation dargestellt. Die aktuelle Transkriptkonzentration (steady-state) ist die Summe aus der aktuellen RNA Synthese und dem aktuellen RNA-Abbau. Wenn die steady-state Konzentration einer RNA bekannt ist, kann die Messung der Abbaurate dazu genutzt werden, um die Syntheserate zu bestimmen und um Regulationen, die für die RNA Stabilität notwendig sind, aufzudecken [Selinger *et al.*, 2003].

Um die Stabilität der verschiedenen sRNAs zu bestimmen, wurden RNA-Proben entlang der Wachstumskurve in Komplexmedium (LB) bei 28°C von WT und Derivat mit *csrD::cat*-Mutation genommen. Hier wurde nur die *csrD::cat*-Mutation verwendet, da zwischen den beiden

*csrD*-Mutationen keine großen Unterschiede bezüglich der RNA-Konzentrationen auftraten (weitere Gründe siehe Kapitel 4.2.4.). Die Kulturen wurden mit dem Antibiotikum Rifampicin zu einem definierten Zeitpunkt ( $OD_{578nm}$ : 1.0, 2.0 und 3.5) behandelt und die Probennahme erfolgte nach bestimmten Zeitpunkten. Rifampicin ist ein bakterizides Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine und hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase. So wird die Transkription der Bakterien spezifisch gehemmt.

Die Halbwertzeit einer mRNA liegt normalerweise bei ungefähr sieben Minuten [Selinger *et al.*, 2003] und die Halbwertszeiten von sRNA decken mit zwei bis 32 Minuten eine durchschnittlich größere Spanne ab [Vogel *et al.*, 2003].



## Abb. 4.8: Einfluss von CsrD auf die RNA-Stabilität verschiedener kleiner RNAs entlang der Wachstumskurve.

Der Wildtypstamm W3110, sowie ein Derivat mit einer Insertionsmutation in CsrD (mit einer Chloramphenicol-Kassette: *csrD::cat*) wurden bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei einer definierten und oben angegebenen optischen Dichte (OD bei 578 nm) wurden vor Rifampicinzugabe (0,5mg/ml) sowie 2, 4, 8, 10, 15 und 30 Minuten nach Rifampicingabe Proben für die anschließende Northernblotanalyse entnommen. 5 µg RNA wurden auf ein 6% (für CsrB), 8% (für ArcZ, GlmZ, RprA) oder 12% (OmrA, OmrB) -iges PAA/Urea-Gel aufgetragen und bei 10 mA laufen gelassen. Nach dem Blotten bei 20V für 1h wurde die positiv-geladene Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen die entsprechende sRNA bei 50°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion, die mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte. Nach der Detektion wurde die Sonde mit heißem Stripping Puffer abgewaschen und die Membran wurde erneut mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen die 5S RNA (als Ladekontrolle) bei 50°C inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter behandelt.

Die hier untersuchten RNA-Stabilitäten, dargestellt in Abbildung 4.8, bei 28°C in Komplexmedium zeigen unterschiedliche Muster. Während ArcZ und CsrB eine kurze Halbwertzeit haben, sind die sRNAs OmrA, OmrB und RprA im Wildtyp-Hintergrund sehr stabil (Abb. 4.8).

Vogel *et al.* (2003) konnten für ArcZ bei 37°C in LB eine Halbwertszeit von 32 Minuten bestimmen. Bei 28°C in LB hat ArcZ eine durchschnittliche Halbwertszeit von drei Minuten unabhängig davon in welcher Wachstumsphase sich die Bakterien befinden. Bezüglich der Stabilität kann kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem *csrD::cat*-Derivat festgestellt werden (Abb. 4.8, oben).

Für CsrB konnte eine kurze Halbwertszeit im Wildtyp bestimmt werden (4 bis 6 Minuten). Diese scheint unabhängig von der Wachstumsphase zu sein. Die erhöhte RNA-Konzentration im *csrD::cat*-Derivat ist deutlich sichtbar (s. auch Abb. 4.7). Im *csrD*-Mutanten-Hintergrund wird die CsrB-RNA stabilisiert und die Halbwertszeit steigt auf über 30 Minuten an

(Abb. 4.8, zweite von oben). Dieser stabilisierende Effekt auf CsrB in einer *csrD*-Mutation wurde schon von Suzuki *et al.* (2006) bei 37°C beobachtet.

Bei OmrA und OmrB wird eine Halbwertszeit von über 30 Minuten beobachtet. Beide zeigen bezüglich ihrer Stabilität keine Unterschiede im *csrD*-Mutanten-Hintergrund, aber bezüglich der RNA-Konzentration ist die Erhöhung im *csrD::cat*-Derivat bei OD3.5 (bei 578nm) deutlich sichtbar (Abb. 4.8, Mitte und zweite von unten, s. auch Abb. 4.7). Vogel *et al.* (2003) haben für OmrA eine Halbwertszeit von 16 Minuten und für OmrB von über 30 Minuten bei 37°C in LB festgestellt.

Die regulatorische RNA RprA hat sowohl im Wildtyp als auch in der *csrD::cat*-Mutante bei  $OD_{578nm}$  1 und  $OD_{578nm}$  2 eine ungefähre Halbwertszeit von 20 Minuten und in der stationären Phase ( $OD_{578nm}$  3.5) eine ungefähre Halbwertszeit von 12 Minuten. Deutlich sichtbar ist hier die erhöhte RNA-Konzentration im *csrD*-defizienten Hintergrund (Abb. 4.8, unten, s. auch Abb. 4.7). Majdalani *et al.* (2001) konnten für RprA eine Halbwertszeit von sieben bis acht Minuten bei 37°C bestimmen.

Zusammenfassend kann zu den sRNA-Studien festgehalten werden, dass CsrD die RNA-Konzentration von verschiedenen sRNAs beeinflusst. Da eine veränderte Stabilität nur für das bekannte Ziel von CsrD, CsrB gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass CsrD die Expression der anderen sRNAs beeinflusst. Auffällig bei diesen Untersuchungen waren die durchweg erhöhten RprA-RNA-Konzentrationen. Diese sind nicht durch eine erhöhe Stabilität erklärbar. Möglicherweise hat CsrD einen Einfluss auf die Transkription von RprA.

### 4.2.3 CsrD reprimiert das Rcs-Phosphorelay-System

CsrD ist Teil des Csr-Systems und zusammen mit der RNase E am Umsatz der kleinen RNAs CsrB und CsrC beteiligt [Romeo *et al.*, 2012]. CsrD wirkt aber anscheinend nicht nur auf die kleinen RNAs des Csr-Systems, sondern auch auf mindestens vier weitere (s. Abb. 4.7 und Abb. 4.8). In einem *csrD*-defizienten Hintergrund kann ein starker Anstieg der RprA-RNA-Konzentration beobachtet werden (Abb. 4.7). Dieser Anstieg ist nicht in einer stabileren RNA begründet (Abb. 4.8). CsrD beeinflusst also möglicherweise direkt oder indirekt die Transkription dieser kleinen RNA. Die Transkription von RprA ist direkt abhängig vom Transkriptionsfaktor RcsB. Dieser Response-Regulator gehört zum Rcs-Phosphorelay-System, welches für die Reifung eines Biofilms wichtig ist [Majdalani & Gottesman, 2005].

### 4.2.3.1 CsrD reprimiert Rcs-abhängige Gene

In E. coli können 271 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Diese lassen sich in elf Familien mit DNA-bindenden Domänen organisieren. Viele dieser Proteine weisen eine Zwei-Domänen-Struktur auf und bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne und einer regulatorischen Domäne. Membrandomänen sind bei Transkriptionsfaktoren nicht zu finden [Babu & Teichmann, 2003]. Bei CsrD handelt es sich um ein membranständiges Protein mit zwei Transmembran-Domänen. Ein direktes Binden an den Promotor von rprA kann also aufgrund der Domänenstruktur von CsrD ausgeschlossen werden. Ein indirekter Einfluss auf die Expression von RprA durch CsrD könnte durch das Rcs-Phosphorelay-System realisiert sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde neben der Expression von rprA, auch die Expression von bdm und flhDC untersucht. Die Studie der Expression erfolgte bei 28°C in Komplexmedium mit Hilfe von chromosomalen lacZ-Reportergenfusionen zu den verschiedenen Genen. Alle drei Gene (rprA, bdm, flhDC) stehen unter der Kontrolle des Rcs-Phosphorelay-Systems. Die Transkription von rprA [Majdalani et al., 2002] und bdm [Francez-Charlot et al., 2005] wird durch ein Homodimer aus RcsB aktiviert, die Transkription von *flhDC* wird durch das Heterodimer aus RcsA und RcsB reprimiert [Francez-Charlot et al., 2003].



Abb. 4.9: CsrD reprimiert die Expression von *rprA* und *bdm* und aktiviert die Expression von *flhDC*. Ein W3110-Derivat mit einer in das Genom integrierten *lacZ*-Reportergenfusion zu *rprA* (A), *bdm* (B) oder *flhDC* (C) (jeweils durch Quadrate dargestellt), als auch Derivate dieser Stämme mit einer Insertionsmutation in *csrD* (*csrD::cat*) (jeweils durch Kreise dargestellt) wurden bei 28°C in reichem Medium (LB) inkubiert. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. oN, über-Nacht-Kultur (24 Stunden nach Inokulation).

Die Untersuchung der Transkription von *rprA* ergab, dass *rprA* bei 28°C in Komplexmedium (LB) durchweg gleich stark exprimiert wird (Abb. 4.9 A, Quadrate) und nicht, wie bei 37°C, Stationärphasen-induziert ist [Argaman *et al.*, 2001]. Die *csrD*-Mutation führt zu einer Stationärphasen-abhängigen Induktion der *rprA*-Transkription (Abb. 4.9 A, Kreise). Im *csrD*-Mutanten-Hintergrund ist die *rprA*-Transkription dreimal stärker als im Wildtyp (Abb. 4.9 A, Vergleich Quadrate mit Kreisen).

Die Expression des Genes bdm (biofilm-dependent modulation protein) ist in reifen Biofilmen [Prigent-Combaret *et* 1999]. Unter reduziert al., den getesteten Bedingungen (28°C, LB, Flüssigkultur, entspricht den initialen Schritten der Biofilmentwicklung) steigt die Expression in der post-exponentiellen Phase an und erreicht ihr Maximum in der Stationärphase. Danach kommt es zum Absinken der Expression (Abb. 4.9 B, Quadrate). Die csrD-Mutation führt, wie bei rprA, zu einer Induktion der Expression (Abb. 4.9 A, Kreise). Die bdm-Expression ist im csrD-Mutanten-Hintergrund zweifach erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.9 B, Vergleich Quadrate mit Kreisen). Die Expression von bdm beginnt in der csrD-Mutante ungefähr bei OD 1 (bei 578nm) und im Wildtyp erst ungefähr bei OD 2 (bei 578nm). Das Muster der Expression wird durch die csrD-Mutation nicht verändert (Abb. 4.9 B, Vergleich Quadrate mit Kreisen).

In Abbildung 4.9 C ist die Expression des Masterregulators der Motilität (*flhDC*) dargestellt. Die Expression hat ihr Maximum in der logarithmischen Phase und sinkt im weiteren Verlauf des Wachstums ab (Abb. 4.9 C, Quadrate). Durch die *csrD*-Mutation kommt es zu einer 30 prozentigen Reduktion der *flhDC*-Expression (Abb. 4.9 B, Vergleich Quadrate mit Kreisen).

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass CsrD den gegenteiligen Effekt zum Rcs-Phosphorelay-System bei den ausgewählten Genen ausübt. So reprimiert CsrD die Expression/Transkription von den durch das Rcs-Phosphorelay-System aktivierten Genen *rprA* und *bdm* und aktiviert die Expression von *flhDC*, dessen Expression durch das Rcs-Phosphorelay-System reprimiert wird.

### 4.2.3.2 CsrD inhibiert das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF

Die Ergebnisse der Expressionsstudie zu Rcs-abhängigen Genen lassen also den Schluss zu, dass CsrD einen negativen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System haben könnte (Abb. 4.9).

Das Rcs-Phosphorelay-System ist ein Multi-Komponenten-Phosphorelay-System. Es besteht aus den Komponenten RcsC, RcsD, RcsB und RcsF. Die Sensorkinase RcsC überträgt nach Aktivierung durch Autophosphorylierung einen Phosphatrest auf das Hpt-Protein RcsD. Von hier aus wird das Phosphat auf den Response Regulator RcsB übertragen. Der Phosphat-Fluss kann sowohl von RcsC über RcsD zu RcsB gehen, als auch von RcsB über RcsD zu RcsC. Durch die Phosphorylierung von RcsB kommt es zu einer Konformationsänderung und RcsB kann als Homodimer oder als Heterodimer beispielsweise mit RcsA an die DNA binden und so die Expression seiner Zielgene aktivieren oder reprimieren. Die Außenmembrankomponente RcsF ermöglicht die Integration externer Signale und Veränderungen der Membran in das Rcs-Phosphorelay-System. Interne Signale werden durch RcsC wahrgenommen.

Um zu testen über welche Komponente CsrD einen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System hat, wurde eine Expressionsstudie mit einer *lacZ*-Reportergenfusion zu *bdm* mit Mutationen in den verschiedenen Komponenten des Rcs-Phosphorelay-Systems durchgeführt.



Abb. 4.10. CsrD reprimiert die Expression von *bdm* über die Außenmembrankomponente des Rcs-Phosphorelay-Systems RcsF.

Ein W3110-Derivat mit einer in das Genom integrierten *lacZ*-Reportergenfusion zu *bdm*, als auch Derivate dieser Stämme mit Deletionsmutationen in *rcsC* (**A**), *rcsD* (**B**), *rcsB* (**C**) und *rcsF* (**D**) wurden bei 28°C in reichem Medium (LB) inkubiert. Alle Einzelmutanten in den Komponenten des Rcs-Phosphorelay-Systems wurden zusätzlich auch mit einer Mutation in *csrD* (*csrD::cat*) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die optische Dichte bei 578nm (OD<sub>578nm</sub>) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. oN, über-Nacht-Kultur (24 Stunden nach Inokulation).

Die in Abbildung 4.10 dargestellte Expressionsstudie zeigt, dass eine *csrD*-Mutation zu einer mindestens zweifachen Induktion der *bdm*-Expression im Vergleich zum Wildtyp führt. Des Weiteren beginnt die *bdm*-Expression im *csrD*-Mutanten-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp eher (ungefähr OD<sub>578nm</sub> 1 bei *csrD*-Mutante, ungefähr OD<sub>578nm</sub> 2 beim Wildtyp) (Abb. 4.10, Vergleich Quadrate mit Kreisen).

Die Kinase-Mutation rcsC hat eine sechsfache Induktion der bdm-Expression zur Folge. Hier beginnt die bdm-Expression ungefähr zwei Stunden eher als im Wildtyp (Abb. 4.10 A; Vergleich Quadrate mit Dreiecken). Die Doppelmutation rcsC csrD führt ebenfalls zu einer Induktion der bdm-Expression (Abb. 4.10 A; Vergleich Quadrate mit Rauten). Diese Induktion (Abb. 4.10 A; Rauten) ist stärker als bei der csrD-Mutation (Abb. 4.10 A; Kreise) und schwächer als bei der rcsC-Mutation alleine (Abb. 4.10 A; Dreiecke) (2-fache Induktion bei csrD<sup>-</sup>, 6-fache Induktion bei rcsC<sup>-</sup> und 5-fache Induktion bei rcsC<sup>-</sup> csrD<sup>-</sup>) (Abb. 4.10 A). Die rcsD-Mutation führt zu einer zwölffachen Induktion der bdm-Expression (Abb. 4.10 B; Vergleich Quadrate mit Dreiecken). Die Induktion der rcsD-Mutation scheint stärker zu sein als bei der *rcsC*-Mutation (Vergleich Abb. 4.10 A und B; jeweils die Quadrate und Dreiecke). Im rcsD-defizienten Hintergrund beginnt die bdm-Expression sofort zu Beginn des Messzeitraums (3 Stunden eher als im Wildtyp) (Abb. 4.10 B; Vergleich Quadrate mit Dreiecken). Die Doppelmutation rcsD csrD führt ebenfalls zu einer Induktion der bdm-Expression (Abb. 4.10 B; Vergleich Quadrate mit Rauten). Diese Induktion (Abb. 4.10 B; Rauten) ist stärker als bei der csrD-Mutation (Abb. 4.10 B; Kreise) und schwächer als bei der rcsD-Mutation (Abb. 4.10 B; Dreiecke) (2-fache Induktion bei csrD, 12-fache Induktion bei rcsC<sup>-</sup> und 9-fache Induktion bei rcsC<sup>-</sup> csrD<sup>-</sup>) (Abb. 4.10 B). Die bdm-Expression in der Doppelmutante beginnt zwei Stunden eher als im Wildtyp (Abb. 4.10 B; Vergleich Quadrate mit Rauten).

Durch eine Mutation im Response Regulator *rcsB* kommt es zu einer Reduktion der *bdm*-Expression um 60 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.10 C; Vergleich Quadrate mit Dreiecken). Die sekundäre Mutation in *rcsB* supprimiert die *csrD*-Mutation, sodass die *bdm*-Expression in diesem Fall ebenfalls um 60% im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Abb. 4.10 C; Vergleich Quadrate mit Rauten).

Die Mutation des außenmembranständigen Lipoproteins *rcsF* führt, wie die Mutation des Response Regulators *rcsB* (Abb. 4.10 C), zu einer Reduktion der *bdm*-Expression um 50 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.10 D, Vergleich Quadrate mit Dreiecken). Die sekundäre Mutation in *rcsF* supprimiert die *csrD*-Mutation, sodass die *bdm*-Expression in diesem Fall ebenfalls um 50% im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Abb. 4.10 D; Vergleich Quadrate mit Rauten).

Die Expressionsstudie zu *bdm*, als Reporter für das Rcs-Phosphorelay-System, in Abhängigkeit von den einzelnen Rcs-Phosphorelay-System-Komponenten zeigt, dass CsrD einen hauptsächlich negativen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System ausübt. Die Wirkung wird über das Lipoprotein RcsF vermittelt und CsrD beeinflusst möglicherweise die Signalweiterleitung von RcsF an die Sensorkinase RcsC.

Die Signale, die das Rcs-Phosphorelay-System wahrnimmt sind nicht bekannt. Es gibt unterschiedliche Stressbedingungen, die zu einer Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems führen. So induzieren niedrige Temperaturen (18°C), Glukose, Zink und hohe Osmolarität das Rcs-Phosphorelay-System [Schmöe et al., 2011; Francez-Charlot et al., 2005]. Das Lipoprotein RcsF wird bei der Rcs-spezifischen Antwort auf Stress mit Lysozym oder **B-Laktam-Antibiotika** benötigt. Die Außenmembrankomponente RcsF ist also möglicherweise an der Wahrnehmung einer Missordnung der Peptidoglykan-Schicht beteiligt [Callewaert et al., 2009; Castanie-Cornet et al., 2006; Laubacher & Ades, 2008; Majdalani et al., 2005]. Die Peptidoglykanschicht (Mureinschicht) folgt direkt der Zytoplasma-Membran und besteht aus Zuckern und Aminosäuren. Peptidoglykan spielt eine strukturelle Rolle für die bakterielle Zellwand und vermittelt strukturelle Stärke, um gegen den osmotischen Druck des Zytoplasmas zu bestehen.

Eine mögliche Erklärung für den Einfluss des Innenmembran-ständigen Proteins CsrD auf das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF ist, dass CsrD die Zusammensetzung der Peptidoglykanschicht verändert. Diese Veränderung macht sich möglicherweise durch eine veränderte Zellstruktur (Länge) bemerkbar. Um die Zelllänge des Wildtyps und eines Derivats mit einer *csrD*-Mutation (*csrD::cat*) zu bestimmen, wurden die Bakterien mikroskopisch entlang der Wachstumskurve untersucht.

Die Ergebnisse der Zelllängenbestimmung sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Der Wildtyp hat bis OD 3 (bei 578nm) eine mittlere Zelllänge von ungefähr drei Mikrometern und die csrD-Mutation führt zu einer mittleren Zelllänge von 2,5 Mikrometern bis OD 3 (bei 578nm). Dieser Unterschied wurde durch den statistischen t-Test abgesichert und erwies sich als signifikant. Die Zelllänge bei E. coli variiert entlang der Wachstumskurve von zwei bis sechs Mikrometern. Die mikroskopische Untersuchung der E. coli Bakterien ergab also, dass die csrD-Mutation zu einer verkürzten Zellform führt und dass der Wildtyp und die Mutante sich beim Übergang in die Stationärphase angleichen. Bei diesem Übergang werden die Bakterienzellen RpoS-kontrollierte durch die Expression bolA kürzer von [Lange & Hengge-Aronis, 1991].



#### Abb. 4.11: Einfluss von CsrD auf die Länge der Zelle entlang der Wachstumskurve.

Der Wildtypstamm W3110, sowie ein Derivat mit einer Insertionsmutation in *csrD* (*csrD::cat*) wurden bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei definierten optischen Dichte (0,5, 1, 2, 3, und 4 bei 578 nm) wurden Proben für die anschließende Zelllängenbestimmung entnommen. 20 µl der Kultur (ab OD1 entsprechend verdünnt) wurden auf einen mit 1,5%-iger Agarose überschichteten Objektträger gegeben und mikroskopisch analysiert. Die Zelllänge wurde mittels des Programms AxioVision 4.7 (Carl Zeiss) bestimmt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig von einander durchgeführt. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Der Stern gibt an, dass die mittleren Zelllänge vom Wildtyp signifikant größer war, als die der csrD-Mutante (t-Test, p<0,05). Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt.

Das membranständige Protein CsrD beeinflusst die Länge einer *E. coli* Zelle. Dieser Einfluss kann durch die degenerierten GGDEF/EAL-Domänen, nicht aber durch eine aktive Beteiligung am c-di-GMP-Umsatz begründet sein. Durch seinen Einfluss auf verschiedene kleine RNAs (Abb. 4.7 und Abb. 4.8) verändert CsrD möglicherweise die Zusammensetzung der Membran. sRNAs wurden oft im Zusammenhang mit der Kontrolle der Expression von Außenmembranproteinen gefunden [Vogel & Papenfort, 2006]. Die Veränderung der Zelllänge (Abb. 4.11) und möglicherweise auch der Zusammensetzung der Membran könnte die Erklärung für den Einfluss von CsrD auf das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF (Abb. 4.10) sein.

### 4.2.4 CsrD und das Aktinhomolog MreB

Für die Konstruktion der Insertionsmutationen nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) stehen zwei verschiedene Antibiotika-Kassetten zur Verfügung, zum einen eine Chloramphenicol-Kassette (kodiert durch das Gen cat auf dem Plasmid pKD3) und zum anderen die Kanamycin-Kassette (kodiert durch das Gen neo auf den Plasmid pKD4). Für die Isolierung der csrD-Mutation wurden sowohl die Chloramphenicol-, als auch die Kanamycin-Kassette, verwendet. Die jeweilige Antibiotika-Kassette ersetzt durch homologe Rekombination das Gen (hier csrD), welches mutiert werden soll. Es wurden beide Varianten hergestellt, um eine einfache Kombination mit verschiedenen anderen Mutationen zu ermöglichen. Die phänotypische Analyse der beiden Mutanten-Hintergründe ergab, dass beide einen negativen Einfluss auf die *csgB*-Expression haben (Abb. 4.5, Daten nicht gezeigt). Auffällig war, dass die *csrD::kan*-Mutation eine stärkere Reduktion der *csgB*-Expression zur Folge hatte, als die csrD::cat-Mutation (80% durch die csrD::kan-Mutation, 50% durch die csrD::cat-Mutation; Daten nicht gezeigt). Auch einen negativen Einfluss auf die Motilität konnte durch die csrD::kan-, nicht aber durch die csrD::cat-Mutation, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei beiden CsrD-Mutationen kam es zu einer veränderten Wachstumsrate, sowohl bei 37°C als auch bei 28°C (Daten nicht gezeigt). Die Analyse des genetischen Kontextes von csrD ergab, dass csrD bei Minute 73 direkt vor dem mreBCD-Operon kodiert ist.

Bei MreB handelt es sich um ein Homolog des eukaryotischen Aktin [van den Ent *et al.*, 2001] und es ist wichtig für die Zellformerhaltung und die Chromosomensegregation [Kruse *et al*, 2003]. Für die Zellumwandlung von stäbchenförmig zu verkürzt und abgerundet oder rund sind fünf Proteine, PbP2, RodA, MreB, MreC und MreD, notwendig [Bendezú & de Boer PAJ., 2008]. MreB ist direkt unter der Zytoplasmamembran in einem spiralförmigen Muster über die gesamte Länge der Zelle lokalisiert [Shih *et al*, 2003].

