

**Unorthodoxe Mechanismen der Regulation
innerhalb von Zweikomponentensystemen
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
Susan Busse

November 2009

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Oktober 2004 und November 2009 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Hengge

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Turgay

Tag der Disputation: 02.März 2010

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Tschowri N., Busse S. and Hengge R. (2009).

The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*.

Genes and Development 23: 522-534

Busse S., Mika F., Pruteanu M., Possling A. und Hengge R. (2009)

Multiple effects of the Rcs phosphorelay system and the small RprA RNA in the σ^S /CsgD/curli fimbriae control cascade in *Escherichia coli*.

in Vorbereitung

Busse S., Marquardt M., Auras P., Possling A., Flieger A. und Hengge R. (2009)

Phospholipase-mediated signaling in the stress response network of a bacterium.

in Vorbereitung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Hengge, die mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas in ihrer Arbeitsgruppe ermöglichte, durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war und mich bei der Bewerbung um das NaföG-Stipendium, das mir letztendlich für zweieinhalb Jahre zugesprochen wurde, unterstützte.

Prof. Dr. K. Turgay danke ich für die sehr schnelle Begutachtung meiner Arbeit.

Der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses (NaföG) danke ich für zweieinhalb Jahre Unterstützung bei meiner Forschung.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Hengge danke ich für jegliche Unterstützung im Laboralltag und für die nette Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Nassos, Claudia, Maya, Mihaela, Martin, Ebi, Alex, Franzi und Johanna möchte ich für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Gespräche danken, die sich glücklicherweise nicht immer um das Labor drehten. Ein Dankeschön geht auch an Frau Wedel, Klaus und die TA`s für ihre Hilfe und Unterstützung.

Christina danke ich besonders für die unvergesslichen Meetingreisen nach Frankfurt und Bochum, den regen wissenschaftlichen und privaten Austauschen und den vielen schönen langen Abenden im und außerhalb des Labors.

Natalia gilt mein Dank für die Möglichkeit projektübergreifend zu forschen, die Empfehlung einer Schneiderin und allen anderen netten Vorschlägen.

Den beiden Labormitstreitern Nicole und Gisela danke ich für aufregende und hektische Momente in unseren Gefilden.

Mandy und Janine danke ich für schöne Cocktailabende, das alljährliche Spargelessen und Plätzchenbacken, sowie die Zeit während und nach unserem gemeinsamen Studium in Potsdam.

Mein allergrößtes Dankeschön jedoch gebührt meinen Eltern Ehrhardt und Doris Busse, die mich auf all meinen Wegen unterstützend und ermutigend begleiten, mir mein Studium ermöglichten und mir ein liebevolles, geborgenes und gemütliches Zuhause geben.

Ein besonders dickes Dankeschön geht an meinen Bruder Stefan Busse, der sich immer Zeit für mich und meine häufigen computertechnischen Probleme nahm, sowie Teile dieser Arbeit korrigiert hat. Danke auch für wundervolle WG-Jahre in Berlin und für das schönste Geschenk zusammen mit Viviana - meinen kleinen Neffen Christoph.

Allen Freunden und Verwandten, die namentlich hier nicht erwähnt sind danke ich für schöne Stunden abseits vom mikrobiologischen Geschehen.

Und zu guter Letzt danke ich besonders Christian für seine unendliche Geduld, die Tolerierung meiner kleinen Standardabweichungen und die allabendliche Versorgung mit leckerem Essen.

**Leben ist das, was passiert,
während du eifrig dabei bist,
andere Pläne zu machen.**

(John Lennon)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
Einleitung	1
1. Globale Genregulation bei Mikroorganismen	1
1.1. Globale Regulation der Genexpression durch Sigmafaktoren	2
1.2. Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren	4
1.3. Signaltransduktion und Genregulation durch Zwei-Komponentensysteme als Antwort auf spezielle Umweltbedingungen	7
1.3.1. Aufbau und Funktionsweise von Zwei-Komponentensystemen	7
1.3.1.1. Klassische Zwei-Komponentensysteme	8
1.3.1.2. Phosphorelay-Zweikomponentensysteme	11
1.3.1.3. Modulation von Zweikomponentensystemen durch „Connectors“	12
1.3.2. Phosphorelaysysteme und ihre Funktion in <i>E.coli</i>	13
1.3.2.1. Das RcsC/D/B-System und Biofilmregulation	14
1.3.2.2. Das BarA/UvrY-System und das Csr-System bei der Biofilmregulation	16
1.3.2.3. Das ArcB/ArcA-System und die generelle Stressantwort	17
1.4. Neue Regulationsmechanismen durch kleine RNAs	18
1.4.1. Funktionsweise von kleinen regulatorischen RNAs	20
1.4.2. Funktion der kleinen RNA RprA in <i>Escherichia coli</i>	23
1.5. Biofilmbildung in Mikroorganismen	25
1.5.1. Biofilmbildung in <i>E.coli</i>	27
1.5.2. CsgD als essentieller transkriptionaler Regulator der adhäsiven Curli-Fimbrien und anderer Biofilmfunktionen	29
Zielsetzung	31
Material und Methoden	33
1. Chemikalien, Materialien und Geräte	33
2. Medien und Medienzusätze	34

2.1.	Flüssigmedien	34
2.2.	Feste Medien	34
2.3.	Medienzusätze	35
3.	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	35
4.	Mikrobiologische Methoden	46
4.1.	Sterilisation	46
4.2.	Wachstumsbedingungen	46
4.3.	Aufbewahrung von Bakterienstämmen	46
4.4.	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	46
4.5.	Herstellung eines P1-Lysates	46
4.6.	P1 Transduktion	47
4.7.	Plattentests (β -Gal Plattenaktivitätstest, Motilitätstest, Kongorotplattentest, Glycogenplattentest, Fluoreszenztest-Fuji Imager)	47
5.	Molekularbiologische Methoden	49
5.1.	Präparation chromosomaler und Plasmid DNA	49
5.2.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	49
5.3.	Restriktionsenzymverdau	49
5.4.	Agarosegelelektrophorese	49
5.5.	Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	50
5.6.	Ligation von DNA-Fragmenten (Sambroock <i>et al.</i> ,1989 und Urban <i>et al.</i> ,2007)	50
5.7.	Transformation	50
5.8.	Polymerasekettenreaktion	51
5.9.	Klonierung	56
5.10.	Konstruktion von Plasmiden (<i>lacZ</i> , <i>gfp</i> ,)	57
5.11.	Kreuzung von transkriptionalen und translationalen <i>lacZ</i> -Fusionen ins Chromosom von <i>Escherichia coli</i>	57
5.12.	Konstruktion von Mutanten (Datsenko and Wanner, 2000)	58
5.13.	Präparation von Gesamt-RNA (Hot phenol/chloroform; Kit von Promega)	59
5.14.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Gesamt-RNA	59
5.15.	Northernblotanalysen (mit Agarosegelen und PAA-Gelen)	60
5.16.	RNA-Stabilitätsanalysen (Rifampicin-Abbau)	63
5.17.	Transkriptomanalysen-Arrayanalysen (MWG-Protokoll zum Teil, Kit Amersham)	63
6.	Biochemischen Methoden	64
6.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	64
6.2.	Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Fairbanks-Färbung)	66
6.3.	Immunoblotanalyse (Westernblot)	66
6.4.	Überproduktion und Reinigung von BarA, BaeS, DcuB, RstB	67
6.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce)	67
6.6.	β -Galaktosidaseaktivitätstest	68
6.7.	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsassay (Autophosphorylierung, Transphosphorylierung)	69
6.8.	Messung freier Fettsäuren	70
6.9.	Protein-DNA-Bindestudien (Electrophoretic Mobility Shift-Experimente EMS)	70
7.	Computerprogramme und Internetadressen	71

Ergebnisse	72
1. Die Rolle der patatin-ähnlichen Phospholipase RssA bei der Kontrolle des ArcB/ArcA/RssB-Systems und anderer Zweikomponentensystemen	72
1.1. Das aus der enzymatischen Aktivität von RssA hervorgehende Spaltungsprodukt LPG hemmt die Autophosphorylierung von ArcB, RstB, BaeS und BarA <i>in vitro</i>	73
1.2. Die ebenfalls aus der Spaltung hervorgehende freie Fettsäure – Palmitinsäure hat keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB <i>in vitro</i>	75
1.3. RssA zeigt Auswirkungen auf die genomweite Genexpression <i>in vivo</i>	76
1.4. Zeigt RssA enzymatische Aktivität in Bezug auf andere Membrankomponenten wie Cardiolipin <i>in vitro</i> ?	80
2. Die Rolle des Zweikomponentensystems RcsCDB und der kleinen RNA RprA bei der Expression des Biofilmregulators CsgD und der adhäsiven Curli-Fimbrien in <i>E.coli</i>	82
2.1. Das Rcs-System übt seinen Einfluss auf die Curli-Expression über die kleine RNA RprA aus	83
2.1.1. Erhöhte RprA-Level in der Zelle führen zu einer Aktivierung der <i>rpoS</i> – Genexpression und zu einer Inhibierung der <i>csgB</i> , <i>yaiC</i> und <i>ydaM</i> – Genexpression	84
2.1.2. RpoS-Proteinlevel und CsgD-Proteinlevel in <i>rsc</i> -Mutanten spiegeln die Genexpressionsdaten wider	89
2.1.3. Die RprA – RNA Mengen steigen beim Übergang in die stationäre Phase an und sind in den verschiedenen Rcs-Mutanten unterschiedlich ausgeprägt	91
2.1.4. Das RcsB-Regulon überlappt mit dem RprA-Regulon	92
2.1.5. RprA hat einen Einfluss auf die Menge an <i>csgD</i> mRNA , nicht jedoch auf deren Stabilität	96
2.2. Die durch RprA vermittelte Regulation innerhalb der SigmaS/CsgD Kaskade	100
2.2.1. Die konstitutive, ektopische Expression von RprA reduziert die Expression von <i>csgB</i> , <i>yaiC</i> und <i>ydaM</i>	100
2.2.2. Die ektopische Expression von CsgD::Gfp und YdaM::Gfp ist in Anwesenheit von konstitutiv expremiertem RprA ebenfalls reduziert	101
2.3. Die Rolle der <i>csgD</i> 5`UTR bei der RprA-vermittelten Regulation	102
2.3.1. Innerhalb der <i>csgD</i> 5`UTR befinden sich zwei potentielle Bindestellen für RprA	103

2.3.2.	Eine translationale Kontrolle durch RprA erfolgt über die Bindestelle im Translationsinitiationsbereich von <i>csgD</i>	105
2.3.3.	Die weiter stromaufwärts in der <i>csgD</i> 5'UTR liegende potentielle RprA-Bindestelle spielt möglicherweise eine Rolle bei der Transkriptionselongation	107
2.4.	Mögliche andere RprA-Targets	109
2.4.1.	Die Regulation von GadE durch RprA	
2.5.	Das degenerierte GGDEF/EAL-Protein YhdA (CsrD) aktiviert die CsgD-Expression durch Inhibition der RprA-Expression	111
2.5.1.	CsrD (YhdA) hat keinen Einfluss auf die Stabilität von RprA	111
2.5.2.	CsrD reprimiert die <i>rprA</i> -Transkription	114
2.5.3.	CsrD reprimiert die <i>rprA</i> -Expression ist nicht über RcsB	115
3.	Der Einfluss des Konnektors YmgB auf den „Output“ des Rcs-Systems	118
4.	Globale Analyse von Zweikomponenten-Phosphorelay-Systemen hinsichtlich ihrer Vernetzung (Crosstalk) untereinander und deren Einfluss auf den Stationärphasen-Sigmafaktor SigmaS	121
4.1.	Das Rcs-System – und dessen Zielgene	123
4.2.	Das BarA/UvrY – Zwei-Komponentensystem als ein hauptsächlich linear wirkendes System	124
4.3.	Das ArcB/ArcA – Zwei-Komponentensystem als ein Kandidat für Crosstalk	125
5.	Beziehungen des Responseregulators RssB zu anderen Zwei-Komponentensystemen	126
Diskussion		129
1.	Zweikomponentensysteme: „Crosstalk“ und „unorthodoxe“ Regulation	129
2.	Die Rolle der Phospholipase RssA bei der Kontrolle von ArcB/ArcA/RssB und anderen Zweikomponentensystemen	135
2.1.	Das RssA Spaltungsprodukt LPG hemmt neben ArcB auch BarA, BaeS und RstB in ihrer Autophosphorylierung	135
2.2.	Die Wirkung auf Sensorinasen ist spezifisch durch LPG vermittelt, Palmitinsäure zeigt keine Autophosphorylierungshemmung	138
2.3.	RssA hat globale Auswirkungen auf die genomweite Genexpression	139

2.4.	Das zu PG sehr ähnliche Cardiolipin wird ebenfalls durch RssA gespalten	142
3.	Das RcsC/D/B-System wirkt pleiotrop über die kleine RNA RprA	144
3.1.	Die globale Wirkung von RcsB ist überwiegend über die RNA RprA	144
3.2.	Die Wirkung des Rcs-Systems und RprA auf CsgD und Curli-Expression	146
3.2.1.	RcsB reduziert die Curli-Expression hauptsächlich über die RNA RprA	146
3.2.2.	Das Haupttarget von RprA innerhalb der Curli-Kaskade ist CsgD, aber auch YdaM ist beeinflusst	148
3.2.3.	Die Regulation der <i>csgD</i> -Translation erfolgt über die direkte Interaktion der kleinen RNA-RprA mit dem Translationsinitiationsbereich von <i>csgD</i>	149
3.2.4.	An der stromaufwärts in der <i>csgD</i> 5`UTR liegenden Bindestelle für RprA wird in Anwesenheit von RprA möglicherweise die Transkriptionselongation verhindert	150
3.2.5.	YhdA (CsrD) reguliert CsgD über RprA	151
4.	Das σ^S/CsgD/Rcs regulatorische Netzwerk und seine Rolle in der generellen Stressantwort und Biofilmbildung in <i>E.coli</i>	154
5.	Ausblick	157
	Zusammenfassung	159
	Summary	161
	Literaturverzeichnis	163
	Anhang	188

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung I:** Regulation des zellulären σ^S -Spiegels (abgewandelt nach Hengge-Aronis, 2002)
- Abbildung II:** Schematische Darstellung der Komponenten des Rcs-Phosphorelaysystems (aus Majdalani und Gottesman, 2005)
- Abbildung III:** Übersicht kleiner RNAs, die an Proteine binden und deren Aktivität beeinflussen (aus Waters und Storz, 2009)
- Abbildung IV:** Schematische Darstellung der Funktionsweisen kleiner RNAs A) für in *cis*-kodierte RNAs und B) für in *trans*-kodierte RNAs (aus Waters und Storz, 2009)
- Abbildung V:** vorhergesagte RprA-Struktur (Mfold-Quickfold Zucker *et al.*, 1999)
- Abbildung 1:** LPG reduziert die Autophosphorylierung von ArcB (A) und die Transphosphorylierung von ArcB auf RssB (B)
- Abbildung 2:** LPG reduziert die Autophosphorylierung der Sensorkinasen RstB (A), BaeS (B) und BarA (C)
- Abbildung 3:** Die Fettsäure Palmitinsäure hat keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB
- Abbildung 4:** RssA hat einen Einfluss auf die genomweite Genexpression in *E.coli*
- Abbildung 5:** Messung des Gehaltes an abgespaltenen freien Fettsäuren von Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL)
- Abbildung 6:** Expressionsprofil der *rpoS::lacZ* (A), *csgB::lacZ* (B) *yaiC::lacZ* (C) und *ydaM::lacZ* (D) Fusionen und deren verschiedene *rcs*-Mutantenhintergründe
- Abbildung 7:** Expressionsprofil der *csgD::lacZ* Fusion und deren verschiedene *rcs*-Mutantenhintergründe
- Abbildung 8:** Einfluss des Rcs-Systems/RprA auf Proteinebene von RpoS und CsgD (eine Mutation in *rcsC* reduziert die Menge an CsgD-Protein)
- Abbildung 9:** RprA-Mengen in den verschiedenen *rcs*-Mutanten (A) und entlang der Wachstumskurve (B)
- Abbildung 10:** *csgD*-Transkriptmengen der verschiedenen *rcs*-Mutanten
- Abbildung 11:** *csgD*-Stabilitätsuntersuchungen des Wildtyps im Vergleich zur *rprA*-Mutante

-
- Abbildung 12:** *csgD*-Stabilitätsuntersuchungen des Wildtyps im Vergleich zur *rscC*-Mutante
- Abbildung 13:** Einfluss von überexprimiertem RprA auf *csgB::lacZ*, *ydaM::lacZ*, *mlrA::lacZ*, *yciR::lacZ*, *yaiC::lacZ*
- Abbildung 14:** Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu CsgD, YdaM und MlrA
- Abbildung 15:** Die mit dem Programm „TargetRNA“ vorhergesagten Bindestellen für RprA in *csgD* und deren Lokalisation zwischen dem Transkriptionsstart und Translationsstart
- Abbildung 16:** Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu CsgD und einer verkürzten CsgD-Version
- Abbildung 17:** Die translationale Kontrolle von *csgD* durch RprA erfordert die zweite Bindestelle und kann durch spezifische Basenaustausche innerhalb von *csgD* unterbunden werden
- Abbildung 18:** Das Vorhandensein der potentiellen ersten Bindestelle führt zur Verminderung der *csgD::gfp* Transkriptmenge
- Abbildung 19:** Die Expression der *gadB::lacZ* Fusion ist in Anwesenheit von RprA leicht erhöht
- Abbildung 20:** Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu zwei GadE-Versionen in An- und Abwesenheit der kleinen RNA RprA
- Abbildung 21:** Die Mutation von *yhdA* führt zur Reduzierung der *csgB::lacZ* Expression, die durch die gleichzeitige Mutation von *rprA* wieder aufgehoben werden kann.
- Abbildung 22:** Eine *yhdA*-Mutante hat erhöhte RprA-Mengen
- Abbildung 23:** YhdA zeigt keinen Einfluss auf die Stabilität von RprA
- Abbildung 24:** YhdA reprimiert die *rprA::lacZ* Expression
- Abbildung 25:** YhdA reprimiert die *rprA::lacZ* Expression nicht über RcsB
- Abbildung 26:** Eine *uhpB*-Mutation zeigt keine zusätzliche Stabilisierung von σ^S

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte
- Tabelle 2:** Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze und deren Konzentration
- Tabelle 3:** Zusammenstellung der verwendeten Bakterienstämme
- Tabelle 4:** Zusammenstellung der verwendeten Bakteriophagen
- Tabelle 5:** Zusammenstellung der verwendeten Plasmide
- Tabelle 6:** Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide
- Tabelle 7:** Zusammenstellung aller durch RcsB/RprA differentiell regulierter Gene
- Tabelle 8:** Zusammenstellung aller durch YmgB regulierten Gene

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp, Amp ^{r/s}	Ampicillin, resistent bzw. sensitiv gegen Amp
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp; kb	Basenpaare; Kilobasenpaare
cAMP	3', 5'-zyclo-Adenosin-Monophosphat
Cm, Cm ^{r/s} , cat	Chloramphenicol, resistent/sensitive gegen Cm
CRP	cAMP receptor protein
DMF	N, N, Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotid
E	RNA-Polymerase-Kernenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
φ	Fusion
g	Gramm
Glc	Glukose
Gly	Glycerin
h	Stunde
Kan; Kan ^{r/s}	Kanamycin; resistent bzw. sensitiv gegen Kan
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
m	milli
μ	mikro
M	molar
M9	Minimalmedium 9
MES	4-N-Morpholmetanesulfonic acid

min	Minute
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumsalz
Nt	Nukleotide
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
PVDF	Polyvinylidenflourid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNAP	RNA-Polymerase
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet; Tet ^{r/s}	Tetracyclin; resistent bzw. sensitiv gegen Tet
Tn	Transposon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	transformation and storage solution
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid

1. Globale Genregulation bei Mikroorganismen

Mikroorganismen sind seit über Millionen von Jahren ein großer Bestandteil unserer Erde. Im Laufe der Evolution haben sie sich als Künstler der Anpassungsfähigkeit bewiesen und sind deshalb in vielen Habitaten anzutreffen. Bakterien besiedeln also nicht nur das Wasser, den Boden und die Luft, sondern sind auch in lebensfeindlichen Lebensräumen wie zum Beispiel heißen Quellen, unter dem Eis der Antarktis, Salz- und Alkaliseen, sowie anaeroben Lebensnischen präsent. Neben den hoch spezialisierten Anpassungsmechanismen für diese lebensfeindlichen Habitate haben Bakterien aber auch Anpassungsstrategien entwickelt, die eine schnelle und effiziente Anpassung an sich ändernde Umweltparameter in nicht extremen Habitaten ermöglichen. Die dafür notwendige globale Änderung der Genregulation ist Grundvoraussetzung für die Sicherung des Überlebens des Bakteriums unter diesen vielfältigen und oft auch extremen Stressbedingungen.

Escherichia coli (*E.coli*) aus der Familie der Enterobacteriaceae ist das derzeit am besten untersuchte gram-negative Bakterium und dient in der Mikrobiologie seit langem als Modellorganismus zur Untersuchung genetischer Regulationsmechanismen. Es besiedelt als Lebensraum neben dem Intestinaltrakt der Säugetiere auch den Boden und das Wasser. Damit ist *E.coli* besonderen Umweltschwankungen ausgesetzt und gezwungen schnell auf diese zu reagieren. Es hat dafür im Laufe der Evolution ein hierarchisches gegliedertes Netzwerk der Genregulation entwickelt, bei dem an erster Stelle einige wenige Masterregulatoren die Expression einer Vielzahl von Zielgenen, die für das Überleben unter verschiedenen Bedingungen essentiell sind, veranlassen. Zu diesen Zielgenen können wiederum Regulatorproteine gehören, die ihrerseits die Expression anderer Gene beeinflussen können und somit eine Stressantwort auslösen (Gottesman, 1984).

Grundsätzlich kann man zwei Arten der Stressantworten voneinander unterscheiden. Zum einen sind Bakterien in der Lage auf sehr spezifische Stresse zu reagieren, mit dem Ziel das Stressagens möglichst schnell zu beseitigen und mögliche zelluläre Schäden zu reparieren. Demgegenüber steht die generelle Stressantwort, bei der sehr viele unterschiedliche Stresssignale integriert werden können und in einer umfangreichen Antwort resultieren. Die Hauptfunktion der generellen Stressantwort besteht darin, die Bakterienzellen gegen sehr viele Stressbedingungen resistenter zu machen und sie gleichzeitig auf solche Stresse vorzubereiten, die die Bakterienzelle noch gar nicht erfahren hat (Hengge-Aronis, 2002a). Der Masterregulator der generellen Stressantwort ist der Stationärphasen-Sigmafaktor σ^S , der bei Eintritt in die stationäre Phase und als Antwort auf vielfältige Stresssituationen induziert wird. Er unterliegt neben der transkriptionalen Regulation auch der Regulation

auf Ebene der Translation, Proteolyse und der Proteinaktivität. Eine zentrale regulatorische Rolle spielt dabei der Responseregulator RssB, der als Erkennungsfaktor σ^S dem Abbau durch die ClpXP-Protease zuführt. Zusätzlich dazu spielen aber auch Zweikomponentensysteme eine wesentliche Rolle bei der Regulation von σ^S . Von besonderer Bedeutung ist dabei das ArcB/ArcA-System. Weiterführende Untersuchungen der Zweikomponentensysteme BarA/UvrY und RcsC/D/B und deren Einfluss auf den Stationärphasen-Sigmafaktor dienten unter anderem als Ausgangspunkte dieser Arbeit (zusammengefasst in Hengge, 2008).

1.1. Globale Regulation der Genexpression durch Sigmafaktoren

Die Fähigkeit von *E.coli* viele verschiedene Stressbedingungen (oxidativer Stress, Osmostress, hohe und niedrige pH-Werte, Hitzeschock, UV-Strahlung u.s.w.) zu bewältigen erfordert eine Vielzahl von Antwortsystemen und Anpassungsmechanismen. Solch eine Anpassung erreichen Bakterien durch die Änderung der Genexpression, verbunden mit der Änderung der DNA-Topologie (durch histonähnliche Proteine z.B. H-NS), der Aktivierung von Zweikomponentensystemen und durch die Veränderung der RNA-Polymerase hinsichtlich ihrer Promotorspezifität. *E.coli* verfügt im Gegensatz zu Eukaryonten nur über eine DNA-abhängige RNA-Polymerase. Eine spezifische Promotorerkennung erfolgt hier nicht über eine spezifische Polymerase, sondern wird über andere Mechanismen gewährleistet. Von bedeutender Rolle sind dabei reversibel assoziierte Faktoren der RNA-Polymerase, die so genannten Sigmafaktoren. Erst nach Bindung des Sigmafaktors an die RNA-Polymerase ist diese zur spezifischen Promotorerkennung und zur Transkriptionsinitiation befähigt (Mulligan *et al.*, 1984). *E.coli* verfügt über sieben verschiedene Sigmafaktoren mit unterschiedlichen Promotorspezifitäten, sodass auf verschiedene Umweltsituationen mit der Expression der dafür relevanten Gene reagiert werden kann. In exponentiell wachsenden Zellen findet man den vegetativen Sigmafaktor σ^{70} (RpoD) als Hauptsigmafaktor vor. Er steuert die Transkription der „Haushaltsgene“, die als Grundausstattung in jeder wachsenden Zelle vorhanden sein müssen (Gross *et al.*, 1998). σ^H (RpoH) – dem Hitzeschock-Sigmafaktor kommt Bedeutung bei der Genexpression während hohen Temperaturen zu (Gross *et al.*, 1996; Yura *et al.*, 2000). σ^F (FliA) ist der Flagellen-Sigmafaktor und steuert die Expression von Genen für Motilität und Chemotaxis (Arnosti und Chamberlin, 1989b; Chilcott und Hughes, 2000; Helmann, 1991). σ^E (RpoE) wird für die Expression von Genen genutzt, um periplasmatischem Stress oder Hitzeschock entgegenzuwirken und den Erhalt der Zellhülle zu gewährleisten (Alba und Gross, 2004; Erickson und Gross,

1989; Raina *et al.*, 1995; Ades *et al.*, 2003). σ^N (RpoN) ist in *E.coli* für die Regulation des Stickstoffmetabolismus zuständig (Merrick, 1993; Kutsu *et al.*, 1989) und σ^{FecI} (FecI) kontrolliert die Transkription des *fec*-Operons und ist an der Regulation des Eisencitrattransportsystems beteiligt (Braun *et al.*, 2003; Enz *et al.*, 1995; Pressler *et al.*, 1988). Der Sigmafaktor der generellen Stressantwort σ^S (RpoS) hingegen ist besonders wichtig für das Überleben von Stressbedingungen oder in der stationären Phase (Hengge-Aronis, 1996; Tanaka *et al.*, 1993). Transkriptomstudien zeigten, dass die Expression von ca 10 % aller *E.coli* Gene direkt oder indirekt durch σ^S beeinflusst werden (Weber *et al.*, 2005).

In der Zelle stellt in Bezug auf die Anzahl der Promotoren und Sigmafaktoren freies, nicht an DNA gebundenes RNA-Kernenzym den limitierenden Faktor für die Transkriptionsinitiation eines Gens dar (Ishihama, 1993; Ishihama, 2000; Grigorova *et al.*, 2006). Damit einher geht die starke Konkurrenz der Sigmafaktoren um das Kernenzym und dementsprechend eine Konkurrenz der Promotoren um die RNA-Polymerase. Damit eine globale Veränderung der Genexpression durch Sigmafaktoren gewährleistet werden kann, müssen diese in ihrer zellulären Konzentration, ihrer Affinität zum Polymerasekernenzym (E) und zu den Promotoren, sowie in ihrer Bindungsfähigkeit (z.B. durch Anti-Sigmafaktoren) kontrolliert werden.

Der zelluläre Gehalt an σ^S wird abhängig von verschiedenen Umweltbedingungen auf Ebene der Transkription, der Translation und der Proteolyse reguliert (Abb. I) (Lange und Hengge-Aronis, 1994).

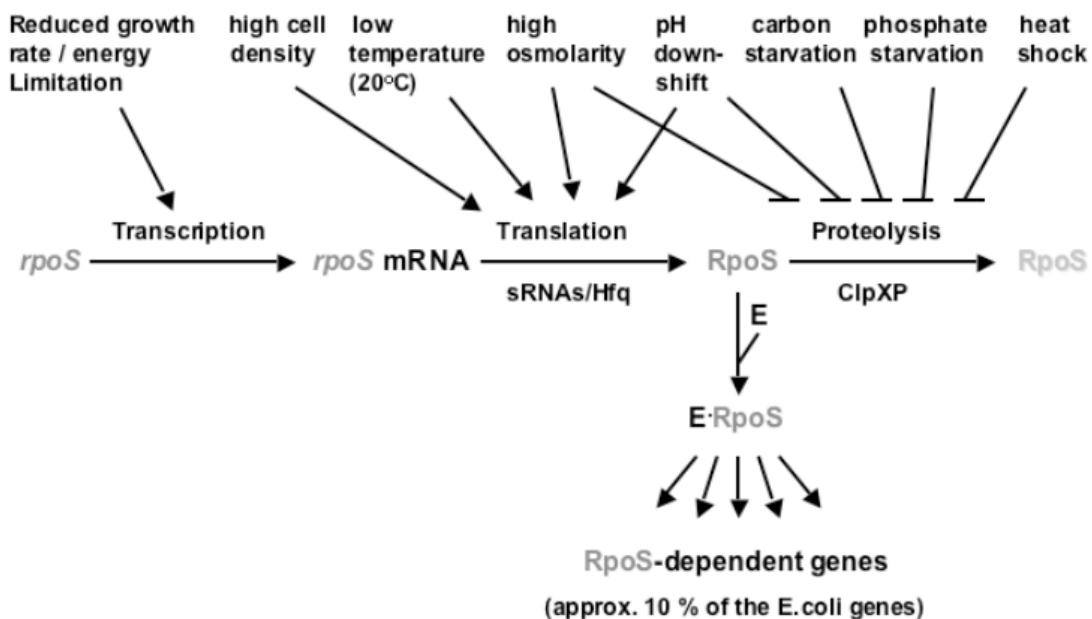


Abbildung I. Regulation des zellulären σ^S -Spiegels (abgewandelt nach Hengge-Aronis, 2002)

Der vegetative Sigmafaktor σ^{70} und der Sigmafaktor der generellen Stressantwort σ^S weisen speziell in den Regionen zur Promotorbindung sehr hohe Sequenzhomologien auf (Lonetto *et al.*, 1992). Beide nutzen in *vitro* sehr ähnliche Promotorsequenzen zur Erkennung, aber dennoch unterscheidet sich das in *vivo* Regulon grundsätzlich voneinander (Tanaka *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993). Wie diese in *vivo* Spezifität trotzdem gewährleistet wird, ist im Folgenden kurz erläutert.

Im Promotorbereich des Zielgens sind für σ^S spezifische Sequenzen der Erkennung lokalisiert z.B. C(-13), T(-14) (Becker und Hengge-Aronis, 2001). Des Weiteren kann σ^S Abweichungen von der Konsensussequenz tolerieren z.B. in der Spacerlänge (Typas und Hengge, 2006) oder in der Konservierung der -10 und -35 Region (Wise *et al.*, 1996; Gaal *et al.*, 2001, Lacour *et al.*, 2003; Typas und Hengge, 2006).

Transkriptionsregulatoren wie Crp, Lrp und H-NS beeinflussen die Promotorspezifität zusätzlich, indem sie z.B. in unterschiedlicher Art und Weise mit den Sigmafaktoren oder der RNA-Polymerase interagieren. Außerdem wird durch die Bindung globaler Regulatoren wie z.B. H-NS die DNA-Topologie dementsprechend verändert, dass entweder besser $E\sigma^{70}$ oder $E\sigma^S$ an die DNA binden kann. Aber auch die Wachstumsphase hat eine Auswirkung auf die DNA-Topologie. In der stationären Phase liegt die DNA eher entspannt in wenig supergecoilter Form vor. Dieser Zustand wird durch $E\sigma^S$ bevorzugt, wohingegen $E\sigma^{70}$ an stark negativ supergecoilte DNA bindet (Kusano *et al.*, 1996; Bordes *et al.*, 2003).

Zusätzlich dazu spielen Faktoren eine Rolle, die die Bindungsbereitschaft des Sigmafaktors an das Polymerasekernenzym beeinflussen können. Hierzu zählen Crl als ein kleines Protein, welches die Bindungsaffinität von σ^S an E steigert (Typas *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite kann die Bildung von $E\sigma^{70}$ durch das Alarmon ppGpp inhibiert werden (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003; Constanzo *et al.*, 2008). Rsd, der Anti- σ^{70} -Faktor sequestriert σ^{70} in der stationären Phase und lässt damit $E\sigma^S$ den Vorrang (Ilag *et al.*, 2004; Jishage und Ishihama, 1998).

Dennoch reicht eine Regulation der Genexpression durch die alleinige Auswahl des entsprechenden Sigmafaktors meist nicht aus, sondern benötigt die zusätzliche Transkriptionskontrolle durch weitere an die DNA-bindende Transkriptionsfaktoren.

1.2. Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren

Obwohl in *E.coli* mehr als 300 Gene für Transkriptionsfaktoren (TF) kodieren, haben insgesamt nur sieben einen direkten modulierenden Einfluss auf die Genexpression von ca. 51% der Gene (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL, Lrp). Für etwa 60 Transkriptionsfaktoren

ren ist je nur ein einziges Zielgen bekannt (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000; Martinez-Antonio und Collado-Vides, 2003).

Aufgrund von Sequenzhomologien wurden die folgenden Familien von Regulatoren festgelegt: AraC, LacI, LysR, CRP, TetR, GntR, cI/Cro und OmpR.

Transkriptionsfaktoren ihrerseits werden ebenfalls auf Ebene der Transkription, Translation und Proteolyse (Jenal und Hengge-Aronis, 2003) reguliert. Zusätzlich dazu werden sie auf verschiedene Weise in ihrer Aktivität beeinflusst. Ein prominentes Beispiel, bei dem die Bindeaffinität des TF an die DNA durch die Bindung eines Liganden verändert wird, ist CRP-cAMP. Unter Glukosemangelsituationen steigt die zelluläre cAMP-Konzentration an. cAMP bindet an den TF CRP und reguliert den Katabolithaushalt der Zelle. Die Aktivitätsmodulation eines TF, zu denen auch die Responseregulatoren der Zweikomponentensysteme gehören, kann auch durch Phosphorylierung erfolgen. Auf die Aktivitätsmodulation von Responseregulatoren wird noch einmal genauer im Abschnitt 1.3.1.3. eingegangen.

Das cyclische-di-GMP ist bereits 1987 entdeckt worden (Ross *et al.*, 1987) aber dessen Funktion als sekundärer Botenstoff in Bakterien erlangte erst in den letzten Jahren an Bedeutung. *E.coli* besitzt 19 c-di-GMP synthetisierende GGDEF-Proteine (Diguanylatcyclasen) und 17 c-di-GMP abbauende EAL-Proteine (Phosphodiesterasen). Eine Vielzahl dieser Proteine sind durch den Stationärphasen-Sigmafaktor σ^S reguliert. Über die Effektoren ist bislang noch wenig bekannt. Im Fall des Transkriptionsaktivators der Curlifimbrien, CsgD, übt c-di-GMP einen positiven Einfluss auf dessen Transkription aus und fördert damit die Biofilmbildung in *E.coli*. Die mechanistischen Grundlagen sind bislang jedoch noch ungeklärt (Weber *et al.*, 2006).

Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren oder Repressoren in der Zelle fungieren. Häufig wird ein einziges Gen durch mehrere Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die aktivierend oder reprimierend an dessen Promotor wirken. Dadurch ist es möglich verschiedene Signale zu integrieren und die Expression eines Gens exakt auf die Bedingungen abgestimmt zu regulieren. Die Transkription von *csgD* wird beispielsweise durch die Transkriptionsfaktoren MlrA und OmpR positiv beeinflusst, während CpxR reprimierend wirkt (Brown *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 1998; Prigent-Combaret *et al.*, 2001).

Generell interagieren Transkriptionsfaktoren mit der RNA-Polymerase, um diese bei der Transkription zu unterstützen oder zu behindern. Sowohl für die Aktivierung, als auch für die Repression sind jeweils drei Mechanismen in der Literatur beschrieben und werden im Folgenden erläutert. Der erste Mechanismus beschreibt die Klasse I Aktivierung, bei der

der Aktivator stromaufwärts der -35 Region des Promotors bindet und mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (α CTD) interagiert. Dadurch wird die RNA-Polymerase zum Promotor rekrutiert (Ebright, 1993; Busby und Ebright 1999). Die Klasse II Aktivierung, als zweiter Mechanismus, erfolgt durch Bindung des TF überlappend mit der -35 Region des Promotors (Busby und Ebright 1999). Der TF interagiert hier mit der Region 4 der σ Untereinheit und teilweise mit der α NTD und rekrutiert die Polymerase zum Promotor (Dove *et al.*, 2000; Dove *et al.*, 2003). Ein prominentes Beispiel eines TF, der beide Aktivierungsmechanismen nutzen kann ist CRP (Busby und Ebright 1999). Beim dritten Aktivierungsmechanismus wird durch die Bindung des TF innerhalb der Spacerregion zwischen der -10 und -35 Region die Konformation der Promotor-DNA so verändert, dass die Erkennung durch die RNA-Polymerase besser erfolgen kann (Brown *et al.*, 2003; Sheridan *et al.*, 1998).

Transkriptionsfaktoren, die als Repressoren wirken, binden im Promotorbereich und behindern die Bindung der RNA-Polymerase. Ein Beispiel, bei dem durch die Bindung des Repressor an den Promotor die Bindung der RNA-Polymerase verhindert wird, ist der Lac Repressor (Müller-Hill, 1975). Ein zweiter Mechanismus ist die Ausbildung einer Loop-Struktur, die durch die Bindung der Repressoren an stromaufwärts und stromabwärts des Promotors gelegenen Bindestellen zustande kommt (Bsp. GalR) (Choy und Adhya, 1996). Zusätzlich dazu kann eine Repression auch durch den Anti-Aktivierungsmechanismus erreicht werden. Als Beispiel sei hier CytR zu erwähnen, der als Anti-Aktivator an vielen Promotoren mit CRP interagiert. Dadurch wird die aktivierende Wirkung von CRP mit der RNA-Polymerase behindert und resultiert in der Repression (Valentin-Hansen *et al.*, 1996).

Für viele Transkriptionsfaktoren konnten bereits definierte Bindestellen identifiziert werden (Bsp. RcsB-Box – siehe Abschnitt 1.3.2.1.). Einige Transkriptionsfaktoren binden jedoch sehr unspezifisch und an vielen Orten an die DNA, wie beispielsweise H-NS, das AT-reiche Regionen bevorzugt (Atlung *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997).

Abhängig von externen oder internen Signalen sind Transkriptionsfaktoren in ganzen Netzwerken innerhalb der Zelle miteinander verschalten. Damit wird eine fein abgestimmte Regulation aller Gene abhängig vom jeweiligen Umweltsignal und eine dementsprechende Anpassung erreicht. Innerhalb der letzten Jahre sind Regulationsnetzwerke intensiv erforscht worden, wobei immer neuere Erkenntnisse zur Funktion der einzelnen Module und Motive erlangt werden konnten. Die Analyse des *E.coli* Transkriptionsnetzwerkes lieferte vier immer wiederkehrende Hauptmuster: a) die Autoregulation, b) der Feed-Forward-

Loop (FFL), c) das Single Input Modul (SIM) und d) das dense overlapping regulon (DOS). Eine exzellente Übersicht dazu liefert das Buchkapitel „Architecture and Dynamics of Transcriptional Networks“ von Bren und Alon (2009).

1.3. Signaltransduktion und Genregulation durch Zweikomponentensysteme als Antwort auf sehr spezielle Umweltbedingungen

1.3.1. Aufbau und Funktionsweise von Zwei-Komponentensystemen

Zweikomponentensysteme sind Signaltransduktionssysteme, die ihren evolutionären Ursprung in Bakterien haben und durch lateralen Gentransfer auch in Archaeen und nichttierischen Eukaryoten existent sind. Sie ermöglichen eine Aufnahme und Weiterleitung externer Stimuli und rufen eine Antwort auf spezielle Umweltbedingungen hervor. Dadurch ist es den Organismen möglich auf Umweltveränderungen zu reagieren und die Genexpression entsprechend dieser Veränderungen so anzupassen, dass ein Überleben möglich ist (Perraud *et al.*, 1999; Stock und Levit, 2000; West und Stock, 2001).

Ein typisches Zweikomponentensystem besteht aus einer meist membranverankerten Sensorkinase (SK-Histidinkinase) und einem Responseregulator (RR), wobei die Signaltransduktion über die Membran via Phosphorylierung der Zwei-Komponentensystemproteine erfolgt. Sensorkinasen nehmen ein meist externes Signal (z.B. kleine Moleküle oder veränderte Membranspannung) wahr, welches dann die Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest zur Folge hat. Nach der Autophosphorylierung erfolgt die Übertragung des Phosphatrestes auf den dazugehörigen Responseregulator, dessen Konformationszustand dadurch verändert wird. Die meisten Responseregulatoren sind Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren oder Repressoren), deren C-terminale Domäne ein DNA-Bindemotiv aufweist und somit eine Interaktion mit der DNA ermöglicht (Stock und Levit, 2000; West und Stock, 2001; Wolanin *et al.*, 2002). Dieser Histidin-Aspartat Phosphotransfer ermöglicht dann die spezifische Regulation von Zielgenen.

E.coli besitzt mit 62 eine durchaus moderate Anzahl an Zweikomponentensystemproteinen (Mizuno, 1997) und nutzt diese unter anderem zur Regulation der Chemotaxis (CheZ/CheY), der Osmolarität (PhoP/PhoQ), der Kapselsynthese (RcsC/RcsB), des Metabolismus (ArcB/ArcA) und des Kohlenstoffmetabolismus (BarA/UvrY).

In einigen *Mykoplasmen* sind keine dieser Proteine anzutreffen, während das Cyanobakterium *Synechocystis* mit 94 mehr als *E.coli* besitzt (Mizuno, 1997). Generell findet man

eine höhere Anzahl an Zweikomponentensystemen in frei lebenden Bakterien als in pathogenen Species. Der Grund hierfür liegt in der Spezialisierung von Pathogenen an ihren Wirt und den damit sehr speziellen und immer identischen Umweltbedingungen. In pathogenen Mikroorganismen spielen Zweikomponentensysteme hauptsächlich eine Rolle bei der Vermittlung der Virulenz und der Antibiotikaresistenz (Tomenius *et al.*, 2006, Kato und Groisman, 2004).