Um den Einfluss der unterschiedlichen *csrD*-Mutation auf die *mreBCD*-Expression zu untersuchen, wurden Northern Blot-Analysen mit einer spezifischen Sonde gegen *mreB* durchgeführt. Die Proben wurden bei 28°C in Komplexmedium zu bestimmten optischen Dichten (OD<sub>578nm</sub> 1.0, OD<sub>578nm</sub> 2.0 und OD<sub>578nm</sub> 3.0) genommen.



Abb. 4.12: Einfluss der gewählten Antibiotikakassette in *csrD* auf das folgende Gen *mreB* entlang der Wachstumskurve.

Der Wildtypstamm W3110, sowie Derivate mit einer Insertionsmutation in *csrD* (mit einer Kanamycin-Kassette (*csrD::kan*) oder einer Chloramphenicol-Kassette (*csrD::cat*)) wurden bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei definierter und oben angegebener optischer Dichte (bei 578 nm) wurden Proben für die anschließende Northernblot-Analyse entnommen. Die Position von *mreB* (alleine) und des gesamten Operons *mreBCD* sind angeben. Der Stern gibt die Position einer RNA an, die möglicherweise durch die Konstruktion der *csrD::kan*-Mutation entsteht. 10 µg RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotten für 1 h wurde die positiv-geladene Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen *mreB* bei 50°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszens Reaktion auf einem Röntgenfilm.

Die Untersuchung der mRNA-Konzentrationen von *mreB* in den unterschiedlichen *csrD*-Mutanten-Hintergründen ergab, dass die *csrD::kan*-Mutation zu einer Erhöhung der *mreB*-RNA-Konzentration führt (Abb. 4.12, Mitte im Vergleich zu links). Diese Erhöhung ist im *csrD::cat*-Derivat nicht zu beobachten (Abb. 4.12, rechts im Vergleich zu links). Wachi *et al.* (2006) zeigten, dass *mreB* hauptsächlich als monocistronische mRNA exprimiert ist und nur ein bis zwei Prozent des Transkripts als polycistronische *mreBCD* mRNA exprimiert wird. Dies kann auch bei dieser Untersuchung beobachtet werden. Bei OD 1 (bei 578nm) kann im Wildtyp (und in der *csrD::cat*-Mutante) die polycistronische und die monocystronische mRNA nachgewiesen werden und bei OD<sub>578nm</sub> 2 und OD<sub>578nm</sub> 3 ist nur die monocystronische *mreB* mRNA nachweisbar (Abb. 4.12). Auffällig ist, dass durch die *csrD::kan*-Mutation ein viel größeres Fragment mit einer Größe von ungefähr vier Kilobasen nachgewiesen werden kann (Abb. 4.12, Mitte gekennzeichnet durch den Stern).

Die Untersuchung der *mreB*-RNA-Konzentration entlang der Wachstumskurve ergab, dass durch die unterschiedlichen Konstruktionen der *csrD*-Mutation es zu weiteren Veränderungen kommt. Diese Veränderungen erklären möglicherweise den verstärkten Effekt der *csrD::kan*-Mutation auf die *csgB*-Expression.

### 4.2.3.1 Ein erhöhter MreBCD-Gehalt inhibiert CsgD und die Curli-Expression

Die einfachste Möglichkeit zur Untersuchung eines Proteins ist die Studie einer Mutation in diesem Protein (s. oben, beispielsweise Abb. 4.5). Bei *mreB* ist dies leider nicht möglich, da *mreB* zu den essentiellen Genen gehört. Ein Verlust der Mre-Proteine führt laut Literatur entweder zu stabilen sich ausbreitenden Kugeln [Nilsen *et al.*, 2005] oder ist lethal [Kruse *et al.*, 2005, Wachi *et al.*, 2006]. Die folgenden Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von MreB auf die Curli-Expression wurden durch die ektopische Expression des kompletten Komplexes (MreBCD) von einem IPTG-induzierbaren Niederkopien-Vektor (pCAB18) realisiert.



Abb. 4.13: Überexpression von MreBCD verändert die Expression der Curli-Gene und den CsgD-Proteingehalt.

(A) Der Laborwildtyp W3110 mit einer ins Genom integrierten *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, wurde in Anwesenheit des Plasmides pMreBCD (Kreise) oder pCAB18 (Quadrate) in Komplexmedium (LB) bei 28°C wachsen gelassen. Die Plasmide wurden bei OD1.0 (Pfeil) mit IPTG (1mM) induziert. Die optische Dichte  $(OD_{578nm})$  (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. oN, über Nacht Kultur (24h nach Inokulation der Kultur). (**B**) Immunoblot-Analyse von CsgD in W3110 in Anwesenheit des Plasmides pMreBCD oder pCAB18. Die Kulturen wurden bei 28°C in LB wachsen gelassen. 6,5 Stunden nach Induktion der Plasmide bei einer OD 1.0 (bei 578nm) wurden Proben für die Immunoblot-Analyse von CsgD sowohl von den induzierten (mit einem Plus gekennzeichnet) als auch von den uninduzierten (mit einem Minus gekennzeichnet) Kulturen genommen. Die densitometrische Quantifizierung ist unter dem Blot dargestellt. 5µg Protein wurden auf ein 12% iges Polyacrylamidgel aufgetragen. CsgD wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen CsgD detektiert. pMreB(CD) = pCAB18, komplettes Operon von mreBCD mit eigener SD, IPTG-induzierbar, AMP<sup>R</sup>; pCAB18 = Kontrollplasmid, IPTG-induzierbar, AMP<sup>R</sup>

Einfluss MreB(CD) die Curli-Expression Der von auf wurde durch eine lacZ-Reportergenfusion zu csgB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Induktion des MreBCD-Komplexes hat eine Reduktion der csgB-Expression zur Folge (Abb. 4.13 A). Dieser Effekt kann auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Durch die Induktion des MreBCD-Komplexes kommt es zu einer Reduktion der CsgD-Proteinmenge im Vergleich zum Leerplasmid und zur uninduzierten Kontrolle (Abb. 4.13 B).

Die Studie zu Expression der Curli-Fimbrien ergab also, dass der Zellform-gebende Komplex MreBCD die Expression des Masterregulators der Curli-Fimbrien CsgD, und damit auch die Curli-Expression inhibiert.

### 4.2.4.2 Das MreBCD-System aktiviert das Rcs-Phosphorelay-System

Im *E. coli* Genom sind *csrD* und *mreBCD* an der gleichen Stelle des Genoms kodiert (Minute 73,2). Gene, die für Proteine des gleichen Stoffwechselprozesses kodieren, sind bei Bakterien häufig nahe bei einander lokalisiert. Diese Gengruppierungen sind ein markantes Merkmal bakterieller Genome [Demerec & Hartman, 1959]. Die bekanntesten funktionalen Gengruppierungen bei Bakterien sind die Pathogenitätsinseln und die Zusammenfassung der flagellaren Gene.

Bedingt durch die gleiche chromosomale Lokalisierung könnten auch CsrD und MreBCD im selben Kontext wirken. Das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD hat auf der einen Seite einen destabilisierenden Einfluss auf die sRNAs CsrB (Abb. 4.7 und Abb. 4.8; Suzuki *et al.*, 2006) und CsrC (Daten nicht gezeigt; Suzuki *et al.*, 2006) und auf der anderen Seite einen positiven Einfluss auf die Curli-Expression (Abb. 4.5) über einen negativen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System (Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Möglicherweise kann der negative Einfluss von MreBCD auf die Curli-Expression (Abb. 4.13) auch hier über einen Effekt auf das Rcs-Phosphorelay-System zu erklären sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss von MreBCD auf die Expression des Reporters des Rcs-Phosphorelay-Systems *bdm* mit Hilfe einer *bdm::lacZ*-Reportergenfusion untersucht. Des Weiteren wurde die Zelllänge von Bakterien, die den MreBCD-Komplex überexprimieren, bestimmt und der Einfluss auf die kleine RNA RprA mittels Northern Blot-Analyse untersucht.



### Abb. 4.14: Überexpression von MreBCD induziert die Expression von bdm und RprA.

(A) Sowohl der Laborwildtyp W3110 mit einer ins Genom integrierten lacZ-Reportergenfusion zu bdm, als auch ein Derivat dieses Stammes mit einer Deletionsmutation in rcsF wurden in Anwesenheit des Plasmides pMreBCD oder pCAB18 in Komplexmedium (LB) bei 28°C wachsen gelassen. Die Plasmide wurden bei OD1.0 (Pfeil) mit IPTG (1mM) induziert. Die optische Dichte (OD578nm) (offene Symbole) und die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt. Die Symbole der verschiedenen Stämme und Plasmide sind der entsprechenden Grafik zu entnehmen oN, über Nacht Kultur (24h nach Inokulation der Kultur). (B) Der Wildtypstamm W3110 wurden in Anwesenheit des Plasmides pMreBCD oder pCAB18 bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 1 (bei 578 nm) wurden die Plasmide mit 1mM IPTG induziert. Proben für die anschließende Zelllängenbestimmung wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 150 Minuten nach Induktion entnommen. 20 ul der Kultur (ab OD1 entsprechend verdünnt) wurden auf einen mit 1,5%-iger Agarose überschichteten Objektträger gegeben und mikroskopisch analysiert. Die Zelllänge wurde mittels des Programms AxioVision 4.7 (Carl Zeiss) bestimmt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig von einander durchgeführt. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt. (C) Northernblotanalyse von RprA in W3110 in Anwesenheit des Plasmides pMreBCD oder pCAB18. Die Kulturen wurden bei 28°C in LB wachsen gelassen. Bei einer optischen Dichte von 1.0 (bei 578 nm) wurden vor IPTG-Gabe (1mM) sowie 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Induktion Proben für die anschließende Northernblotanalyse entnommen. Es wurden sowohl Proben von der induzierten (mit einem Plus gekennzeichnet) als auch Proben einer uninduzierten (Kontrolle, mit einem Minus gekennzeichnet) Kultur genommen und bearbeitet. 5 µg RNA wurden auf ein 8%iges PAA/Urea-Gel aufgetragen und bei 10 mA laufen gelassen. Nach dem Blotten bei 20V für 1h wurde die positiv-geladene Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten RprA-Sonde bei 50°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszens-Reaktion, die mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte. Nach der Detektion wurde die Sonde mit heißem Stripping Puffer abgewaschen und die Membran wurde erneut mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gerichtet gegen die 5S RNA (als Ladekontrolle) bei 50°C inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter behandelt.

pMreB(CD) = pCAB18, komplettes Operon von *mreBCD* mit eigener SD, IPTG-induzierbar, AMP<sup>R</sup> pCAB18 = Kontrollplasmid, IPTG-induzierbar, AMP<sup>R</sup>

Abbildung 4.14 zeigt die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses des MreBCD-Systems auf das Phosphorelay-System RcsFCDB. Die Expression von *bdm* ist deutlich induziert, wenn das MreBCD-System induziert ist (Abb. 4.14 A, Vergleich Quadrate mit Kreise). Die Induktion der *bdm*-Expression erfolgte auch zeitnah nach Induktion des MreBCD-Systems durch Gabe des Induktors IPTG. Durch die *rcsF*-Mutation kommt es zu einer Reduktion der *bdm*-Expression (Abb. 4.14 A, Dreiecke und Abb. 4.10 D). Wenn in diesem Hintergrund (*rcsF*-) der MreBCD-Komplex durch Gabe von IPTG induziert wird, hat dies bezüglich der *bdm*-Expression keine Folgen. Die induzierte *bdm*-Expression, begründet durch die induzierte *mreBCD*-Expression, wird durch die *rcsF*-Mutation supprimiert (Abb. 4.14 A, Vergleich Dreiecke und Kreise).

Das MreBCD-System ist für die Stäbchenform von *E. coli* wichtig [Wachi *et al.*, 1989]. Eine veränderte Expression dieses System könnte also eine Veränderung der Zellform (Länge) zur Folge haben. Kruse *et al.* (2003) konnte bei einer Überexpression von MreB feststellen, dass die Zellteilung inhibiert ist. Dies führte zu verlängerten Zellen. Unter den hier getesteten Bedingungen konnten keine verlängerten Zellen festgestellt werden. Die Induktion des kompletten MreBCD-System hatte keinerlei Veränderungen der Zelllänge zur Folge (Abb. 4.14 B, Vergleich schwarze und weiße Balken).

Der negative Effekt des Rcs-Phosphorelay-System auf die Curli-Expression wirkt einmal über den Response Regulator RcsB im Komplex mit RcsA [Vianney *et al.*, 2005] und zum anderen über die kleine RNA RprA [Mika *et al.*, 2012]. RprA bindet an die 5' UTR des *csgD*-mRNA-Transkripts und destabilisiert so das Transkript. Die Expression der sRNA RprA ist von RcsB abhängig [Majdalani *et al.*, 2002]. Durch die Induktion des MreBCD-Systems kommt es zu einem Anstieg der RprA-RNA-Konzentration in der Zelle (Abb. 4.14 C).

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Daten daraufhin, dass der Zellform-gebenden Komplex MreBCD einen aktivierenden Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF ausübt. Dieser Effekt ist nicht durch eine veränderte Zellform erklärbar.

## 4.3 Die Zielgene des CsgD/RprA-Kontrollnetzwerkes

Die Mikroarray-basierten Transkriptom-Analysen von S. Busse (2009) weisen auf ein gemeinsames Regulon des Biofilmregulators CsgD und der kleinen RNA RprA hin. Die Studie zeigt, dass die, durch RprA-regulierten, Gene, die in der Stationärphase exprimiert werden, weitestgehend mit den Zielgenen, die durch CsgD kontrolliert werden, übereinstimmen. Des Weiteren konnten Mika *et al.* (2012) zeigen, dass RprA direkt an die 5' UTR der *csgD*-mRNA bindet und reprimiert so dessen Translation.

Das gemeinsame CsgD/RprA-Regulon wird also anscheinend invers durch RprA und CsgD reguliert. Die Gene, die positiv durch CsgD reguliert werden, stehen unter negativer Kontrolle von RprA. Das RprA-Regulon weist aber auch *csgD*-unabhängige Ziele, wie beispielsweise *gadE*, auf [Mika *et al.*, 2012]. Zur näheren Charakterisierung dieses gemeinsamen CsgD/RprA-Regulons wurden im Rahmen dieser Arbeit gesamtgenomische Mikroarray-Analysen durchgeführt.

### 4.3.1 Das CsgD-Regulon im *rprA*+ und *rprA*- Hintergrund

Bei den vorangegegangenen Transkriptom-Studien wurde der Wildtyp mit einer Deletion des *csgD*-ORFs verglichen [S. Busse, 2009]. Dieser *csgD*-defiziente Hintergrund weist immer noch eine intakte 5'UTR auf.

Für die Analyse des CsgD/RprA Regulons wurden als die gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zu CsgD wiederholt. Dafür wurde eine Insertionsmutation in *csgD* (*csgD2::kan*) genutzt, die zur Deletion des kompletten ORFs und der 5' UTR von *csgD* führt. Die sRNA RprA kann also unter diesen Bedingungen, nicht mehr an die *csgD*-mRNA binden und eventuelle weitere Ziele regulieren. In diesem gesamtgenomischen Mikroarray-Ansatz sollten also Gene differentiell reguliert sein, die von CsgD und / oder von RprA kontrolliert.

Das Experiment zum CsgD-Regulon wurde in einem zweiten Mikroarray-Ansatz zusätzlich im *rprA*-defizienten Hintergrund durchgeführt, um herauszufinden, ob CsgD auch unabhängig von RprA Gene reguliert.

Als Bedingung für den Mikroarray-Ansatz wurde der Eintritt in die Stationärphase  $(OD_{578nm} 4.0, LB, 28^{\circ}C)$  gewählt. Unter diesen Bedingungen akkumuliert normalerweise die *csgD*-mRNA und das CsgD-Protein (Abb. 4.19) und die kleine RNA RprA wird ebenfalls unter diesen Bedingungen exprimiert (Abb. 4.7, 4.8 und 4.9; Mika *et al.*, 2012).



### Abb. 4.15: CsgD reguliert die Genexpression in *E. coli*

Die Mikroarray-Analysen wurden zum einen mit dem Laborwildtyp W3110 (CsgD<sup>+</sup>) und mit einem Derivat mit einer csgD2::kan-Mutation (CsgD<sup>-</sup>) durchgeführt. Die differentiell regulierten Gene dieser Analyse sind durch (A) repräsentiert. Zum anderen wurde im Vergleich dazu eine weitere Mikroarray-Analyse gesamtgenomische dieser beiden Stämme im zusätzlichen RprA::scar-Hintergrund durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind durch (B) dargestellt. Die durch CsgD negativ regulierten Gene sind grün und die durch CsgD positiv regulierten Gene sind rot markiert. Die hier dargestellten Ergebnisse resultieren jeweils aus den Mittelwerten von zwei unabhängigen Experimenten (die genauen Werte sind dem Anhang Tab. A1 und A2 zu entnehmen). Es sind die Gene dargestellt, die eine mindestens dreifache differentielle Expression aufweisen.

Die erhaltenen signifikanten jeweils Ergebnisse der gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen wurden miteinander verglichen und sind in Abbildung 4.15 als so genannte Heat-Map dargestellt, wobei die Gene mit einer dreifach nur differentiellen Expression ausgewählt wurden.

Eine Zusammenfassung der gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zum Regulon von CsgD im Wildtyp-Hintergrund (A) bzw. im *rprA*-defizienten Hintergrund (B) sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Die differenziell regulierten Gene (insgesamt 41) lassen sich in drei verschiedene Gruppen unterteilen:

 (I) Gene, die eine differentielle Genexpression in CsgD<sup>+</sup>- und CsgD<sup>-</sup>- Stämmen aufweisen, die jedoch unabhängig von RprA sind,

(II) Gene, die durch CsgD reguliert sind, deren Regulation jedoch in Abwesenheit von RprA verloren geht und

(III) Gene, die ausschließlich im RprAdefizienten Hintergrund einer Regulation durch CsgD unterliegen.

Die Gene der Gruppe I sind sowohl im 1. Mikroarray-Ansatz (*rprA*<sup>+</sup> Hintergrund, erste Spalte (A) in Abb. 4.15), als auch im 2. Mikroarray-Ansatz (*rprA*-defizienter Hintergrund, zweite Spalte (B) in Abb. 4.15) differenziell reguliert. CsgD wirkt also unabhängig von RprA auf die Expression vieler Gene. Dies ist durch die Zu den Genen (insgesamt 13) der Gruppe I zählen: artQ (Permease des Arginintransportsystems), csgA (Hauptuntereinheit der Curli-Fimbrien), csgB (Nukleatorprotein der Curli-Fimbrien), csgC (Protein, das möglicherweise bei der Curli-Fimbrien-Produktion beteiligt), csgD (FixJ/LuxR/UhpA-Transkriptionsfaktor), csgF (Protein für Assemblierung/ Transport der Curli-Fimbrien), csgG (Kanal für Sekretion der Curli-Fimbrien), ftsW (Membranprotein der Zellteilung), mnmA (tRNA-spezifische 2-Thiouridylase), (Innenmembranprotein, beteiligt an Aufnahme von Gruppe tolR Α Colcine). wcal (Glykosyltransferase, Kolanssäuresynthese), yeil (mögliche Kinase), ymfE (Prophage e14; prädiziertes Innenmembranprotein). Für csgBAC konnte die CsgD-Abhängigkeit schon gezeigt werden [Brombacher et al., 2003].

Die Gene der zweiten Gruppe (II) sind nur bei Anwesenheit von RprA differenziell durch CsgD reguliert. Hier wirkt CsgD also über die kleine RNA RprA. Zu dieser Gruppe (insgesamt 19 Gene) gehören auch Gene (6), die mit dem flagellaren oder chemotaktischen System in Verbindung gebracht werden: flgM (Anti-FliA (Anti-Sigma) Faktor), fliA (flagellarer (alternativer) Sigmafaktor 28), fliC (Filament-Untereinheit Flagellin), fliS (zytoplasmatisches, Substrat-spezifisches Chaperon des flagellaren Exportsystems; Chaperon für FliC), tar (Methyl-akzeptierendes Chemotaxis-Protein IV, Aspartatrezeptor), trg (Methylakzeptierendes Chemotaxis-Protein IV, Riboserezeptor). Des Weiteren sind in dieser Gruppe Gene des Nährstoffaufnahme und -verarbeitung zu finden: gatB (Galactitol-spezifisches Enzym IIB des Phosphotransferasesystems), malK (ATP-bindende Komponente des Maltose-Transportsystems), *mdlB* (mögliche ATP-bindende Komponente eines Transportsystems), nagE (N-Acetylglucosamine-spezifisches Enzym IIABC des Phosphotransferasesystems), putP (Natrium/Prolin Symporter), sfsB (regulierender Faktor des Maltoseverarbeitungssystems), ssuA (periplasmatische Substrat-bindende Komponente des Alkanesulfonat ABC Transporters) und *ycfT* (möglicher Transporter). Außerdem gehören zur zweiten Gruppe csgE (Protein für Assemblierung/Transport der Curli-Fimbrien), mnmG (Protein beteiligt an der tRNA Modifizierung), rluC (23S rRNA Pseudouridin-Synthase), ycdF (Phantomgen zwischen wrbA und ymdF) und yceA (hypothetisches Protein). Die differentiell regulierten Gene der zweiten Gruppe verweisen auf die durch CsgD und RprA vermittelte Verbindung zwischen der motilen und der sessilen Phase des bakteriellen Lebensstils.

In die Gruppe III sind schließlich diejenigen Gene eingeordnet, die ausschließlich im rprAdefizienten Hintergrund einer Regulation durch CsgD unterliegen. Hierbei handelt es sich um Gene, die möglicherweise unter Kontrolle einer anderen kleinen RNA stehen. Dabei handelt es sich um folgende Gene: bioA (7,8-diaminopelargonische Säure Synthetase), dgoA (2-Oxo-3-Deoxygalactonat 6-Phosphat Aldolase und Galactonatdehydratase), prpB (2-Methylisocitrat-Lyase), prpC (Methylcitratsynthase), prpE (mögliche Propionyl-CoA-Synthetase), sthA (Pyridinnukleotid-Transhydrogenase), yaaX (hypothetisches Protein), ybjK (möglicher DEOR-Transkriptionsfaktor), vihV (mögliche Kinase). Die Gene der ersten (CsgD reguliert, unabhängig von RprA; I in Abb. 4.15) und der dritten (CsgD reguliert, nur in Abwesenheit von RprA; III in Abb. 4.15) Gruppe werden alle positiv durch CsgD reguliert. Die genauen Werte der Regulation sind der Tabelle A1 und A2 im Anhang zu entnehmen.

Die Ergebnisse dieser gesamtgenomischen Studie weisen daraufhin, dass der Biofilmregulator CsgD und die kleine RNA RprA sich gegenseitig beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass CsgD, RprA-abhängig und RprA-unabhängig, Zielgene reguliert.

### 4.3.2 Regulation durch csgD-mRNA sowie durch CsgD Protein

Um die Funktion von CsgD als Protein, unabhängig von RprA, zu definieren, wurde ein weiterer gesamtgenomische Mikroarray-Ansatz in einem *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund durchgeführt. Für diese Analyse wurde nun das CsgD-Protein ektopisch von einem induzierbaren Niederkopien-Plasmid (pSD1: pRH800 CsgD-ORF) exprimiert und mit dem Leerplasmid (pRH800) verglichen (Abb. 4.16, Spalte B). Die Probennahme erfolgte in diesem Fall bei einer OD<sub>578nm</sub> 3.0 und nicht wie in den vorangegangenen Experimenten bei OD<sub>578nm</sub> 4.0. Die Änderung ergab sich aus den Ergebnissen der Diplomarbeit von S. Donath (2010). S. Donath konnte zeigen, dass, sobald das Protein CsgD vom Plasmid ektopisch exprimiert (ohne Induktion) wird, dann erreicht die *csgB*-Expression schon bei OD<sub>578nm</sub> 3.0 ihr Maximum.

Eine Zusammenfassung der gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zu CsgD im Wildtyp-Hintergrund (A) bzw. zu ektopisch exprimiertem CsgD-Protein im *rprA-* und *csgD*defizienten Hintergrund (B) sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

Die differenziell regulierten Gene (insgesamt 43) lassen sich in zwei verschiedene Gruppen unterteilen: (I) Gene, die eine differentielle Genexpression sowohl in CsgD<sup>-</sup>-, als auch in CsgD<sup>++</sup>-Stämmen aufweisen und (II) Gene, die nur in CsgD<sup>-</sup>-Stämmen reguliert sind.