In Pflanzen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* sind Zweikomponentensysteme an der Regulation des Osmostress, des Zellwachstums und der Differenzierung von Bedeutung, wobei häufig Hormone wie z.B. Cytokinine als Signal der Kinasen dienen (Oka *et al.*, 2002; Lohrmann und Harter, 2002). Generell werden in eukaryotischen Signalkaskaden andere Kinase-Klassen (Serin/Threonin und Tyrosin) genutzt (Hanks und Hunter, 1995). Meist sind die eukaryotischen Zweikomponentensysteme anderen Signalkaskaden (wie z.B. MAP-Kinase-Weg in *Saccharomyces cerevisiae* oder zyklischen-Nukleotid-Kaskaden) vorgeschaltet und lösen im Gegensatz zu bakteriellen Zweikomponentensystemen nicht direkt eine spezifische Antwort aus (Maeda *et al.*, 1994; Wurgler-Murphy und Saito, 1997; West und Stock, 2001).

Die evolutionäre Entwicklung vieler verschiedener Zweikomponentensysteme innerhalb einer Bakterienspecies ist vermutlich auf den horizontalen Gentransfer und die Abstammungsspezifische Ausbreitung durch Genduplikationen zurückzuführen (Alm *et al.*, 2006). Während der Entwicklung haben sich dann die Spezifitäten für verschiedene Signale und die Sensorkinase-Responseregulatorerkennung herausgebildet (Fabret *et al.*, 1999; Hoch 2000; Zhang *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008; Laub und Goulian, 2007). Bis heute sind die konkreten Stimuli, die die Sensorkinasen aktivieren, weitestgehend unbekannt.

Auf Grund der Struktur der Sensorkinasen werden zwei Klassen von Zweikomponentensystemen voneinander unterschieden. Die klassischen orthodoxen Zweikomponentensysteme und die unorthodoxen – Multikomponentensysteme (Phosphorelaysysteme) (Perraud *et al.*, 1999; Stock und Levit, 2000; West und Stock, 2001). Beide Klassen sind in Bakterien anzutreffen, wobei die klassischen Zweikomponentensysteme dabei jedoch dominieren. In Eukaryonten hingegen trifft man vermehrt Phosphorelaysysteme an.

1.3.1.1. Klassische Zweikomponentensysteme

Klassische Zweikomponentensysteme sind gekennzeichnet durch den Besitz von einfach aufgebauten Sensorkinasen und dem dazugehörigen Responseregulator.

Hauptsächlich sind diese Sensorkinasen in der Zytoplasmamembran lokalisiert, wobei die N-terminale Sensor- bzw. Inputdomäne in das Periplasma reicht und an das jeweils aufzunehmende Signal angepasst ist. In der Regel sind diese Sensorkinasen über zwei Transmembranhelices in der Membran verankert (Stock und Levit, 2000). Dennoch gibt es auch Beispiele, bei denen die Anzahl der Membranhelices nicht auf zwei beschränkt ist. So besitzen einige Sensorkinasen bis zu acht Transmembranhelices (Bsp. UhpB) und andere wie z.B. die Stickstoff-regulatorische Kinase NtrB besitzen keinen Membrananker. Diese löslichen Sensorkinasen werden durch intrazelluläre Signale oder durch die Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne anderer Proteine reguliert (Stock und Levit, 2000).

Über einen flexiblen Linker (HAMP-Domäne = Histidin Kinase, Adenylyl Cyclase, MCP und Phosphatase) ist die Sensordomäne mit der Transmitterdomäne verbunden (Williams und Stewart, 1999). Dieser Linker ist ca. 50 Aminosäuren lang und spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung, indem er eine Konformationsänderung der Sensorkinasemonomere zueinander bewirkt (Tomenius *et al.*, 2005; Hulko *et al.*, 2006).

Die Transmitterdomäne ist ungefähr 350 Aminosäuren lang und enthält C-terminal die ATP-bindende katalytische Domäne und die Dimerisierungsdomäne (Khorchid und Ikura, 2006; Stock *et al.*, 2000; West und Stock, 2001; Wolanin *et al.*, 2002). Abhängig von dieser Transmitterdomäne kann man 11 verschiedene Sensorkinase-Klassen bilden, die jedoch alle fünf Sequenzmotive gemein haben: H, N, G1, F und G2 (Parkinson und Kofoid, 1992). Innerhalb der Dimerisierungsdomäne ist die so genannte H-Box mit dem konservierten Histidin als Phosphorylierungssubstrat lokalisiert. Da die Autophosphorylierung in *trans* vollzogen wird, die katalytische Domäne eines Monomers also das Histidin im zweiten Monomer phosphoryliert, spielen bei der Histidin-Kinase-Aktivität die Sensor- und die Dimerisierungsdomäne eine entscheidende Rolle (Ninfa *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1993). Im Anschluss daran erfolgt die Übertragung des Phosphates vom Histidin auf ein Aspartat im Responseregulator (Weigel *et al.*, 1982). In vielen Fällen besitzt die Transmitterdomäne nicht nur Autokinaseaktivität, sondern auch Phosphataseaktivität für den Partner-Responseregulator (Carmany *et al.*, 2003; Perego und Hoch, 1996; Zhu *et al.*, 2000).

Responseregulatoren setzen sich aus zwei Domänen zusammen, der N-terminalen konservierten regulatorischen Domäne (Receiver) und der C-terminalen Outputdomäne (Stock und Levit, 2000). Das konservierte Aspartat befindet sich innerhalb der Receiverdomäne und empfängt das Phosphat von der Sensorkinase. Zusätzlich dazu ist die Receiverdomäne auch an der Katalyse der Autodephosphorylierung und an der Regulation der Aktivität der

Outputdomäne beteiligt (Perraud *et al.*, 1999; Stock und Levit, 2000; West und Stock, 2001). Wie bei den Transmitterdomänen lassen sich innerhalb der Receiverdomäne drei konservierte Sequenzmotive: D1, D2 und K beschreiben, wobei das konservierte Phosphat-akzeptierende Aspartat im Motiv D2 anzutreffen ist (Mizuno, 1997). Strukturell ähnelt die Receiverdomäne einem Fass, das aus fünf parallelen β -Faltblättern umgeben von fünf α -Helices gebildet wird (Stock und Levit, 2000; West und Stock, 2001). Die C-terminale Outputdomäne der meisten Responseregulatoren ist durch die Fähigkeit an die DNA zu binden charakterisiert. Strukturell kann diese DNA-bindende Domäne unterschiedlich gestaltet sein, z.B. durch „winged“ Helices (OmpR-Familie), vier Helix-Domänen (NarL-Familie) oder zwei Domänen (Helix-turn-Helix Motiv und ATPase-Domäne der NtrC-Familie) (Baikalov *et al.*, 1998; Martinez-Hackert und Stock, 1997; Mizuno und Tanaka, 1997; Pelton *et al.*, 1999). Außerdem gibt es auch einige Responseregulatoren, die keine Outputdomäne besitzen (Bsp. CheY) oder deren Outputdomäne nicht an die DNA bindet sondern enzymatische Aktivität besitzt oder andere Proteine binden kann (Bsp. CheB und RssB) (Stock *et al.*, 1989; Snyder *et al.*, 1984). Die Aktivierung der Responseregulatoren setzt die Phosphorylierung voraus und resultiert in einer Konformationsänderung des Proteins (Fabret *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 2000). So kann zum Beispiel die Phosphorylierung des Responseregulators das Lösen der Receiverdomäne von der Outputdomäne bewirken, sodass nunmehr die Outputdomäne frei für die Bindung an die DNA vorliegt (Kahn und Ditta, 1991; Huala *et al.*, 1992; Grimsley *et al.*, 1994). Oder aber die Interaktion mehrerer Receiverdomänen miteinander führen über die Dimerbildung bzw. Oligomerbildung zur Aktivierung der Outputdomäne (Fiedler und Weiss, 1995; McCleary, 1996; Weiss *et al.*, 1992; Wyman *et al.*, 1997; Webber und Kadner, 1997). Das Phosphorylierungsereignis von Responseregulatoren erfolgt nicht nur durch die Partner-Sensorkinase sondern kann *in vitro* auch durch Acetylphosphat, Carbamylphosphat, Imidazolphosphat, Benzoylphosphat oder Phosphoamidat vollzogen werden (Lukat *et al.*, 1992; Mayover *et al.*, 1999). Dabei ist hauptsächlich dem Acetylphosphat eine physiologische Relevanz zuzusprechen. Es kann als Stoffwechselintermediat auf zwei verschiedenen Wegen in der Zelle gebildet werden (aus Acetat und aus Acetyl-Co). Zahlreiche *in vivo* Studien haben außerdem gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Acetyl-Phosphatpool in der Zelle und der Aktivierung von Zweikomponentensystem-Zielgenen besteht (zusammengefasst in Wolfe, 2005; Klein *et al.*, 2007). Eine besondere Rolle spielt Acetylphosphat bei der Regulation der Flagellensynthese und der Kapselsynthese über das RcsC/D/B-Phosphorelaysystem (Fredericks *et al.*, 2006). Unter ganz bestimmten Bedingungen kann die Phosphorylierung eines Respon-

seregulators auch durch eine Nicht-Partnersensorkinase erfolgen (Groban *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2005). Als Nicht-Partner wird die Komponente bezeichnet (kann Sensorkinase oder Responsregulator sein), die nicht denselben regulatorischen / phänotypischen Output liefert wie es die eigentliche Partnerkomponente tun würde.

Eine Dephosphorylierung des Responseregulators kann beispielsweise durch die zugehörige bifunktionale Sensorkinase erfolgen, die im unphosphorylierten Zustand als Phosphatase wirkt (Alves und Savagenau, 2003). Außerdem können Responsregulatoren eine intrinsische Autophosphataseaktivität besitzen oder aber sie werden durch eine zusätzliche Phosphatase reguliert (Blat und Eisenbach 1994, 1996; Perego, 1997; Pena-Sandoval *et al.*, 2005).

1.3.1.2. Phosphorelay-Zweikomponentensysteme

Phosphorelaysysteme unterscheiden sich von klassischen Zweikomponentensystemen dahingehend, dass zusätzliche Module wie Receiver-Domänen (D1) oder Hpt-Domänen (H2, Hpt = Histidin-Phosphotransfer) für den Phosphotransfer benutzt werden. In vielen Fällen ist die Receiverdomäne D1 an die Transmitterdomäne (H1) der Sensorkinase fusioniert. Die Hpt-Domäne kann als eigenständige Domäne oder der D1-Domäne der Sensorkinase nachfolgend am Phosphotransfer beteiligt sein (Appleby *et al.*, 1996; Posas *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung der D1-Domäne erfolgt wie bei der Receiverdomäne von Responsregulatoren (D2) an einem konservierten Aspartat. Damit besitzt die D1-Domäne katalytische Aktivität sowohl für den Phosphotransfer von der H1-Domäne als auch für den Phosphotransfer zur H2-Domäne (Georgellis *et al.*, 1997). Hpt-Domänen sind den Transmitterdomänen (H1) nicht homolog und präsentieren den Responsregulatoren den Phosphatrest, ohne katalytisch aktiv zu sein (Tsuzuki *et al.*, 1995). Durch diese zusätzlichen Module wird die Phosphorylierung des Responseregulators durch einen seriellen Mehrfachphosphotransfer (ATP-His-Asp-His-Asp) realisiert (Georgellis *et al.*, 1997; Jourlin *et al.*, 1997; Uhl und Miller, 1996). In *E.coli* sind insgesamt fünf dieser Hybrid-Sensorkinasen existent (RcsC, BarA, ArcB, TorR und EvgS). RcsC ist dabei die einzige Kinase, die eine eigenständige Hpt-Domäne (RcsD) bedient. Bei allen anderen Kinasen ist die Hpt-Domäne mit der D1-Domäne der Sensorkinase gekoppelt (Ishige *et al.*, 1994; Mizuno, 1997). Aufgrund dieser besonderen Struktur der Phosphorelaysysteme werden sie als potentielle Kandidaten für Crossregulation in der Zelle angesehen (Bijlsma und Groisman, 2003). Crossregulation ist definiert als die Phosphorylierung eines Responseregulators durch eine Nichtpartner-Sensorkinase mit physiologischer Relevanz *in vivo* (Wanner,

1992). Obwohl eine Vielzahl von Sensorkinasen in *vitro* Nichtpartner-Responseregulatoren phosphorylieren können, ist dieses Ereignis in der Zelle nur in Ausnahmefällen und unter ganz bestimmten Bedingungen zu beobachten. Damit wird ein ungewollter Crosstalk, der potentiell schädlich für die Zelle sein kann, verhindert (Groban *et al.*, 2009; Siryaporn *et al.*, 2008; Laub und Goulian, 2007; Mika *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005).

1.3.1.3. Modulation von Zweikomponentensystemen durch „Konnektoren“

Der Großteil der Responseregulatoren ist erst dann aktiv, wenn deren Phosphorylierung stattgefunden hat (Hoch 2000; Gao *et al.*, 2007). Jede Bedingung oder jedes Produkt, das in irgendeiner Form den Phosphorylierungsstatus des Responseregulators steuert, beeinflusst damit die Fähigkeit des Responseregulators bei der Ausübung seiner biologischen Funktion. Deshalb ist der Output von Responseregulatoren nicht nur abhängig vom spezifischen Signal, das durch die Sensorkinase wahrgenommen und weitergeleitet wird sondern auch von Genprodukten, die eine Stimulierung oder Inhibierung der Sensorkinase verursachen können. Prinzipiell können solche Produkte an den verschiedenen Schritten, die zur Phosphorylierung des Responseregulators führen, wirken. So können die Autophosphorylierung der Sensorkinase, der Phosphotransfer zum Responseregulator, die Dephosphorylierung des Responseregulators und die Aktivität der Outputdomäne Ziel der Kontrolle durch solche Produkte sein. Erst in den letzten Jahren wurden solche Genprodukte, die zum größten Teil kleine Proteine (meist kleiner als 200 Aminosäuren) darstellen, näher untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass diese kleinen Proteine als Antwort auf ein Signal synthetisiert werden, dass unterschiedlich zu dem Signal des Zweikomponentensystems ist, welches es beeinflusst, werden sie Konnektoren genannt. Sie kommen membrangebunden oder frei im Periplasma bzw. Zytoplasma der unterschiedlichen Bakterienspecies vor.

Das erste und bisher am besten untersuchte kleine Protein, das als Konnektor fungiert, stellt PmrD (engl.: resistance to polymyxin B) in *Salmonella typhimurium* dar. Es ist im Zytoplasma lokalisiert, umfasst 85 Aminosäuren und vernetzt die Zweikomponentensysteme PhoQ/P und PmrB/A miteinander. Das PhoQ/P-System ist bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen aktiv und erhöht die Expression des *pmrD*-Gens. Das synthetisierte PmrD Protein bindet dann direkt an den N-Terminus des Responseregulators PmrA und hält diesen in seinem phosphorylierten, aktiven Zustand, indem zum einen die intrinsische Autophosphataseaktivität von PmrA inhibiert wird und zum anderen die Dephosphorylierung durch dessen Kinase/Phosphatase PmrB verhindert wird. Als Antwort wird das Operon, welches die Polymyxin B Resistenz vermittelt, induziert. Hohe Eisenkonzentrationen hin-

gegen aktivieren das PmrB/A-System, das dann zu einer Hemmung der *pmrD*-Expression durch PmrA führt, um möglicherweise eine Akkumulation von aktiviertem Responseregulator PmrA zu verhindern (Kato und Groisman, 2004). Somit vermitteln zwei Signale (niedrige Magnesiumkonzentrationen und hohe Eisenkonzentrationen) die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Polymyxin B und sichern ein Überleben des Bakteriums unter diesen Umständen.

Ein weiteres kleines Protein, das eine Vernetzung von zwei Zweikomponentensystemen vollzieht, ist B1500. Diese Protein umfasst 65 Aminosäuren und durchspannt die Membran einmal, wobei der N-Terminus in das Zytoplasma und der C-Terminus in das Periplasma ragt. Es wird abhängig vom EvgS/EvgA-System induziert, interagiert mit der Sensorkinase PhoQ und aktiviert diese. Ob diese Aktivierung das Ergebnis einer Inhibition der Phosphataseaktivität oder die Aktivierung der Kinaseaktivität von PhoQ darstellt ist bislang noch nicht geklärt. Als Antwort wird die Expression von PhoQ/PhoP-abhängigen Genen, zu denen auch Säureresistenzgene (*GadW/HdeA*) zählen, aktiviert. Sowohl das EvgS/A-System, als auch das PhoQ/P-System sind an der Regulation der Säureresistenz beteiligt. Durch die Vernetzung dieser beiden Zweikomponentensysteme wird offenbar die Säureresistenz von *E.coli* bei Eintreffen zwei verschiedener Signale gewährleistet (Eguchi *et al.*, 2007).

Ein erst kürzlich identifiziertes kleines Protein, das ebenfalls als Konnektor zweier Systeme fungiert, ist YmgB. YmgB umfasst 88 Aminosäuren und vernetzt das YcgF/YcgE-Signalsystem mit dem RcsC/D/B-Phosphorelaysystem. Unter Bedingungen wie Blaulicht oder Kälte agiert YcgF als direkter Antagonist zu dem MerR-ähnlichen Regulator YcgE. Dieser kann dann nicht mehr an die Operator DNA binden und als Konsequenz werden acht kleine Proteine, zu denen auch YmgB zählt, induziert. Diese Induktion von YmgB hat die Ausbildung eines mukoiden Phänotyps zur Folge, der typischerweise über das Rcs-System durch die Aktivierung der Kapselsynthesegene vermittelt wird (Tschowri *et al.*, 2009). Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss von YmgB auf die Komponenten des Rcs-Systems näher untersucht und ist im Ergebnisteil 3 dargestellt.

1.3.2. Phosphorelaysysteme und ihre Funktion in *E.coli*

E.coli besitzt insgesamt fünf Phosphorelaysysteme (*ArcB/ArcA*, *EvgA/EvgS*, *TorS/TorR*, *BarA/UvrY* und *RcsC/D/B*), die abhängig von den eintreffenden Umweltsignalen spezifische Antworten in der Zelle auslösen. Im Folgenden werden die drei Systeme *RcsC/D/B*, *BarA-/UvrY* und *ArcB/ArcA* sowie deren Funktionen genauer erläutert.

1.3.2.1. Das RcsC/D/B-System und Biofilmregulation

Das Rcs-Phosphorelaysystem setzt sich aus der Sensorkinase RcsC, dem Hpt-Protein RcsD (früher YojN) und dem Responseregulator RcsB zusammen. In *E.coli* ist es das einzige Phosphorelaysystem, das ein eigenständiges (nicht an die Sensorkinase anfusioniertes) Hpt-Protein zur Übertragung des Phosphates benutzt (Takeda *et al.*, 2001). Die Funktion dieses Phosphorelaysystems ist vielfältig, so aktiviert es die Kapselsynthesegene, 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 (zusammengefasst in Majdalani und Gottesman, 2005).

Die Sensorkinase RcsC ist über zwei Transmembranhelices in der Membran verankert, besitzt eine periplasmatische Sensordomäne, gefolgt von einer PAS-Domäne, der charakteristischen Transmitterdomäne (H1) und der Receiverdomäne (D1). An Position H479 in der Transmitterdomäne (H1) ist das konservierte Histidin und an Position 875 in der Receiverdomäne (D1) ist das konservierte Aspartat lokalisiert (Takeda *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2002). Das besondere bei der Phosphatübertragung innerhalb dieses Phosphorelays ist, dass von der Receiverdomäne (D1) der Kinase das Phosphat auf das eigenständige Hpt-Protein RcsD überträgt. RcsD ist ebenfalls über zwei Transmembranhelices in der Membran verankert, besitzt N-terminal eine periplasmatische Domäne und C-terminal die Hpt (H2)-Domäne. Der Responseregulator RcsB besitzt N-terminal die typische Receiverdomäne (D2) mit dem konservierten Aspartat an Position 56. Der C-Terminus von RcsB ist gekennzeichnet durch das Helix-turn-Helix Motiv zur Bindung an die DNA, welches in die LuxR-Familie einzuordnen ist (Stout und Gottesman, 1990). Nach der Aktivierung des Responseregulators RcsB durch das Phosphorylierungsereignis kann dieser eigenständig oder zusammen mit dem zusätzlichen Faktor RcsA die Genexpression steuern. Dieser Kofaktor RcsA ist ebenfalls in der Lage durch eine Helix-turn-Helix Domäne (LuxR-Familie) spezifisch an die DNA zu binden. Untersuchungen einiger Zielgene von RcsB oder RcsB/RcsA haben gezeigt, dass je nachdem, ob RcsB alleine oder zusammen mit RcsA reguliert, unterschiedliche Bereiche innerhalb des Promotors als Bindestelle benutzt werden. Die Expression der kleinen RNA RprA wird beispielsweise nur durch RcsB aktiviert, wobei die Bindestelle in der Nähe der -35 Promotorregion (ausgehend vom Transkriptionsstart) lokalisiert ist (Majdalani *et al.*, 2002). Die positive Regulation der Kapselsynthesegene (*cps*) hingegen ist abhängig von RcsB und dem Kofaktor RcsA, die zusammen an Position -98 bis -112 (ausgehend vom Transkriptionsstart) innerhalb des Promotorbereiches binden (Pristovsek *et al.*, 2003). Über die Art und Weise, wie RcsB bzw. RcsB/RcsA

die Transkription seiner Zielgene aktiviert ist bislang nichts bekannt und auch das tatsächlich aktivierende Signal für die Sensor kinase konnte noch nicht identifiziert werden. Die meisten phänotypischen Ausprägungen wurden mit Hilfe von Mutanten oder durch Überproduktion bestimmter Proteine erzielt. Dabei konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die bei der Aktivitätsregulation von RcsC eine wesentliche Rolle spielen. So führen zum Beispiel die Überproduktion des DnaJ-ähnlichen Proteins (DjlA) zur Aktivierung der Sensor kinase und Mutationen in den Genen *rfaG* (kodiert für ein Enzym der Lipopolysaccharidcoresynthese), *mdo* (periplasmatisches, Membran-Oligosaccharid), *pgsA* (Phosphatidylglycerinsynthese) und *surA* (Peptidyl Propyl Isomerase) zur Inaktivierung (Shiba *et al.*, 2004; Rouviere und Gross, 1996; Ebel *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1997; Kelley und Georgopoulos, 1997; Parker *et al.*, 1992). Ein weiteres, an der Signalweiterleitung beteiligtes Protein, ist das in der Außenmembran lokalisierte Lipoprotein RcsF (Castanie-Cornet *et al.*, 2006). Damit nehmen Membranveränderungen einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung des Rcs-Systems. Zusätzlich dazu führen auch Bedingungen wie hohe Osmolaritäten und das Wachstum auf einer feuchten Oberfläche zur Aktivierung des Rcs-Phosphorelaysystems (zusammengefasst in Majdalani und Gottesman, 2005). Von besonderer Bedeutung ist das Rcs-System bei der Biofilmbildung. Erste Hinweise dafür lieferten Mutanten in den Genen für die Kapselsynthese, die nicht mehr in der Lage waren, die typische dreidimensionale Biofilmstruktur auszubilden (Danese *et al.*, 2000). Dieser Defekt in der Biofilmbildung wurde später auch mit einer *rscC* loss of funktion – Mutante beobachtet (Ferrieres und Clarke, 2003). Der zusätzliche Befund, dass die Flagellensynthese durch das Rcs-Phosphorelaysystem reprimiert wird (Francez-Charlot *et al.*, 2003), deutet auf eine Rolle dieses Systems bei der Reifung eines Biofilms, nachdem also die Anheftung an eine Oberfläche schon abgeschlossen ist. Welche Rolle und über welchen Mechanismus das Rcs-System die Synthese der Curlifimbrien beeinflusst, die essentiell für die Anheftung an Oberflächen sind, wurde innerhalb dieser Arbeit intensiv untersucht und im Ergebnisteil 2 dargestellt.

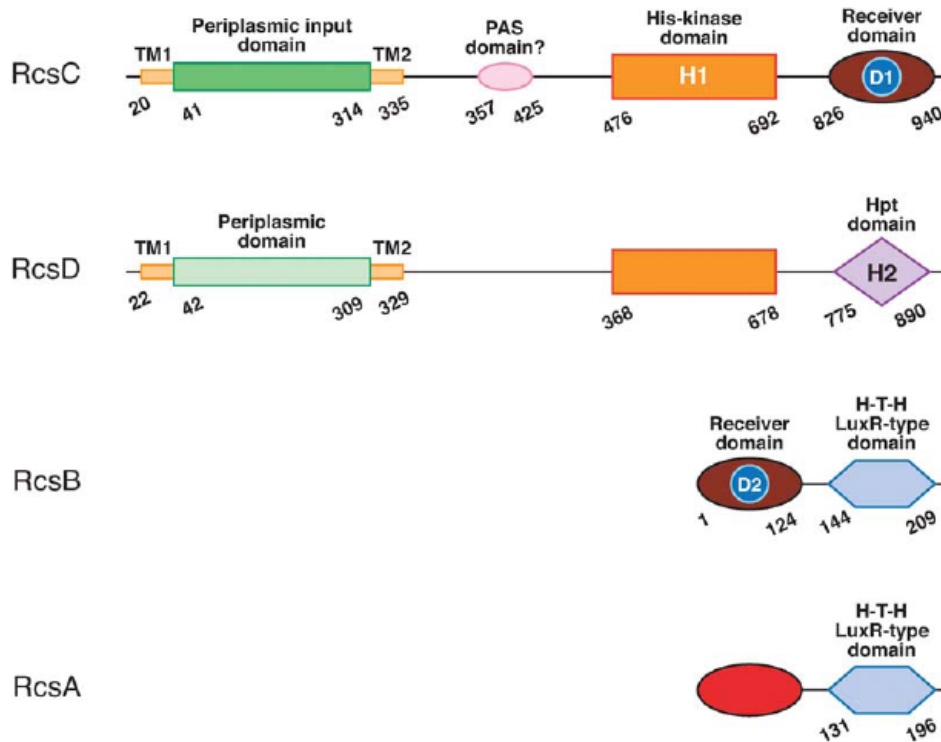


Abbildung II: Schematische Darstellung der Komponenten des Rcs-Phosphorelaysystems (aus Majdani und Gottesman, 2005)
 Erläuterungen siehe Text

1.3.2.2. Das BarA/UvrY-System und das Csr-System bei der Biofilmregulation

Ein durchaus global agierendes Phosphorelaysystem ist das BarA/UvrY-System. Das tatsächliche Signal für die Sensorkinase BarA ist bislang unbekannt, dennoch konnte mit verschiedenen Methoden ein Einfluss des BarA/UvrY-Systems auf den Kohlenstoffmetabolismus, Eisenmetabolismus, die Zellteilung und die Flagellen- und Pilissynthese festgestellt werden (Sahu *et al.*, 2003; Pernestig *et al.*, 2003). Die Sensorkinase BarA (engl.: bacterial adaptive response gene A) ist eine typische Hybridsensorkinase, die nach ihrer Autophosphorylierung über einen seriellen Phosphotransfer das Phosphat auf den zugehörigen Responseregulator UvrY, der der FixJ Familie angehört, überträgt (Nagasawa *et al.*, 1992; Pernestig *et al.*, 2001). Das *uvrY*-Gen wird mit dem *uvrC*-Gen, das für ein DNA Reparaturenzym kodiert, kotranskribiert. Dennoch spielt UvrY keine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden, die durch UV-Licht verursacht werden (Moolenaar *et al.*, 1987). Die Transkription von *uvrY* ist abhängig von SdiA. SdiA ist der LuxR Familie angehörig, die durch eine Domäne für die Bindung von N-Acetyl-Homoserinlaktone (AHL) und eine DNA-bindende Domäne charakterisiert ist (Stevens und Greenberg, 1999). Für *E.coli* und auch *Salmonella* ist jedoch nicht bekannt, dass sie N-Acetyl-Homoserinlaktone synthetisieren können. Innerhalb ihres Genoms konnten zudem keine Gene, die für AHL-Synthasen

kodieren, auffindig gemacht werden. Trotzdem scheint das Protein SdiA in *Salmonella enterica* als Rezeptor für AHL, die von anderen Species gebildet werden, zu fungieren (Michael *et al.*, 2001). Dies könnte auch auf *E.coli* zutreffen.

Das BarA/UvrY-System ist Homolog zum GacS/GacA-System in *Pseudomonas*, VarS/VarA in *Vibrio*, ExpS/ExpA in *Erwinia* und BarA/SirA in *Salmonella*, wo es hauptsächlich an der Regulation von Virulenzmechanismen beteiligt ist (Heeb und Haas, 2001; Ahmer *et al.*, 1999). Es agiert global und zeigt einen Einfluss auf den Kohlenstoffmetabolismus (beim Wechsel von glykolytischen zu glukoneogenen Kohlenstoffquellen), die Motilität (negativ), die Biofilmbildung (positiv) und vermittelt die Virulenz in uropathogenen *E.coli* Stämmen (Pernestig *et al.*, 2003; Tomenius *et al.*, 2006; Teplitski *et al.*, 2003). Einige dieser Einflüsse (wie z.B. Herunterregulation der Motilität, Aktivierung der Biofilmbildung und der Einfluss auf den Kohlenstoffmetabolismus) werden nicht direkt durch das BarA/UvrY-System vermittelt sondern sind die Folge der Regulation von Komponenten des Csr (engl.: carbon storage regulator) – Systems durch das BarA/UvrY-System. In *E.coli* aktiviert das BarA/UvrY-System die Expression der kleinen RNAs CsrB und CsrC (Suzuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003). Sie sequestrieren den globalen Regulator CsrA, ein RNA-bindendes Protein, das posttranskriptional die Prozesse des Kohlenstoffmetabolismus, der Motilität und der Biofilmbildung kontrolliert (Romeo, 1998; Wei *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Jonas *et al.*, 2008; und zusammengefasst in Babitzke und Romeo, 2007).

1.3.2.3. Das ArcB/ArcA-System und die generelle Stressantwort

Das Kürzel Arc steht im Englischen für Aerobic Respiration Control und beschreibt bereits die Funktion dieses Systems ArcB/ArcA, das mit der Wahrnehmung der Redoxbedingungen während des Wachstums die Umprogrammierung des Stoffwechsels von aerobem zu anaerobem Metabolismus reguliert (Lynch und Lin, 1996a). Die Sensorkinase ArcB ist eine typische Hybridsensorkinase mit Inputdomäne, Transmitterdomäne (H1), Receiverdomäne (D1) und Hpt-Domäne (H2) (Iuchi *et al.*, 1990). Innerhalb der Linker-Domäne sind eine PAS-Domäne und ein Leucin-Zipper-Motiv vorhanden, wobei die PAS-Domäne in die Wahrnehmung von Sauerstoff, des Redoxpotentials und von Licht beteiligt ist (Taylor und Zhulin, 1999; Georgellis *et al.*, 1998). Das Arc-System ist eines der wenigen Systeme, bei denen das direkte Signal für die Sensorkinase bekannt ist. So konnte gezeigt werden, dass oxidierte Quinone (Ubiquinone und Menadion) das direkte Signal für ArcB darstellen (Georgellis *et al.*, 2001). In Anwesenheit oxidiertes Quinone erfolgt die Oxidie-

rung von Cysteinresten in der Linkerregion von ArcB, die dann zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei ArcB-Monomeren führen und in der Inhibition der Kinase resultieren. Für anaerobe Bedingungen postuliert man das Vorhandensein von reduzierten Quinonen, die kein Signal für ArcB darstellen, deshalb ArcB also aktiviert vorliegt (Malpica *et al.*, 2004). Zusätzlich kann die Autophosphorylierbarkeit von verschiedenen anaeroben Metaboliten wie D-Laktat, Pyruvat und Acetat stimuliert werden (Georgellis *et al.*, 1999). Die Autophosphorylierungsreaktion läuft am His292 der Transmitterdomäne ab. Von dort erfolgt der serielle Phosphotransfer auf das Aspartat576 der Receiverdomäne (D1), dann auf das Histidin717 der Hpt-Domäne (H2) und letztendlich auf das Aspartat54 im Responseregulator ArcA (Georgellis *et al.*, 1997; Ishige *et al.*, 1994; Iuchi, 1993; Tsuzuki *et al.*, 1995). Ein reverser Phosphorelay führt unter oxidierenden Bedingungen zur Dephosphorylierung von ArcA (Pena-Sandoval *et al.*, 2005). ArcA selbst ist ein transkriptioneller Regulator, der durch ein Helix-turn-Helix Motiv zur Bindung an die DNA befähigt ist (Iuchi und Lin, 1988). Im inaktiven (unphosphorylierten) Zustand liegt ArcA als Dimer vor. Nach der Phosphorylierung ist ArcA aktiv, bildet Oktamere aus (Jeon *et al.*, 2001) und ist in der Lage Gene oder ganze Operone in ihrer Expression zu regulieren. Dazu zählen zum Beispiel Enzyme, die unter aeroben Bedingungen im TCA-Zyklus aktiv sind (Bsp. *sdh*-Operon), fettsäureabbauende Enzyme, Flavoprotein-Dehydrogenasen und Ubiquinonoxidasen (zusammengefasst in Malpica *et al.*, 2005). Eine weitere Funktion des Arc-Systems ist die Regulation der generellen Stressantwort in *E.coli*, die auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht. Zum einen reprimiert das Arc-System die Expression des Stationärphasen-Sigmafaktors σ^S auf transkriptionaler Ebene und zum anderen ist die Sensorkinase ArcB in der Lage den „orphanen“ Responseregulator RssB zu phosphorylieren, der dann in seinem aktiven Zustand den Stationärphasen-Sigmafaktors σ^S bindet und der ClpX-Protease zum Abbau zuführt (Mika *et al.*, 2005). Damit koordiniert das Arc-System die Synthese und den Abbau von σ^S .

1.4. Neue Regulationsmechanismen durch kleine RNAs

Die Erforschung kleiner RNAs (small RNAs) - auch nicht kodierende RNAs genannt - in Bakterien ist in den letzten Jahren immer mehr in das wissenschaftliche Interesse gerückt. Lange Zeit blieben kleine RNAs unerkant, denn durch ihre geringe Größe sind sie nicht so oft von Mutationsereignissen betroffen. Wenn dann doch eine Mutation innerhalb einer kleinen RNA stattfand, resultierte das meist nicht in einem ausgeprägten Phänotyp. Innerhalb der letzten Jahre wurden jedoch vermehrt neue Methoden zur Identifizierung und zur

Funktionsaufklärung kleiner RNAs etabliert. Viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich intensiv mit der Computer-basierten Suche nach neuen RNAs (zusammengefasst in Livny und Waldor, 2007). Weitere Methoden wie Mikroarrays und „deep“-Sequenzierungen brachten zusätzlich eine große Anzahl von kleinen RNA-Kandidaten ans Tageslicht (Sittka *et al.*, 2008; Landt *et al.*, 2008). In *E.coli* wurden bislang die meisten kleinen RNAs identifiziert.

Die erste identifizierte kleine RNA überhaupt war MicF im Jahre 1984, wobei deren Funktion der Translationsinhibition der *ompF*-mRNA erst im Jahre 1993 aufgeklärt wurde (Mizuno *et al.*, 1984).

Prinzipiell kann man in *cis* und in *trans* kodierte kleine RNAs voneinander unterscheiden. In *cis* kodierte RNAs sind auf dem gegenüberliegenden Strang der zu regulierenden mRNA lokalisiert und basenpaaren in der Regel mit dem gesamten Bereich der Ziel-mRNA. Sie sind zwischen 50 – 350 Nukleotide lang, besitzen nur ein einziges Zielgen und sind hauptsächlich a) an der Kontrolle der Replikation, Stabilität und Konjugation von Plasmiden und b) der Transposition von Transposons beteiligt. Zusätzlich dazu können chromosomal *cis*-kodierte RNAs den Stoffwechsel, die Stressantwort und die Killertoxinbildung regulieren. Als ein Beispiel für die Säurestressantwort sei hier die kleine RNA GadY erwähnt, die nach Bindung an die *gadXW*-mRNA zur Prozessierung führt, die die *gadX*-mRNA stabilisiert (Brantl, 2007; Opdyke *et al.*, 2004; Tramonti *et al.*, 2008).

In *trans* kodierte kleine RNAs sind ca. 50-250 Nukleotide lang. Sie sind an einer anderen Stelle im Genom als ihr Zielgen kodiert und zeigen nur kurze, unvollständige Komplementarität zur Ziel-mRNA. Aus diesem Grund können in *trans* kodierte RNAs mehrere Zielgene besitzen.

In der Regel nehmen kleine RNAs einen Einfluss auf die Translationseffizienz oder mRNA Stabilität, indem sie mit der Ziel-mRNA basenpaaren, die Shine-Dalgarno-Sequenz maskieren oder durch Veränderung der mRNA-Sekundärstruktur diese für die Ribosomen zugänglich machen. Viele kleine RNAs rekrutieren nach ihrer Bindung an die Ziel-mRNA RNasen, um den Abbau der mRNA zu vollziehen (Masse *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2003).

Eine entscheidende Rolle bei der Aktivitätsregulation kleiner RNAs spielt das RNA-Chaperon Hfq. Es bindet bevorzugt an AU-reiche Regionen der kleinen RNAs, stabilisiert diese und unterstützt die Bindung an die Ziel-mRNA (zusammengefasst in Gottesman, 2005).

Kleine RNAs selbst werden abhängig vom Signalinput auf Syntheseebene reguliert. Die kleine RNA-RprA, die innerhalb dieser Arbeit im Speziellen untersucht wurde, ist abhän-

gig von dem RcsC/D/B-Phosphorelaysystem (Majdalani *et al.*, 2002). Andere kleine regulatorische RNAs wie zum Beispiel MicA und RybB sind dem σ^E -Regulon angehörig und werden demnach bei extrazytoplasmatischem Stress induziert (Johansen *et al.*, 2006; Udekwa *et al.*, 2005). Nach der Synthese werden kleine RNAs häufig prozessiert, wobei bisher wenig über die Aktivität der dabei entstehenden Fragmente bekannt ist.

Die einfachsten bakteriellen regulatorischen Elemente sind Sequenzen am 5' Ende von mRNAs. Sie können verschiedene Konformationen als Antwort auf unterschiedliche Umweltsignale (wie zum Beispiel veränderte Temperaturen oder kleine Moleküle-Liganden) annehmen und werden als Riboswitches bezeichnet. RNA-Thermometer als ein Beispiel stellen komplexe Stem-Loop Strukturen dar, die die Shine-Dalgarno-Sequenz maskieren. Erst bei höheren Temperaturen schmelzen diese Strukturen auf und ermöglichen den Ribosomen Zugang (Narberhaus *et al.*, 2006).

1.4.1. Funktionsweise von kleinen regulatorischen RNAs

a) Modulierung der Proteinaktivität

Kleine RNAs, die an Proteine binden und diese in ihrer Aktivität modulieren sind beispielsweise CsrB, CsrC, 6S und GlmY (Abb.III).

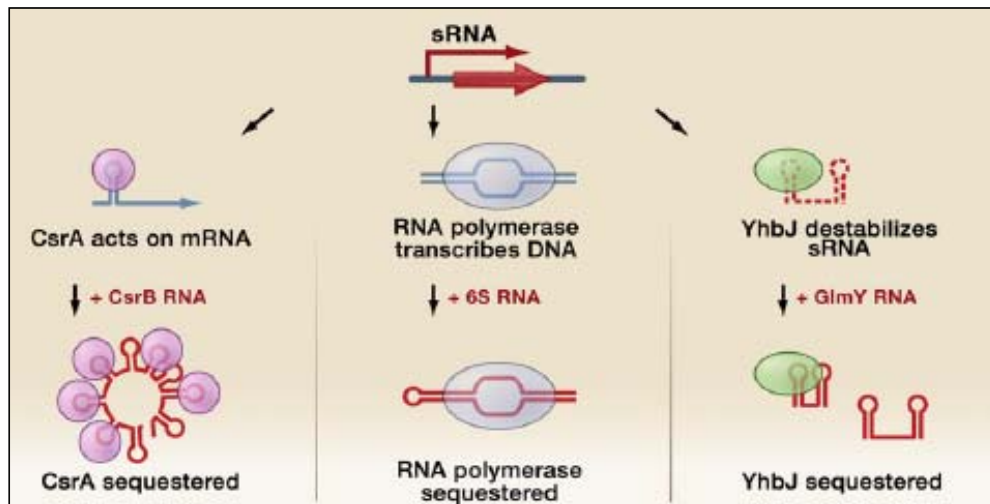


Abbildung III: Übersicht kleiner RNAs, die an Proteine binden und deren Aktivität beeinflussen (aus Waters und Storz, 2009)

Im Folgenden wird der Einfluss der kleinen RNAs CsrB und CsrC näher erläutert. Beide RNAs binden mit ihren mehrfach vorhandenen GGA-Bindestellen an das Regulatorprotein CsrA und modulieren damit dessen Aktivität. CsrA (engl.: carbon storage regulator) selbst bindet als Dimer an GGA-Motive innerhalb der 5' UTR seiner Ziel-mRNAs und übt

posttranskriptional einen Einfluss auf deren Stabilität und/oder Translation aus. Durch CsrA werden zum Beispiel die Biofilmbildung, die Motilität und der Kohlenstoffmetabolismus reguliert (zusammengefasst in Babitzke und Romeo, 2007). Die Transkription der *csrB* und *csrC* Gene wird durch das BarA-UvrY-Zweikomponentensystem aktiviert (Suzuki *et al.*, 2002; Gudapaty *et al.*, 2001). Zusätzlich dazu werden CsrB und CsrC durch ein weiteres RNA-bindendes Protein CsrD (YhdA) in ihrer Stabilität beeinflusst. CsrD rekrutiert RNaseE für den Abbau dieser beiden kleinen RNAs (Jonas *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006). In Anwesenheit der kleinen RNAs CsrB und CsrC binden diese an das CsrA Regulatorprotein, sequestrieren es, sodass CsrA keinen regulatorischen Einfluss mehr an den entsprechenden Ziel-mRNAs ausüben kann.

b) Regulation der mRNA Stabilität

Eine weitere wichtige Funktion kleiner RNAs in der Zelle ist die Destabilisierung von mRNAs. Häufig führt die Bindung einer kleinen RNA zum schnellen Abbau der Ziel-mRNA. Größtenteils wird dieser gezielte Abbau durch die Endonuklease RNase E bewerkstelligt, die bevorzugt AU-reiche einzelsträngige Sequenzen schneidet. Der weitere vollständige Abbau erfolgt durch Exonukleasen (zusammengefasst in Kennell, 2002). Der Mechanismus des mRNA-Abbaus, der über kleine RNAs gesteuert wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch gibt es Vermutungen, die zum einen darauf basieren, dass durch die verhinderte Ribosomenbindung Erkennungssequenzen für RNase E freigelegt werden und dadurch einen Abbau ermöglichen (Deana und Belasco, 2005). Zum anderen wird spekuliert, dass durch die Bindung der kleinen RNA an die Ziel-mRNA deren Sekundärstruktur derart verändert wird, dass die RNase E stimuliert wird. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die AU-reichen Regionen, die RNase E als Erkennungssequenz nutzt, häufig in der Nähe von stabilen Haarnadelschleifen befinden (Ehretsmann *et al.*, 1992; Coburn *et al.*, 1999). Damit könnten auch Sekundärstrukturen eine Rolle bei der Erkennung durch RNase E spielen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das RNA-Chaperon Hfq in den Abbau involviert ist. Hfq und RNase E nutzen ähnliche Erkennungssequenzen und sind in der Lage direkt miteinander zu interagieren, was vermuten lässt, dass Hfq bei der Erkennung und dem anschließenden Abbau durch RNase E behilflich ist.