Abb. 4.16: CsgD reguliert zum einen als Protein und zum anderen als mRNA die Genexpression in *E. coli* 

Die Mikroarray-Analysen wurden zum einen mit dem Laborwildtyp W3110 (CsgD<sup>+</sup>) und mit einem Derivat mit einer csgD2::kan-Mutation (CsgD) durchgeführt. Die differentiell regulierten Gene dieser Analyse sind durch (A) repräsentiert. Zum anderen wurde, im Vergleich dazu, eine weitere gesamtgenomische Mikroarray-Analyse mit ektopisch exprimiertem CsgD von einen Niederkopien-Vektor csgDim und rprAdefizienten Hintergrund durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Niederkopien-Vektor ohne CsgD eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind durch (B) dargestellt. Die durch CsgD negativ regulierten Gene sind grün und die durch CsgD positiv regulierten Gene sind rot markiert. Die hier dargestellten Ergebnisse resultieren jeweils aus den Mittelwerten von zwei unabhängigen Experimenten (die genauen Werte sind dem Anhang Tab. A1 und A3 zu entnehmen). Es sind die Gene dargestellt, die eine mindestens dreifache differentielle Expression aufweisen.

Die Gene der Gruppe I sind sowohl im 1. Mikroarray-Ansatz ( $csgD^-$  Hintergrund, erste Spalte (A) in Abb. 4.16), als auch im 2. Mikroarray-Ansatz ( $CsgD^{++}$  Hintergrund, zweite Spalte (B) in Abb. 4.16) differenziell reguliert. CsgD wirkt also als Protein auf die Expression vieler Gene.

Zu den Genen (insgesamt 21) der Gruppe I zählen: *b1030* (intergene Region zwischen ycdUund serX). bioA (7.8-diaminopelargonische Säure Synthetase), csgA (Curli-Fimbrien Untereinheit), csgB (Nukleatorprotein der Curli-Fimbrien), csgC (Protein, das möglicherweise bei der Curli-Fimbrien-Produktion beteiligt ist), csgD (Transkriptionsfaktor der Curli-Fimbrien), fadJ (Komponente Fettsäure-Oxidationsdes anaeroben (tRNA-spezifische komplexes), mnmA 2-Thiouridylase), purM (Phosphoribosylaminoimidazol-Synthetase), ssuA (periplasmatische Substrat-bindende Komponente des Alkane-sulfonat ABC Transporters), tolR (Innenmembranprotein, beteiligt an Aufnahme von Colcinen), wcaI (Glykosyltransferase, Kolansäuresynthese), yaiC (adrA, Diguanylatzyklase), *ycdF* (hypothetisches Protein), yceA (hypothetisches Protein), *ycfQ* (prädizierter Transkriptionsfaktor), *ycfT* (hypothetisches Protein), *yciG* (hypothetisches Protein), yeil (mögliche Kinase), prädiziertes *ymfE* (Prophage e14; Innenmembranprotein) und ymfT (Prophage e14; prädizierter Transkriptionsfaktor). Alle Gene dieser Gruppe werden positiv durch das CsgD-Protein reguliert.

Neben den vorher ermittelten CsgD-regulierten Genen (Vergleich Abb. 4.15 und 4.16) traten unter den hier verwendeten Bedingungen weitere Gene auf. Das Auftreten neuer CsgD-regulierter Gene kann möglicherweise durch die zeitliche Verschiebung der Probenahme erklärt werden. Für das Gen *yaiC*, beispielsweise, konnte schon gezeigt werden, dass es CsgD-abhängig ist [Weber *et al.*, 2006].

Die Gene der zweiten Gruppe (II) treten nur als differenziell reguliert in den Transkriptom-Analysen auf, wenn das intakte csgD-Gen, inklusive 5' UTR vorliegt (Abb. 4.16 Vergleich Spalte A und B). Hier wirkt CsgD also nicht als Protein, sondern hier scheint csgD als mRNA wichtig zu sein. Zu dieser Gruppe (insgesamt 22 Gene) gehören artQ (Permease des Arginintransportsystems), csgE (Protein für Assemblierung/Transport der Curli-Fimbrien), csgF (Protein für Assemblierung/Transport der Curli-Fimbrien) csgG (Kanal für Sekretion der Curli-Fimbrien), *flgM* [Anti-FliA (Anti-Sigma) Faktor], *fliA* [flagellarer (alternativer) Sigmafaktor 28], fliC (Filament-Untereinheit Flagellin), fliS (zytoplasmatisches, Substratspezifisches Chaperon des flagellaren Exportsystems), ftsW (Membranprotein der Zellteilung), gatB (Galactitol-spezifisches Enzym IIB des Phosphotransferasesystems), gidA (Glucose-inhibierte Teilung), malK (ATP-bindende Komponente des Maltose-Transportsystems), *mdlB* (mögliche ATP-bindende Komponente eines Transportsystems), nagE (N-Acetyl-glucosamine-spezifisches Enzym IIABC des Phosphotransferasesystems), yihV (mögliche Kinase), nlp (regulatorischer Faktor des Maltose-Metabolismus), putP (Natrium/Prolin Symporter), rluC (23S rRNA Pseudouridin-Synthase), tar (Methylakzeptierendes Chemotaxis-Protein IV, Aspartatrezeptor), trg (Methyl-akzeptierendes Chemotaxis-Protein IV, Riboserezeptor), ybjK (möglicher DEOR-Transkriptionsfaktor) und yjdA (prädiziertes Vimentin).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Mikroarray-Analyse daraufhin, dass CsgD zum einen als Protein (Abb. 4.16, Gruppe I und Tab. A3 im Anhang) und zum anderen als mRNA-Transkript (Abb. 4.16 Gruppe II) eine wichtige Rolle bei Regulation seiner Zielgene spielt. Die Charakterisierung des CsgD-Regulons durch gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zeigt, dass CsgD maßgeblich an der Umorganisierung der Zelle bei 28°C in der Stationärphase und während der Biofilmbildung beteiligt ist. Durch die Vielzahl der durch CsgD regulierten Gene mit ganz unterschiedlichen Funktionen kann CsgD durchaus eine globale Rolle, sowohl als Protein, als auch als mRNA, in *E. coli* zugesprochen werden

(Abb. 4.15 und 4.16). Die drei Studien zu CsgD zeigen außerdem, dass CsgD und RprA invers ein gemeinsames Regulon regulieren.

# 4.3.3 RprA reguliert die Genexpression, wenn keine *csgD*-Expression stattfindet

Die kleine RNA RprA fördert zum einen die *rpoS*-Translation [Majdalani *et al.*, 2001] und inhibiert zum anderen die *csgD*-Translation [Mika *et al.*, 2012] durch Bindung an die jeweiligen mRNA-Transkripte. Möglicherweise reguliert diese sRNA noch weitere Gene.

Um weitere Ziele dieser kleinen RNA zu finden, wurden auch hier gesamtgenomische Mikroarray-Analysen durchgeführt. Diese Studien wurden bei 28°C in Komplexmedium (LB) zu verschiedenen Wachstumsphasen, in denen RprA in der Zelle vorhanden ist (Abb. 4.7, 4.8 und 4.9) durchgeführt (Abb. 4.16). Als Orientierungspunkt für diese Analyse wurden die Ergebnisse der CsgD-Mikroarray-Analysen, die deutlich auf ein gemeinsames Regulon hinweisen, genutzt (Abb. 4.15; Gruppe II). So wurden Proben vom Wildtyp und einem Derivat mit einer *rprA*-Mutation zum einen bevor und nachdem sich *csgD*-mRNA nachweisen lässt (OD<sub>578nm</sub> 2.0 bzw. fünf Stunden nach OD<sub>578nm</sub> 4.0) und zum anderen wenn die *csgD*-mRNA ihr Maximum erreicht (OD<sub>578nm</sub> 4.0), genommen [Mika *et al.*, 2012] (Abb. 4.17).



Abb. 4.17: RprA reguliert die Genexpression in E. coli, wenn csgD nicht exprimiert ist

Die Mikroarray-Analysen wurden zum einen mit dem Laborwildtyp W3110 ( $RprA^+$ ) und mit einem Derivat mit einer rprA::kan-Mutation (RprA-) durchgeführt. Die Probennahme erfolgte vor der csgD-Expression (OD2.0, I), bei maximaler csgD-Expression (OD4.0, II) und nach der csgD-Expression (OD4+5h, III) [Mika *et al.*, 2012]. Die hier dargestellten Ergebnisse resultieren jeweils aus den Mittelwerten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten (die genauen Werte sind dem Anhang Tab. A4 und A5 zu entnehmen). Die angegebenen Gene weisen mindestens eine dreifache differentielle Expression. Durch positiv durch RprA regulierte Gene sind in rot und negativ durch RprA regulierte Gene sind in grün dargestellt. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen zu RprA ergaben, dass RprA weitere Ziele mindestens dreifach differenziell reguliert (Abb. 4.17, Tab. A4 und A5 im Anhang). Die Untersuchung bei OD<sub>578nm</sub> 2.0 ergab, dass RprA einen positiven Einfluss auf das Operon *paaABCD* (beteiligt am aeroben Abbau von Phenylacetat) hat. Die Analyse der späten Ziele (fünf Stunden nach OD<sub>578nm</sub> 4.0) ergab, dass RprA auch zu diesem Zeitpunkt Gene differentiell reguliert. Zum einen werden hier die Gene *csgAB* und *tolR* negativ durch RprA reguliert (s. Anhang Tab. A5). Diese Gene sind bei den Analysen zum CsgD-Regulon als positiv durch CsgD reguliert, aufgetreten (Abb. 4.15, Gruppe I). RprA reguliert aber in der späten Stationärphase noch weitere Gene (*fryB, kbaZ (agaZ), Lar, pdxY, ycbS, ydiO, yfeA, yfjM, yidZ*). Diese Gene werden alle positiv durch RprA reguliert.

Bei OD<sub>578nm</sub> 4.0 konnten keine regulierten Gene nachgewiesen werden (Abb. 4.17). Eine zusätzliche gesamtgenomische Mikroarray-Analyse zum RprA-Regulon in einem csgDdefizienten Hintergrund bei OD<sub>578nm</sub> 4.0 ergab, dass in Abwesenheit von CsgD RprA weitere Ziele mindestens zweifach differenziell regulieren kann (s. Tab. A6 im Anhang). Zu den durch RprA differentiell regulierten Genen, wenn CsgD fehlt, gehören: flgC (Teil des flagellaren Basalkörpers), flgD (Initiator der Haken-Assemblierung), gatD (Galactitol-1phosphat-Dehydrogenase), *prpC* (Methylcitratsynthase), *tdcC* (L-serin Permease), yadI (mögliches PTS-Enzym II B) und ybgO (Fimbrien-Protein). Alle genannten Gene werden unter diesen Bedingungen positiv durch RprA beeinflusst. Das Gen prpC trat schon durch CsgD reguliert in der Gruppe III (Abb. 4.15, CsgD-abhängig, wenn RprA fehlt) auf. Das Gen prpC wird sowohl von RprA (wenn CsgD abwesend ist, Anhang Tab. A6) als auch von CsgD (wenn RprA abwesend ist, Abb. 4.15, Anhang Tab. A2) positiv beeinflusst.

Die hier erhaltenen Ergebnisse weisen daraufhin, dass RprA neben den bekannten Zielen (RpoS und CsgD) möglicherweise weitere Ziele, wie die Gene des Phenylacetat-Metabolismus (*paaABCD*) beeinflusst. Die Daten dieser gesamtgenomische Mikroarray-Analysen müssen noch verifiziert werden.

### 4.3.4 Die induzierten Gene der späten Stationärphase

Die bisher erhaltenen Daten resultieren entweder aus Untersuchungen mit Mutationen (in *rprA* oder *csgD*) (Abb. 4.15 und 4.17, Anhang Tab. A1, A2, A4, A5 und A6) oder aus Studien mit ektopisch exprimiertem CsgD (Abb. 4.16, Anhang Tab. A3). Diese Analysen spiegeln demnach nicht den physiologischen Zustand der Zelle unter den getesteten Bedingungen wider, sondern stellen eine besondere Situation dar.

Der Biofilmregulator CsgD wird beim Übergang in die Stationärphase bei Temperaturen unter 30°C RpoS-abhängig exprimiert. Die Untersuchungen von Mika *et al.* (2012) zeigen, dass das *csgD*-Transkript beim Übergang in die stationäre Phase die maximale RNA-Konzentration aufweist und danach wieder absinkt. In der späten Stationärphase (fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0) kann kein *csgD*-Transkript mehr nachwiesen werden (Abb. 4.18 A).



# Abb. 4.18: Darstellung der RNA-Konzentration des *csgD*-Transkripts und des zellulären Protein-Gehalts von CsgD in der Stationärphase.

(A) Der Wildtypstamm W3110 wurde bei 28°C in Komplexmedium (LB) inkubiert. Bei definierten und oben angegebenen Zeit nach einer optischen Dichte (bei 578 nm) 4.0 wurden Proben für die anschließende Northernblot-Analyse entnommen. Für die *csgD*-mRNA können mehrere Transkripte nachgewiesen werden [Mika *et al.*, 2012]. 20  $\mu$  g RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotten für 1 h wurde die positiv-geladene Nylonmembran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gegen *csgD* bei 50°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszens Reaktion auf einem Röntgenfilm. (B) Immunoblot-Analyse von CsgD in W3110 und in einem Derivat mit einer *rprA*-Mutation. Die Kulturen wurden bei 28°C in LB wachsen gelassen. Bei einer OD 4.0 (bei 578nm) und drei bzw. fünf Stunden später wurden Proben für die Immunoblot-Analyse von CsgD sowohl vom Wildtyp (WT) als auch von dem Derivat mit der *rprA*-Mutation (RprA-) genommen. 5 $\mu$  g Protein wurden auf ein 12% iges Polyacrylamidgel aufgetragen. CsgD wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen CsgD detektiert.

Ab ungefähr einer optischen Dichte von 3 (bei 578nm) kann bei 28°C in Komplexmedium (LB) das CsgD-Protein nachgewiesen werden. Der Protein-Gehalt erreicht sein Maximum in der Stationärphase ( $OD_{578nm}$  4.0). Später in dieser Phase (fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0) kann das Protein, wenn auch stark reduziert, noch nachgewiesen werden (Abb. 4.18 B). Nach 24 Stunden Wachstum (über Nacht-Kultur) kann dann weder das Protein noch die mRNA von CsgD nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um die physiologische Rolle vom Biofilmregulator CsgD und der kleinen RNA RprA in der Zelle besser untersuchen zu können, wurden für die folgenden gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen Proben, genommen bei  $OD_{578nm}$  4.0 und Proben, die fünf Stunden später genommen wurden, miteinander verglichen. So könnten eventuell bisher unentdeckte Ziele des RprA/CsgD-Kontrollmoduls aufgedeckt werden.

#### Tabelle 4.1: Zusammenstellung der induzierten Gene beim Vergleich von OD4 + 5h und OD4.

Die Bedingungen der Probennahme waren 28°C in Komplexmedium. Es wurde hier mit dem Laborwildtypstamm W3110 gearbeitet. Die angebenen Ratios sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine zweifache Regulation aufweisen. Die dazugehörigen Scatterplots befinden sich im Anhang.

Name	b-Nummer	Ratio OD4 + 5h / OD4	Beschreibung		
induziert bei OD4+5h					
bssR	b0836	10,82	regulator of biofilm formation		
bssS	b1060	8,02	regulator of biofilm formation		
fadE	b0221	4,10	acyl-CoA dehydrogenase		
mcbA	b0806	8,67	protein involved in colanic acid production		
ychH	b1205	3,25	stress-induced protein		

Diese Analyse ergab, dass beim Vergleich der frühen ( $OD_{578nm}$  4.0) und der späten (fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0) Stationärphase insgesamt 29 Gene als differenziell reguliert auftreten. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen, zum einen in Gene, die im Vergleich zu  $OD_{578nm}$  4.0 fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0 induziert (Tab. 4.1) und zum anderen in Gene, die im Vergleich zu  $OD_{578nm}$  4.0 fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0 induziert (Tab. 4.1) und zum anderen in Gene, die im Vergleich zu  $OD_{578nm}$  4.0 fünf Stunden nach  $OD_{578nm}$  4.0 inhibiert sind (Tab. 4.2).

Unter den fünf induzierten Genen befinden sich neben den drei Biofilm-assoziierten Genen *bssRS* und *mcbA*, noch *fadE* und *ychH* (Tab. 4.1).

Für zwanzig der 24 in der späten Stationärphase herunterregulierten Gene haben Mika *et al.* (2012), ebenfalls durch gesamtgenomische Mikroarray-Analysen, gezeigt, dass sie durch RprA und / oder das Rcs-Phosphorelay-System differenziell reguliert werden (grau unterlegt in Tab. 4.2). Von den 24 herunterregulierten Genen konnte für zwölf, innerhalb dieser Arbeit, gezeigt werden, dass sie ebenfalls von CsgD reguliert werden (Vergleich Tab. 4.2 mit Abb. 4.15). Diese zwölf Gene sind auch bei Mika *et al.* (2012) als durch RprA und / oder RcsB abhängig reguliert zu finden. Alle CsgD-abhängigen Gene (außer *ybjK*) gehören zur ersten Gruppe (Abb. 4.15).

### Tabelle 4.2: Zusammenstellung der inhibierten Gene beim Vergleich von OD4 + 5h und OD4

Die Bedingungen der Probennahme waren 28°C in Komplexmedium. Es wurde hier mit dem Laborwildtypstamm W3110 gearbeitet. Die angebenen Ratios sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine zweifache Regulation aufweisen. Grau unterlegt sind Gene, die durch S. Busse schon als durch RcsB/RprA-differentiell regulierte Gene gefunden wurden [Mika *et al.*, 2012]. Die dazugehörigen Scatterplots befinden sich im Anhang.

Name	b-Nummer	Ratio OD4 + 5h / OD4	Beschreibung		
inhibiert	inhibiert bei OD4+5h				
ariR	b1166	0,36	regulator of acid resistance, influenced by indole		
artQ	b0862	0,19	arginine 3rd transport system permease protein		
csgA	b1042	0,04	curlin major subunit CsgA		
csgB	b1041	0,04	minor curlin subunit precursor, similar ro CsgA		
csgD	b1040	0,22	putative 2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon		
csgE	b1039	0,14	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon		
csgF	b1038	0,20	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon		
csgG	b1037	0,16	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon		
gadB	b1493	0,31	glutamate decarboxylase isozyme		
glmM	b3176	0,34	phosphoglucosamine mutase		
hdeA	b3510	0,34	HdeA dimer, inactive form of acid-resistance protein		
hdeB	b3509	0,35	acid stress chaperone		
mdlB	b0449	0,33	putative ATP-binding component of a transport system		
mnmA	b1133	0,06	tRNA-specific 2-thiouridylase		
nagE	b0679	0,25	PTS system, N-acetylglucosamine-specific enzyme IIABC		
rluC	b1086	0,29	23S rRNA pseudouridine synthase		
sthA	b3962	0,32	pyridine nucleotide transhydrogenase		
tdcC	b3116	0,27	TdcC threonine/serine STP transporter		
tolR	b0738	0,04	inner membrane protein, involved in the tonB-independent uptake of group A colicins		
wcaI	b2050	0,13	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase		
ybjK	b0846	0,22	putative DEOR-type transcriptional regulator		
yliL	b0816	0,38	phantom gene, maybe small protein mntS		
ymfE	b1138	0,10	e14 prophage; predicted inner membrane protein		
ymgA	b1165	0,39	protein involved in biofilm formation		

Durch Mikroarray-basierte Transkriptom-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der in der späten Stationärphase differentiell regulierten Gene auch durch die kleine RNA RprA reguliert werden. Die Wahl dieses speziellen Vergleichs (frühe vs. späte Stationärphase) ermöglicht es Ziele der sRNA RprA unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen.

## 4.3.5 Charakterisierung des YdaM- und YegE-Regulons zur Klärung ihres Einflusses auf die CsgD-Expression

Die Expression von CsgD wird durch zwei c-di-GMP-Kontrollmodule aktiviert [Pesavento *et al.*, 2008]. Das erste besteht aus der DGC YegE und der antagonistisch wirkenden PDE YhjH. Dieses System ist an der c-di-GMP-spezifischen Reprimierung der flagellaren Aktivität durch YcgR und an der c-di-GMP-abhängigen Aktivierung von CsgD unabhängig von YcgR beteiligt [Boehm *et al.*, 2010; Pesavento *et al.*, 2008]. Pesavento *et al.* (2008) konnten zeigen, dass das c-di-GMP dieses Systems frei diffundierbar ist. Das zweite c-di-GMP-Kontrollmodul besteht aus der DGC YdaM und der PDE YciR. Mutationen in *ydaM* und *yciR* führen zu starken Veränderungen in der *csgD*-Expression, haben aber keinen Einfluss auf die Motilität. Da YdaM und YciR nur spezifisch auf die *csgD*-Transkription wirken, kann vermutet werden, dass das durch dieses System kontrollierte c-di-GMP lokal wirkt [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006].

### 4.3.5.1 Die DGC YdaM wirkt spezifisch auf CsgD

Gesamtgenomische Mikroarray-Analysen mit dem Wildtyp und einem *ydaM*-defizienten Derivat wurden durchgeführt, um zu klären, ob das Kontrollmodul YdaM/YciR-Kontrollmodul weitere Gene, neben *csgD*, reguliert. Die Bedingungen für diese Mikroarray-Analysen waren Komplexmedium,  $28^{\circ}$ C und OD<sub>578nm</sub> 4.0. Es handelt sich dabei um Bedingungen bei denen CsgD und YdaM exprimiert werden.

### Tabelle 4.3: Zusammenstellung aller durch YdaM regulierten Gene.

Die Bedingungen der Probennahme waren 28°C in Komplexmedium bei OD<sub>578nm</sub> 4.0 und es wurde hier der Laborwildtypstamm W3110 mit einem Derivat mit einer *ydaM*-Mutation verglichen. Die angegebenen Ratios sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine zweifache Regulation aufweisen. Grau unterlegt sind Gene, die in dieser Arbeit schon als durch CsgD-differentiell regulierte Gene gefunden wurden (Vgl. Abb. 4.16). Die dazugehörigen Scatterplots befinden sich im Anhang.

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
artQ	b0862	6,15	arginine 3rd transport system permease protein
bioA	b0774	5,47	7,8-diaminopelargonic acid synthase
csgA	b1042	53,64	curlin major subunit CsgA
csgB	b1041	41,13	minor curlin subunit precursor, similar ro CsgA
csgC	b1043	6,27	putative curli production protein
csgD	b1040	9,65	putative 2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon
csgE	b1039	6,36	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
csgF	b1038	12,70	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
csgG	b1037	10,14	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
mnmA	b1133	9,35	tRNA-specific 2-thiouridylase
prpB	b0331	2,73	2-methylisocitrate lyase
prpC	b0333	5,14	methylcitrate synthase
prpD	b0334	3,51	2-methylcitrate dehydratase
putP	b1015	5,06	major sodium/proline symporter
tolR	b0738	19,40	inner membrane protein, involved in the tonB-independent uptake of group A colicins
wcaI	b2050	6,90	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase
yadI	b0129	3,93	predicted N-acetylgalactosamine-transporting PEP-dependent phosphotransferase system
ybjK	b0846	7,60	predicted DNA-binding transcriptional regulator
ycfT	b1115	6,57	putative transport protein
yfmP	b1152	3,41	e14 prophage; conserved protein
vmfE	b1138	29.83	e14 prophage: predicted inner membrane protein

In Tabelle 4.3 sind die Gene dargestellt, die durch YdaM differentiell reguliert werden. Von den insgesamt 21, ausschließlich positiv, durch YdaM regulierten Genen, konnte für 18 schon eine CsgD-Abhängigkeit (durch Mikroarray-Analysen, Abb. 4.15) nachgewiesen werden. Einige der hier differenziell regulierten Gene treten in vorherigen Studien (Abb. 4.15) nur als CsgD reguliert auf, wenn RprA fehlt: *bioA*, *prpBC* und *ybjK*. Mika *et al.* (2012) konnten zeigen, dass RprA einen negativen Einfluss auf die *ydaM* mRNA-Stabilität hat. Dies erklärt

möglicherweise das Auftreten dieser Gene unter den hier getesteten Bedingungen.

Das YdaM/YciR-Kontrollmodul wirkt sehr spezifisch auf die *csgD*-Transkription, denn eine weitere gesamtgenomische Mikroarray-Analyse in einem *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund zeigt, dass keine Gene durch YdaM differenziell reguliert werden (Scatterplots siehe Anhang).

Diese gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen ergeben also, dass das YdaM/YciR-Kontrollmodul lokal und spezifisch auf die *csgD*-Transkription wirkt.

### 4.3.5.2 Die DGC YegE als Schnittstelle zwischen Motilität und Biofilmbildung

Um die Ziele des Kontrollmoduls YegE/YhjH in Bezug auf die Biofilmbildung zu klären, wurden gesamtgenomische Mikroarray-Analysen durchgeführt. Die Bedingungen für diese Mikroarray-Analysen waren Komplexmedium, 28°C und OD<sub>578nm</sub> 4.0. Es handelt sich dabei um Bedingungen bei denen CsgD und YegE exprimiert sind und die Motilität keine Rolle mehr spielt.

### Tabelle 4.4: Zusammenstellung aller durch YegE regulierten Gene in *csgD*-defizienten Hintergrund.

Die Bedingungen der Probennahme waren 28°C in Komplexmedium bei  $OD_{578nm}$  4.0. Verglichen wurden der Laborwildtypstamm W3110 im *csgD*-defizienten Hintergrund und eine *csgD*<sup>-</sup>/*yegE*<sup>-</sup>-Doppelmutante. Die angebenen Ratios sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine zweifache Regulation aufweisen. Grau unterlegt sind Gene, die in dieser Arbeit schon als durch CsgD-differentiell regulierte Gene gefunden wurden (Vgl. Abb. 4.15). Die dazugehörigen Scatterplots befinden sich im Anhang.

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
negativ durch YegE (CsgD unabhängig)			
prpC	b0333	0,22	putative citrate synthase; propionate metabolism; prpC
prpD	b0334	0,34	orf, hypothetical protein; prpD
positiv durch YegE (CsgD unabhängig)			
yeaI	b1785	5,96	orf, hypothetical protein; yeaI

In Tabelle 4.4 sind die Gene (insgesamt 3) dargestellt, die durch YegE differentiell reguliert werden. Die zwei negativ durch YegE regulierten Gene können durch die vorangegangenen Mikroarray-Analysen dem CsgD-Regulon zugeschrieben werden (Abb. 4.15, Gruppe III). Das durch YegE positiv regulierte Gen *yeaI* kodiert für ein degeneriertes GGDEF-Protein.

Der Einfluss von YegE wurde auch hier im *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund untersucht (Tab. 4.5). Hier treten Gene auf, die Teil des flagellaren Systems und des Stoffwechsels sind. Es handelt sich hier z. T. um Gene, die in dieser Arbeit als CsgD-reguliert gefunden worden sind (wenn RprA vorhanden ist, *fliC* und *malK*) (Vergleich Tab. 4.4 und Abb. 4.15).

# Tabelle 4.5: Zusammenstellung aller durch YegE regulierten Gene in *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund.

Die Bedingungen der Probennahme waren 28°C in Komplexmedium bei  $OD_{578nm}$  4.0. Verglichen wurden der Laborwildtypstamm W3110 im *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund und eine *csgD*<sup>-</sup>/*rprA*<sup>-</sup>/*yegE*<sup>-</sup>- Trippelmutante. Die angebenen Ratios sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine dreifache Regulation aufweisen. Die dazugehörigen Scatterplots befinden sich im Anhang.

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
negativ reguliert durch YegE (RprA und CsgD unabhängig)			
bssR	b0836	0,29	regulator of biofilm formation
iscR	b2531	0,28	IscR DNA-binding transcriptional dual regulator
positiv reguliert durch YegE (RprA und CsgD unabhängig)			
flgC	b1074	5,92	flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod; flgC
fliA	b1922	3,30	flagellar biosynthesis; alternative sigma factor 28; regulation of flagellar operons; fliA
fliM	b1945	5,34	flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing, enabling rotation and determining its direction; fliM
gatD	b2091	5,55	galactitol-1-phosphate dehydrogenase; gatD
malE	b4034	4,68	periplasmic maltose-binding protein; substrate recognition for transport and chemotaxis; malE
malK	b4035	4,56	ATP-binding component of transport system for maltose; malK
ompT	b0565	3,09	outer membrane protein 3b (a), protease VII; ompT
yegE	b2067	3,98	predicted diguanylate cyclase

Unter den getesteten Bedingungen zeigt sich, dass das YegE/YhjH-Kontrollmodul global in der Zelle wirkt. Es beeinflusst sowohl Gene des RprA/CsgD-Kontrollmoduls als auch Gene der flagellaren Kaskade.

Die Transkriptom-Analysen dieser Arbeit legen dar, dass durch gesamtgenomische Mikroarray-Analysen komplexe Regulons, wie das RprA/CsgD-Regulon, aufgeklärt werden können. Diese Methode ermöglicht schnell und gezielt unter verschiedenen Bedingungen eine

Analyse durchzuführen. Für das Regulon YdaM/YciR konnte gezeigt werden, dass es sehr spezifisch an der Regulation des Masterregulators der Curli-Fimbrien, CsgD, beteiligt ist. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung dieser Arbeit konnte die Komplexität des RprA/CsgDund des YegE/YhjH-Regulons nicht vollständig aufgeklärt werden. Die hier durchgeführten Mikroarray-Analysen bieten die Grundlagen für weitere Untersuchungen.

## 5. Diskussion

## 5.1 Die Expression und die Funktion aller 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in *Escherichia coli*

Die Mehrzahl der Bakterien ist sessil in multizellulären Verbänden organisiert, die diverse ökologische Nischen und Wirte besiedeln. Diese Biofilme bestehen aus bakteriellen Populationen, die an sich selbst und/oder an einer Oberfläche adhäriert sind und bietet einen erhöhten Schutz vor Veränderungen der Umgebung, wie Nährstoffmangel, pH-Wert-Veränderungen, Sauerstoffradikalen, Bioziden und antimikrobiellen Wirkstoffen [Costerton *et al.*, 1995].

Die Biofilmentwicklung gliedert sich in verschiedene Stadien – Initiation, Reifung, Erhaltung und Auflösung, die alle einer komplexen Regulation unterliegen [Prüß *et al.*, 2006]. Ein wichtiger Schritt bei der Biofilmentwicklung ist der Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Anheftung. Dieser Übergang ist durch den Verlust der Motilität und durch die Ausbildung adhäsiver Komponenten, wie Curli-Fimbrien gekennzeichnet. Für den sekundären Botenstoff c-di-GMP konnte gezeigt werden, dass eine hohe zelluläre Konzentration die Produktion der Curli-Fimbrien, und damit die Biofilmentwicklung, fördert und die Motilität hemmt [Pesavento *et al.*, 2008].

Der Umsatz des sekundären Botenstoffs c-di-GMP wird durch Diguanylat-Zyklasen (DGC) und durch spezifische Phosphodiesterase (PDE) realisiert. DGCs sind durch eine intakte GGDEF-Domäne charakterisiert und PDEs besitzen eine prägende EAL- oder HD-GYP-Domäne (die HD-GYP-Domäne ist in *E. coli* nicht vertreten). Seshasayee *et al.* (2010) konnten kürzlich durch *in silico*-Studien zeigen, dass die Mehrheit der Bakterien (85%) mit Genomen über zwei Megabasen eine stark variierende Anzahl von c-di-GMP-metabolisierenden Proteinen besitzt. So konnte beispielsweise in *Vibrio vulnificus* 50 dieser Proteine und in *Proteus mirabilis* nur ein solches Protein nachgewiesen werden [Römling, 2011]. Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* K-12 besitzt 29 dieser GGDEF/EAL-Domänen-Proteine. Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der regulatorischen Funktionen aller GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in einem Organismus.
# 5.1.1 Die Expressionsstudie aller 29 GGDEF/EAL-Gene in *Escherichia coli* gibt Aufschluss über ihre mögliche zelluläre Funktion

Biofilme sind auf nahezu jeder Oberfläche, auch bei industriellen und medizinischen Prozessen, zu finden und sie verursachen einen signifikanten Teil der mikrobiellen Infektionen beim Menschen. Mit dem Ziel, den einzelnen GGDEF/EAL-Domänen-Proteinen eine Rolle in diesem wichtigen System zu zuschreiben, wurde die Expression aller vorkommenden GGDEF/EAL-Gene eines Bakteriums miteinander verglichen (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mehrheit dieser Gene in E. coli (22 von 29) bei Wachstum in flüssigem Komplexmedium (LB) exprimiert wird. Die Expressionsstärke und die regulatorischen Muster variierten dabei sehr stark. Die Untersuchungen hier demonstrieren, dass (1) verschiedene GGDEF/EAL-Gene zu verschiedenen Phasen des Wachstums exprimiert werden, dass (2) die Mehrheit der exprimierten GGDEF/EAL-Gene unter der Kontrolle des generellen Stress- und Stationärphasen-Sigmafaktors RpoS stehen (15 der exprimierten 22), dass (3) ein Teil der Gene eine stärkere oder ausschließliche Expression bei der niedrigeren Temperatur (28°C) zeigt und dass (4) eine individuelle Gruppe der GGDEF/EAL-Gene eine höhere Expression bei Wachstum auf Festmedium im Vergleich zu Wachstum in Flüssigkultur zeigt (Abb. 4.1, 4.2, 4.3 und 4.4).

Die Untersuchung der GGDEF/EAL-Gene ergab eine hohe Variation in der Ausprägung der Expressionsstärke. Es sind sowohl Gene, die keine Expression (z. B. *yliE*) zeigen, als auch Gene mit einer starken Expression (z. B. *yeaJ*) vertreten. Zwei Gene, die vor allem in der exponentiellen Phase des Wachstums exprimiert werden (*yeaJ* und *yhjH*), sollen hier näher betrachtet werden. Das Gen *yeaJ* kodiert für ein GGDEF-Domänen-Protein mit einem aktiven A- und I-Zentrum. Möglicherweise handelt es sich hier also um eine aktive DGC, die besonders bei 37°C exprimiert ist (Abb. 4.1). Das Gen *yhjH* steht unter der Kontrolle des flagellaren Sigmafaktors FliA und kodiert für ein EAL-Domänen-Protein mit PDE-Aktivität [Frye *et al.*, 2006, Pesavento *et al.*, 2008], welches bei beiden untersuchten Temperaturen stark exprimiert ist (Abb. 4.3). Pesavento *et al.* (2008) konnten zeigen, dass diese beiden Proteine (YeaJ und YhjH) antagonistisch die Motilität in post-exponentiell wachsenden Zellen bei einer Temperatur von 37°C regulieren. Bei der niedrigeren Temperatur (28°C) wirkt YegE (und zu einem marginalen Teil auch YedQ) an der Stelle von YeaJ antagonistisch zu YhjH, um die Motilität zu kontrollieren [Pesavento *et al.*, 2008].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression einiger GGDEF/EAL-Domänen-Proteine beim Eintritt in die Stationärphase induziert wird (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Interessanterweise stehen viele dieser Stationärphasen-induzierten Gene auch unter der Kontrolle des Stress- und Stationärphasen-Sigmafaktors RpoS. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Expression von sechs der 29 GGDEF/EAL-Genen in *E. coli* positiv durch RpoS kontrolliert wird (*ydaM*, *yciR*, *yaiC*, *yedQ* und *yddV* und damit auch *yddU*) (Weber *et al*, 2006). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass insgesamt zehn der 22 exprimierten Gene unter positiver Kontrolle von RpoS stehen und Stationärphasen-induziert sind. Bei diesen Genen handelt es sich, neben den Genen von Weber *et al*. (2006), um *yegE*, *yjcC*, *ylaB* und *yoaD*. Fünf der entsprechenden Proteine weisen eine aktive GGDEF-Domäne (mit A- und I-Zentrum) auf und haben aufgrund dessen möglicherweise eine DGC-Aktivität. Diese fünf sind YaiC, YdaM, YddV, YedQ und YegE. Die anderen fünf RpoS-abhängigen GGDEF/EAL-Gene scheinen für aktive EAL-Domänen-Proteine zu kodieren und könnten somit PDE-Aktivität besitzen. Dabei handelt es sich um YciR, YddU, YjcC, YlaB und YoaD.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben der positiven Kontrolle durch RpoS für fünf GGDEF/EAL-Gene (*ydeH*, *yfeA*, *rtn*, *ycgF* und *yhjH*) eine negative Kontrolle durch RpoS beobachtet werden. Bei YdeH handelt es sich um ein GGDEF-Domänen-Protein und bei den anderen vier scheint die EAL-Domäne die wichtigere Rolle zu spielen. Ihre negative Regulation durch RpoS kann vermutlich durch Sigmafaktor-Kompetition erklärt werden. Bei Abwesenheit von RpoS herrscht weniger Konkurrenz unter den Sigmafaktoren in der Zellen und es kann mehr RNAP-Holoenzym mit dem vegetativen oder anderen alternativen Sigmafaktoren gebildet werden [Gruber & Gross, 2003, Weber *et al.*, 2005].

Für den Übergang in die Stationärphase lassen sich die erhaltenen Daten wie folgt zusammenfassen: *E. coli* exprimiert diverse GGDEF/EAL-Domänen-Proteine, die in schnell wachsenden Zellen entweder gar nicht oder nur sehr gering exprimiert sind. Diese kodieren sowohl für mögliche DGCs als auch für mögliche PDEs (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). In der stationären Phase könnte also eine komplexere Kontrolle des c-di-GMP-Umsatzes notwendig sein, um verschiedene Ziele durch diesen sekundären Botenstoff zu regulieren. In der Stationärphase ist der zelluläre Gehalt an c-di-GMP höher als in der exponentiellen Phase [Boehm *et al.*, 2010]. Dieser könnte, zum einen durch die induzierten GGDEF-Domänen-Proteine begründet sein, oder aber durch die Aktivierung und / oder Inaktivierung von schon vorhandenen DGCs oder PDEs. Die Akkumulierung dieses sekundären Botenstoffs hängt stark von den vorherrschenden Bedingungen ab. Diese Bedingungen werden von den

sensorischen Domänen der jeweiligen Proteine wahrgenommen.

Beim Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Anheftung spielt die Expression adhäsiver Komponenten eine wichtige Rolle. Die Expression der adhäsiven Curli-Fimbrien ist Stationärphasen-induziert, RpoS-, c-di-GMP- und Temperatur-abhängig. Das alles könnte dafür sprechen, dass in der Stationärphase in Komplexmedium bei 28°C der zelluläre c-di-GMP-Gehalt erhöht ist. Dennoch akkumulieren zur gleichen Zeit ebenfalls RpoSabhängig EAL-Proteine (YciR, YddU, YjcC, YlaB und YoaD). Dies könnte zum einen zeigen, dass der Umsatz an c-di-GMP in der Stationärphase ein schneller sein muss, um c-di-GMP-stimulierte Funktionen kontrollieren zu können. Zum anderen könnten diese PDEs inaktiv in der Zelle vorliegen. Auf ein spezifisches Signal hin, könnten diese PDEs aktiv werden und c-di-GMP-abhängige Regulatoren kontrollieren. So könnte beispielsweise eine massive Curli-Produktion, die eine unkontrollierte Anheftung an einander und an Oberflächen zur Folge hätte, verhindert werden.

Ferner stellte sich im Rahmen dieser Arbeit heraus, dass auch die Temperatur eine wichtige Rolle bei der Expression der GGDEF/EAL-Gene spielt. Von den 22 exprimierten Genen werden sieben verstärkt oder ausschließlich bei der niedrigeren Temperatur (28°C) exprimiert (*yaiC*, *ydaM*, *yddU*, *yhjK*, *ycgF* und *yoaD*) (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Nur ein einziges Gen, *yeaJ*, zeigt eine höhere Expression bei 37°C (Abb. 4.1). Das entsprechende Protein ist bei 37°C, nicht aber bei 28°C, für die Verringerung der Motilität verantwortlich [Pesavento *et al.*, 2008]. Die induzierte Expression von *yeaJ* bei 37°C könnte ein Hinweis darauf sein, dass das entsprechende Produkt eine wichtige Rolle im Darm des Wirtes spielt. Verschiedene pathogene *E. coli* können auch bei Temperaturen über 30°C adhäsive Curli-Fimbrien ausbilden [Barnhart & Chapman, 2006]. Möglicherweise übernehmen GGDEF/EAL-Gene, wie *yeaJ*, die bei 37°C eine induzierte Expression zeigen, hier eine gesonderte Rolle.

Die Tendenz, dass diverse GGDEF/EAL-Domänen-Protein mit unterschiedlichen Sensordomänen bei Temperaturen unter 37°C exprimiert werden, spricht für eine multiple Signalintegration bei der Kontrolle des zellulären c-di-GMP-Spiegels außerhalb des Wirts in einer hochvariablen Umgebung.

Die Biofilmbildung wird nicht nur durch Signale, wie Nährstoff-, Phosphat- oder Stickstoffmangel induziert, sondern auch durch die Anwesenheit einer Oberfläche. Durch das Zweikomponentensystem CpxAR, welches hauptsächlich Membranstress wahrnimmt, können Bakterien direkt den Kontakt mit einer Oberfläche wahrnehmen. Durch diesen Kontakt wird die sessile Lebensweise gefördert [Otto & Silhavey, 2002]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte

gezeigt werden, dass bei Wachstum auf Festmedium sich die RpoS-Kontrolle und der Temperatureffekt noch verstärken (Abb. 4.4, Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigen vier RpoS-abhängige Gene (*ydaM*, *yciR*, *yegE* und *yoaD*) eine, im Vergleich zum Wachstum in Flüssigkultur, erhöhte Expression, wenn sie auf Festmedium wachsen (Abb. 4.1 bis 4.4). Die entsprechenden Genprodukte spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese der Curli-Fimbrien und der Matrixkomponente Cellulose. Sie sind die entscheidenden Faktoren des rdar-Morphotyps von Kolonien, die auf CR-Platten gewachsen sind [Römling, 2005]. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die PDE YhjH, die den c-di-GMP-Gehalt für die Motilität niedrig hält [Girgis *et al.*, 2007, Ko & Park, 2000, Pesavento *et al.*, 2008], eine reduzierte Expression bei Wachstum auf Festmedium aufweist. Auffällig war unter diesen Bedingungen auch, dass besonders Gene, die für GGDEF-Domänen-Proteine kodieren (*yaiC*, *ydaM*, *yddV* und *yeaJ*), verstärkt exprimiert werden (Abb. 4.4). Möglicherweise sprechen diese Erkenntnisse für eine Akkumulierung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP in der Zelle bei Wachstum auf Festmedium und bestätigen damit die positive Funktion von c-di-GMP bei der Entwicklung eines Biofilms.

### 5.1.2 20% der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine sind an der Kontrolle der Curli-Fimbrien-Expression beteiligt

Die Expression adhäsiver Komponenten ist ein wichtiger Schritt beim Übergang zur irreversiblen Anheftung der Bakterien aneinander und/oder an eine Oberfläche. Die adhäsiven Curli-Fimbrien vermitteln diese Anheftung an andere Zellen, aber auch an biotische und abiotische Oberflächen [Römling & Rohde, 1999]. Der Transkriptionsfaktor CsgD ist essentiell für die Expression des Curli-Strukturoperons *csgBAC* und ist ein wichtiges Ziel der positiven Kontrolle durch den sekundären Botenstoff c-di-GMP [Hengge, 2009]. Zu Beginn diese Arbeit war bekannt, dass in *E. coli* die DGC YdaM und die PDE YciR ein c-di-GMP-Kontrollmodul repräsentieren, das spezifisch und ausschließlich die Transkription von *csgD* kontrolliert [Weber *et al.*, 2006]. Des Weiteren war bekannt, dass zusätzlich auch die DGC YegE und die PDE YhjH antagonistisch die Transkription von *csgD* beeinflussen. Diese beiden bilden ein Kontrollmodul, welches global den zellulären c-di-GMP-Spiegel beeinflusst [Pesavento *et al.*, 2008].

CsgD aktiviert neben den Genen für die Curli-Fimbrien auch das Gen *yaiC* (*adrA* in *Salmonella*). Das Gen *yaiC* kodiert für eine DGC und kontrolliert spezifisch über die Synthese von c-di-GMP die bakterielle Cellulose-Synthase-Aktivität [Kader *et al.*, 2006]. Das

EAL-Domänen-Protein YoaD ist an der Reduktion der Cellulose-Produktion beteiligt [Brombacher *et al.*, 2006]. Die hier vorliegende Expressionsstudie des Gens *yoaD* zeigt, dass es die gleiche zeitliche Induktion der Expression wie *yaiC* aufweist (Abb. 4.1 und 4.3, rote Kurven). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass ein relevanter Antagonist für das GGDEF-Domänen-Protein YaiC das EAL-Domänen-Protein YoaD sein könnte.

Mit Hilfe einer chromosomalen *lacZ*-Reportergenfusion zu *csgB*, dem ersten Gen des Curli-Strukturoperons, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein weiteres GGDEF/EAL-Domänen-Protein, CsrD (YhdA), an der Regulation der Curli-Fimbrien beteiligt ist (Abb. 4.5 und 4.6). Beim Eintritt in die Stationärphase übernimmt CsrD eine positive Rolle bei der Regulation der Expression von CsgD (siehe unten).

### 5.1.3 Welche zelluläre Funktion übernehmen die restlichen 80% der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in *Escherichia coli*, die keinen Einfluss auf die Motilität und/oder Regulation der Curli-Fimbrien haben?

Zyklische Nukleotide als Sekundärbotenstoffe sind weit verbreitet in allen Bereichen des Lebens. Die allosterische und posttranskriptionale Kontrolle durch diese Botenstoffe erfolgt spezifisch und sehr schnell. Der Nukleotidbotenstoff cAMP übernimmt in Eukaryoten eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung und Verstärkung von zahlreichen Hormonen, wie beispielsweise Adrenalin, von Wachstumsfaktoren und anderen regulatorischen Molekülen. Das eukaryotische, zyklische Nukleotid cGMP vermittelt in verschiedenen Geweben unterschiedliche Botschaften. So löst es in der Niere und im Darm Veränderungen beim Ionentransport und bei der Wasserretention aus, im glatten Herzmuskel signalisiert es Entspannung und im Gehirn ist es möglicherweise an der Entwicklung und an der Funktion des adulten Organs beteiligt. Zyklisches GMP hat außerdem eine wichtige weitere Funktion im Auge von Wirbeltieren. Hier bewirkt es, dass sich die ionenspezifischen Kanäle in den Stäbchen- und Zapfenzellen der Retina öffnen. Bei Bakterien übernehmen neben cGMP und cAMP auch zyklische Dinukleotidbotenstoffe, wie c-di-AMP und c-di-GMP wichtige Funktionen. C-di-AMP ist beispielsweise unter bestimmten Bedingungen an der Zellzykluskontrolle in Bacillus subtillis beteiligt [Witte et al., 2008]. Für c-di-GMP konnte bisher gezeigt werden, dass es in Prozesse der Motilität, Biofilmbildung, Pathogenität und Zellzykluskontrolle beteiligt ist [Sondermann *et al.*, 2012]

Die Expressionsstudien dieser Arbeit zeigen, dass vierzehn GGDEF/EAL-Gene in der postexponentiellen Phase des Wachstums exprimiert werden (Abb. 4.1 bis 4.3). Von diesen konnte für fünf (*yegE*, *yedQ*, *yeaJ*, *csrD* und *yhjH*) ein Einfluss auf die Motilität nachgewiesen werden (Abb. 4.9) [Girgis *et al.*, 2007, Pesavento *et al.*, 2008, Suzuki *et al.*, 2006]. Dreizehn der 22 exprimierten Gene werden entweder weiterhin in der Stationärphase exprimiert oder dann erst induziert. Von diesen dreizehn konnte bisher für fünf (*ydaM*, *yciR*, *yegE*, *csrD*, *yaiC*) eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Curli-Fimbrien und der Cellulose-Produktion nachgewiesen werden (Abb. 4.5) [Pesavento *et al.*, 2008, Weber *et al.*, 2006, Zogaj *et al.*, 2001]. Die Frage ist, welche Funktionen die anderen GGDEF/EAL-Proteine in der Zelle erfüllen.

In dieser Arbeit konnte für 22 GGDEF/EAL-Gene gezeigt werden, dass sie exprimiert werden, aber eine Funktion für einige der entsprechenden Genprodukte konnte noch nicht gezeigt werden. Bei diesen Kandidaten handelt es sich um die Gene *yeaP*, *yfeA*, *yhjK*, *rtn* und *ylaB*. Eine weiterführende Studie der Expression mit einer Kombination verschiedener Wachstums- und Stressbedingungen könnten hier weiteren Aufschluss über die Funktion und die Expression dieser GGDEF/EAL-Domänen-Proteine geben.