Ein besonders gut untersuchtes Beispiel stellt die kleine RNA RyhB, die zusammen mit ihrer Ziel-mRNA durch RNase E sehr schnell abgebaut wird (Masse *et al.*, 2003)

c) Regulation der Translation

Der wichtigste Mechanismus kleiner regulatorischer RNAs ist die Translationsinhibition der entsprechenden Ziel-mRNA. Diese Translationsinhibition kann durch die direkte Blo-

ckierung der Ribosomenbindestelle (RBS), der Blockierung einer Ribosomen standby site oder der Induktion von Strukturveränderungen stromabwärts der RBS, die für eine effiziente Translation erforderlich ist, erfolgen. Häufig -aber nicht immer- ist die Translationsinhibierung von den oben erwähnten Abbauereignissen begleitet. Einige kleine RNAs können aber auch die Translation aktivieren. Dies wird im Fall der Translationskontrolle der *rpoSm*RNA durch die kleinen RNAs DsrA und RprA vermittelt. Zusätzlich dazu hat die Bindung der kleinen RNA OxyS an die *rpoSm*RNA eine Translationsinhibierung zur Folge. Bedingungen wie hohe Osmolarität, niedriger pH-Wert, niedrige Temperaturen und eine hohe Zelldichte führen zur erhöhten Translation von *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002b). Oxidativer Stress hingegen verringert die Translation von *rpoS* (siehe auch Abschnitt 1.4.2.).

d) Regulation durch Transkriptionstermination

Der Regulationsmechanismus der Transkriptionstermination ist bislang nur für in cis-kodierte kleine RNAs beschrieben worden. Ein Beispiel dafür stellt die Plasmidreplikationskontrolle des Streptokokkenplasmid pIP501 dar. Die Replikation des Plasmides wird dabei durch das geschwindigkeitslimitierende Initiatorprotein RepR reguliert. Die konstitutiv exprimierte in cis-kodierte RNA RNAlII bindet komplementär zu einem Teil der untranslatierten Region der *repR*-mRNA, was eine Konformationsänderung zur Folge hat und zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription vom *repR* Promotor führt (Brantl und Wagner 1994; Brantl, 2007).

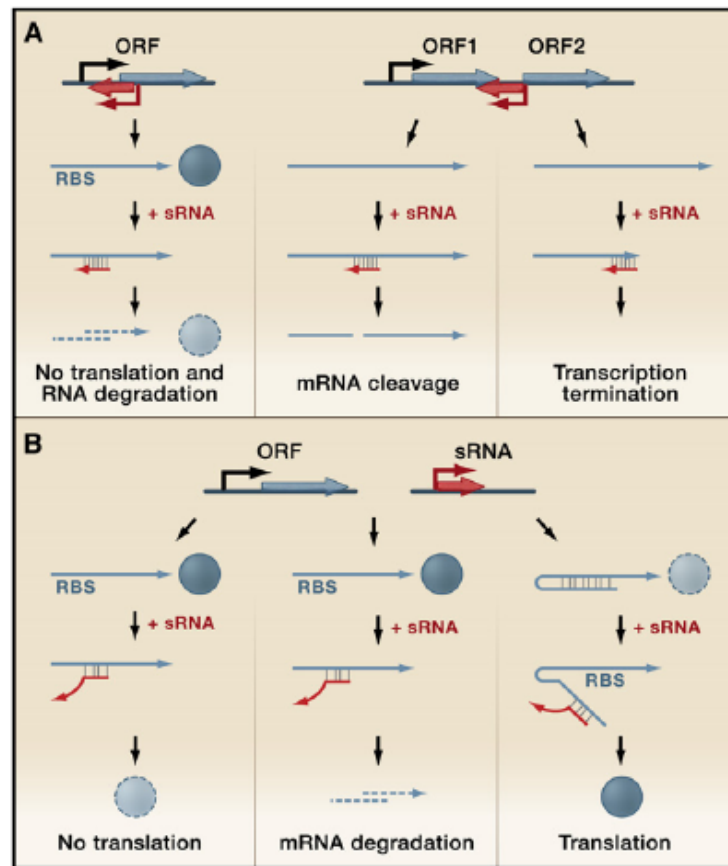


Abbildung IV: Schematische Darstellung der Funktionsweisen kleiner RNAs A) für in *cis*-kodierte RNAs und B) für in *trans*-kodierte RNAs (aus Waters und Storz, 2009)

Erläuterungen siehe Text

1.4.2. Funktion der kleinen RNA RprA in *E.coli*

Die Abkürzung RprA steht für RpoS regulatorische RNA. RprA ist eine in *trans* kodierte 105 Nukleotide große RNA und bei 38 min auf dem *E.coli* Chromosom lokalisiert (Argaman *et al.*, 2001). Nachdem man die RNA DsrA mit aktivierendem Einfluss auf die RpoS-Translation identifiziert hatte, suchte man mit Hilfe einer Multikopien Bibliothek von *E.coli* DNA Fragmenten nach weiteren Faktoren, die in Abwesenheit von DsrA ebenfalls einen aktivierenden Einfluss auf die RpoS-Translation ausübten. Dabei fand man die kleine RNA RprA (Majdalani *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen zeigten, dass RprA das RNA-Chaperon Hfq bindet und für seine Aktivität benötigt (Wassarman *et al.*, 2001; Majdalani *et al.*, 2002; Updegrove *et al.*, 2008). Die Synthese von RprA ist abhängig vom RcsC/D/B-Phosphorelay-system, wobei der Responseregulator RcsB in seinem aktiven Zustand die Transkription von *rprA* stimuliert (Majdalani *et al.*, 2002). Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass die Überproduktion des Transkriptionsfaktors LrhA einen reprimierenden Einfluss auf die *rprA*-Expression ausübt (Peterson *et al.*, 2006). Die RprA Mengen in der Zelle steigen mit Zunahme der Zelldichte an und sind besonders hoch in der stationären Phase (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001; Majdalani *et al.*, 2002).

Seine Halbwertszeit beträgt in der logarithmischen Phase zwischen 7-8 min (Majdalani *et al.*, 2002).

Zu Beginn dieser Arbeit war der Stationärphasen-Sigmafaktor *rpoS* als einziges Zielgen von RprA bekannt. Dabei kontrolliert RprA die Translation von *rpoS*. Die Translationseffizienz von *rpoS* steigt bei hoher Osmolarität, niedrigem pH-Wert, niedriger Temperatur und hoher Zelldichte (Hengge-Aronis, 2002b). Dieser Anstieg ist abhängig von Hfq (Muffler *et al.*, 1996b) und einer regulatorischen Sequenz, die sich stromaufwärts des *rpoS* Startkodons befindet. Unter uninduzierten Bedingungen sorgt diese Sequenz für die Ausbildung einer stabilen Haarnadelschleifenstruktur der *rpoS*-mRNA, wobei die Shine-Dalgarno-Sequenz durch Basenpaarung maskiert wird (Brown und Elliott, 1997). Die beiden kleinen RNAs DsrA und RprA wurden als Aktivatoren der *rpoS*-Translation identifiziert (Sledjeski *et al.*, 1996; Majdalani *et al.*, 2001), indem sie an die stromaufwärts gelegene Sequenz binden und damit diese Haarnadelstruktur auflösen (Majdalani *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 2001). Obwohl RprA während Osmoschockbedingungen nicht signifikant induziert wird, ist es teilweise an der Aktivierung der *rpoS*-Translation unter diesen Bedingungen beteiligt. Oxidativer Stress führt zur Induktion der kleinen RNA OxyS, die aber im Gegensatz zu DsrA und RprA die *rpoS*- Translation nach einem noch nicht geklärten Mechanismus inhibiert (Zhang *et al.*, 1998).

Die tatsächliche Struktur von RprA ist bislang nicht bekannt. Vorhersagen zeigen, dass RprA möglicherweise vier unterschiedlich große stem loops ausbildet (siehe Abb. V). Northernblotanalysen zeigten des weiteren, dass RprA prozessiert wird (Argaman *et al.* 2001).

Innerhalb dieser Arbeit konnte *csgD* als ein weiteres direktes Zielgen von RprA identifiziert werden. Zusätzlich dazu scheinen auch weitere Gene durch RprA reguliert (siehe Ergebnisteil 2).

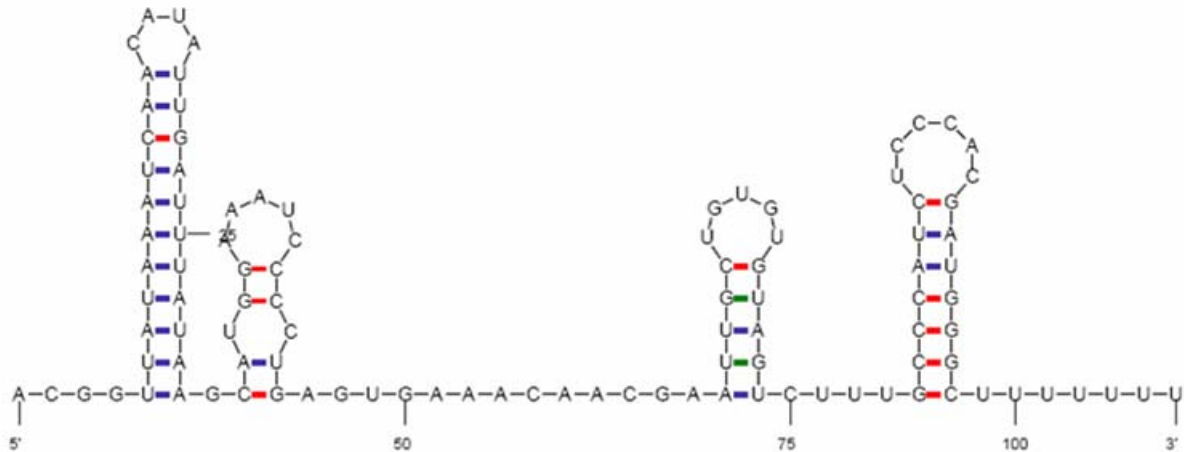


Abbildung V: vorhergesagte RprA-Struktur (Mfold-Quickfold Zuker *et al.*, 2003)

1.5. Biofilmbildung von Mikroorganismen

Abhängig von den aktuell vorherrschenden Umweltbedingungen sind Bakterien in der Lage zwischen verschiedenen „Lebensformen“ zu wechseln. So können sie je nach Umwelteinfluss zwischen dem motilen einzelligen Stadium (planktonische Lebensweise) und dem multizellulären Stadium (sesshafte Lebensweise) wechseln. Bei Biofilmen handelt es sich um eine mikrobielle Lebensgemeinschaft, die an einer Oberfläche adhärirt ist und von einer extrazellulären Matrix umgeben und geformt wird. Dabei können Bakterien einer Species oder Bakterien verschiedener Species einen Biofilm ausbilden. Eine Induktion der Biofilmbildung geht häufig mit Nährstoffmangelbedingungen einher (Gerstel und Römling, 2001). Ebenso beeinflussen die Temperatur, die Osmolarität, eine hohe Zelldichte (O'Toole *et al.*, 2000) oder Signalmoleküle wie N-Acetylhomoserinlaktone (Davies *et al.*, 1998; Stanley und Lazizzera, 2004) und Autoinducer-2 die Biofilmenentwicklung (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung beim Umschalten von planktonischer Lebensweise zur sesshaften Lebensweise ist das Signalmolekül c-di-GMP (D'Argenio und Miller, 2004; Jenal, 2004; Römling, 2005; Jenal und Malone, 2006; Mendez-Ortiz *et al.*, 2006). Bakterien in einem Biofilm sind insbesondere vor Stressen und auch vor Antibiotika, Desinfektionsmitteln und der Immunabwehr besser geschützt (Elvers *et al.*, 2002; Luppens *et al.*, 2002; Maira-Litran *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2002). Die Besiedlung von Oberflächen wie z.B. Implantate durch Bakterien stellt deshalb ein großes Problem in der Medizin dar. Zusätzlich dazu sind eine Vielzahl von chronischen Erkrankungen auf eine Biofilmbildung zurückzuführen (Bsp. Zystische Fibrose).

Die Entwicklung eines Biofilms kann man in insgesamt fünf Stadien untergliedern: 1) die reversible Adhäsion planktonischer Zellen an eine Oberfläche, 2) der Übergang von rever-

sibler zu irreversibler Adhäsion, 3) das frühe Reifestadium, 4) die Entwicklung von Mikrokolonien hin zum reifen Biofilm und 5) die Dispersion von Zellen aus dem Biofilm zurück zur planktonischen Lebensweise (zusammengefasst in van Houdt und Michiels, 2005; siehe Abbildung VI). Alle diese Stadien müssen fein aufeinander abgestimmt durch die Änderung der globalen Genexpression reguliert werden (zusammengefasst in Prüß *et al.*, 2006). Für viele Bakterien ist eine Flagellen-vermittelte Motilität notwendig, um eine Biofilmbildung überhaupt erst zu ermöglichen (Pratt und Kolter, 1999). Planktonische Bakterienzellen können dann mit anderen Bakterienzellen oder aber mit abiotischen oder biotischen Oberflächen interagieren und bilden so genannte Mikrokolonien. Abhängig von der Oberfläche werden für die irreversible Adhäsion TypI-Pili oder Curlifimbrien gebildet (Pratt und Kolter, 1998). Aus diesen Mikrokolonien entsteht dann der ausgereifte Biofilm. Zwischen den Mikrokolonien befinden sich Wasser gefüllte Kanäle, denen eine Rolle beim Influx von Nährstoffen und Efflux von Stoffwechselendprodukten zugesprochen wird (Costerton *et al.*, 1995; Pratt und Kolter, 1999). Der reife Biofilm ist gekennzeichnet durch die Bildung einer Kapsel aus Exopolysacchariden wie Cellulose und Kolansäure. Werden die Bakterien in einem Biofilm nicht mit ausreichend Nährstoffen versorgt, so sind sie in der Lage den Biofilm auch wieder zu verlassen. Dafür produzieren sie Enzyme, die die Auflösung der Matrix in ihrer unmittelbaren Umgebung auflösen und kehren dann zur planktonischen Lebensweise zurück (O'Toole *et al.*, 2000).

Die Biofilmbildung und -inhibition ist intensiv am Modellorganismus *E.coli* untersucht worden. Eine Fülle an Untersuchungen (Transkriptomanalysen, phänotypische Untersuchungen, *in vitro* DNA-Bindestudien, Mutantencharakterisierungen usw.) führten zu zahlreichen Erkenntnissen: die eine Rolle von Stress, der Zell-Zellkommunikation, kleiner RNAs und eine Rolle von Toxin/Antitoxingenen bei der Biofilmbildung/-inhibition aufzeigten (zusammengefasst in Wood, 2009).

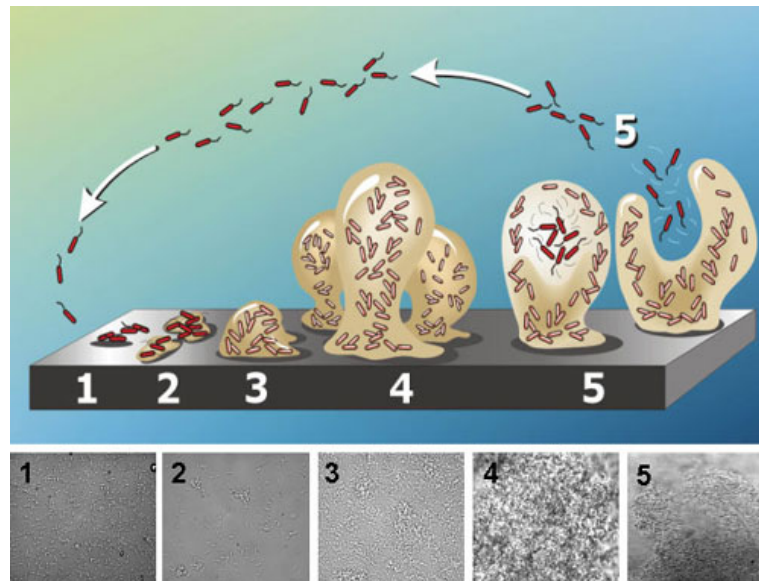


Abbildung VI: Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen der Biofilmstadien von *Pseudomonas* (von der Homepage von David Gavies)
Erläuterungen siehe Text

1.5.1. Biofilmbildung in *E.coli*

Die Biofilmbildung in *E.coli* folgt den oben erwähnten fünf Stadien. Über eine Vielzahl regulatorischer Komponenten werden diese Stadien, abhängig von den vorherrschenden Umweltbedingungen, kontrolliert. Bedingungen wie Nährstoffmangel, niedrigere Temperaturen (28°C) und der Übergang in die stationäre Phase induzieren die Biofilmbildung in *E.coli* (Weber *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006). Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, also gute Nährstoffbedingungen vorfinden, bewegen sich schwimmend mit Hilfe der dafür notwendigen Flagellen fort. Die Gene für die Synthese und Funktion des Flagellensystems werden hierarchisch exprimiert und die entsprechenden Promotoren werden in Abhängigkeit von ihrer zeitlichen Expression in drei verschiedene Klassen eingeteilt. An oberster Stelle der flagellaren Kaskade steht das *flhDC*-Operon, das in Abhängigkeit regulatorischer Signale (z.B. RcsB/RcsA, CRP-cAMP) exprimiert wird (Fraser und Hughes, 1999). Die Proteine FlhD und FlhC bilden einen heteromultimeren Komplex und wirken als Transkriptionsaktivatoren an den σ^{70} -abhängigen Klasse 2 Promotoren. Von diesen Klasse 2 Promotoren werden dann Strukturgene und regulatorische Gene wie *fliA*, *flgM* und *fliZ* transkribiert (Pesavento *et al.*, 2008). Das *fliA* Gen kodiert für den flagellaren Sigmafaktor σ^{28} , der für die Transkription der Klasse 3 Gene verantwortlich ist. FlgM stellt den Anti-Sigmafaktor da, der nach dem Aufbau der Haken-Basalkörper-Struktur durch diese exportiert wird und σ^{28} nicht mehr in seiner Aktivität behindert. FlhZ moduliert die Aktivität des Stationärphasen-Sigmafaktors σ^S und nimmt damit in der post-

exponentiellen Wachstumsphase einen inhibitorischen Einfluss auf die generelle Stressantwort und die Curli-Fimbrien Expression (Pesavento *et al.*, 2008).

Flagellen sind jedoch nicht nur für die schwimmende Fortbewegung von *E.coli* notwendig sondern auch für das erste Stadium der Biofilmbildung, der reversiblen Adhärenz an Oberflächen oder anderen Zellen. Dem folgt das zweite Stadium der irreversiblen Adhärenz, das durch z.B. Nährstoffmangelsituationen, beim Übergang in die stationäre Phase eingeleitet wird. *E.coli* stellt die Synthese der Flagellen ein, wirft vermutlich die vorhandenen Flagellen ab und beginnt mit der Synthese der adhäsiven Curli-Fimbrien, die über den essentiellen Regulator CsgD gesteuert wird (in Abschnitt 1.5.2 näher erläutert).

Im dritten (frühen) Reifestadium bilden sich so genannte Mikrokolonien für deren Entwicklung die Curli-Fimbrien essentiell sind. Zwischen diesen Mikrokolonien bilden sich Wasser gefüllte Kanäle, die eine Rolle bei der Versorgung mit Nährstoffen spielen (Costeron *et al.*, 1995; Pratt und Kolter, 1999).

Das vierte Stadium des reifen Biofilm ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer komplexen dreidimensionalen Struktur. Diese Struktur wird durch die Bildung weiterer extrazellulärer Matrixkomponenten wie Cellulose, Kolansäure, und PGA (beta-1,6-N-Acetyl-D-Glukosamin) hervorgerufen. Cellulose ist Hauptbestandteil der Pflanzen, wird aber auch von vielen Bakterienspezies gebildet. Die Rolle der Cellulose, die Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, konnte in der Familie der Enterobacteriaceae (zu denen auch *E.coli* gehört) noch nicht aufgeklärt werden. Derzeitige Untersuchungen liefern keinen Hinweis auf einen möglichen Einfluss auf die Virulenz von Enterobakterien. In *E.coli* ist die Cellulose-synthese über den Regulator CsgD mit der Curli-Expression verknüpft. Das Exopolysaccharid PGA vermittelt die Bindung an abiotische Oberflächen und interzelluläre Adhäsion während der Biofilmbildung (Wang *et al.*, 2004). Essentiell für den reifen Biofilm ist die Produktion der Kolansäure, die durch das RcsC/D/B-Phosphorelaysystem vermittelt wird.

Bei der Umschaltung von planktonischer Lebensweise zur sessilen Lebensweise spielen auch sekundäre Botenstoffe wie c-di-GMP und c-AMP eine große Rolle (zusammengefasst in Prüß *et al.*, 2006; Pesavento und Hengge, 2009). Zusätzlich dazu ist die zelluläre Konzentration von Acetyl-Phosphat entscheidend für die jeweilige Lebensweise von *E.coli* (Fredericks *et al.*, 2006).