### c-di-GMP und das Csr-System

In einer natürlichen Umgebung müssen Bakterien mit einem unterschiedlichen Angebot an Nährstoffen auskommen [Matin *et al.*, 1989; Kolter *et al.*, 1993]. Um ein schnelles Wachstum oder eine Stressresistenz bei Nährstoffüberschuss oder -mangel zu ermöglichen, wird eine globale Anpassung der Genexpression benötigt. Als Antwort auf die Stationärphase und verschiedene Stressbedingung des Wachstums wird in *E. coli* der alternative Sigmafaktor RpoS induziert. Dieser gilt als zentraler Regulator der generellen Stressantwort und Stationärphase [Klauck *et al.*, 2007]. Ein weiterer wichtiger Regulator es bakteriellen Wachstums ist das RNA-bindende Protein CsrA. Dieses reprimiert die Gene der Stationärphase und aktiviert Gene, die für das Wachstum in der postexponentielle Phase notwendig sind [Romeo *et al.*, 2011].

Sowohl RpoS als auch CsrA spielen eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung. Mittels der Transkriptom-Analyse von Jonas *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass das RNAbindende CsrA-Protein, wie auch der Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS (diese Arbeit), eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Expression der 29 GGDEF/EAL-Gene in *E. coli* spielt. Durch die Verwendung eines CsrA-Überexpressionssystems konnte für die Gene *ycdT*, *ydeH*, *yliF* und *ydiV* eine Reprimierung der Expression durch CsrA nachgewiesen werden [Jonas *et al.*, 2008]. Die Studien von Boehm *et al.* (2009, 2010) weisen zum einen daraufhin, dass das GGDEF-Domänen-Protein YdeH und das EAL-Domänen-Protein YjcC einen antagonistisch Einfluss auf die Biofilmbildung haben und zum anderen, dass die GGDEF-Domänen-Proteine YfiN und DosC negative Regulatoren der Motilität sind. Für die GGDEF-Domänen-Proteinen YcdT und YdeH konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sie einen negativen Einfluss auf die Motilität haben. Bei beiden Proteinen scheint dieser Effekt über die Synthese des sekundären Botenstoffs c-di-GMP realisiert zu werden [Jonas *et al.*, 2008].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Effekte der Proteine YjcC, YdeH, YfiN, DosC und YcdT auf die Biofilmbildung und die Motilität nicht beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die hier aufgeführten Studien das Derivat W3110 des Wildtyps *E. coli* K-12 als Grundlage genutzt. In den Studien von Jonas *et al.* (2008) und Boehm *et al.* (2009, 2010) wurden ein anderes Derivat, MG1655, des *E. coli* K-12 Wildtyps benutzt. Bei den Stämmen W3110 und MG1655 handelt es sich um nahe verwandte *E. coli* K-12-Stämme, die beide von dem Stamm W1485 abstammen [Bachmann, 1972]. Bei den Analysen von Jonas *et al.* (2008) und Boehm *et al.* (2009, 2010) wurden zusätzlich entweder ein CsrA-Überexpressionssystem oder eine spezielle CsrA-Mutation eingesetzt. Darüber hinaus wurden auch die Wachstumsbedingungen so gewählt, dass sie eine Induktion des Csr-Systems zur Folge haben. Die unterschiedlichen Einflüsse der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine auf die Biofilmbildung und die Motilität der vorliegenden Arbeit und der Arbeiten von Jonas *et al.* (2008) und Boehm *et al.* (2009, 2010) können möglicherweise durch die Verwendung dieser unterschiedlichen Laborwildtypstämme und die verschiedenen Wachstumsbedingungen erklärt werden.

#### Das Kontrollmodul DosC/DosP

Für die Stationärphasen-induzierten und RpoS-abhängigen GGDEF/EAL-Domänen-Proteine YddV (DosC) und YddU (DosP) konnten Tuckerman *et al.* (2009) zeigen, dass sie ein Sauerstoff-abhängiges c-di-GMP-Kontrollmodul bilden, in dem DosC als DGC und DosP als PDE arbeitet. Tuckerman *et al.* (2011) konnten ebenfalls zeigen, dass DosC und DosP einen Komplex mit der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), ein wichtiges Enzym für den RNA-Stoffwechsel, bilden können und so die RNA-Prozessierung beeinflussen. Das c-di-GMP-Kontrollmodul DosP/DosC ist ein weiteres Beispiel für die vermutete Kompartimentierung des c-di-GMP-Signalweges, um spezifische Ziele bedienen zu können.

Die Diskrepanz zwischen den Daten von Tuckerman et al. (2009) und der hier vorliegenden Untersuchung kann möglicherweise durch die Wahl unterschiedlicher Mutationen und Wachstumsbedingungen erklärt werden. Die Daten von Tuckermann *et al.* (2009) konnten nur durch die Isolierung spezieller Mutationen in DosC oder DosP beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Studien unter aeroben Bedingungen mit kompletten Deletionsmutationen in DosP oder DosC durchgeführt. Möglicherweise gibt die Untersuchung einer Deletion des gesamten Operons *dosCP* und die Veränderung des Sauerstoffgehalts weitere Aufschlüsse über die spezielle Rolle des DosC/DosP-Kontrollmoduls in der Zelle.

### Das Blaulicht-wahrnehmende, degenerierte EAL-Domänen-Protein YcgF

Die generelle Stressantwort vermittelt durch den alternativen Sigmafaktor RpoS wird nicht nur durch Stressbedingungen wie Nährstoffmangel oder Säurestress, sondern auch bei niedrigen Temperaturen induziert [Hengge-Aronis, 2002]. Für das RpoS-abhängige und Stationärphasen-induzierte Gen *ycgF* konnten Tschowri *et al.* (2009) zeigen, dass die Expression bei Wachstum bei 16°C stark induziert ist. Dieses degenerierte EAL-Protein interagiert Blaulicht-abhängig mit dem Repressor YcgE. Zu den durch YcgE reprimierten Genen gehören die kleinen Proteine YmgAB, die das Rcs-Phosphorelay-System aktivieren. Das Rcs-Phosphorelay-System hat einen negativen Einfluss auf die Produktion der Curli-Fimbrien und einen positiven Einfluss auf die Kapselsynthesegene und ist wichtig für die Reifung des Biofilms. Das EAL-Domänen-Protein YcgF hat somit indirekt einen positiven Einfluss auf die späte Biofilmentwicklung. Die Kombination von Nährstoffmangel, niedriger Temperaturen und intensivem Blaulicht, die zur Induktion des YcgE/YcgF-Systems führen, legen die Vermutung nahe, dass dieses Kontrollmodul eine wichtige Rolle beim Wachstum oder Überleben in mariner Umgebung oder in Frischwasser spielt [Tschowri *et al.*, 2009].

#### Funktionen für die Proteine, die keine Expression in dieser Arbeit zeigten

Andere Arbeitsgruppen konnten Genen beziehungsweise Proteinen, die in dieser Arbeit keine Expression zeigten und keinen Einfluss auf die untersuchten Prozesse hatten (*yeaI*, *yliF*, *yneF*, *yfgF*, *ycgG*, *ydiV*, *yliE*, Abb. 4.1 bis 4.5), eine Funktion zuweisen.

So konnten Sanchez-Torres *et al.* (2010) für das GGDEF-Domänen-Protein YeaI zeigen, dass es einen negativen Einfluss auf die initialen Schritte der Biofilmbildung hat. Die Diskrepanz der Daten der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Sanchez-Torres *et al.* (2010) kann hier wiederum möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Laborwildtypstämme erklärt werden. Während für die Versuche dieser Arbeit der *E. coli K-12*-Stamm W3110 als Grundlage diente, verwendeten Sanchez-Torres *et al.* (2010) den Stamm BW25113.

Bei den Stämmen W3110 und BW25113 handelt es ebenfalls sich um nahe verwandte E. coli K-12-Stämme, die beide von dem Stamm W1485 abstammen [Bachmann, 1972]. Sie weisen nur wenige genetische Unterschiede auf, die aber gravierende Folgen für die hier vorliegende Untersuchung haben könnten. Beispielsweise können im Promotorbereich von flhDC verschiedene IS-Elemente auftreten [Barker et al. 2004]. Diese mobilen DNA-Elemente, die oft nur für die eigene Mobilität kodieren, können durch Insertion ins bakterielle Genom Mutationen oder veränderte Transkriptionsraten benachbarter Gene zur Folge haben (Reynolds et al. 1984). Durch die Integration solcher IS-Elemente im flhDC-Promotorbereich kommt es zu einer verstärkten Transkription von flhDC und demzufolge auch von FlhDCabhängigen Genen (Barker et al. 2004). Zu den FlhDC-abhängigen Genen gehört auch die PDE YhjH, die für die Umschaltung von der motilen in die sessile Phase notwendig ist. Im Gegensatz zu BW25113 zeigt der E. coli K-12-Stamm W3110, welcher Grundlage für alle in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme war, eine Motilität, die durch ein solches IS-Element verstärkt ist. Die Integration des IS-Elements verlagert die Regulation der Flagellen in die postexponentielle Phase des Wachstums. Diese postexponentielle Motilität ist die Grundlage für die hier vorliegende Studie der GGDEF/EAL-Domänen-Proteine und ihres Einflusses auf den Übergang von der motilen in die sessile Phase. Aufgrund dieses Unterschieds in den verwendeten E. coli K-12-Stämmen sind Unterschiede in der Regulation der c-di-GMP-Kontrollkaskade vorstellbar.

Für das GGDEF/EAL-Gen *yfgF* konnten Lacey *et al.* (2010) zeigen, dass es unter anaeroben Bedingungen Stationärphasen-induziert exprimiert wird. Das GGDEF/EAL-Domänen-Protein

YfgF übernimmt eine negative Funktion bei der anaeroben Biofilmbildung und bei der Antwort auf anaeroben Wasserstoffperoxid-Stress [Lacey *et al.*, 2010].

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Langzeitstudien zur Expression auf Festmedium zeigen, dass das Gen *ydiV* unter diesen Bedingungen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Für das degenerierte EAL-Domänen-Protein YdiV konnte des Weiteren durch Überexpression gezeigt werden, dass es eine negative Rolle bei der Kontrolle der Motilität spielt [Wada *et al.*, 2012].

Für das nicht exprimierte GGDEF-Domänen-Proteine YliF sollten weitere Untersuchungen bezüglich seines Promotors durchgeführt werden. Auch eine Klärung, ob es ein Operon mit dem davor liegenden *yliE* bildet, ist notwendig. Für das ebenfalls nicht exprimierten GGDEF-Domänen-Protein YneF und das EAL-Domänen-Protein YcgG sollten weitere Studien des Promotors durchgeführt werden. Möglicherweise kann eine Markierung des Proteins mit einem speziellen Anhang, beispielsweise FLAG-Tag, Aufschluss über die Expression geben. Auch eine weiterführende Studie der Expression mit einer Kombination verschiedener Wachstums- und Stressbedingungen könnten hier weiteren Aufschluss über die Funktion und die Expression dieser GGDEF/EAL-Domänen-Proteine geben.

Insgesamt weist die vorliegende Studie zur Expression und Funktion aller 29 GGDEF/EAL-Domänen-Proteine in *E. coli* darauf hin, dass sie nicht nur zeitlich (durch die differentielle Regulation der Expression entlang der Wachstumskurve), sondern auch funktional reguliert sein müssen. Durch diesen Regulationsmechanismus ist es möglich, dass verschiedene GGDEF/EAL-Systeme parallel präsent und aktiv in der Zelle oder verschiedenen Regionen in Biofilmen sind und spezifische Ziele bedienen können (Mikrokompartimentierung). Die vorliegende Studie kann als Grundlage für die Aufklärung weitere möglicher c-di-GMP-Kontrollsysteme genutzt werden.

# 5.2 Der Einfluss des degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Proteins CsrD auf die Biofilmbildung

Die Expression des Biofilmregulators CsgD wird in E. coli durch zwei die zwei c-di-GMP-Kontrollmodule YdaM/YciR und YegE/YhjH beeinflusst (Abb. 4.5) [Pesavento et al., 2008; Weber et al., 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD einen positiven Einfluss auf die Expression von CsgD hat (Abb. 4.5). Da sowohl die GGDEF-, als auch die EAL-Domäne bei CsrD degeneriert sind, kann eine Beteiligung am Umsatz des sekundären Botenstoff c-di-GMP weitestgehend ausgeschlossen werden. Für das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, kleine RNAs zu binden. CsrD stimuliert den RNase Eabhängigen Abbau zweier kleiner RNAs, CsrB und CsrC (Abb. 4.8, Daten nicht gezeigt) [Suzuki et al., 2006]. Die sRNAs CsrB und CsrC sequestrieren das RNA-bindende Protein auf posttranskriptionaler Ebene die Expression des flagellaren CsrA, welches Masterregulators FlhDC aktiviert und die Expression der Matrixkomponente PGA reprimiert. Übereinstimmend mit diesen Daten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CsrD am präzisen Abschalten der FlhDC Expression beim Übergang in die Stationärphase beteiligt ist (Abb. 4.9). Das Abschalten von FlhDC ist notwendig für die Induktion der Curli-Fimbrien [Pesavento et al., 2008].

# 5.2.1 Das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD beeinflusst verschiedene kleine RNAs

Die komplexe Kontrolle der *csgD*-Transkription wird durch eine posttranskriptionale Regulation durch kleine RNAs abgerundet. Bei den CsgD-regulierenden sRNAs handelt es sich um die *trans*-kodierte sRNAs RprA, OmrA, OmrB, McaS (Abb. 4.6) und GcvB. Alle diese sRNAs binden an die 5' UTR des *csgD*-Transkripts und reprimieren so die Translation von CsgD [Holmqvist *et al.*, 2010; Thomason *et al.*, 2012; Jørgensen *et al.*, 2012; Mika *et al.*, 2012]. Es bestand also die Hypothese, dass CsrD über eine solche kleine RNA die Curli-Fimbrien-Expression beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass der Einfluss von CsrD auf die Expression von CsgD zusätzlich zu dem Effekt der kleinen regulatorischen RNAs OmrAB, McaS, RprA und ArcZ wirkt (Abb. 4.6). Durch das enge Zusammenspiel der fünf bisher bekannten kleinen RNAs (OmrA, OmrB, GcvB, McaS und RprA) bei der Regulation von CsgD könnte ein möglicher Einfluss von CsrD überdeckt worden sein. Die Deletion einer einzelnen sRNA in einem komplex regulierten System hat meist keine Auswirkung. So sind bei der Regulation der Quorum-Sensing-Kaskade in *Vibrio* Spezies vier bis fünf homologe sRNAs beteiligt. Eine Repression der Ziel-mRNA kann hier allerdings nur beobachtet werden, wenn alle beteiligten sRNAs deletiert sind [Lenz *et al.*, 2004]. Auch für den Wirkmechanismus von CsrD ist ein solches Szenario denkbar. Durch weitere Mutationsanalysen mit gezielter Kombination der bekannten sRNAs kann möglicherweise der genaue Einfluss von CsrD auf die Expression der Curli-Fimbrien geklärt werden.

Kleine regulatorische RNAs sind in vielen Bereichen des Lebens beteiligt und reprogrammieren die Proteinexpression bei Veränderungen der Umwelt oder unter Stressbedingungen. Im Genom von E. coli sind ungefähr 100 dieser Regulatoren kodiert [Sharma & Vogel, 2009]. Die trans-kodierten RNAs, die eine wichtige Rolle in dieser Arbeit spielen, werden meist nur unter sehr spezifischen Bedingungen induziert. Die Induktion erfolgt entweder über eine erhöhte Expression oder über die Stabilisierung der sRNA. In dieser Arbeit konnte mittels Northern Blot Analysen nachgewiesen werden, dass CsrD neben den kleinen RNAs des Csr-Systems weitere kleine regulatorische RNAs (ArcZ, OmrA, OmrB und RprA) beeinflusst. Anders als bei CsrB und CsrC beeinflusst CsrD bei diesen kleinen RNAs die Expression und nicht die Stabilität (Abb. 4.7 und 4.8). Mika et al. (2012) konnten zeigen, dass ein erhöhter Gehalt an RprA zu einer starken Reduktion der csgD-mRNA führt. Somit könnten die besonders erhöhte RprA-Konzentration in einem csrD-defizienten Hintergrund (Abb. 4.7) eine Erklärung für die Reprimierung der Expression der Curli-Fimbrien sein. Des Weiteren scheint CsrD unter den getesteten Bedingungen nicht über den bekannten Mechanismus zusammen mit der RNase E zu wirken. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass dieses Protein an der Kontrolle der jeweiligen Signalkaskaden, die für die Expression der entsprechenden sRNA notwendig sind, beteiligt ist. Möglicherweise können durch CsrD auch verschiedene Signale integriert und weitergeleitet werden, da die durch CsrD vermittelten Veränderungen der zellulären RNA-Konzentrationen verschiedene sRNA aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen ansprechen. Das GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD kontrolliert möglicherweise also c-di-GMP-unabhängig global, durch das sRNA-Netzwerk, die Regulation in der Zelle (Abb. 5.1).

Eine Mutation in CsrD führt unter allen getesteten Bedingungen zu einem erhöhten zellulären Gehalt an RprA, ohne dessen Stabilität dabei zu verändern (Abb. 4.7 und 4.8). Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von CsrD auf die kleine RNA RprA aufzuklären. Die Expression der kleinen RNA RprA hängt vom Rcs-Phosphorelay-System [Majdalani *et al.*, 2002]. Die Aktivierung oder Reprimierung der Zielgene des Rcs-Phosphorelay-Systems wird durch die Phosphorylierung und Dimerisierung des Responseregulators RcsB realisiert. RcsB kann sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer in phosphorylierter Form an die DNA binden. Durch das RcsB-Homodimer wird, unter anderem, die Expression von *rprA* oder *ftsZ* aktiviert. Die Heterodimerbildung aus RcsA und RcsB ermöglicht unter anderem die Aktivierung der Expression der Kapselsynthesegene und die Reprimierung der Expression des flagellaren Masterregulators FlhDC [Majdalani *et al.*, 2002]. Dieses unorthodoxe Zwei-Komponenten-System spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung von Biofilmen [Ferrieres & Clarke, 2003]. Es ist bekannt, dass hohe Osmolarität, das Wachstum auf feuchten Oberflächen und niedrige Temperaturen das Rcs-Phosphorelay-System aktivieren [Majdalani & Gottesmann, 2006].

Tschowri *et al.* (2009) konnten zeigen, dass das degenerierte EAL-Domänen-Protein YcgF c-di-GMP-unabhängig, über die Induktion der Expression der kleinen Proteine YmgA und YmgB, das Rcs-Phosphorelay-System aktiviert. Die Mutation des EAL-Domänen-Proteins YcgF hat eine starke Induktion der Kapselsynthesegene (mukoider Phänotyp) zur Folge [Tschowri *et al.*, 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein weiteres GGDEF/EAL-Domänen-Protein (CsrD) unabhängig von c-di-GMP einen Einfluss auf das Phosphorelay-System RcsCDB hat (Abb. 4.9). Für eine Mutation in *csrD* konnte allerdings unter den getesteten Bedingungen keine Induktion des mukoiden Phänotyps nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies und die Untersuchung der Rcs-Phosphorelay-System-abhängigen Gene (Abb. 4.9) weisen darauf hin, dass CsrD anscheinend spezifisch das Homodimer RcsB beeinflusst und über einen anderen Mechanismus als YcgF auf das Rcs-Phosphorelay-System wirkt.

Die hier ebenfalls beobachtete Inhibierung der Expression des flagellaren Masterregulators FlhDC könnte durch eine Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems, durch ein Heterodimer aus RcsB und RcsA erklärt werden. Allerdings hätte eine Aktivierung des Heterodimers RcsAB durch eine *csrD*-Mutation einen stärkeren Verlust der *flhDC*-Transkription, wie bei Francez-Charlot *et al.* (2003) beobachtet, zur Folge. Des Weiteren hätte dies einen kompletten Verlust der Motilität zur Folge. Dies konnte für einen *csrD*-defizienten Hintergrund nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss des Csr-Systems ist somit wahrscheinlicher. In einem *csrD* –defizienten Hintergrund werden die kleinen RNAs CsrB und CsrC stabilisiert und dies hat eine erhöhte Sequestrierung von CsrA zur Folge. Dementsprechend fehlt der *flhDC*-mRNA die Stabilitäts-gebende Funktion von CsrA. Dies erklärt auch die leicht reduzierte Expression von *flhDC* im *csrD*-defizienten Hintergrund (Abb. 4.9).

Durch eine kombinierte Mutantenanalyse mit den Komponenten des Rcs-Phosphorelay-Systems sollte geklärt werden, an welcher Position der Effekt von CsrD integriert wird (Abb. 4.10). Diese Analyse weist daraufhin, dass CsrD spezifisch auf das Rcs-Phosphorelay-System wirkt. Die Ergebnisse der Studien im rcsC- und rcsD-defizienten Hintergrund weisen daraufhin, dass CsrD möglicherweise kreuzregulierende Kinasen aktiviert, wenn der Phosphattransfer innerhalb des Rcs-Phosphorelay-Systems gestört ist. Um welche es sich hier handelt, könnte beispielsweise durch Transkriptom-Analysen geklärt werden. Die dabei auftretenden veränderten Gene könnten auf ein anderes Zweikomponenten-System hinweisen. Durch die Deletion der Außenmembrankomponente RcsF können nur noch interne Signale in das Rcs-Phosphorelay-System integriert werden (Daten nicht gezeigt). Eine csrD-Mutation hat keine Induktion der reduzierten bdm-Expression in einem rcsF-defizienten Hintergrund zur Folge (Abb. 4.11 D). Das Innenmembran-ständigen Proteins CsrD scheint also seine Informationen an die Außenmembrankomponenten RcsF weiter zu leiten, um so das Phosphorelay-System RcsCDB zu beeinflussen (Abb. 5.1). Das Rcs-Phosphorelay-System kann durch verschiedene Antibiotika, niedrige Temperaturen und hyperosmotische der Bedingungen aktiviert werden. Die Veränderungen Zusammensetzung der Außenmembran und der Peptidoglykanschicht kann dann durch das Rcs-Phosphorelay-System wahrgenommen werden [Venkatesh et al., 2010].

Für einen Teil der kleinen RNAs (beispielsweise OmrA und OmrB), die durch CsrD beeinflusst werden, konnte gezeigt werden, dass sie einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Außenmembran haben (Abb. 5.1). Ein Drittel aller in *E. coli* bekannten sRNAs ist in die Regulation der Außenmembranproteine (OMPs) involviert [Vogel & Papenfort, 2006]. Die Expression der OMPs ist stark von der Umwelt abhängig und wird auf der Transkriptionsebene komplex reguliert. Die Feineinstellung der Zusammensetzung der OM übernehmen in vielen Enterobakterien die sRNAs. Möglicherweise beeinflusst also CsrD über die Veränderung der Konzentration kleine RNAs in der Zelle die Homöostase der Komponenten der Zellhülle und übt so Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System aus.



## Abb. 5.1: Zusammenfassendes Modell zur Regulation vom degenerierten GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD und dem MreBCD-Komplex auf das Rcs-Phosphorelay-System in *Escherichia coli*

In E. coli besteht das Rcs-Phosphorelay-System aus den Komponenten RcsF, RcsC, RcsD und RcsB. Nachdem dieses Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF durch einen externen Stimulus (z. B. Membranstress) aktiviert wurde, autophosphoryliert sich die Innenmembran-ständige Hybrid-Sensorkinase RcsC. Der Phosphattransfer (graue Pfeile) auf den zytoplasmatischen Response Regulator RcsB erfolgt über das Innenmembran-ständige Hpt-Protein RcsD. Die Phosphorylierung von RcsB induziert seine Dimerisierung und RcsB kann als Transkriptionsfaktor aktiv werden. Die Inaktivierung dieses Systems erfolgt durch die Phosphatase-Aktivität von RcsC. Die, durch RcsB aktivierte kleine RNA RprA ist unter anderem für die Destabilisierung der mRNA von csgD, dem Masterregulator der Curli-Fimbrien, verantwortlich. Die 5' UTR der csgD-mRNA ist Ziel verschiedenster kleiner RNAs (z. B.: OmrA, OmrB). Einige der csgD-regulierenden sRNAs werden durch das Innenmembran-ständige, degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD beeinflusst. Die, durch dieses Protein beeinflussten, sRNA wirken, unter anderem, auch die Zusammensetzung der Außenmembran. CsrD inhibiert also vermutlich indirekt über die sRNAs die Signalweiterleitung von RcsF an das Rcs-Phosphorelay-System. Des Weiteren beeinflusst auch der MreBCD-Komplex, ein wichtiger Teil des bakteriellen Zytoskeletts, das Rcs-Phosphorelay-System über die Außenmembrankomponente RcsF. Die Gene dieses Komplexes sind im E. coli-Genom adjazent zu CsrD lokalisiert. Die Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems erfolgt hier möglicherweise durch den Einfluss von MreBCD auf die Peptidoglykan-Maschinerie. (OM: Außenmembran, P: Peptidoglykanschicht, IM: Innenmembran, OMP: Außenmembranproteine, P: Phosphat; Pfeile: grau = Phosphattransfer, grün = Regulation auf Transkriptionsebene, blau = Regulation auf RNA-Ebene, schwarz = unbekannte Regulation) Weitere Details siehe Text.