1.5.2. CsgD als essentieller transkriptionaler Regulator der adhäsiven Curli-Fimbrien und anderer Biofilmfunktionen

Die zwei divergent zueinander angeordneten Operone *csgDEFG* und *csgBAC* kodieren für die Curlifimbrien-Biosynthese (Römling *et al.*, 1998a). Curli-Fimbrien sind proteinöse, filamentöse Oberflächenstrukturen von Bakterien (Olsen *et al.*, 1989), die in der Lage sind an biotische und abiotische Oberflächen zu binden und damit die Biofilmbildung ermöglichen (Römling und Rohde, 1999). Zusätzlich dazu können Curli-Fimbrien auch an Humanproteine w.z.B. Laminin und auch an Cellulose binden (Olsen *et al.*, 1993; Zogaj *et al.*, 2003). CsgA bildet durch Polymerisation die Curli-Fimbrien. CsgB ist ein Nukleatorprotein und ermöglicht die Verankerung der Curli-Fimbrien in die Außenmembran. CsgC ist noch nicht weiter charakterisiert. CsgE und CsgF sind an der Komplexbildung beteiligt.

Das Protein CsgD (engl. *curlin subunit gene D*) ist essentiell für die positive transkriptionale Regulation des *csgBAC*-Operons (Hammar *et al.*, 1995; Römling *et al.*, 1998). Neben diesen Genen reguliert CsgD auch *yaiC*, *yagS*, *pepD* und *glyA* (Brombacher *et al.*, 2003; Chirwa und Herrington, 2003). In *Salmonella* und *E.coli* aktiviert CsgD die Transkription der Gene *adrA* bzw. *yaiC* (Römling *et al.*, 2000; Römling, 2002). *YaiC* in *E.coli* ist ein GGDEF-Domänen Protein, das an der Bildung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP beteiligt ist. Darüber übt es einen positiven Einfluss auf die Cellulosesynthese aus. CsgD wirkt demzufolge über *YaiC* indirekt aktivierend auf die Cellulosesynthesegene *bcsA* und *bcsC*.

Strukturell ist CsgD der FixJ/LuxR/UhpA-Familie angehörig, die durch eine C-terminale Domäne mit einem potentiellen Helix-turn-Helix DNA-Bindemotiv und einer Receiverdomäne in der N-terminalen Region gekennzeichnet ist (Volz, 1993). Damit ist CsgD den Responseregulatoren von Zweikomponentensystemen sehr ähnlich, wird aber durch das Fehlen des Aspartatrestes nicht über den Phosphorylierungsstatus in seiner Aktivität beeinflusst.

Eine Reihe von Umweltbedingungen wie Temperatur, Nährstoffmangel, Osmolarität, Eisenkonzentration und pH-Wert kontrollieren die Curli-Expression (Gerstel und Römling, 2001; Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Römling *et al.*, 1998; Römling *et al.*, 2003). Die Expression von *csgD* ist sehr komplex reguliert und wird durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert ($E\sigma^S$, MlrA, EnvZ/OmpR, CpxA/CpxR, RcsC/D/B, IHF, H-NS, c-di-GMP). Der Stationärphasen Sigmafaktor σ^S steht an oberster Stelle und aktiviert die *csgD*-Expression (Olsen *et al.*, 1993). Dabei kann σ^S zum einen direkt am *csgD*-Promotor aktivieren und zum anderen kann σ^S indirekt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors MlrA positiv

wirken (Brown *et al.*, 2001). In *vitro* Untersuchungen haben für die Faktoren OmpR, IHF, H-NS und CpxR eine Bindung an die *csgD*-DNA gezeigt (zusammengefasst in Prüß *et al.*, 2006). Außerdem wird die Expression des Transkriptionsregulator CsgD durch GGDEF- und EAL-Domänen Proteine beeinflusst. So haben Studien von H. Weber gezeigt, dass die *csgD*-Transkription in *E.coli* antagonistisch durch das GGDEF-Domänen Protein YdaM und das EAL-Domänen Protein YciR kontrolliert wird (Weber *et al.*, 2006). YegE, als ein weiteres GGDEF/EAL-Domänen Protein, beeinflusst die Curlisynthese positiv und die Motilität negativ über die Bildung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP (Pesavento *et al.*, 2008). Antagonistisch zu YegE wirkt YhjH (EAL-Domänen Protein). YhjH, dessen Expression vom flagellaren Sigmafaktor FliA abhängig ist, baut den sekundären Botenstoffs c-di-GMP ab und sorgt dafür, dass der Spiegel niedrig bleibt, so lange Flagellen gebildet und benötigt werden (Pesavento *et al.*, 2008). Kürzliche Studien von N. Sommerfeldt zeigten, dass zwei weitere GGDEF/EAL-Domänen Proteine YhdA und YeaP an der Regulation der Curli-Fimbrien beteiligt sind. YhdA beispielsweise aktiviert die Expression von *ydaM* und *csgD*. YeaP aktiviert das *csgBAC*-Operon (Sommerfeldt *et al.*, 2009).

Der Einfluss des Rcs-Phosphorelaysystems bei der Regulation der Curli-Fimbrien wurde innerhalb dieser Arbeit intensiv untersucht und ist in Abschnitt 2 des Ergebnisteils ausführlich beschrieben.

Zielsetzung

Besonders wichtige Mechanismen zur Anpassung an widrige und ständig schwankende Umweltbedingungen stellen die Signaltransduktion und Regulation durch Zweikomponentensysteme dar. Lange Zeit wurden diese Systeme als in sich geschlossene Systeme betrachtet und analysiert. Zu Beginn dieser Arbeit gab es erste Hinweise, dass Zweikomponentensysteme durchaus mit anderen Systemen in einem regulatorischen Netzwerk organisiert sind, somit multiple Informationen integrieren und letztlich die Expression aller Gene koordinieren. Der Untersuchungsschwerpunkt innerhalb dieser Arbeit wurde dabei auf die Phosphorelaysysteme ArcB/ArcA, RcsC/D/B und BarA/UvrY gelegt. Drei Hauptfragestellungen diese Systeme betreffend waren: 1. Was ist (soweit nicht bekannt) der regulatorische Output dieser Systeme, 2. zeigen sie neuartigen regulatorischen Input und 3. sind sie über Crosstalk vernetzt.

Phosphorelaysysteme zeichnen sich durch den Besitz von Hpt-Domänen aus, die an die Sensorkinase anfusioniert (ArcB, BarA) oder als eigenständiges Protein (RcsD) vorkommen können. Durch diese besondere Architektur sind diese Sensorkinasen in der Lage einen seriellen Mehrfachphosphotransfer zu vollziehen und deshalb möglicherweise besser zum Crosstalk geeignet, als einfach aufgebaute Sensorkinasen.

Ein Teilbereich dieser Arbeit sollte deshalb unter Anwendung des Ansatzes der „Globalen Genetik“ Auskunft darüber geben:

- 1) welche Zweikomponentensysteme möglicherweise über Crosstalk/Crossregulation miteinander vernetzt sind,
- 2) welche Gene durch diese Zweikomponenten Phosphorelaysysteme reguliert werden und
- 3) in welcher Beziehung diese Phosphorelaysysteme zu dem Stationärphasen-Sigmafaktor σ^S und der generellen Stressantwort stehen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Rolle der patatin-ähnlichen Phospholipase RssA bei der Kontrolle von ArcB/ArcA/RssB und anderer Zweikomponentensysteme. Intensive Voruntersuchungen zeigten, dass RssA in der Lage ist, das Phospholipid Phosphatidylglycerin in Lysophosphatidylglycerin (LPG) und freie Fettsäuren zu spalten. Zudem gab es erste Hinweise darauf, dass dieses Spaltungsprodukt LPG *in vitro* an der Regulation der Sensorkinase ArcB beteiligt ist (Marquardt, Dissertation 2006). Innerhalb dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden:

- 1) welche Rolle RssA/LPG *in vivo* ausübt (Mikroarray-basierte Transkriptomanalysen),
- 2) wie RssA/LPG auf das ArcB/ArcA/RssB System wirkt,

-
- 3) ob Sensorkinasen anderer Zweikomponentensysteme ebenfalls durch RssA/LPG beeinflusst werden (mittels *in vitro* Auto- und Transphosphorylierungsexperimenten) und
 - 4) ob auch andere Membrankomponenten wie z.B. Cardiolipin der enzymatischen Aktivität von RssA unterliegen?

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei der intensiven Untersuchung des RcsC/D/B-Zweikomponenten Phosphorelaysystems und dessen Rolle bei der Biofilmbildung. Nachdem sich innerhalb dieser Arbeit herausgestellt hatte, dass die Vernetzung des YcgF/YcgE-Systems mit dem Rcs-System auf der Aktivitätsmodulation von RcsB durch den so genannten Konnektor YmgB beruht und in der Inhibition der Expression der Curlisynthesegene resultiert (Tschowri *et al.*, 2009), erhärteten sich die Vermutungen, dass das Rcs-System eine Rolle bei der Biofilmbildung spielt. Zusätzlich dazu gab es weitere Hinweise anderer Arbeitsgruppen, die eine Rolle des Rcs-Systems bei der Biofilmbildung postulierten (Ferrieres *et al.*, 2003; Vianney *et al.*, 2005). Dennoch waren die molekularen Mechanismen dieser Regulation völlig unklar. Daraus ergab sich die Frage, ob möglicherweise die RcsB-abhängige kleine RNA RprA ebenfalls an der Regulation der Curlisynthesegene beteiligt ist. Es war daher von Interesse zu klären:

- 1) welche Gene durch RcsB und/oder RprA reguliert werden,
- 2) auf welcher Ebene RcsB und/oder RprA in die Regulation der Curlisynthese eingreifen und
- 3) welcher Mechanismus dieser Regulation zugrunde liegt.

Im Allgemeinen sollte diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation von Zweikomponentensystemen und ihrer Funktion im global regulatorischen Netzwerk der Kontrolle der generellen Stressantwort und der Biofilmbildung liefern.

1. Chemikalien, Materialien, Geräte

Die für die beschriebenen Experimente verwendeten Standard-Chemikalien und Materialien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Amersham Bioscience Europe (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Biozym (Hess.-Oldendorf), Boehringer-Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), NeoLab (Heidelberg), Perkin-Elmer (USA), Promega (Mannheim), Roboklon (Berlin), Riedel de Haen (Selze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Qiagen (Hilden) und VWR International (Darmstadt). Medienzusätze stammen von der Firma Difco Laboratories (Augsburg).

Weitere Produkte und Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte.

Produkt	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
Antibiotika	Roth, Sigma-Aldrich
APS	Roth
BCIP	Roth
Blotmembranen für Proteine (Roti-PVDF)	Roth
Blotmembranen für RNA (positiv geladene Nylon Membran)	Roche
Coomassie Brilliant Blau R-250	Appli-Chem
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Pierce (USA)
DNA-Längenmarker 100bp	NEB, Frankfurt am Main
λ DNA-BstEII	NEB, Frankfurt am Main
DNA-Polymerasen (Vent, Opti-Taq, Phusion, Pfu)	Qbiogene (Heidelberg), NEB, Eurex (Polen), Biozym, Fermentas
dNTP / dig-markierte dNTP Stammlösung	Qbiogene, Roche
Elektroporationsapparatur	BioRad (München)
ELISA-Reader (Modell 550)	BioRad (München)
Fotopapier für Geldokumentationsanlage	SEIKO Precision (Hamburg)
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	GE Healthcare, Perkin-Elmer
Geldokumentationsanlage	Alpha Innotech (USA)
Gelelektrophoreseanlage	Peqlab (Erlangen), Biozym
IPTG	Roth
Mikroarray Scanner()	Biozym (Hess. Oldendorf)
NBT	Appli-Chem
Oligonukleotide	Metabion (Martinsried)

ONPG	Serva
PCR-Geräte (Thermocycler)	MWG Biotech (Ebersberg)
PhosphoImager (FLA-2000G)	Fuji Photo Film
Photometer (Ultraspec 1000)	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Plasmidpräparationskit	Qiagen, Analytik Jena
Post-labeling Kit	GE Healthcare/Amersham
Primäre Antikörper (GFP, anti-Dig)	Roche
Proteingrößenstandard	NEB
Protein-Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit/PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	NEB, Fermentas, USB (USA)
Sekundäre Antikörper	Sigma-Aldrich
SV-Total-RNA Kit (Z3100)	Promega
T4-DNA-Ligase	NEB
Temed	Roth
X-Gal	Appli-Chem

2. Medien und Medienzusätze

2.1. Flüssigmedien zur Kultivierung von *E.coli* Stämmen

Die Zusammensetzung des reichhaltigen Luria-Bertani-Mediums erfolgte nach Silhavy *et al.* (1984). Das Minimalmedium 9 (M9) wurde nach Miller (1972) angesetzt und enthielt als Kohlenstoffquelle entweder 0,4 % Glycerin oder 0,1 % Glukose.

Für eine maximale Transformationseffizienz während der „One-Step“ Inaktivierung chromosomaler Gene wurde SOB (Super Optimal Broth) und SOC (SOB-Medium supplementiert mit 20 mM Glukose) verwendet (Hanahan, 1983). Zur Herstellung des SOB-Mediums wurden 20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 0,5 g NaCl in ca. 950 ml deionisiertem Wasser gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung und das Auffüllen auf ein Volumen von einem Liter. Nach dem Autoklavieren bzw. direkt vor dem Gebrauch wurden 5 ml einer sterilen MgCl₂-Lösung zugegeben.

2.2. Feste Medien

Für das Herstellen von festen Medien wurden zusätzlich 15g Agar zu einem Liter Medium gegeben, anschließend autoklaviert, zusätzlich je nach Verwendung mit den entsprechenden Zusätzen versehen und davon etwa 25ml in eine sterile Petrischale gegossen.

2.3. Medienzusätze

Die in der Tabelle 2 aufgeführten Medienzusätze wurden in hochkonzentrierten Stammlösungen angesetzt (100-1000fach) und in der jeweils benötigten Konzentration den Flüssig- oder Festmedien zugesetzt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze und deren Konzentration.

Medienzusätze	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	100 µg/ml
Arabinose	H ₂ O	10 mM
Chloramphenicol	70% Ethanol	20 µg/ml
Glukose	H ₂ O	0,1 %
Glycerin	H ₂ O	0,4 %
IPTG	H ₂ O	1 mM
Kanamycin	H ₂ O	50 µg/ml
NaCl	H ₂ O	0,3 M
Natriumcitrat	H ₂ O	20 mM
Rifampicin	DMSO	500 µg/ml
Tetracyclin	70% Ethanol	5 µg/ml
X-Gal	DMF	30 µg/ml

3. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Bakterienstämme:

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
FS1	MC4100 <i>rpoS::lacZ</i> (transkriptional)	Mika und Hengge, 2005
FS20	MC4100 <i>rpoS::kan</i>	Mika und Hengge, 2005
FS75	MC4100 <i>arcA::kan</i>	Mika, Dissertation 2006
FS76	MC4100 <i>arcB::tet</i>	Mika, Dissertation 2006
FS89	MC4100 <i>uvrY::scar</i>	Mika, Dissertation 2006
FS90	MC4100 <i>barA::scar</i>	Mika, Dissertation 2006
FS99	MC4100 <i>arcB::kan</i>	Mika, Dissertation 2006
FS100	MC4100 <i>pta-ackA201 zfa::Tn10</i> <i>arcB::kan</i>	Mika, unveröffentlicht
MP1	MC4100 <i>rssAB::lacZ</i>	Pruteanu und Hengge 2002
MP43	MC4100 <i>rscB::kan</i>	Pruteanu, unveröffentlicht
MP54	MC4100 <i>evgS::cat</i>	Pruteanu, unveröffentlicht
MP59	MC4100 <i>rscC::cat</i>	Pruteanu, unveröffentlicht
MP111	MC4100 <i>rprA::kan</i>	Pruteanu, unveröffentlicht
JH41	MC4100 <i>deoC::lacZ</i>	J. Heuveling, unveröffentlicht
JK14	MC4100 <i>otsB::lacZ</i>	J.Kampmann, unveröffentlicht

AM106	MC4100 <i>rssB::Tn10</i>	Muffler <i>et al.</i> , 1996a
AM125	MC4100 <i>clpP1::cat</i>	Muffler <i>et al.</i> , 1997
RH158	MC4100 <i>rssAB::cat</i>	R.Hengge
GB43	MC4100 <i>osmY::lacZ</i>	G.Becker, unveröffentlicht
GB350	W3110Δ <i>lacU169 csgB::lacZ</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008
GB847	W3110Δ <i>lacU169 csgB::lacZ csgD::cat</i>	G.Becker, unveröffentlicht
FI1202	W3110 LacIq <i>lacL8 glnG::Tn5 λ202</i>	Fiedler, 1995
BL21	F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm (DE3)	Novagen
RO90	MC4100 <i>rpoS379::lacZ</i>	Lange und Hengge, 1994
RO91	MC4100 <i>rpoS742::lacZ</i>	Lange und Hengge, 1994
CP2	MC4100 <i>ydaM::lacZ</i>	Weber <i>et al.</i> , 2006
HW142	MC4100 <i>csgB::lacZ</i>	Weber <i>et al.</i> , 2006
HW217	W3110Δ <i>lacU169 csgD::lacZ</i>	
HW212	W3110Δ <i>lacU169 (-756)csgD549::lacZ</i> (TA-266, -225AT)	Weber, unveröffentlicht
AP90	W3110Δ <i>lacU169 csgD::lacZ</i>	A.Possling, unveröffentlicht
AP94	W3110Δ <i>lacU169 flhDC::lacZ</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008
MC4100	<i>E.coli</i> K12 F- <i>araD139 Δ(argF-lacU) 169 deoC flbB5301 relA1 rpsL150 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
W3110	<i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 2006
W3110Δ <i>lacU169</i>	W3110Δ(<i>argF-lacU</i>)169 <i>zaj-3053::Tn10</i>	Nichols <i>et al.</i> , 1998 Peters <i>et al.</i> , 2003
JG2	W3110Δ <i>lacU169 gadB::lacZ</i>	J.Gundlach, unveröffentlicht
NS32	W3110 <i>yhdA::kan</i>	Sommerfeldt, unveröffentlicht
NS122	W3110Δ <i>lacU169 csgB::lacZ yhdA::kan</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
NS123	W3110Δ <i>lacU169 ydaM::lacZ</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
NS125	W3110Δ <i>lacU169 mlrA::lacZ</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
NS149	W3110Δ <i>lacU169 yciR::lacZ</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
NS153	W3110Δ <i>lacU169 yaiC::lacZ</i>	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
CAB94	W3110Δ <i>lacU169 fliA::lacZ cl2</i>	Barembuch und Hengge, 2007
SB26	MC4100 <i>evgA::cat</i>	diese Arbeit
SB27	MC4100 <i>torS::cat</i>	diese Arbeit
SB28	MC4100 <i>torR::cat</i>	diese Arbeit
SB29	FS1 <i>torS::cat</i>	diese Arbeit
SB30	FS1 <i>torR::cat</i>	diese Arbeit
SB31	MC4100 [λRS45:φ(<i>crp</i> (-299)- <i>crp65::lacZ</i>)] transl.	diese Arbeit
SB32	FS89 <i>crp::lacZ</i> (hyb.)	diese Arbeit
SB33	FS90 <i>crp::lacZ</i> (hyb.)	diese Arbeit
SB34	FS75 <i>arcB::tet</i>	diese Arbeit

SB35	SB31 <i>evgA::cat</i>	diese Arbeit
SB36	SB31 <i>evgS::cat</i>	diese Arbeit
SB37	SB31 <i>torR::cat</i>	diese Arbeit
SB38	SB31 <i>torS::cat</i>	diese Arbeit
SB39	SB31 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB40	SB31 <i>rcsB::cat</i>	diese Arbeit
SB41	SB31 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB42	SB31 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB45	FS89 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB46	SB45 <i>arcB::tet</i>	diese Arbeit
SB47	JK14 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB48	SB47 <i>arcB::tet</i>	diese Arbeit
SB49	FS75 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB50	SB34 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB51	GB43 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB52	GB43 <i>arcA::kan_arcB::tet</i>	diese Arbeit
SB53	AM125 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB54	MC4100 <i>uhpB::cat</i>	diese Arbeit
SB55	AM106 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB56	RH158 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB57	FS1 <i>uhpB::cat</i>	diese Arbeit
SB58	RO90 <i>uhpB::cat</i>	diese Arbeit
SB59	MP1 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB60	MP1 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB61	RO91 <i>uhpB::cat</i>	diese Arbeit
SB62	MP1 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB63	SB59 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB64	SB60 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB65	MC4100 [λ RS45: ϕ (<i>cspB</i> (-494)- <i>cspB</i> 153:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB70	MC4100 <i>cspB::lacZ arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB71	MC4100 <i>cspB::lacZ arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB72	MC4100 <i>cspB::lacZ rssB::tet</i>	diese Arbeit
SB76	SB70 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB77	SB71 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB78	MC4100 [λ RS45: ϕ (<i>sdhC</i> (-555)- <i>sdhC</i> 184:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB79	SB78 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB80	SB78 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB81	SB78 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB82	SB70 <i>arcB::tet</i>	diese Arbeit
SB83	SB78 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
SB84	SB78 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit

SB85	SB81 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB86	SB84 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB87	SB65 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
SB88	SB78 <i>clpP::cat</i>	diese Arbeit
SB89	SB78 <i>clpX::cat</i>	diese Arbeit
SB90	FS100 <i>uhpB::cat</i>	diese Arbeit
SB91	AM106 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB92	RH158 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB93	JH41 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB94	JH41 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB95	FS89 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB96	FS89 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB97	SB65 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB98	SB65 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB99	SB71 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB100	CP2 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB101	CP2 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB102	SB100 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB103	SB100 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB104	SB101 <i>arcA::kan</i>	diese Arbeit
SB105	SB101 <i>arcB::kan</i>	diese Arbeit
SB106	MC4100 <i>evgA::scar</i>	diese Arbeit
SB107	MC4100 <i>evgS::scar</i>	diese Arbeit
SB108	MC4100 <i>rcsC::scar</i>	diese Arbeit
SB109	JH41 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB110	JH41 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB111	JH41 <i>barA::scar</i>	diese Arbeit
SB112	JH41 <i>uvrY::scar</i>	diese Arbeit
SB113	CP2 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB114	MP43 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB115	MP43 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB116	FS90 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB117	FS90 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB118	CP2 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB119	CP2 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB120	CP2 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB121	HW142 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB122	HW142 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB123	HW142 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB124	RO91 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB125	RO91 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB126	RO91 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB127	MP111 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB128	RO91 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB129	HW142 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit

SB130	SB123 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB131	SB126 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB133	FS20 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB134	GB350 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB135	GB350 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB136	GB350 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB137	GB350 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB138	GB350 <i>rcsC::cat_rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB139	NS123 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB140	NS123 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB141	NS125 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB142	NS125 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB143	NS149 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB144	NS149 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB145	NS149 <i>rcsC::cat_rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB146	NS125 <i>rcsC::cat_rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB147	NS123 <i>rcsC::cat_rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB148	CAB94 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB149	MC4100 [λ RS45: ϕ (<i>lsrB</i> (-132)- <i>lsrB</i> 48:: <i>lacZ</i>)]transl.	diese Arbeit
SB150	NS123 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB151	NS123 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB152	SB149 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB153	SB149 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB154	MC4100 <i>crp::lacZ_rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB155	SB134 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB156	NS122 <i>yhdA::scar</i>	diese Arbeit
SB157	SB156 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB158	HW217 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB159	HW217 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB160	HW217 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB161	HW217 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB162	AP90 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB163	AP90 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB164	AP90 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB165	AP90 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB166	SB158 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB167	SB162 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB168	SB149 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB169	SB152 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB170	SB153 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB171	SB152 <i>barA::scar</i>	diese Arbeit
SB172	SB153 <i>uvrY::scar</i>	diese Arbeit
SB173	SB149 <i>crp::cat</i>	diese Arbeit
SB174	SB149 <i>lsrR::kan</i>	diese Arbeit

SB175	SB149 <i>lsrK::kan</i>	diese Arbeit
SB176	SB171 <i>lsrK::kan</i>	diese Arbeit
SB177	GB847 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB178	GB847 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB179	GB847 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB180	GB847 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB181	GB847 <i>rcsC::cat_rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB182	HW212 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB183	HW212 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB184	HW212 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB185	AP94 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB186	AP94 <i>rcsBC::kan</i>	diese Arbeit
SB187	AP94 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB188	AP90 <i>clpP::cat</i>	diese Arbeit
SB189	SB81 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB190	MC4100 <i>rcsA::kan</i>	diese Arbeit
SB191	AP94 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB192	HW212 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB193	W3110 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB194	GB350 <i>rcsA::kan</i>	diese Arbeit
SB195	SB134 <i>rcsA::kan</i>	diese Arbeit
SB196	SB188 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB197	SB193 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB198	SB193 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB199	HW217 <i>csgD::kan</i>	diese Arbeit
SB200	GB847 <i>clpP::cat</i>	diese Arbeit
SB201	SB199 <i>clpP::cat</i>	diese Arbeit
SB202	MC4100 [λ RS74: ϕ (<i>rcsA</i> (-392)- <i>rcsA</i> 159:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB203	W3110 Δ lacU169 [λ RS74: ϕ (<i>glnA</i> (-300)- <i>glnA</i> 182:: <i>lacZ</i>)] transk.	diese Arbeit
SB204	W3110 Δ lacU169 [λ RS74: ϕ (<i>dcuB</i> (-467)- <i>dcuB</i> 203:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB205	W3110 Δ lacU169 [λ RS45: ϕ (<i>lsrA</i> (-179)- <i>lsrA</i> 194:: <i>lacZ</i>)]transl.	diese Arbeit
SB206	MC4100 [λ RS74: ϕ (<i>dcuB</i> (-467)- <i>dcuB</i> 203:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB207	W3110 Δ lacU169 [λ RS74: ϕ (<i>rcsA</i> (-392)- <i>rcsA</i> 159:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB209	MC4100 [λ RS45: ϕ (<i>lsrA</i> (-179)- <i>lsrA</i> 194:: <i>lacZ</i>)]transl.	diese Arbeit
SB210	SB205 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB211	SB205 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB212	SB205 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB213	SB205 <i>lsrR::kan</i>	diese Arbeit
SB214	SB205 <i>crp::cat</i>	diese Arbeit

SB215	SB209 <i>barA::cat</i>	diese Arbeit
SB216	SB209 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB217	SB209 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
SB218	SB209 <i>lsrR::kan</i>	diese Arbeit
SB219	SB209 <i>crp::cat</i>	diese Arbeit
SB220	SB205 <i>fliA::cat</i>	diese Arbeit
SB221	SB205 <i>fliA::scar</i>	diese Arbeit
SB222	SB203 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB223	SB203 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB224	SB203 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB225	SB203 <i>rssB::cat_rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB226	SB203 <i>rssAB::cat_rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB227	SB204 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB228	SB206 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB229	W3110ΔlacU169 [λRS45:φ(<i>rcsB</i> (-349)- <i>rcsB</i> 113:: <i>lacZ</i>)]transl.	diese Arbeit
SB230	SB229 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB231	SB229 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB232	SB204 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB233	SB204 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB234	SB206 <i>rssB::cat</i>	diese Arbeit
SB235	SB206 <i>rssAB::cat</i>	diese Arbeit
SB236	NS123 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB237	NS123 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB238	NS153 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB239	SB238 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB240	SB236 <i>rprA::scar</i>	diese Arbeit
SB241	SB237 <i>yhdA::scar</i>	diese Arbeit
SB242	SB238 <i>rcsC::scar</i>	diese Arbeit
SB243	SB241 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB244	SB242 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB245	NS153 <i>rprA::kan</i>	diese Arbeit
SB246	GB350 <i>dsrA::cat</i>	diese Arbeit
SB247	SB157 <i>dsrA::cat</i>	diese Arbeit
SB248	SB156 <i>dsrA::cat</i>	diese Arbeit
SB250	SB240 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB251	SB136 <i>rprA::scar</i>	diese Arbeit
SB252	SB251 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB253	ER2566 <i>rssB::Tn10</i>	diese Arbeit
SB254	W3110ΔlacU169 [λRS45:φ(<i>rprA</i> (-146)- <i>rprA</i> 150:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB255	SB254 <i>rpoS::kan</i>	diese Arbeit
SB256	SB254 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB257	SB254 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB258	RH158 [λRS45:φ(<i>rssA</i> (-300)-	diese Arbeit

SB259	<i>rssA1205::lacZ</i>]transk. RH158 [λ RS45: ϕ (<i>rssA</i> ^{S41A} (-300)- <i>rssA</i> ^{S41A} 1205:: <i>lacZ</i>)]transk.	diese Arbeit
SB260	SB254 <i>yhdA::scar</i>	diese Arbeit
SB261	SB254 <i>rcsB::scar</i>	diese Arbeit
SB262	SB229 <i>yhdA::kan</i>	diese Arbeit
SB263	SB260 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB264	NS153 <i>rcsB::kan</i>	diese Arbeit
SB265	NS153 <i>rcsCB::kan</i>	diese Arbeit
SB266	W3110 <i>cpxR::kan</i>	diese Arbeit
SB267	SB126 <i>rprA::scar</i>	diese Arbeit
SB268	GB350 <i>cpxR::kan</i>	diese Arbeit
SB269	SB254 <i>uvrY::cat</i>	diese Arbeit
SB270	SB254 <i>rcsC::cat</i>	diese Arbeit
SB271	SB254 <i>yngB::kan</i>	diese Arbeit
SB272	GB350 <i>cpxR::scar</i>	diese Arbeit

Bakteriophagen:

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Bakteriophagen.

Lysat	Referenz
λ RS45	Simons <i>et al.</i> , 1987
λ RS74	Simons <i>et al.</i> , 1987
P1 vir	Laborsammlung
P1 (MP109 <i>rprA::kan</i>)	Pruteanu, Dissertation 2003
P1 (MC4100 <i>rcsB::kan</i>)	Pruteanu, Dissertation 2003
P1 (MC4100 <i>rcsBC::kan</i>)	Pruteanu, Dissertation 2003
P1 (MC4100 <i>rcsC::cat</i>)	Pruteanu, Dissertation 2003
P1 (W3110 <i>uvrY::cat</i>)	Kademci, Diplomarbeit
P1 (MC4100 <i>uvrY::cat</i>)	Mika, Dissertation 2006
P1 (MC4100 <i>barA::kan</i>)	Mika, Dissertation 2006
P1 (MC4100 <i>rpoS::kan</i>)	Mika <i>et al.</i> , 2005
P1 (MC4100 Δ <i>rssAB::cat</i>)	Laborsammlung
P1 (MC4100 <i>rssB::Tn10</i>)	Muffler <i>et al.</i> , 1996a
P1 (MC4100 <i>rssB::cat</i>)	Laborsammlung
P1 (MC4100 <i>arcA::kan</i>)	Mika, Dissertation 2006
P1 (MC4100 <i>arcB::kan</i>)	Mika, Dissertation 2006
P1 (MC4100 <i>arcB::tet</i>)	Mika, Dissertation 2006
P1 (MC4100 <i>uhpB::cat</i>)	diese Arbeit
P1 (MC4100 <i>yngB::kan</i>)	Tschowri <i>et al.</i> 2009
P1 (MC4100 <i>fliA::cat</i>)	Barembuch und Hengge, 2007
P1 (MC4100 <i>lsrR::kan</i>)	G.Becker, unveröffentlicht
P1 (MC4100 <i>dsrA1::cat</i>)	J.Heuveling, unveröffentlicht

Plasmide:

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBAD18	induzierbarer Vektor mit dem Promoter des <i>araBAD</i> -Operons, <i>araC</i> , AmpR	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBADRssB	pBAD18-Derivat mit Wildtyp <i>rssB</i> -Gen	Becker <i>et al.</i> , 2000
pBADRssBD58E	pBAD18-Derivat mit mutiertem <i>rssB</i> -Gen Aspartat an Position 58 zu Glutamat	Becker <i>et al.</i> , 2000
pRpoS18(KE)	pBAD18-Derivat mit mutiertem <i>rpoS</i> -Gen Lysin an Position 173 zu Glutamat	Becker <i>et al.</i> , 1998
pFS21	pQE30-Derivat ArcB78-778 -Überproduktionsvektor	Mika <i>et al.</i> , 2005
pKH37-3	BarA197-918 -Überexpressionsvektor	Yamamoto <i>et al.</i> , 2005
pBaeS	BaeS89-363 -Überexpressionsvektor	Yamamoto <i>et al.</i> , 2005
pKH14-4	RstB157-433 -Überexpressionsvektor	Yamamoto <i>et al.</i> , 2005
pMA4	pET32a-Derivat mit Wildtyp- <i>rssA</i> -Gen, ampR	Marquardt, Diss. 2007
pMA5	pET32a-Derivat mit mutiertem- <i>rssA</i> -Gen; statt <i>tca_gca</i> , AmpR	Marquardt, Diss. 2007
pCAB6	pJL29-Derivat transkriptionaler <i>lacZ</i> -Fusionsvektor	Barembuch, Diss. 2007
pCP20	FLP-Helferplasmid (temperatursensitive Replikation, temperaturinduzierbare FLP-Synthese, AmpR, CmR)	Datsenko and Wanner 2000
pKD3	Template-Plasmid für CmR-Kassette (AmpR, CmR)	Datsenko and Wanner 2000
pKD4	Template-Plasmid für KanR-Kassette (AmpR, KanR)	Datsenko and Wanner 2000
pKD13	Template-Plasmid für KanR-Kassette (AmpR, KanR)	Datsenko and Wanner 2000
pKD46	λ Red Helferplasmid (temperatursensitive, Replikation, AmpR)	Datsenko and Wanner 2000

pQE30	Überexpressionsvektor (His6-Tag am N-Terminus, AmpR)	Qiagen
pJL28	LacZ-Fusionsvektor, AmpR	Lucht <i>et al.</i> 1994
pMP9	pQE30-Derivat RcsB-Überexpressionsvektor	Pruteanu, unveröffentlicht
pKP15-13	Salmonella pBAD-RprA	Papenfort, unveröffentlicht
pSB37	pQE30-Derivat RcsBD56E-Überexpressionsvektor mit Austausch von Aspartat56 zu Glutamat	diese Arbeit
pSB10	pJL28-Derivat, translationale <i>crp::lacZ</i> (-299 bis +65)	diese Arbeit
pSB11	pJL28-Derivat, translationale <i>lsrB::lacZ</i> (-132 bis +48)	diese Arbeit
pSB12	pJL28-Derivat, translationale <i>lsrA-lsrB::lacZ</i> (-179 bis +48)	diese Arbeit
pSB13	pCAB6-Derivat, transkriptionale <i>sdhC::lacZ</i> (-555 bis +184)	diese Arbeit
pSB14	pCAB6-Derivat, transkriptionale <i>cspB::lacZ</i> (-494 bis +153)	diese Arbeit
pSB15	pCAB6-Derivat, transkriptionale <i>rcaA::lacZ</i> (-392 bis +159)	diese Arbeit
pSB16	pCAB6-Derivat, transkriptionale <i>glnA::lacZ</i> (-300 bis +182)	diese Arbeit
pSB17	pCAB6-Derivat, transkriptionale <i>dcuB::lacZ</i> (-467 bis +203)	diese Arbeit
pSB18	pJL28-Derivat, translationale <i>lsrA::lacZ</i> (-179 bis +194)	diese Arbeit
pSB19	pJL28-Derivat, translationale <i>rcaDB::lacZ</i> (-237 bis +113)	diese Arbeit
pSB20	pJL28-Derivat, translationale <i>rcaB::lacZ</i> (-349 bis +113)	diese Arbeit
pXG-0	Kontrollplasmid mit Luciferase	Urban <i>et al.</i> , 2007
pXG-1	Kontrollplasmid mit vollständigem <i>gfp</i> -Gen	Urban <i>et al.</i> , 2007
pXG-10	Gfp-Fusionsvektor, low copy, PLtetO, CmR	Urban <i>et al.</i> , 2007

pSB24	pXG-10 Derivat, (-25 bis +90) <i>mlrA</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB25	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB26	pXG-10 Derivat, (-148 bis +549) <i>csgD</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB27	pXG-10 Derivat, (-120 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB29	pXG-10 Derivat, (-36 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB30	pXG-10 Derivat, (-75 bis +60) <i>ydaM</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB31	pXG-10 Derivat, (-125 bis +99) <i>gadE1</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB32	pXG-10 Derivat, (-92 bis +99) <i>gadE2</i> ::gfp	diese Arbeit
pSB33	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -1C,-4C zu -1G,-4G	diese Arbeit
pSB34	pCAB6-Derivat, (-146 bis +150) transkriptionale <i>rprA</i> ::lacZ Fusion	diese Arbeit
pSB35	pCAB6-Derivat, (-300 bis +1205) transkriptionale <i>rssA</i> ::lacZ Fusion	diese Arbeit
pSB36	pCAB6-Derivat, (-300 bis +1205) transkriptionale <i>rssAS41A</i> ::lacZ Fusion Austausch Serin41 zu Alanin	diese Arbeit
pSB38	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -5T,-6T, -7T zu -5A,-6A,- 7A	diese Arbeit
pSB39	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -96tac-94 zu -96atg-94	diese Arbeit
pSB40	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -117catt-114 zu -117gtaa- 114	diese Arbeit
pSB41	pXG-10 Derivat, (-148 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -90cagc-87 zu -90gtcg-87	diese Arbeit
pSB42	pXG-10 Derivat, (-36 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch: -1C,-4C zu -1G,-4G	diese Arbeit
pSB43	pXG-10 Derivat, (-36 bis +90) <i>csgD</i> ::gfp mit Austausch-5T,-6T, -7T zu -5A,-6A,-7A	diese Arbeit
pJV300	Hochkopienvektor mit nonsense RNA unter Kontrolle des PLacO-1, AmpR	Urban <i>et al.</i> , 2007
pJV100IA-T4 = pRprA	Hochkopienvektor mit <i>E.coli rprA</i> -Gen unter Kontrolle des PLacO-1, AmpR	Urban <i>et al.</i> , 2007

4. Mikrobiologische Methoden

4.1. Sterilisation

Medien und Lösungen wurden 20 Minuten lang bei einem Überdruck von 1 bar und einer Temperatur von 120°C feucht autoklaviert. Glaswaren wurden mindestens 3, aber maximal 8 Stunden bei 180°C trocken sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden unter Verwendung von Millipore-Filtern (0,25µm oder 0,45µm) sterilfiltriert.

4.2. Wachstumsbedingungen

Die Vermehrung von Bakterien erfolgte in gut belüfteten Glasgefäßen (aerob) bei 28°C oder 37°C im Schüttelwasserbad (Infors), im Reagenzglasroller oder auf dem Schütteltisch (Infors). Die Gefäße waren dabei zu höchstens 20% gefüllt. Das Wachstum der Bakterien auf Agarplatten erfolgte bei 28°C oder 37°C im Brutraum oder im Brutschrank.

4.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Die Aufbewahrung von Bakterienstämmen über längere Zeit erfolgte in DMSO bei -80°C. Hierfür wurden Übernachtskulturen (1 ml) in LB-Medium mit DMSO (Endkonzentration 7 %) versetzt und tiefgefroren. Über einen Zeitraum von wenigen Tagen wurden Bakterien auf Agarplatten bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.4. 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. Bei Werten oberhalb 0,5 ist keine Linearität des Verhältnisses der Bakterienkonzentration zur OD₅₇₈ nm mehr gegeben. Deshalb wurden Kulturen ab diesem Wert entsprechend verdünnt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der eigentliche Wert der Kultur errechnet.

4.5. Herstellung von P1-Lysaten

Zur Herstellung eines P1-Lysates wurden 5 ml frisches LB-Medium mit 50 µl einer Übernachtskultur des Spenderstammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ nm von 0,3-0,6 im Roller aerob inkubiert. Nach Zugabe von einem Tropfen 1M CaCl₂ und 2-3 Tropfen eines Wildtyp P1_{vir}-Lysates wurden die Zellen bis zu ihrer Lyse etwa 4-6 Stunden bei 37°C weiter im Roller inkubiert. Die nun klare, mit Zellfetzen versehene Lösung wurde mit 5-

10 Tropfen Chloroform versetzt und kräftig gevortext, um die Bakterienzellen endgültig abzutöten. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 g wurden die Zelltrümmer von den im Überstand befindlichen P1-Phagen getrennt. Dieser Überstand wurde in ein steriles Schraubdeckelgläschen überführt, mit 2-3 Tropfen Chloroform versetzt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Das P1-Lysat enthält nun Phagen, die neben ihrer eigenen DNA auch das gesamte Chromosom des Spenderstammes verpackt haben.

4.6. P1-Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man die Übertragung von DNA einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle mittels Bakteriophagen. Die prinzipielle Vorgehensweise ist bei Miller (1972, 1992) beschrieben. Hierzu wurde wie unter Punkt 4.5. beschrieben als erstes ein P1-Lysat vom Spenderbakterium hergestellt. Mit diesem P1-Lysat erfolgte dann die Infizierung der Empfängerkultur wie folgt. 5 ml LB wurden mit dem Empfängerstamm angeimpft und bis zu einer OD_{578} nm von etwa 0,7 angezogen. Danach wurde durch Zugabe von 50 µl 1M $CaCl_2$ die Affinität des Phagen zum Lipopolisaccharid des Bakteriums erhöht. Von dieser Kultur wurden 0,5 ml mit etwa 50 µl des P1-Lysates 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte das Stoppen der Phagenadsorption durch Zugabe von 50 µl 1M NaCitrat und die phänotypische Expression für eine Stunde bei 37°C im Roller. Die Transduktanten mit dem gewünschten Spendergen erhält man durch Ausplattierung auf geeignete Selektionsplatten und Bebrütung bei 37°C.

4.7. Plattentests

β-Galaktosidaseaktivitäts-Test:

X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid) ist ein farbloses β-Galaktosid, das dem Plattenmedium zugesetzt wurde. Das Enzym β-Galaktosidase hydrolysiert X-Gal, so dass ein unlöslicher Indigofarbstoff entsteht. Kolonien, die also eine intakte β-Galaktosidase exprimieren, färben sich auf diesen Testplatten blau. Da dieser Test sehr sensitiv ist und schon auf geringe Enzymaktivität reagiert, ist er nur eingeschränkt als quantitativer Test geeignet.

Motilitäts-Test:

Um die Motilität von Bakterienstämmen zu testen wurden so genannte Schwimmlatten verwendet. Dafür wurden Bakterienkulturen über Nacht (ca. 14h) bei 37°C im Roller inkubiert und nach Ermittlung der optischen Dichte auf einen einheitlichen Wert eingestellt. Jeweils 4 µl wurden mit einer Pipettenspitze in den Schwimmlatten pipettiert und bei 28°C

oder 37°C inkubiert. Motile Bakterienstämme zeichnen sich durch die Ausbildung eines Ringes im Schwimmagar aus.

Ein Liter des verwendeten Schwimmagar setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 5 g Trypton, 5 g NaCl, 3 g Bacto-Agar und Wasser.