### 5.2.3 Wirkung von CsrD auf die bakterielle Zellmorphologie

Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist ein gerades, zylindrisches Stäbchen mit abgerundeten Enden. Der Durchmesser beträgt 1,1–1,5 und die Länge 2,0–6,0 µm. In einem definierten Medium ist die Zellgröße und –zusammensetzung weitestgehend unabhängig von der Wachstumstemperatur. Die Charakteristika der Zellen scheinen primär durch das Muster der biochemischen Aktivitäten bedingt durch das Medium selbst festgelegt zu werden. Bei einer gegebenen Temperatur ist die Größe und Zusammensetzung der Zelle abhängig von der Wachstumsrate die durch das Medium vorgegeben ist [Schaechter *et al.*, 1958].

Diffusion spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Zellgröße. Zum einen gibt die Zellgröße vor, wie oft ein Kontakt mit externen Nährstoffen zustande kommt, und zum anderen limitiert die Zellgröße die Rate, mit der sich Proteine und Nährstoffe in der Zelle begegnen [Young, 2006]. Beveridge (1988) berechnete, dass ein 50 kDa Protein in einem typischen Stäbchenbakterium fünf Sekunden benötigt, um von einem Pol zu anderen zu gelangen. Schulz und Jørgensen (2001) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Diese Zeiten verändern sich natürlich, wenn sich die Größe der Zelle verändert. Und obwohl die generelle Form eines Bakteriums gleich bleibend ist, so kann die Zelllänge und –breite als Antwort auf die umgebenden Bedingungen stark variieren [Neidhardt *et al.*, 1990].

In *E. coli* verändert sich beispielsweise die Zellgröße, meist durch eine Verlängerung der Zelle sichtbar, wenn Nährstoffe im Überschuss vorhanden sind [Donachie *et al.*, 1989]. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass *E. coli*-Zellen mit einem *csrD*-defizienten Hintergrund in der exponentiellen und postexponentiellen Phase des Wachstums verkürzt vorliegen (Abb. 4.11). Diese Verkürzung kann möglicherweise durch eine veränderte Wahrnehmung der Nährstoffe in der Umgebung erklärt werden. CsrD ist Teil des Csr-Systems und in einem *csrD*-defizienten Hintergrund werden die kleinen RNAs CsrB und CsrC stabilisiert. Dies hat eine vermehrte Sequestrierung von CsrA zur Folge. CsrA, wurde als wichtiger negativer Regulator der Glykogensynthese und Aktivator der Gluconeogenese entdeckt [Romeo *et al.*, 2003]. Die Veränderung des Csr-System in einem *csrD*-defizienten Hintergrund könnte also eine Erklärung für die Veränderung der Zellgröße sein.

Möglicherweise beeinflusst CsrD aber auch die Interaktion von FtsZ und FtsA. Diese Proteine sind Teil des bakteriellen Zytoskeletts. Das bakterielle Tubulin-Homolog FtsZ koordiniert die Zellteilung, das Wachstum und die Zellgröße [Löwe & Amos, 1998] und assembliert an der Stelle der Zellteilung zu einem zytokinetischen Ring, der Z-Ring genannt wird. [Bi & Lutkenhaus, 1991, Ma *et al.*, 1996]. FtsZ kann so die Zellgröße kontrollieren. In

Komplexmedium konnten in *E. coli* Mutationen isoliert werden, die eine 20% Reduktion der Zellgröße bei gleich bleibender Wachstumsrate aufwiesen. Bei einer dieser Mutationen handelt es sich um eine Erhöhung der Funktion (gain-of-function) des Aktin-ähnliche Zellteilungsproteins FtsA. Die Reduktion der Zellgröße ergab sich dabei aus einer erhöhten Interaktion von FtsA und FtsZ, die eine erhöhte Integrität des Z-Rings zur Folge hatte [Geissler *et al.*, 2007]. Zu Klärung, ob CsrD diesen Prozess beeinflusst, könnten mikroskopische Untersuchungen mit GFP-markierten Proteinen des Zytoskeletts durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen also daraufhin, dass das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD, unabhängig von YcgF (Daten nicht gezeigt), auf das Rcs-Phosphorelay-System wirkt. Die Inhibierung dieses System durch CsrD wird durch die Außenmembrankomponente RcsF realisiert. CsrD beeinflusst möglicherweise über seine Verbindung zum Csr-System oder über weitere kleine RNAs die Homöostase der Zellhülle und ist so c-di-GMP-unabhängig an der Koordinierung der Biofilmentwicklung beteiligt.

### 5.2.4 Der Einfluss des Aktinhomologs MreB auf die Biofilmbildung von Escherichia coli

Bakterien kommen in verschiedenen Formen wie Kugeln und Stäbchen, vor und können dabei ein internes Volumen von ungefähr  $10^{-2}$  bis  $10^{6}\mu$ m besitzen [Young, 2006]. Die Uniformität einer bakteriellen Spezies spricht für einen robusten Mechanismus zur Aufrechterhaltung ihrer Form und Größe [Typas *et al.*, 2011]. Ein Sakkulus aus Peptidoglykan bestimmt diese Zellform und vermittelt die nötige Festigkeit, um den osmotischen Veränderungen standzuhalten [Vollmer *et al.*, 2008]. Die Synthese und der Einbau von Peptidoglykan werden durch spezielle Elemente des bakteriellen Zytoskeletts in verschiedenen Phasen des Zellzykluses begleitet. Zuerst verlängern sich neu geteilte Zellen mit Hilfe des Aktin-Homologs MreB, welches die Stäbchenform von *E. coli* bestimmt, durch den Einbau von Peptidoglykan an verschiedenen Stellen der Zellwand (zerstreute Verlängerung). Später akkumuliert das Tubulin-Homolog FtsZ, welches zu den Zellteilungsproteinen gehört, in der Mitte der Zelle und leitet die Septumbildung ein. Das ermöglicht die Zellteilung und die Tochterzellabtrennung [Typas *et al.*, 2011].

Das Aktin-Homolog MreB wird von vielen Stäbchen-förmigen Bakterien für die Verlängerung ihrer Peptidoglykanketten verwendet. MreB bildet Filamente [Vats *et al.*, 2009] und interagiert mit den konservierten Innenmembranproteinen MreC, MreD und RodZ

[Kruse *et al.*, 2005, Alyahya *et al.*, 2009]. Die MreB-Filamente werden über die Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von RodZ mit der Innenmembran verbunden [van den Ent *et al.*, 2010]. Ursprünglich wurde angenommen, dass MreB dynamische helikale Strukturen entlang der gesamten Zelllänge ausbildet [Gitai *et al.*, 2004]. Jüngere Studien zeigen aber, dass MreB in *E. coli* und *Bacillus subtillis* kleine filamentöse Komplexe ausbildet, die sich dann entlang der Längsachse bewegen [Domínguez-Escobar *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2011]. Eine Verminderung von MreB führt dazu, dass die Zellen sich nicht mehr verlängern und als runde Zellen weiter existieren [Karczmarek *et al.*, 2007]. Eine komplette Deletion von MreB ist allerdings lethal für *E. coli* Zellen [Kruse *et al.*, 2005, Wachi *et al.*, 2006]. Die alleinige Überexpression von MreB verhindert die Zellteilung und führt zu lang gestreckten Zellen [Kruse et al., 2003]. All diese Studien demonstrieren die bedeutende Rolle dieses Proteins bei der Festlegung der Zellform.

Die Isolierung der *csrD::kan*-Mutation hatte eine erhöhte Expression des *mreBCD*-Operons (Abb. 4.12) zur Folge. Durch die Erhöhung der *mreBCD* –Expression kam es zu einer verstärkten Wirkung der *csrD::kan*-Mutation auf die *csgB*-Expression (Daten nicht gezeigt). Die genaue Untersuchung des Einflusses von MreBCD, auf die Expression der Curli-Fimbrien (Abb. 4.13) zeigt klar, dass auch der MreBCD-Komplex, wie eine Mutation in *csrD*, das Rcs-Phosphorelay-System aktiviert (Abb.4.14 und 4.9). Die Aktivierung erfolgt dabei ebenfalls über die Außenmembrankomponente RcsF (Abb. 5.1), allerdings ohne eine Veränderung der Zellform (Abb. 4.14).

Die Daten von van Teeffelen *et al.* (2011) weisen daraufhin, dass die Peptidoglykansynthese-Maschinerie die MreB-Filament-Bewegung an der Zytoplasmamembran steuert. Die Bewegungsgeschwindigkeit (und –richtung) der Peptidoglykansynthese-Maschinerie ist die gleiche wie die von MreB. Das Aktin-Homolog MreB ist also entscheidend für die Formgebung der Zelle und rekrutiert und positioniert direkt oder indirekt die Peptidoglykansynthese-Maschinerie. Fehlt aber eine fortlaufende Peptidoglykansynthese so bewegt sich auch MreB nicht [Typas *et al.*, 2011]. Möglicherweise wird durch die Überexpression des gesamten MreBCD-Komplexes (durch die *csrD::kan*-Mutation oder ektopisch vom Plasmid) (Abb. 4.14) die Geschwindigkeit oder die Richtung der Peptidoglykansynthese-Maschinerie verändert. Eine veränderte Geschwindigkeit dieser Maschinerie könnte möglicherweise eine Aktivierung des Rcs-Phosphorelay-Systems zur Folge haben. Die TIRF Mikroskopie (total internal reflection fluorescence microscopy), wie sie von Garner *et al.* (2011) und Dominguez-Escobar *et al.* (2011) genutzt wurde, wäre eine Möglichkeit, um eine veränderte Peptidoglykan-Bewegung durch die Überexpression des MreBCD-Komplexes aufzudecken.

In *E. coli* werden bei jeder Zellteilung 40 bis 50% des gesamten Peptidoglykans entfernt. Die löslichen Fraktionen, die vom Sakkulus entfernt werden, können sehr effizient im Peptidoglykan-Wiederverarbeitungs-Zyklus erneuert werden [Park & Uehara 2008]. Der genaue Mechanismus zum Einbau neuer Glykanketten ist noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass während der Zellteilung neue Peptidverbindungen nur zwischen neu-synthetisierten Ketten hergestellt werden. Ein Drittel der neuen septalen Peptidoglykanketten wird entfernt [Uehara & Park, 2008]. Das Modell "drei für eins" von Höltje (1998) geht davon aus, dass drei neue Ketten eingebaut und eine alte Kette entfernt wird. Durch die Überexpression des MreBCD-Komplexes könnte es sein, dass die Zusammensetzung der Peptidoglykan-Ketten gestört ist und dass dies das Signal für das Rcs-Phosphorelay-System ist. Eine Visualisierung der Zellmaschinerie und der Ultrastrukturen in verschiedenen Mutanten-Hintergründen durch die Elektron-Cryo-Tomographie (ECT) könnten veränderte Zusammensetzungen in der Zellhülle aufdecken.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die beiden benachbarten Genloci *csrD* und *mreBCD* in dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* das Phosphorelay-System RcsFCDB beeinflussen. Der genaue Mechanismus des unabhängigen Wirkens dieser beiden Komponenten konnte nicht geklärt werden, aber sowohl das Innenmembran-ständige Protein CsrD, als auch der Innenmembran-assozierte Komplex MreBCD wirken über die Außenmembrankomponente RcsF. Das Aktin-Homolog MreB wirkt möglicherweise durch eine veränderte Peptidoglykansynthese-Maschinerie auf dieses Zweikomponenten-System. Das degenerierte GGDEF/EAL-Domänen-Protein CsrD hingegen beeinflusst möglicherweise durch die Veränderung des Gehalts kleiner regulatorischer RNAs die Zellgröße und/oder die Zusammensetzung der Außenmembran und übt so einen Einfluss auf das Rcs-Phosphorelay-System aus.

## 5.3 Der Biofilmregulator CsgD und die kleine RNA RprA bilden ein gemeinsames Regulon

Zu Beginn dieser Arbeit war durch die Transkriptom-Analysen von S. Busse (2009) bekannt, dass RprA und CsgD viele Gene gemeinsam, aber invers regulieren. Zur weiteren Charakterisierung dieses Regulons wurden kombinierte gesamtgenomische Mikroarray-Analysen durchgeführt.

Mit Hilfe von einer Kombination aus ChIP- und Microarray-Analyse konnten Ogasawara *et al.* (2011) mehr als 20 verschiedene Ziele für CsgD identifizieren. Sie vermuten für CsgD eine duale Rolle bei der Förderung der Biofilmbildung und der Inhibierung der Flagellenproduktion. Die in dieser Arbeit erhaltenden Gene, die durch CsgD reguliert werden (Abb. 4.15), weisen in dieselbe Richtung. Die Diskrepanz zwischen den erhaltenen Zielgene von CsgD könnte durch die Verwendung unterschiedlicher Laborwildtyp-Stämme erklärt werden. Während für die Versuche dieser Arbeit der *E. coli K-12*-Stamm W3110 als Grundlage diente, verwendeten Ogasawara *et al.* (2011) den Stamm BW25113. Die unterschiedliche Regulation des Übergangs von der motilen in die sessile Phase erklären möglicherweise auch das Auftreten unterschiedlicher Gene bei der Regulation der CsgD-abhängigen Biofilmbildung.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen CsgD-regulierten Gene können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die je ein spezifisches Regulationsmuster repräsentieren. In Gruppe I gehören all die Gene, die RprA-unabhängig durch CsgD reguliert sind. Die Gene dieser Gruppe werden alle positiv durch CsgD reguliert. In diese Gruppe lassen sich die Curli-Struktur- und Transportproteine einordnen. Die zweite Gruppe setzt sich aus Genen zusammen, die durch CsgD und RprA reguliert werden. Zu dieser Gruppe gehören flagellare und chemotaktische Gene. Sie werden eindeutig über RprA, und vermutlich indirekt durch CsgD, reguliert. Diese Gruppe repräsentiert die wichtige Rolle dieser beiden Komponenten bei der Umschaltung von der motilen in die sessile Lebensphase. Die dritte und letzte Gruppe umfasst schließlich Gene, die ausschließlich im *rprA*-defizienten Hintergrund durch CsgD reguliert werden. Die Gene dieser Gruppe werden, wie die Gene der ersten Gruppe positiv durch CsgD reguliert. Die Gene dieser Gruppe werden möglicherweise durch andere kleine RNAs reguliert. Da die Bindestelle von RprA in der 5' UTR der *csgD*-mRNA auch von den sRNAs McaS und GcvB erkannt wird [Vogel & Boehm, 2012], kann in der Abwesenheit von RprA die *csgD*-mRNA von einer anderen sRNAs gebunden werden. Dies könnte den Einfluss auf die Genexpression unter diesen Bedingungen erklären. Da zu dieser Gruppe auch Gene des Propionat-Metabolismus zählen, wird die Annahme, dass weitere sRNAs beteiligt sind, bestätigt. Dabei könnte es sich um sRNAs handeln, die eine regulatorische Funktion beim Stoffwechsel haben, wie CsrB und CsrC (Glykolyse und Gluconeogenese), GcvB (Aminosäurestoffwechsel) oder McaS (PGA-Synthese). Für die genaue Aufklärung sind weitere Transkriptom-Analysen notwendig.

### 5.3.1 Die duale Regulation durch *csgD*-mRNA und CsgD Protein

Durch die gesamtgenomische Mikroarray-Analyse zu CsgD im Wildtyp- oder *rprA*-defizienten Hintergrund konnte gezeigt werden, dass CsgD unabhängig von RprA agieren kann. Ob diese Gene direkt vom CsgD-Protein abhängen, sollte durch eine weitere Transkriptom-Analyse mit von seinem Promotor und seiner 5'UTR, unabhängig überexprimiertem CsgD gezeigt werden. Diese Analyse wurde zusätzlich im *rprA*- und *csgD*-defizienten Hintergrund durchgeführt, um eventuelle Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Ergebnisse zeigen klar, dass Gene sowohl durch das CsgD-Protein, als auch durch die *csgD*-mRNA (Abb. 4.16) reguliert werden.

Zu den Genen, die durch das CsgD-Protein reguliert werden, gehören unter anderem, die schon bekannten CsgD-Ziele *csgBAC* und *yaiC*. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zum RprA / CsgD-Kontrollnetzwerk stellt *csgA* ein besonderes Gen dar. Normalerweise zeigen Gene, die in einem gemeinsamen Operon strukturiert sind, unterschiedliche Signale in den Mikroarray-Analysen. Das erste Gen liefert normalerweise das stärkste Signal und die folgenden Gene eher geringere Signale (AG Hengge, unveröffentlicht). Für das *csgBAC*-Operon scheint diese nicht der Fall zu sein. Das *csgA*-Gen zeigt durchgehend eine stärkere Antwort als das erste Gen des Operons *csgB*. Möglicherweise unterliegt *csgA* einer doppelten Regulation einmal durch den Promotor des Operons über CsgD und zum anderen eine Regulation auf mRNA-Ebene durch RprA (Anhang Tab. A1, A2, A4, A5, A6). Ein weitere Hinweis auf diese additive Wirkung auf *csgA* tritt bei der Analyse mit dem ektopisch exprimierten CsgD-Protein im *rprA*- und *csgD*-defizienten Hintergrund auf, denn hier ist kein Unterschied bei der Antwort von *csgB* und *csgA* feststellbar (Anhang Tab. A3).

Auch das Gen *yaiC* stellt einen besonderen Kandidaten dar. Dieses Gen konnte den bisher durchgeführten gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen nicht als durch CsgD reguliert nachgewiesen werden. Die hier durchgeführten Transkriptom-Analysen legen die Vermutung

nahe, dass *yaiC* zum einen direkt durch das CsgD-Protein und zum anderen indirekt über die *csgD*-mRNA reguliert wird. YaiC kann also erst richtig in der Abwesenheit der *csgD*-mRNA und der gleichzeitigen Anwesenheit des CsgD-Proteins, exprimiert werden. Durch diese komplexe Regulation wird möglicherweise einer verfrühten Cellulose-Produktion entgegengewirkt. Welche kleine RNA an das *csgD*-Transkript und die *yaiC*-mRNA bindet und diese kontrolliert muss noch geklärt werden.

Das Auftreten weitere Gene unter den gewählten Bedingungen, die in der Analyse der Mutanten nicht vertreten sind, kann zum einen durch die zeitliche Verschiebung der Probennahme und zum anderen durch Erhöhung des CsgD-Proteingehalts in der Zelle erklärt werden. Die Transkriptom-Analysen zu CsgD im *csgD*- und/oder *rprA*-defizienten Hintergrund wurden in der Stationärphase durchgeführt und die mit dem überexprimierten CsgD wurden früher, beim Übergang in die Stationärphase, bearbeitet. Die zeitliche Verschiebung ergab sich durch die Ergebnisse der Diplomarbeit von S. Donath (2010), die daraufhin wiesen, dass das CsgD-Regulon zum Zeitpunkt des Übergangs in die Stationärphase, vollständig aktiv ist.

Zu den Genen, die durch die *csgD*-mRNA reguliert werden, gehören unter anderem der flagellare Gene und Transkriptionsfaktor *ybjK*. Diese Gene werden vermutlich durch die kleinen RNAs, die an die *csgD*-mRNA binden, reguliert.

Die Daten dieser Arbeit zeigen also, dass die *csgD*-mRNA zum einen "wie ein Schwamm" kleine RNAs abfängt und diese so reguliert und zum anderen dass das CsgD-Protein als Transkriptionsfaktor aktiv ist.

### 5.3.2 Weitere Zielgene der kleinen RNA RprA

Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob RprA noch weitere Ziele neben RpoS [Majdalani *et al.*, 2002] und CsgD [Mika *et al.*, 2012] hat. Die Transkriptom-Analyse des RprA-Regulons zu definierten Zeitpunkten des Wachstums zeigt, dass RprA unabhängig von CsgD weitere Gene beeinflusst (Abb. 4.18). Unter Bedingungen unter denen beispielsweise das Rcs-Phosphorelay-System aktiviert wird, welches die Expression der kleinen RNA RprA induziert, könnte eine schnelle Reprimierung von CsgD notwendig sein. Anschließend könnten dann weitere Ziele durch RprA bedient werden. Hier wirken RcsAB und die kleine RNA RprA dann zusammen, um die Expression von CsgD zu inhibieren. Auch die Wachstumsphasen *per se* scheinen einen wichtigen Einfluss auf die Regulation dieses Systems zu haben. So stabilisiert RprA den Stresssigmafaktor RpoS

[Majdalani *et al.*, 2001] und dieser aktiviert dann beim Übergang in die Stationärphase die Transkription von csgD [Weber et al., 2006]. Die Beobachtung, dass später in der Stationärphase die csgD-Transkription wieder nach lässt (verminderte RNA-Mengen, Abb. 4.18) führten zu der Annahme, dass RprA unter diesen Bedingungen weitere Ziele regulieren könnte. Die Transkriptom-Analyse in der späten Stationärphase (OD<sub>578nm</sub> 4 plus 5 Stunden) zeigt, dass viele der hier als reguliert aufgetretenen Gene auch bei der Analyse des RprA-Regulons von S. Busse (2009) vertreten sind (Tab. 4.1 und 4.2). Diese Ergebnisse sind ein weiteres Beispiel für wichtige Rolle des Rcs-Phosphorelay-Systems bei der Reifung des Biofilms.

Die gesamtgenomischen Mikroarray-Analysen zum gemeinsamen Regulon von CsgD und RprA weisen insgesamt daraufhin, dass nicht nur kleine RNAs eine wichtige regulatorische Funktion als RNA übernehmen. Die Daten zeigen, dass die *csgD*-mRNA wahrscheinlich kleine RNAs sequestriert und damit eine duale regulatorische Funktion ausübt: direkt als csgD-mRNA sowie als dann translatiertes CsgD-Protein und Transkriptionsfaktor.

### 5.3.3 die c-di-GMP-Kontrollmodule YdaM/YciR und YegE/YhjH

Zu Beginn dieser Arbeit war durch die Studien von Pesavento *et al.* (2008) und Weber *et al.* (2006) bekannt, dass die Transkription von *csgD* durch zwei c-di-GMP-Kontrollmodule reguliert wird. Zum einen durch das sehr spezifisch wirkende YdaM/YciR-System und zum anderen das global wirkende YegE/YhjH-System. Durch gesamtgenomische Mikroarray-Analysen sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob zum einen das YdaM/YciR-System neben CsgD (Weber *et al.*, 2006) noch weitere Ziele besitzt und zum anderen, welche anderen Ziele das global wirkende YegE/YhjH-System, neben CsgD und der flagellaren Bremse YcgR (Pesavento *et al.*, 2008) hat. Die Analyse des YdaM/YciR-Systems zeigt eindeutig, dass CsgD das einzige Ziel für durch YdaM und YciR kontrolliertes c-di-GMP ist (Tabelle 4.3). Das YdaM/YciR-Kontrollmodul wirkt also sehr spezifisch. Die Analyse des YegE/YhjH-Systems bestätigt die Annahme, dass neben motilen Zielen und CsgD auch noch weitere Gene kontrolliert werden. Dieses c-di-GMP-Kontrollmodul wirkt also global.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass verschiedene c-di-GMP-Kontrollmodule unterschiedliche Aufgaben in der Zelle übernehmen. Die Transkriptionsanalysen zu den beiden c-di-GMP-Kontrollmodulen YdaM/YciR und YegE/YhjH sind ein weiterer Hinweis dafür, dass es innerhalb der Zelle verschiedene c-di-GMP-Kompartimente geben muss. Weitere Analysen sind notwendig, um das gesamte c-di-GMP-Netzwerk besser zu verstehen.

### 6. Literaturverzeichnis

Adler J, Templeton B (1967). The effect of environmental conditions on the motility of Escherichia coli. J Gen Microbiol. 46(2):175-84.

Agladze K, Jackson D, Romeo T. (2003). Periodicity of cell attachment patterns during Escherichia coli biofilm development. J. Bacteriol. 185:5632–5638

Agladze K, Wang X, Romeo T. (2005). Spatial periodicity of Escherichia coli K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. J. Bacteriol. 187:8237–8246.

Alba, B. M. and C. A. Gross (2004). Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. Mol Microbiol **52**(3): 613-9.

Aldridge P, Hughes KT (2002). Regulation of flagellar assembly. Curr Opin Microbiol.; 5(2):160-5.

Aldridge P., Paul R., Goymer P., Rainey P. and Jenal U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 47: 1695–1708

Alyahya SA, Alexander R, Costa T, Henriques AO, Emonet T, Jacobs-Wagner C. (2009). RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(4):1239-44.

Amikam D. and Galperin M.Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22: 3-6

Amsler CD, Cho M, Matsumura (1993). Multiple factors underlying the maximum motility of Escherichia coli as cultures enter post-exponential growth. J Bacteriol. 175(19):6238-44.

Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli. Curr Biol 11(12);941-50. PMID: 11448770

Arnosti, D. N. and Chamberlin, M. J. 1989. Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**: 830-834.

Bachmann B J (1972) Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. Bacteriol Rev. 36(4): 525–557.

Babu, M. M., and S. A. Teichmann. (2003). Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 31:1234-1244.

**Bansal T**, *et al.* (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on Escherichia coli O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. Infect. Immun. 75:4597–4607

**Barembruch, C., and R. Hengge. 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.,

**Barker, C.S., Prus, B.M., Matsumura, P. (2004):** Increased Motility of *Escherichia coli* by Insertion Sequence Element Integration into the Regulatory Region of the *flhD* Operon. J. Bacteriol. **186** (22): 7529-7537

**Barnhart MM, Chapman MR. (2006).** Curli biogenesis and function. Annu Rev Microbiol. 60:131-47.

Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008). Escherichia biofilms. Curr Top Microbiol Immunol 322: 249-289

**Ben Nasr A., Olsen A., Sjöbring U., Müller-Esterl W. and Björck L. (1996).** Assembly of human contact phase proteins and release of bradikinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20:** 927-935.

**Bendezú FO, de Boer PA. (2008).** Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in mre and mrd shape mutants of Escherichia coli. J Bacteriol. 190(5):1792-811.

Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P., LinChao, S. and Cohen S.N. 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at singlegene resolution using twocolor fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 96979702.

**Beveridge, T. J.** 1988. The bacterial surface: general considerations towards design and function. Can. J. Microbiol. **34:**363–372

Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A. and Yildiz F.H. (2006). Transcriptome and phenotopic responses of *Vibrio cholerae* to increase cyclic di-GMP-level. *J. Bac.* 188: 3600-3613

**Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1991).** FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli. Nature 354, 161–164.

Bijlsma, J. J. and E. A. Groisman (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. Trends Microbiol 11(8): 359-66.

Boehm A, Steiner S, Zaehringer F, Casanova A, Hamburger F, Ritz D, Keck W, Ackermann M, Schirmer T, Jenal U (2009). "Second messenger signaling governs Escherichia coli biofilm induction upon ribosomal stress." Mol Microbiol 72(6);1500-16.

**Boehm A, Vogel J.(2012).** The *csgD-mRNA* as a hub for signal integration via multiple small RNAs. Mol Microbiol.;84(1):1-5.

Boehm A., M. Kaiser, H. Li, C. Spangler, C. A. Kasper, M. Ackermann, V. Kaever, V. Sourjik, V. Roth, U. Jenal (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* 141, 107–116

**Bowden GHW, Li YH**. 1997. Nutritional influences on biofilm development. Adv. Dent. Res. 11:81–99

Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13(1):20-6.

**Brantl S. (2009).** Bacterial chromosome-encoded small regulatory RNAs. Future Microbiol. 4(1):85-103.

**Braun V, Mahren S, Ogierman M.** 2003. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. Curr Opin Microbiol. Apr;6(2):173-80.

**Brombacher E, Dorel C, Zehnder AJ, Landini P (2003).** "The curli biosynthesis regulator CsgD coordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in Escherichia coli." Microbiology 149(Pt 10);2847-57.

**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:** 2027-2037

Brown, M.R. Jr. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century?. J. *Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*. **42:** 487-495.

Brown, P.K., Dozois, C.M., Nickerson, C.A., Zuppardo, A., Terlonge, J., and Curtiss III, R. (2001). MlrA, a novel regulator of curli (Agf) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Mol. Microbiol. *41*, 349-363.

**Busse S. (2009).** Unorthodoxe Mechanismen der Regulation innerhalb von Zweikomponentensystemen in *Escherichia coli*. Dissetation FU Berlin, AG Hengge

Callewaert, L., K. G. A. Vanoirbeek, I. Lurquin, C. W. Michiels, and A. Aertsen. 2009. The Rcs two-component system regulates expression of lysozyme inhibitors and is induced by exposure to lysozyme. *J. Bacteriol.* 191:1979-1981.

**Castanié-Cornet MP, Cam K, Jacq A. (2006).** RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in Escherichia coli. J Bacteriol. 188(12):4264-70.

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. *PNAS* 101: 17084–17089

**Chapman EJ, Carrington JC. (2007).** Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. Nat Rev Genet. 8(11):884-96.

**Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D. (2010)**. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. J. Bacteriol. 192:2009–2012

Chevance, F. F. V., and K. T. Hughes. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:455–465

**Chilcott GS, Hughes KT (2000).** Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. Microbiol Mol Biol Rev. 64(4):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.* 

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**: 30829–30837

Christen, M., B. Christen, M. G. Allan, M. Folcher, P. Jeno, S. Grzesiek and U. Jenal (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**(10): 4112-4117

Chung, C. T., Niemala, S. L. and Mitter, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2172-2175.

**Clarke DJ. (2010).** The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway. Future Microbiol. 5(8):1173-84.

Costerton, J.W. Lewandowski, Z. Caldwell, D.E. Korber D.R. and Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49:** 711–745

**D'Argenio D.A. and Miller S.I. (2004).** Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiol.* **150:** 2497-2502

**Danese PN, Pratt LA, Kolter R. (2000).** Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. J. Bacteriol. 182:3593–3596.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherischia coli* K-12 using PCR products *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645

Demerec and Hartman, (1959) Complex loci in microorganisms. Annu. Rev. Microbiol. 13 377-406.

**Dietzsch, J., Gehlenborg, N., and Nieselt, K. (2006)** Mayday – a microarray analysis workbench. *Bioinformatics* **22:** 1010–1012.

Domingue G.J. SR. and Hellstrom W.J. (1998). Prostatitis. Clin. Microbiol. Rev. 11: 604-613

**Domínguez-Escobar J, Chastanet A, Crevenna AH, Fromion V, Wedlich-Söldner R, Carballido-López R. (2011).** Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. Science. 333(6039):225-8.

**Donachie, W.D., and Begg, K.J. (1989).** Cell length, nucleoid separation, and cell division of rod-shaped and spherical cells of Escherichia coli. J. Bacteriol. 171, 4633–4639.

**Donath S. (2010).** Untersuchungen zur Inhibition von Expression und Aktivität von CsgD und der Curli-Biosynthese in Escherichia coli. Diplomarbeit FU Berlin

**Dorel C, Vidal O, Prigent-Combaret C, Vallet I, Lejeune P. (1999).** Involvement of the Cpx signal transduction pathway of E. coli in biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 178:169–175.

**Dubey, A.K., Baker, C., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005).** RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA–RNA interaction. *RNA* **11:** 1579–1587.

**Duncan MJ, Mann EL, Cohen MS, OfekI, Sharon N, Abraham SN, (2005).** The distinct binding specificities exhibited by enterobacterial type I fimbriae are determined by their fimbrial shafts. J Biol Chem 280: 37707-37716

**Ebel W, Trempy JE (1999).** "Escherichia coli RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression." J Bacteriol 1999;181(2);577-84

**Erickson, J. W. and C. A. Gross (1989).** "Identification of the sigma E subunit of Escherichia coli RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in hightemperature gene expression." Genes Dev **3**(9): 1462-71.

Fang X., M. Gomelsky (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating fl agellar motility. *Mol. Microbiol.* 76, 1295–1305

Ferenci, T. 2001. Hungry bacteria—definition and properties of a nutritional state. *Environ. Microbiol.* **3**:605–611

Ferreira, R. B., L. C. Antunes, E. P. Greenberg and L. L. McCarter (2008). *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. J Bacteriol **190**(3): 851-860.

**Ferrieres, L., and D. J. Clarke (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**:1665–1682.

Flemming HC, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8:623–633.

Fortune D.R., Suyemoto M. and Altier C. (2006). Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* Serova Typhimurium. *Infect. & Immun.* 74: 331-339

**Francez-Charlot A, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C, Cam K. (2005)** Osmotic regulation of the Escherichia coli bdm (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. J Bacteriol. 187(11):3873-7.

**Francez-Charlot A, Laugel B, Van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, et al. (2003).** RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* 49:823–32

**Frye J., Karlinsey J.E., Felise H.R., Marzolf B., Dowidar N., McClelland M. and Hughes K.T.** (2006). Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bac.* 188: 2233-2243

**Fux CA, Costerton JW, Stewart PS and Stoodley P (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 13: 34-40

Galperin M.Y., Nikolskaya A.N. and Koonin E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic twocomponent signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 11-21

Galperin MY, Higdon R, Kolker E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. Mol Biosyst. 6(4):721-8.

Garner EC, Bernard R, Wang W, Zhuang X, Rudner DZ, Mitchison T. (2011). Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in B. subtilis. Science. 333(6039):222-5..

**Geissler, B., Shiomi, D., and Margolin, W. (2007).** The ftsA\* gain-of-function allele of Escherichia coli and its effects on the stability and dynamics of the Z ring. Microbiology 153, 814–825

**Genevaux P, Muller S, Bauda P. (1996).** A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of Escherichia coli K-12 with altered adhesion properties. FEMS Microbiol Lett. 142(1):27-30.

Gerstel U and Römling U. (2003). The csgD promotor, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium. Res. Microbiol.* 154: 659-667

Gerstel U. and Römling U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environ. Microbio.* **3**: 638-648.

Gerstel, U., Park, C. & Romling, U. (2003). Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. Mol Microbiol 49, 639–654.

Girgis, H. S., Liu, Y., Ryu, W. S. & Tavazoie, S. (2007). A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genetics* **3**, e154.

Gitai Z, Dye N, Shapiro L. (2004) An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 8;101(23):8643-8.

**Goller C, Wang X, Itoh Y, Romeo T. (2006).** The cation-responsive protein NhaR of Escherichia coli activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly- $\beta$ -1,6-*N*-acetyl-d-glucosamine. J. Bacteriol. 188:8022–8032

Gomelsky M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! Mol Microbiol. 79(3):562-5.

Görke B, Vogel J. (2008). Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. Genes Dev. 22:2914–2925.

**Gottesman S, Storz G (2011).** Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1;3(12).

Gottesman S. (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. Trends Genet. 21:399–404.

Goulter RM, Gentle IR, Dykes GA. (2009). Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of Escherichia coli to abiotic surfaces as an example. *Lett. Appl. Microbiol.* 49:1–7.

Grant, W. D., I. W. Sutherland, and J. F. Wilkinson. (1969). Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the *Enterobacteriaceae*. J. Bacteriol. 100:1187–1193

Gross, C. A., Chan, C. L. and Lonetto, M. A. 1996. A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **351:** 475-482.

**Gross, C.A., Chan, C. Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, I. And Young, B.** 1998. The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **63:** 141-155.

Gruber, T. & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441-466.

Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Regulatory interactions of Csr components: The RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 183: 6017–6027.

Guillier, M., and Gottesman, S. (2006) Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol* 59: 231–247.

**Gupta, K., P. Kumar and D. Chatterji (2010).** Identification, Activity and Disulfide Connectivity of C-di-GMP Regulating Proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One **5**(11): e15072

Hagiwara, D., M. Sugiura, T. Oshima, H. Mori, H. Aiba, T. Yamashino, and T. Mizuno. (2003). Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185:5735-5746.

Harlow, E. and D. Lane (1999). Using antibodies. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner. B.L., Mori, H., Horiuchi, T. (2006): Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. Mol. Syst. Biol. 2006.0007 doi:10.1038/msb4100049

Hengge R (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat Rev Microbiol. 7(4):263-73.

Hengge R (2010). Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. Sci Signal. 2010 Nov 23;3(149):pe44.

**Hengge, R. 2011**. The general stress reponse in gram-negative bacteria, p. 251–289. *In* G. Storz and R. Hengge (ed.), *Bacterial Stress Responses*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

**Hengge-Aronis R**. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiol Mol Biol Rev. 66(3):373-95,

**Hengge-Aronis R. (2002).** Stationary phase gene regulation: what makes an Escherichia coli promoter sigmaS-selective? Curr Opin Microbiol. 5(6):591-5.

**Hengge-Aronis R. 1996**. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in Escherichia coli. Mol Microbiol. 21(5):887-93

Hickman J. W., C. S. Harwood (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a cdi-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.*69, 376–389

Holmqvist, E., Reimegard, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Romling, U., and Wagner, E.G. (2010) Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. *EMBO J* 29: 1840–1850.

Höltje JV (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli. Microbiol Mol Biol Rev. 62(1):181-203.

Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E. and Romeo T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. J. *Bacteriol.* **184**: 290–301.

Jenal U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate come of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria?. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 185-191

Jenal U. and Malone J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP Signaling in bacteria. Annu. Rev. Genet., 40: 385-407

Jenal U. and Malone J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP Signaling in bacteria. Annu.

Johnson MD, Burton NA, Gutiérrez B, Painter K, Lund PA. (2011). RcsB is required for inducible acid resistance in Escherichia coli and acts at gadE-dependent and -independent promoters. J Bacteriol. 193(14):3653-6

**Jonas K, Edwards AN, Simm R, Romeo T, Romling U, Melefors O (2008).** "The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins." Mol Microbiol 70(1);236-57. PMID: 18713317

**Jonas K, Melefors Ö. (2009)**. The Escherichia coli CsrB and CsrC small RNAs are strongly induced during growth in nutrient-poor medium. FEMS Microbiol. 12:524–540

Jonas K., Tomenius H, Römling U., Georgellis D. and Melefors Ö. (2006). Identification of YhdA as a regulator of the Escherichia coli carbon storage regulation system *FEMS Microbiol Lett* 264: 232–237

Jørgensen, M.G., Nielsen, J.S., Boysen, A., Franch, T., Moller-Jensen, J., and Valentin-Hansen, P. (2012) Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84: 36–50.

Joseph LA, Wright AC. (2004). Expression of Vibrio vulnificus capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186:889–893

**Jubelin G**, *et al.* (2005). CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in Escherichia coli. J. Bacteriol. 187:2038–2049

Kader A., Simm R., Gerstel U., Morr M. and Römling U. (2006). Hierarchical involvment of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica serovar Typhimurium. Mol. Microbiol.* **60**: 602-616

**Kalir, S., and U. Alon.** 2004. Using a quantitative blueprint to reprogram the dynamics of the flagella gene network. *Cell* **117:**713–720

Kaper JB, Nataro JP, Mabley HL (2004). Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2: 123-140

**Karatan E and Watnick P (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev. 73(2):310-47

Karczmarek A, Martínez-Arteaga R, Alexeeva S, Hansen FG, Vicente M, Nanninga N, den Blaauwen T. (2007). DNA and origin region segregation are not affected by the transition from rod to sphere after inhibition of Escherichia coli MreB by A22. Mol Microbiol. 65(1):51-63.

Kazmierczak B.I., Lebron M.B. and Murray T.S. (2006). Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeroginosa*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1026-1043

**Kierek K, Watnick PI. (2003).** The Vibrio cholerae O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca<sup>2+</sup>-dependent biofilm development in sea water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14357–14362

Kimura S., Chen H.P., Saxena I.M., Brown R.M. Jr. and Itoh, T. (2001). Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. J. Bacteriol. 183: 5668-5674.

King SS, Young DA, Nequin LG, Carnevale EM. (2000). Use of specific sugars to inhibit bacterial adherence to equine endometrium in vitro. Am. J. Vet. Res. 61:446–449

Klauck, E., Typas, A., *and* Hengge, R. (2007) The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. Sci Prog 90: 103–127.

**Ko M, Park C (2000).** H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein. J Bacteriol. 182(16):4670-2. Erratum in: J Bacteriol 2000 182(21):6277.

**Kolmsee T. (2011).** Funktion von kleinen regulatorischen RNAs und der Codon-Verwendung bei der Regulation der RpoS ( $\sigma$ S)- Untereinheit der RNA-Polymerase in *Escherichia coli*. Dissertation FU Berlin

Kolter, R., Siegele, D.A., *and* Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. Annu Rev Microbiol 47: 855–874.

Krasteva PV, Fong JC, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MV, Yildiz FH, Sondermann H. (2010) Vibrio cholerae VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. Science. 327(5967):866-8.

**Kruse T, Bork-Jensen J, Gerdes K. (2005)** The morphogenetic MreBCD proteins of Escherichia coli form an essential membrane-bound complex. Mol Microbiol. 55(1):78-89.

Kruse T, Moller-Jensen J, Lobner-Olesen A, Gerdes K (2003). "Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in Escherichia coli." EMBO J 22(19);5283-92.

**Kuchma SL, O'Toole GA. (2000).** Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. Curr. Opin. Biotechnol. 11:429–433.

Kutsu, S., Santero, E., Keener, E., Popham, D. and Weiss, D. 1989. Expression of  $\sigma 54$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by common mechanism. Microbiol. Rev. **53**: 367-376

Lacey MM, Partridge JD, Green J (2010). "Escherichia coli K-12 YfgF is an anaerobic cyclic di-GMP phosphodiesterase with roles in cell surface re-modelling and the oxidative stress response." Microbiology. PMID: 20522491

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-5.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the  $\sigma S$  subunit of RNApolymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* 8, 1600-1612.

**Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1991.** Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor  $\sigma S$  (*rpoS*). *J. Bacteriol.* **173:**4474–4481

**Laubacher ME, Ades SE. (2008).** The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. J Bacteriol. 190(6):2065-74.

Le Quéré B and Ghigo JM (2009). BcsQ is an essential component of *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. Mol Micro 72(3): 724-740.

Leduc J. L., G. P. Roberts (2009). Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J. Bacteriol.* **191**,7121–7122

Lee J, Jayaraman A, Wood TK. (2007). Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. BMC Microbiol. 7:42

Lee, E. R., J. L. Baker, Z. Weinberg, N. Sudarsan and R. R. Breaker (2010). An allosteric selfsplicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. Science **329**(5993): 845-848.

Levi A. and Jenal U. (2006). Holdfast formation in motile swarmer cells optimizes surface attachment during *Caulobacter crescentus* development. J. Bac. 188: 5315-5318

Lim B., Beyhan S., Meir J. and Yildiz F.H. (2006) Cyclic –diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae:* modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 60: 331-348

Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston III, J.F., Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D.P., and Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 17502–17510.

Lopez D, Vlamakis H and Kolter R (2010). Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(7)

Löwe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial celldivision protein FtsZ. Nature 391, 203–206]

Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. and Bremer, E. (1994). Interaction of the nucleotid associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 269: 6578-6578

Luppens S.B., Reij M.W., Van der Heijden R.W., Rombouts F.M. and Abee T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4194-4200.

Ma Q, Wood TK. (2009). OmpA influences Escherichia coli biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ. Microbiol.* 11:2735–2746

**Ma, X., Ehrhardt, D.W., and Margolin, W. (1996).** Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living Escherichia coli cells by using green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12998–13003

Macnab R. M. (1996) Flagella and motility. in *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, *ed* Neidhart F. C., *et al.* (ASM Press, Washington, D.C.) 2nd ed. *pp* 123–145

Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. Mol Microbiol 39(5);1382-94.

Majdalani N, Gottesman S. (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. Annu Rev Microbiol. 59:379-405.

Majdalani N, Heck M, Stout V, Gottesman S. (2005). Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in Escherichia coli. J Bacteriol. 187(19):6770-8.

Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. Mol Microbiol. 46(3):813-26.

Malone JG, Williams R, Christen M, Jenal U, Spiers AJ, Rainey PB. (2007). The structure-function relationship of WspR, a Pseudomonas fluorescens response regulator with a GGDEF output domain. Microbiology. 153(Pt 4):980-94.

Mandin P, Gottesman S (2010). Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. EMBO J. PMID: 20683441

Marden JN, Dong Q, Roychowdhury S, Berleman JE, Bauer CE. (2011). Cyclic GMP controls Rhodospirillum centenum cyst development. Mol Microbiol. 79(3):600-15.

Marshall JC. (1988). Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. Can. J. Microbiol. 34:503–506

Massé E, Escorcia FE, Gottesman S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. Genes Dev. 17(19):2374-83.

Matin, A., Auger, E.A., Blum, P.H., and Schultz, J.E. (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. Annu Rev Microbiol 43: 293–316.

Matsushika, A., and T. Mizuno. (1998). The structure and function of the histidine-containing phosphotransfer (HPt) signaling domain of the *Escherichia coli* ArcB sensor. J. Biochem. 124:440–445.

Méndez-Ortiz M.M., Hyodo M., Hayakawa and Membrillo-Hernández J. (2006). Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high level of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **281:** 8090-8099

Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2006) Comprehensive alaninescanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem* 281: 31832–31842.

**Merrick, M. J.** 1993. In a class of its own – the RNA Polymerase sigma factor  $\sigma 54$  ( $\sigma N$ ). Mol. Microbiol. **10:** 903-909.

Mika F, Busse S, Possling A, Berkholz J, Tschowri N, Sommerfeldt N, Pruteanu M, 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(1):51-65.

**Mika F. (2006)**. Regulation des generellen Stresssigma-Faktors  $\sigma^{s}$  (RpoS) durch Zwei-Komponenten-Systeme und cAMP-CRP in *Escherichia coli*. *Dissertation* FU Berlin AG Hengge

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. Cell Microbiol. (8):1122-9.

Mizuno T (1997). Compilation of all genes encoding twocomponent phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161–168.

Monroe D (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoS Biol 5(11).

N. Sudarsan, E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link, R. R. Breaker (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**, 411–413

Navarro MV, Newell PD, Krasteva PV, Chatterjee D, Madden DR, O'Toole GA, Sondermann H. (2011). Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. PLoS Biol. 1;9(2)

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, and M. Schaechter. 1990. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach, p. 442–462. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.

**Newell PD, Monds RD, O'Toole GA (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(9):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: 6408-6411.

Nilsen T, Yan AW, Gale G, Goldberg MB (2005). Presence of multiple sites containing polar material in spherical Escherichia coli cells that lack MreB. J Bacteriol. 187(17):6187-96.

**O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79

**Ogasawara H, Hasegawa A, Kanda E, Miki T, Yamamoto K, Ishihama A (2007).** Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. J Bacteriol. 189(13):4791-9.

**Ogasawara H, Yamada K, Kori A, Yamamoto K, Ishihama A (2010).** Regulation of the Escherichia coli csgD promoter: interplay between five transcription factors. Microbiology. 156(Pt 8):2470-83.

**Ogasawara, H., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2011)** Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J Bacteriol* **193:** 2587–2597

**Olsén A, Jonsson A, Normark S. (1989).** Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli. Nature. 338(6217):652-5.

**Ophir, T., and D. L. Gutnick. (1994).** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol. **60**:740–745.

Orme R., Douglas I.C.W., Rimmer S. and Webb M. (2006). Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics*. 6: 4269-4277

**Otto K, Silhavy TJ. (2002)**. Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:2287–2292

**Palmer J, Flint S, Brooks J**. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34:577–588.

**Park JT**, **Uehara T** (2008). How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). Microbiol Mol Biol Rev. 72(2):211-27,

**Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF, Harshey RM (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(1):128-39.

**Paul R., Weiser S., Amiot N. C., Chan C., Schirmer T., Giese B., and Jenal U. (2004).** Cell cycledependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes. Dev.* **18:**715–727

**Pernestig, A.K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., and Melefors,** Ö. (2003). The *Escherichia coli* BarA–UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* 185: 843–853.

**Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A. & Hengge, R.** (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 22, 2434-2446.

Peters, J.E., Thate, T.E., Craig, N.L. (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array. J. Bacteriol. 185 (6): 2017-2021

**Petrova OE**, **Sauer K**. (2012) Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. J Bacteriol. 194(10):2413-25.

Pfennig, N. & Wagener, S. (1986) An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. J. Microbiol. Meth. 4: 303-306

Powell, B. S., Court, D. L., Nakamura, Y., Rivas, M. P. and Tournbough, C. L. (1994). Rapid conformation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucl. Acids. Res.* 25: 5765-5766

Pratt L.A. and Kolter R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-293

Pratt L.A. and Kolter R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 598-603

**Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thie TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environ Microbiol 2: 450-464

**Pressler, U., H. Staudenmaier, et al.** (1988). Genetics of the iron dicitrate transport system of Escherichia coli. J Bacteriol **170**(6): 2716-24.