Kongorot-Test:

Mit Hilfe des Kongorot-Plattentests können Hinweise erlangt werden, ob die zu untersuchenden Bakterienstämme in der Lage sind extrazelluläre Matrixkomponenten wie Curli-Fimbrien und Zellulose auszubilden (Römling *et al.*, 1998a). Sie werden dafür auf Kongorotplatten ausgestrichen und bei einer Temperatur von 28°C oder 37°C für 48 h bzw. 24 h inkubiert. Zellulose produzierende Stämme bilden den pdar (pink, dry and rough) Morphotyp aus, während die Curli-Fimbrien produzierende Stämme den bdar (brown, dry and rough) Morphotyp ausbilden.

Zusammensetzung: LB-Agar ohne Salz (500ml autoklaviert) + 10ml Kongorotlösung (sterilfiltriert); Kongorot-Lösung: Kongorot (CR) 2mg/ml + Brilliant-Blue-G 1mg/ml gelöst in 70 % Ethanol.

Glykogen-Test:

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden auf diesen Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht (ca. 14h) inkubiert. Anschließend wurde ein Petrischalendeckel mit Jodkristallen versehen und die bewachsene Platte mit den Kolonien zu den Jodkristallen orientiert darüber gestellt. Jod wird in gasförmiger Form freigesetzt und interkaliert in die Glykogenketten. Diese Einlagerung wird dann durch eine Verfärbung der Bakterien, je nach Intensität der Glykogensynthese, sichtbar.

Zusammensetzung der Glykogenestplatten (Kornbergplatten) für 1 Liter:

8,5 g KH₂PO₄; 11 g K₂HPO₄; 6 g Bacto-Hefeextrakt; 16 g Bacto-Agar; 50 ml 20 % Glukose (sterilfiltriert); die anderen Komponenten wurden vor der Zugabe der Glukose autoklaviert.

Fluoreszenztest:

Bakterienstämme mit Genen, die an das grün fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert sind, können mit Hilfe des PhosphoImagers (FLA 2000G) auf die Expression des GFP's hin untersucht werden. Dafür werden die Bakterienstämme auf eine LB-Platte (mit den jeweils benötigten Zusätzen z.B. Antibiotika) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Im Anschluss daran kann die bewachsene Platte mit dem FLA 2000G gescannt werden (Filter 520 nm, Excitation 473 nm). Bakterienstämme mit einer hohen Expression des grün fluoreszierenden Proteins leuchten.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Präparation chromosomaler und Plasmid DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Chromosomale DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) gereinigt. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

5.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäure bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$. Da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, kann eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt werden. Reine DNA sollte einen Wert zwischen 1,7 und 1,9 aufweisen.

5.3. Restriktionsenzymverdau

Für die Klonierung von DNA- oder PCR-Fragmenten in Vektoren (Plasmide) oder um eine erfolgreiche Klonierung eines Inserts in einen Plasmidvektor zu überprüfen, wurde das zu klonierende Fragment bzw. das Plasmid mit den entsprechenden Enzymen im Einzel- oder Doppelverdau geschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug bei Klonierungen meist $0,2\text{-}1\ \mu\text{g}$ (oder mehrere μg). Für den Verdau wurden 2-8 Einheiten (units) Restriktionsenzym pro μg DNA und der vom Hersteller (New England Biolabs, Fermentas) empfohlene Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von $20\text{-}50\ \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 2 Stunden bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur. Bei Verwendung von schnell schneidenden Enzymen (fast digest Enzyme von Fermentas) verringerte sich die Zeit auf 5-10 Minuten bei der angegebenen Temperatur.

Wenn möglich wurde das Enzym nach dem Verdau für 20 min bei zum Beispiel 65°C hitzeinaktiviert.

5.4. Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben aus Restriktionsenzymverdaus oder PCR-Ansätzen wurden mit 6-fach konzentriertem Gelauftragungspuffer versetzt, auf 1 bzw. 2 %ige Agarosegele (in 1xTAE-Puffer) aufgetragen und bei 80 bzw. 100V ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Laufpuffer diene 1xTAE Puffer. Zur Größenordnung der Fragmente wurde entweder der 100bp DNA-Marker (NEB) oder λ DNA (BstIIE verdaut, von Roth) als Größenstandards mitgeführt. Anschließend wurde die DNA im Ethidiumbromidbad für 10-20 Minuten angefärbt und dann unter UV-Licht sichtbar gemacht.

50x TAE Stammlösung

242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5M EDTA
mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

Gelauftragungspuffer (6x)

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
30 % Glycerin
in 1x TAE

5.5. Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem DNA-Extraktionskit QIAquick (Qiagen) bzw. (Analytik Jena) aus dem Gel eluiert.

5.6. Ligation von DNA-Fragmenten (Sambroock *et al.* 1989 und Urban *et al.* 2007)

Die Ligierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der T4-Ligase erfolgte nach der Standardvorschrift von Sambroock (Sambroock *et al.* 1989). Bei der Ligation von Fragmenten an das grün fluoreszierende Protein (GFP) auf den Plasmidvektor pXG-10 wurde nach der Anleitung von Urban vorgegangen (Urban *et al.* 2007).

5.7. Transformation

Als Transformation versteht man die Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Hierfür sind prinzipiell zwei Methoden anwendbar. Eine Übertragung von gereinigten Plasmiden in den gewünschten Rezipientenstamm erfolgte durch die TSS - Transformationsmethode (Chung *et al.* 1989). Sie stellt eine sehr schnelle und effiziente Methode dar und liefert ausreichend viele Transformanten, wenn gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt wird. Für die Transformation von Ligationsansätzen ist die Elektroporation (Calvin und Hanawalt 1988) die effizientere Methode. Hierbei werden durch Anlegen einer Spannung die kompetenten Bakterienzellwände noch durchlässiger für externe DNA. Bei der Herstellung von kompetenten Zellen wurde nach der Methode von Sambroock vorgegangen (Sambroock *et al.* 1989).

TSS: LB-Medium mit 20 % (w/v) PEG-6000, 100 mM MgSO₄, 10 % DMSO

5.8. Polymerasekettenreaktion/PCR-Purifikation Qiagen-Kit

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) lassen sich geringste Mengen an DNA *in vitro* vervielfältigen. Dabei amplifiziert eine hitzestabile DNA-Polymerase ein durch zwei entgegengesetzt gerichtete Oligonukleotide (Primer) begrenztes DNA-Stück in etwa 30-40 hintereinander geschalteten Zyklen. Ein Zyklus besteht aus drei Schritten: 1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C, 2. Anlagerung der Oligonukleotide an komplementäre Einzelstrangsequenzen (Annealing) bei einer primer-abhängigen Temperatur (50°C bis 65°C) und 3. Synthese des jeweiligen komplementären Stranges von jedem Primer aus bei meist 72°C unter Verbrauch freier dNTP's (Deoxyribonukleotide). Dieser Syntheseschritt wird auch als Elongation bezeichnet. Die Elongationstemperatur richtet sich nach der jeweils verwendeten Polymerase und die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes. Für Klonierungen wurden meist die Pfu-Polymerase (Fermentas) und Phusion-Polymerase (Biozym) verwendet, deren Fehlerrate durch eine Korrekturlesefunktion relativ gering ist. Einzellsogenietests nach Kreuzung transkriptionaler und translationaler *lacZ*-Fusionen an die att-site (attachment site) im Chromosom und die Verifizierung von Mutanten nach der „One-Step“-Inaktivierung chromosomaler Gene wurden unter Verwendung der Opti-Taq-Polymerase (Eurx) durchgeführt. Alle Reaktionen fanden im Primus PCR Gerät der Firma MWG Biotech (Ebersberg) statt. Die Oligonukleotide wurden auf 20pmol/µl verdünnt und dem PCR-Ansatz 1 µl (Endkonzentration 0,4 pmol/µl) zugegeben.

Ein üblicher PCR-Ansatz von 50 µl enthielt:

1 unit Polymerase, 1x Polymerase-Reaktionspuffer, 1mM dNTPs, 400 nM Primer1, 400 nM Primer2, chromosomale DNA oder Plasmid-DNA als Template und bidestilliertes Wasser.

Bei einer Kolonie-PCR wurde eine Kolonie in 500 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert (vortexen) und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt. Am Ende der Waschvorgänge wurde das Pellet in 100µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und dem PCR-Ansatz 5-8 µl hinzugefügt.

Eine Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick-PCR-Purification Kit (50) nach Anleitung des Herstellers oder über die Gelaufreinigungsmethode (siehe Punkt 5.5).

Zweischritt-PCR-Methode:

Für die gerichtete Mutagenese in z.B. CsgD wurde die Zweischritt-PCR-Methode (Becker und Hengge, 2001) gewählt. Dabei sind insgesamt vier Primer erforderlich, wobei zwei Primer jeweils „externe“ Primer darstellen und stromabwärts und stromaufwärts lesen. Die

zwei anderen Primer stellen „interne“ Primer dar und tragen die gewünschte Mutation, wobei ebenfalls einer stromaufwärts und einer stromabwärts liest. In einer ersten PCR-Reaktion wurden jeweils ein „externer“ und ein „interner“ Primer eingesetzt und zwei Fragmente amplifiziert. Es folgte die Gelelektrophorese und eine Elution der Fragmente aus dem Gel. Ca. 20 ng dieser zwei Fragmente dienten in einem zweiten PCR-Schritt als Template und wurden mit den zwei „externen“ Primern erneut amplifiziert. Nach diesem PCR-Schritt erhält man im Gegensatz zu den zwei ersten PCR-Reaktionen ein größeres Fragment, welches nun die Mutation enthält. Auch nach dieser PCR-Reaktion erfolgte eine Gelelektrophorese mit anschließender Elution des Fragmentes aus dem Gel. Das Fragment wurde dann mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (Bsp. NsiI und NheI) und in den entsprechenden Vektor (Bsp. pXG-10) ligiert.

Folgende Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 6: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5` - 3`	Konstruktion
Testprimer und Konstruktionsprimer für one step Inaktivierung (Datsenko und Wanner 2000)		
k1	cagtcatagccgaatagcct	
k2	cggtgcctgaatgaactgc	
kt	cggccacagtcatgaatcc	
c1	ttatacgcaaggcgacaagg	
c2	gatcttcggtcacaggtagg	
P1	gtgtaggctggagctgcttc	
P2	catatgaatatcctccttag	
P4	attccggggatccgtcgacc	
Primer für one step Inaktivierung verschiedener Gene (Datsenko und Wanner 2000)		
<i>evgS</i> H1P1	atctttacattcgacaacgtaacaaaatcggctaaccac	nicht generiert
<i>evgS</i> H2P2	atgtgctggtaaatagctcccacatttgaacattgtgg-gagccgctat	
<i>evgS</i> test_d	ctgtcagcacttataaaagtcgctg	
<i>evgS</i> test_u	tggggaacaaattcgccaggagtctc	
<i>evgA</i> H1P1	ctgtattactacagggagaaggagatgcttcattgcaaagg-gaataatct	<i>evgA::cat</i>
<i>evgA</i> H1P2	caaagaccacaacagagaagaaaaatatagggtaaaaactt-catgtgg	
<i>evgA</i> test_d	catcgggtacaatccctgattttattg	
<i>evgA</i> test_u	gggacttatgtactgcaatcacaag	
<i>torS</i> H1P1	tgcattccgctttgcgactcaaccttttcacctaagtgcacc-gacc	<i>torS::cat</i>
<i>torS</i> H2P2	tataccaaatgccactattctagtgttcttaactggctgatattgat	
<i>torS</i> test_d	gcaacaggtatcagccgaaaatgccggcaa	
<i>torS</i> test_u	gtcattccacggtaattgccgcccgtcg	
<i>torR</i> H1P1	cggcagaatatgaacagatatgaacagaatgagtaa-	<i>torR::cat</i>

	aacctctg	
<i>torR</i> H2P2	ccgctcgcgtgcaccagggggattcgtccggctatttita	
<i>torR</i> test d	gcgtagcgcgtccagagtttc	
<i>torR</i> test u	ctggcggttgagcaggccatcaggc	
<i>uhpB</i> H1P1	cgtcagtaacgacgtagagctggcgcgccgcatgtt- gatggctggtg	<i>uhpB::cat</i>
<i>uhpB</i> H2P2	taatggcgcatcggcaggcgcttcagaaacggcaacatcat- caaacc	
<i>uhpB</i> test d	gccgccgaactgggcttgc	
<i>uhpB</i> test u	gccgacgccagtagcgaatagcgggc	
<i>rcsA</i> H1P1	caggttaaggggaattatcgttacgc	<i>rcsA::kan</i>
<i>rcsA</i> H2P4	cagcctgactggtgggaaaccaccagtcagaatg	
<i>rcsA</i> test d	cggcattaatgccgtaattgc	
<i>rcsA</i> test u	ccaccagtcagaatgtgttagcgc	
<i>cpxR</i> H1P1	ttagcgcgctctgatgacgtaattctgcctcggaggtatttaaa- ca	<i>cpxR::kan</i>
<i>cpxR</i> H2P4	accacgcaaggtttaaacacggggtgaccatctttac- gatccggca	
<i>cpxR</i> test d	attcaacgatagagagtttacga	
<i>cpxR</i> test u	ttcgacatgctgctcaatcat	
<i>yhdA</i> test d	ctgttctaaaagtaacgcctgc	
<i>yhdA</i> test u	gcaaaaatcatctgctacg	
Primer zur Herstellung von <i>lacZ</i>-Fusionen		
<i>crp</i> _d_(-299) EcoRI	ggaattcgcactactccactgcg	<i>crp::lacZ</i> (transl.)
<i>crp</i> _u_(+65) BamHI	cgcggatcctggcaatgagacaagaac	
<i>lsrB</i> _d_(-132) EcoRI	cgaattcgggtgccagcgcctttc	<i>lsrB::lacZ</i> (transl.)
<i>lsrB</i> _u_(+48) BamHI	cggatccatgccaagagcgctaag	
<i>lsrA-B</i> _d_(-179) EcoRI	ggaattcgtgatggcaaccacag	<i>lsrAB::lacZ</i> (transl.)
<i>lsrA-B</i> _u_(+48) BamHI	cggatccatgccaagagcgctaag	
<i>lsrA</i> _d_(-179) EcoRI	ggaattcgtgatggcaaccacag	<i>lsrA::lacZ</i> (transl.)
<i>lsrA</i> _u_(+194) BamHI	gggatccgcaggggtaataccgg	
<i>sdhC</i> _d_(-555) BamHI	cggatccattgatgacgaataaatggcg	<i>sdhC::lacZ</i> (transk.)
<i>sdhC</i> _u_(+184) HindIII	ggaagcttgctcgaaaccttcagg	
<i>cspB</i> _d_(-494) BamHI	cgggatcctgaagggccacgcagacc	<i>cspB::lacZ</i> (transk.)
<i>cspB</i> _u_(+153) HindIII	gcaagctttgaccttcaataaggttcg	
<i>rcsA</i> _d_(-392) BamHI	cggatccggcattaatgccgtaattgc	<i>rcsA::lacZ</i> (transk.)

<i>rcsA_u</i> (+159) HindIII	gaagcttcaccactgaagggcgctg	
<i>glnA_d</i> (-300) BamHI	cggatccacatcctccgcaaac	<i>glnA::lacZ</i> (transk.)
<i>glnA_u</i> (+182) HindIII	gaagctttccagccccaatcgaggagc	
<i>dcuB_d</i> (-467) BamHI	cggatccctccatcatcgc	<i>dcuB::lacZ</i> (transk.)
<i>dcuB_u</i> (+203) HindIII	gaagcttgcaaggtcgccgatg	
<i>rcsDB_d</i> (-237) EcoRI	cgaattcacatccgcataattccagc	<i>rcsDB::lacZ</i> (transl.)
<i>rcsDB_u</i> (+113) BamHI	cggatcctcaaattcgccgacaac	
<i>rcsB_d</i> (-349) EcoRI	ggaattcattgaagtgcaactggcgcaggaag	<i>rcsB::lacZ</i> (transl.)
<i>rcsB_u</i> (+113) BamHI	cggatcctcaaattcgccgacaac	
<i>rprA_d</i> (-146) BamHI	ccggatccgtaatttctcatcaggc	<i>rprA::lacZ</i> (transk.)
<i>rprA_u</i> (+150) HindIII	gcaagcttatcgtgggagatg	
<i>rssA_d</i> (-300) BamHI (SB14)	cgggatccattcagtatgcgcaaat	<i>rssA::lacZ</i> (transk.)
<i>rssA_u</i> (+1205) HindIII (SB15)	cgaaagcttcaggtctggagtgaaa	
<i>rssA^{S41A}_d</i> (SB16)	ttgcaggatgtgcaattggtt	<i>rssA^{S41A}</i> - Mutation
<i>rssA^{S41A}_u</i> (SB17)	aaccaattgcatcctgcaa	
<i>rcsB^{D56E}_d</i> (SB12)	gttgattaccgaacttccat	<i>rcsB^{D56E}</i> – Mutation pSB37
<i>rcsB^{D56E}_u</i> (SB13)	atggagagtccggaatcaac	
Primer zur Herstellung von translationalen gfp – Fusionen		
FMO26 <i>rprA_d</i> (+1) Transkriptionsstart	P-acgggtataaatcaacacattg	mit 5' P
FMO27 <i>rprA_u</i> (+56) XbaI, nach Terminator	tttttctagagcttgaagagagtcacagtatc	
FMO28 <i>mlrA_d</i> (-25) NsiI	gtttttatgcatcgggacctcgcgagc	<i>mlrA::gfp</i> , (pSB24)
FMO29 <i>mlrA_u</i> (+90) NheI	gtttttgctagccagcaatccgtaacgcctc	

FMO30 <i>csgD_d</i> (-148) NsiI	gtttttatgcatcagatgtaatccattagttttatattt	
FMO31 <i>csgD_u</i> (+549) NheI	gtttttgctagcgcgtgatgaacaacgaacg	<i>csgD549::gfp</i> , (pSB26)
FMO32 <i>csgD_u</i> (+90) NheI	gtttttgctagcaaggtgctgcaagagagc	<i>csgD90::gfp</i> , (pSB25)
SB1 <i>csgD_d</i> (-120) NsiI	gtttttatgcataccatttagggctgattta	pSB27 <i>csgD</i> - Verkürzung
SB2 <i>csgD_d</i> (-83) NsiI	gtttttatgcatgcaacatctgtcagtacttctg	nicht generiert
SB3 <i>csgD_d</i> (-36) NsiI	gtttttatgcatcaggtgtgcatcaataaaa	pSB29 <i>csgD</i> - Verkürzung
SB4 <i>gadEp1_d</i> (- 125) NsiI	gtttttatgcatgacgtattagttcacgaagg	pSB31 (<i>gadEp1::gfp</i>)
SB5 <i>gadEp2_d</i> (- 92) NsiI	gtttttatgcatagcgttactatattgaacaacg	pSB32 (<i>gadEp2::gfp</i>)
SB6 <i>gadE_u</i> (+99) NheI	gtttttgctagcgcgatctctgacaggaattg	
SB <i>ydaM_d</i> (-75) NsiI	gtttttatgcatgaattatctgatcatatgacgtgg	<i>ydaM::gfp</i> (pSB30)
SB <i>ydaM_u</i> (+60) NheI	gtttttgctagccgaaacgatccagacaggact	
SB10_d	gcgggggtttgatgatgttaaatgaag	2 Basenaustau- sche in <i>csgD</i> (pSB33) TI
SB11_u	cttcattaacatcatcaaacccegc	
SB18_d	gcgggggaaacatcatgttaaatgaag	3 Basenaustau- sche in <i>csgD</i> (pSB38) TI
SB19_u	cttcattaacatgatgtttcccgc	
SB20_d	attacatgacacagcagtgcaac	3 Basenaustau- sche in <i>csgD</i> (pSB39) upB
SB21_u	tgcactgctgtgtcatgtaat	
SB22_d	atttaccgtaatagggtga	4 Basenaustau- sche in <i>csgD</i> (pSB40)

SB23_u	gtagtaataaatcagccctattacg	
SB24_d	atttattactacacagtcgagtgaac	4 Basenaustausche in <i>csgD</i> (pSB41)
SB25_u	gttgcactcgactgtgtagtaataaat	
SB26_d	ttataagcatccaaatcccct	2 Basenaustausche in <i>rprA</i> TI (Plasmid A.Possling)
SB27_u	aggggatttggatgcttataaa	
SB28_d	ttataagcatggtttcccct	3 Basenaustausche in <i>rprA</i> TI (Plasmid A.Possling)
SB29_u	aggggaaaaccatgcttataaa	
SB30 <i>rprA</i> _d 5'P	P - acgggtataaatcaacatattg	für Klonierung in pZE-luc
SB32 <i>rprA</i> _u EcoRI	cggaattctaaaaaaagcccatcgt	für Klonierung in pZE-luc
<i>rrfA</i> 5SRNA_d	tgctggcagttccctact	Sondenprimer
<i>rrfA</i> 5SRNA_u	tgctggcggcagtag	
<i>gfp</i> _d	gaaggtgatgcaacatacgg	Sondenprimer
<i>gfp</i> _u	aatatagttcttctgtacataacc	
PlacOB (EcoRI)	cgcactgaccgaattcattaa	pZE12-luc backbone Amplifizierung
PlacOC	gtgctcagtatcttgttatccg	pZE12-luc backbone Amplifizierung
JVO-0155	ccgtatgtagcatcaccttc	

5.9. Klonierung/Sequenzierung (AGOWA, GATC)

Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in die verschiedenen Vektoren wurde prinzipiell nach folgenden Schritten vorgegangen.

Restriktionsenzymverdau: Schneiden des Vektors und des zu klonierenden DNA-Fragmentes mit den entsprechenden Restriktionsenzymen. Die gewünschten Restriktionschnittstellen in der Sequenz des DNA-