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*, 7213–7223.

**Prouty A.M., Schwesinger W.H. and Gunn J.S. (2002).** Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **70:** 2640-2649.

**Prüß B**, *et al.* (2010). Environmental and genetic factors that contribute to Escherichia coli K-12 biofilm formation. Arch. Microbiol. 192:715–728

Prüß B.M., Besemann C. Denton A. and Wolfe A.J. (2006). A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. J. Bac. 188: 3731-3739
**Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV (2009).** The Small RNA GcvB Regulates sstT mRNA Expression in Escherichia coli. J Bacteriol 191(1):238-48. PMID: 18952787

Rao, F., Y. Yang, Y. Qi and Z. X. Liang (2008). Catalytic mechanism of cyclic di-GMP specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **190**(10): 3622-3631.

**Reisner A, Höller BM, Moli S, Zechner EL (2006).** Synergistic effects in mixed Escherichia coli biofilms: conjugative plasmid transfer dreives biofilm expansion. J Bacteriol 188: 3582-3588

**Reynolds, A.E., Mahadevan, S., LeGrice, S.F.J., Wright, A. (1984):** Enhancement of Bacterial Gene Expression by Insertion Elements or by Mutation in a CAP.cAMP Binding Site. J. Mol. Biol. **191**: 85-95

**Robbe-Saule, V., Jaumouille, V., Prevost, M.-C., Gaudagnini, S., Talhouarne, C., Mathout, H., Kolb, A. & Norel, F.** (2006). Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol 188, 3983*–3994.

Robinson L.S., Ashman E.M., Hultgren S.J. and Chapman M.R. (2006). Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol. Microbiol.* **59**: 870-881

**Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P. (2012).** Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. Environ Microbiol. 2012 Jun 5.

**Romeo T, Vakulskas CA, Babitzke P. (2012).** Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. Environ Microbiol. 2012 Jun 5. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02794.x.

**Römling U. (2002)**. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol*.**153:** 205-212.

**Römling U. (2005).** Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 1234–1246

**Römling U. (2008).** Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. Sci Signal. 2008 Aug 19;1(33):pe39.

**Römling U. (2011).** Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. Environ Microbiol. 2011 Oct 31.

**Römling U., and Rohde M. (1999).** Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS. Microbiol. Lett.* **180:** 91-102.

**Römling U., Bian Z., Hammer M., Sierralta W.D. and Normark, S. (1998a).** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* **180:** 722-731

**Römling U., Rohde M., Olsen A., Normark S. and Reinköstner, J. (2000).** *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36:** 10-23.

**Römling U., Sierralta W.D., Eriksson, K. and Normark, S. (1998b).** Multicellular and aggregative behaviour of Salmonella typhimurium strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Mol. Microbiol.* **28:** 249-264.

Ross P, Mayer R, Benziman M (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol Rev. 55(1):35-58.

**Ross P., Mayer R., Weinhouse H., Amikam D., Huggirat Y.,** *et al.* (1990). The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J. Biol. Chem.* **265**: 18933–18943

Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., et al. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**:279–281

Rudd KE (1999). Novel intergenic repeats of *Escherichia coli* K-12. Res Microbiol 150(9-10);653-64.

Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, *et al.* (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6712–17

**Ryan RP, Tolker-Nielsen T, Dow JM. (2012)** When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. Trends Microbiol. 20(5):235-42.

**Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. (2007).** Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:644–648.

Ryjenkov D.A., Simm R., Römling U. and Gomelsky M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP. J. Biol. Chem.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Sanchez-Torres V, Hu H, Wood TK (2010). "GGDEF proteins YeaI, YedQ, and YfiN reduce early biofilm formation and swimming motility in Escherichia coli." Appl Microbiol Biotechnol. PMID: 21181144

Sauer FG, Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ (2000). Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. Curr Opin Microbiol 3: 65-72

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. (2002). Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184:1140–1154

SCHAECHTER M, MAALOE O, KJELDGAARD NO (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of Salmonella typhimurium. J Gen Microbiol. 19(3):592-606. No abstract available.

Schmidt A.J., Ryjenkov D.A: and Gomelsky M. (2005). The ubiqitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* 187: 4774-4781

Schmöe K, Rogov VV, Rogova NY, Löhr F, Güntert P, Bernhard F, Dötsch V (2011). Structural insights into Rcs phosphotransfer: the newly identified **RcsD**-ABL domain enhances interaction with the response regulator **RcsB**. Structure. 19(4):577-87.

Schulz, H. N., and B. B. Jørgensen. 2001. Big bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55:105–137

Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C. (2003). Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation. Genome Res. 2003 Feb;13(2):216-23.

Seshasayee AS, Fraser GM, Luscombe NM (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. Nucleic Acids Res. 38(18):5970-81

Sharma CM, Vogel J. (2009) Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. Curr Opin Microbiol. 12(5):536-46.

Shiba Y, Miyagawa H, Nagahama H, Matsumoto K, Kondo D, Matsuoka S, Matsumoto K, Hara H. (2012). Exploring the relationship between lipoprotein mislocalization and activation of the Rcs signal transduction system in Escherichia coli. Microbiology 158(Pt 5):1238-48.

Shih YL, Le T, Rothfield L (2003). Division site selection in Escherichia coli involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7865-70.

Silhavy, T. J., Berman, M. L., et al. (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 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(4): 1123-1134

Simons, R.W., Houman, F., Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. Gene 53: 85-96

Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J. and Kijne J.W. (1992). Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6: 2897-2903.

Smyth CJ, Marron MB, Twohig JM, Smith SG (1996). Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 16: 127-139

Solano C., Garcia B., Valle J., Berasain C., Ghigo J. M., Gamazo C. and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43: 793–808.

**Sondermann H, Shikuma NJ, Yildiz FH. 2012.** You've come a long way: c-di-GMP signaling. Curr Opin Microbiol 15(2):140-6.

Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin, and P. Bertin. 1999. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**:7500–7508

Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. J Bacteriol. 178(16):4885-93.

**Stewart PS and Franklin MJ (2008).** Physiological heterogeneity in biofilms. Nat Tev Microbiol. 6: 199-210

Stock A.M., Robinson V.L., and Goudreau P.N. (2000). Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69:183–215

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol. 56:187-209.

Storz G, Vogel J, Wassarman KM. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. Mol Cell. 43(6):880-91.

**Stout V, Torres-Cabassa A, Maurizi MR, Gutnick D, Gottesman S. (1991).** RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. J Bacteriol. 173(5):1738-47.

Stratmann T, Pul Ü, Wurm R, Wagner R, Schnetz K. (2012). RcsB-BglJ activates the Escherichia coli leuO gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. Mol Microbiol. 83(6):1109-23.

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 ans CsrC for degradation by Rnase E. *Genes Dev.* 20: 2605-2617

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **184**: 5130–5140.

**Takahashi, H. and T. Shimizu (2006).** Phosphodiesterase activity of Ec DOS, a hemeregulated enzyme from *Escherichia coli*, toward 3',5'-cyclic diguanylic acid is obviously enhanced by O2 and CO binding. Chem Lett **35**(8): 970-971.

**Takeda S, Fujisawa Y, Matsubara M, Aiba H, 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(2):440-50.

**Tanaka, K., Fakayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H.** 1993. Heterogeneity of the principle sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product,  $\sigma$ 38, is a second principle sigma factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 3511-3515.

Tani, T. H., A. Khodursky, et al. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary phase genes revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 99(21): 13471-6.

Tarutina M., Ryjenkov D.A. and Gomelski M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **281**(46): 34751-34758.

Thomason, M.K., Fontaine, F., De, N., and Storz, G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84: 17–35.

**Tischler A.D. and Camilli A. (2004).** Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**: 857–869

**Toutain CM, Caizza NC, Zegans ME, O'Toole GA. (2007).** Roles for flagellar stators in biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa. Res. Microbiol. 158:471–477

**Tschowri N, Busse S, Hengge R (2009).** "The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct antirepressor in a blue-light response of Escherichia coli." Genes Dev 23(4);522-34.

**Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA. (2011)**. Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. J Mol Biol. 15;407(5):633-9.

**Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EH, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez MA. (2009).** An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. Biochemistry.48(41):9764-74.

**Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W (2011).** From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. Nat Rev Microbiol. 2011 Dec 28;10(2):123-36.

**Uehara** T, **Park JT**. (2008). Growth of Escherichia coli: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. J Bacteriol. 190(11):3914-22.

**Urban JH, Vogel J. (2008).** Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. PLoS Biol. 6(3):e64.

**Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV (2000).** The gcvB gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in Escherichia coli. Mol Microbiol 37(4);856-68. PMID: 10972807

Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. Proc Natl Acad Sci U S A 98(26):15264-9.

van den Ent F, Amos LA, Löwe J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature. 413(6851):39-44.

van den Ent F, Johnson CM, Persons L, de Boer P, Löwe J. (2010). Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. EMBO J. 29(6):1081-90.

Van Houdt, R., and C. W. Michiels. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Res. Microbiol. **156**:626–633.

van Teeffelen S, Wang S, Furchtgott L, Huang KC, Wingreen NS, Shaevitz JW, Gitai Z. (2011). The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(38):15822-7.

**Vats P, Shih YL, Rothfield L (2009).** Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of Escherichia coli. Mol Microbiol. 72(1):170-82.

Venkatesh GR, Kembou Koungni FC, Paukner A, Stratmann T, Blissenbach B, Schnetz K. (2010). BglJ-RcsB heterodimers relieve repression of the Escherichia coli bgl operon by H-NS. J Bacteriol. 2010 Dec;192(24):6456-64

**Vianney A, Jubelin G, Renault S, Dorel C, Lejeune P, Lazzaroni JC (2005).** "Escherichia coli tol and rcs genes participate in the complex network affecting curli synthesis." Microbiology 151(Pt 7);2487-97. PMID: 16000739

**Vidal, O., Longain, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. & Lejeune, P.** (1998). Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. J Bacteriol 180, 2442–2449.

**Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jäger JG, Hüttenhofer A, Wagner EG.** (2003) RNomics in Escherichia coli detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. Nucleic Acids Res. 2003 Nov 15;31(22):6435-43.

Vogel J, Luisi BF. (2011). Hfq and its constellation of RNA. Nat Rev Microbiol. 9(8):578-89.

**Vogel J, Papenfort K (2006).** Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. Curr Opin Microbiol. 9(6):605-11.

**Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA (2008).** Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev. 2008 Mar;32(2):149-67.

Volz, K. (1993). Structural conservation in the CheY superfamily. Biochemistry 32(44): 11741-53.

Wachi M, Doi M, Okada Y, Matsuhashi M (1989). "New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of Escherichia coli cells." J Bacteriol 171(12);6511-6. PMID: 2687239

Wachi M, Osaka K, Kohama T, Sasaki K, Ohtsu I, Iwai N, Takada A, Nagai K (2006). Transcriptional analysis of the Escherichia coli mreBCD genes responsible for morphogenesis and chromosome segregation. Biosci Biotechnol Biochem. 70(11):2712-9.

Wada T, Hatamoto Y, Kutsukake K (2012). "Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene ydiV in Escherichia coli." Microbiology. PMID: 22461489

Wang X., Dubey A.K., Suzuki K., Baker C.S., Babitzke P. and Romeo T. (2005). CsrA posttranscriptionally represses *pgaABCD*, responsible for the synthesis of a biofilm polyssacharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56(6)**: 1648-1663

Wang X., Preston IV J.F. and Romeo T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**: 2724-2734

Wanner, B. L. (1992). Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? J Bacteriol 174(7): 2053-8.

Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. Genes Dev 15(13);1637-51.

Waters LS, Storz G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. Cell 136: 615-628.

Weber H, Pesavento C, Possling A, Tischendorf G, Hengge R (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. Mol Microbiol. 62(4):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*:  $\sigma$  -Dependent Genes, Promotors, and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.* **187**: 1591-1603

Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Prüss BM, Babitzke P, Romeo T (2001). Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of Escherichia coli. Mol Microbiol. 40(1):245-56.

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: 657–670.

West, A. H. and Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in twocomponent signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26(6): 369-376

Witte G, Hartung S, Büttner K, Hopfner KP. (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. Mol Cell 25;30(2):167-78.

Wood TK, Gonzalez Barrios AF, Herzberg M, Lee J (2006). Motility influences biofilm architecture in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 1-7

**Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. (2010).** c-di-AMP secreted by intracellular Listeria monocytogenes activates a host type I interferon response. Science. 25;328(5986):1703-5.

Yakhnin, H., Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2011) Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by  $E \square^{70}$  and  $E \square^{8}$ , and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol Microbiol* 81: 689–704.

Young KD (2006) The Selective Value of Bacterial Shape Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(3):660.

**Yura, T., Kanemori, M. and Morita, M.T.** (2000) The heat shock response: Regulation and function. In Storz G. and Hengge-Aronis R. (eds.) Bacterial stress responses: ASM Press, Washington, D.C., pp. 3-18.

**Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JC, Römling U. (2010).** Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in Salmonella enterica serovar Typhimurium. Mol Microbiol.; 77(3):771-86.

Zegans M.E., Becker H.I. and O'Toole G. (2002). The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell. Biol.* 21: 415-420.

**Zhao, K., M. Liu, and R. R. Burgess.** 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to "foraging"-like behavior in *E. coli. Nucleic* Acids Res. **35**:4441–4452

Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J. L. & Minchin, S. D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* 32, 5874–5893.

**Zogaj X., Bokranz W., Nimtz M. and Römling U. (2003).** Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **71**: 4151–4158

**Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W. and Römling U. (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39:** 1452–1463

### 7. Anhang

#### 7.1 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der CsgD-Mikroarrays

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 4.0



#### Tabelle A1: Wildtyp vs. csgD2-Mutante

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens dreifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A und B, oben)

	b-			
Name	Nummer	Ratio	Beschreibung	
negative	negative reguliert durch CsgD			
flgM	b1071	0,33	anti-FliA (anti-sigma) factor	
fliA	b1922	0,32	flagellar biosynthesis; alternative sigma factor 28; regulation of flagellar operons	
fliC	b1923	0,30	flagellin, filament structural protein	
			cytoplasmic, substrate-specific chaperones of the flagellar export system; chaperone for	
fliS	b1925	0,29	FliC or flagellin	
malK	b4035	0,30	ATP-binding component of transport system for maltose	
tar	b1886	0,30	methyl-accepting chemotaxis protein II, aspartate sensor receptor	
trg	b1421	0,32	methyl-accepting chemotaxis protein III, ribose sensor receptor	
positiv re	eguliert durcl	n CsgD		
artQ	b0862	21,24	arginine 3rd transport system permease protein	
csgA	b1042	321,4	curlin major subunit CsgA	
csgB	b1041	211,3	minor curlin subunit precursor, nucleator	
csgC	b1043	12,44	putative curli production protein	
csgD	b1040	39,04	2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon	
csgE	b1039	3,93	curli production assembly/transport component	
csgF	b1038	4,20	act in conjunction with CsgB to initiate curli subunit polymerisation	
csgG	b1037	5,11	form the secretion channel for curli subunits	
ftsW	b0089	10,26	cell division; membrane protein involved in shape determination	
gatB	b2093	4,25	galactitol-specific enzyme IIB of phosphotransferase system	
mdlB	b0449	4,74	putative ATP-binding component of a transport system	
mnmA	b1133	40,36	tRNA-specific 2-thiouridylase,	
mnmG	b3741	4,22	protein involved in a tRNA modification pathway	
nagE	b0679	5,32	PTS system, N-acetylglucosamine-specific enzyme IIABC	
putP	b1015	6,77	major sodium/proline symporter	
rluC	b1086	3,07	23S rRNA pseudouridine synthase	
sfsB	b3188	3,51	regulatory factor of maltose metabolism; similar to Ner repressor protein of phage Mu	
ssuA	b0936	3,57	periplasmic substrate-binding component of the alkanesulfonate ABC transporter	
tolR	b0738	184,1	putative inner membrane protein, tonB-independent uptake of group A colicins	
wcaI	b2050	36,24	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase	
ycdF	b1005	12,42	phantomgene	
yceA	b1055	3,76	orf, hypothetical protein	
ycfT	b1115	8,75	putative transporter	
yeiI	b2160	3,87	putative kinase	
ymfE	b1138	40,39	e14 prophage; predicted inner membrane protein,	

# 7.2 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der CsgD-Mikroarrays im *rprA*-defizienten-Hintergrund

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.

#### Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 4.0



#### Tabelle A2: Wildtyp vs. csgD2-Mutante (im rprA-defizienten Hintergrund)

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens dreifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A und B, oben)

$\langle U \rangle$		1		
Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung	
positiv d	positiv durch CsgD reguliert			
artQ	b0862	65,41	arginine 3rd transport system permease protein	
bioA	b0774	12,66	7,8-diaminopelargonic acid synthetase	
csgA	b1042	801,24	curlin major subunit CsgA	
csgB	b1041	580,82	minor curlin subunit precursor, nucleator, similar ro CsgA	
csgC	b1043	7,85	putative curli production protein	
csgD	b1040	11,88	2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon	
csgF	b1038	4,73	curli production assembly/transport component	
csgG	b1037	3,60	form the secretion channel for curli subunits	
			2-oxo-3-deoxygalactonate 6-phosphate aldolase and galactonate	
dgoA	b3692	4,09	dehydratase	
ftsW	b0089	16,29	cell division; membrane protein involved in shape determination	
mnmA	b1133	25,09	tRNA-specific 2-thiouridylase,	
prpB	b0331	3,22	2-methylisocitrate lyase, propionate metabolism	
prpC	b0333	12,96	methylcitrate synthase; propionate metabolism	
prpE	b0335	4,23	putative propionyl-CoA synthetase	
sthA	b3962	5,45	pyridine nucleotide transhydrogenase	
			putative inner membrane protein, involved in the tonB-independent	
tolR	b0738	364,26	uptake of group A colicins	
wcaI	b2050	44,19	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase	
yaaX	b0005	3,69	orf, hypothetical protein	
ybjK	b0846	20,93	putative DEOR-type transcriptional regulator	
yeiI	b2160	5,52	putative kinase; yeiI	
yihV	b3883	5,64	putative kinase; yihV	
ymfE	b1138	121,19	e14 prophage; predicted inner membrane protein,	

### 7.3 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der pCsgD-Mikroarrays

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 3.0 (uninduziert)



#### Tabelle A3: pCsgD vs. pRH800 (im RprA- und CsgD-defizienten Hintergrund)

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens dreifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A und B, oben)

Name	b-Nummern	Ratio	Beschreibung	
durch cs	durch csgD positiv reguliert			
<i>b1030</i>	b1030	3.975	phantom gene	
bioA	b0774	3.354	7,8-diaminopelargonic acid synthetase	
csgA	b1042	138.724	curlin major subunit CsgA	
csgB	b1041	144.811	minor curlin subunit precursor, similar ro CsgA	
csgC	b1043	6.715	putative curli production protein	
			putative 2-component transcriptional regulator for 2nd curli	
csgD	b1040	35.651	operon	
fadJ	b2341	3.761	FadJ component of anaerobic fatty acid oxidation complex	
mnmA	b1133	7.796	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	
purM	b2499	5.327	phosphoribosylaminoimidazole synthetase = AIR synthetase	
			periplasmic substrate-binding component of the alkanesulfonate	
ssuA	b0936	3.152	ABC transporter	
			putative inner membrane protein, involved in the tonB-	
tolR	b0738	31.913	independent uptake of group A colicins	
wcaI	b2050	5.116	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase	
yaiC				
(adrA)	b0385	7.901	Diguanylate cyclase	
ycdF	b1005	11.718	phantomgene overlaps with ymdF	
yceA	b1055	6.818	orf, hypothetical protein	
ycfQ	b1111	3.190	orf, hypothetical protein	
ycfT	b1115	8.677	orf, hypothetical protein	
yciG	b1259	6.103	orf, hypothetical protein	
yeiI	b2160	5.424	putative kinase	
ymfE	b1138	41.004	orf, hypothetical protein	
ymfT	b1146	3.493	E14 prophage; predicted DNA-binding transcriptional regulator	

# 7.4 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der RprA-Mikroarrays bei OD2.0

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 2.0



#### Tabelle A4: Wildtyp vs. RprA-Mutante bei OD<sub>578nm</sub> 2.0

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens dreifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A und B, oben)

Name	id	Mittelwert	Description	
positiv reguliert durch RprA				
paaA	b1388	3,889	ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, monooxygenase subunit	
paaB	b1389	3,027	ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit	
paaC	b1390	4,294	ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, structural subunit	
paaD	b1391	3,950	phenylacetate degradation protein	

### 7.5 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der RprA-Mikroarrays bei OD4.0

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt.



Beim Vergleich beider Arrays bezüglich ihrer differenziert regulierten Gene bleiben keine Gene übrig.

# 7.6 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der RprA-Mikroarrays bei OD4 + 5h

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.



Arraybedingungen: LB,  $28^{\circ}C OD_{578mn} 4 + 5h$ 

#### Tabelle A5: Wildtyp vs. *rprA*-Mutante bei OD<sub>578nm</sub> 4.0 + 5h

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens dreifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A, B und C, oben)

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung		
negativ o	negativ durch RprA				
csgA	b1042	0,184	curlin major subunit CsgA; csgA		
csgB	b1041	0,293	minor curlin subunit precursor, similar ro CsgA; csgB		
			putative inner membrane protein, involved in the tonB-independent		
tolR	b0738	0,298	uptake of group A colicins; tolR		
positiv durch RprA					
fryB	b2387	3,065	predicted enzyme IIB component of PTS		
kbaZ					
(agaZ)	b3132	3,500	putative tagatose 6-phosphate kinase 2; agaZ		
lar	b1348	3,911	restriction alleviation and modification enhancement; lar		
pdxY	b1636	3,650	pyridoxal kinase 2 / pyridoxine kinase; pdxY		
ycbS	b0940	3,705	putative outer membrane usher protein; ycbS		
ydiO	b1695	3,009	putative oxidoreductase; b1695predicted acyl-CoA dehydrogenase		
yfeA	b2395	4,791	predicted diguanylate cyclase		
уfjM	b2629	3,046	orf, hypothetical protein; yfjM		
yidZ	b3711	4,057	putative transcriptional regulator LYSR-type; yidZ		

# 7.7 Scatterplots und Tabellen der differenziell regulierten Gene der RprA-Mikroarrays in der *csgD*-Mutante

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.

### Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 4.0



#### Tabelle A6: Wildtyp vs. rprA-Mutante im csgD-defizienten Hintergrund

Mittelwerte der Ratio der Gene, die mindestens zweifach differenziell reguliert in beiden Mikroarray-Analysen (dargestellt durch Scatterplot A und B, oben)

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
durch RprA positiv reguliert (Csg			(CsgD unabhängig)
flgC	b1074	2,417	flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod; flgC
flgD	b1075	2,644	flagellar biosynthesis, initiation of hook assembly; flgD
gatD	b2091	2,835	Galactitol-1-phosphate dehydrogenase; gatD
			-Methylcitrate synthase; propionate catabolism via 2-methlycitrate
			cycle, characterized primarily in Salmonella; Repressed during biofilm
			formation. Crp regulon. N-terminal protein sequencing of mature PrpC
			indicated that the first 17 aa were removed, although this could be the
prpC	b0333	3,0606	result of proteolysis during protein purification (Patton, 1993); prpC
<i>tdcC</i>	b3116	2,7047	anaerobically inducible L-threonine, L-serine permease; tdcC
yadI	b0129	3,3515	putative PTS enzyme II B component; yadI
ybgO	b0716	2,8915	Fimbrial protein, function unknown; ybgO

# 7.8 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der Mikroarrays bei $OD_{578mn}$ 4.0 im Vergleich zu $OD_{578mn}$ 4.0+5h

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt.

Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 4.0/4.0 + 5h



# 7.9 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der Mikroarrays bei den YdaM-Arrays

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt und in den folgenden Tabellen aufgeführt.



### 7.10 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der YdaM-Mikroarrays im *rprA*und *csgD*-defizienten Hintergrund

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt.

Arraybedingungen: LB, 28°C OD<sub>578mn</sub> 4.0



Beim Vergleich beider Arrays bezüglich ihrer differenziert regulierten Gene bleiben keine Gene übrig.

# 7.10 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der YegE-Mikroarrays im csgD-defizienten Hintergrund

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt.



# 7.11 Scatterplots der differenziell regulierten Gene der YegE-Mikroarrays im *csgD*- und *rprA*-defizienten Hintergrund

Die mindestens zweifach regulierten Gene sind in den Scatterplots grün dargestellt.



Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt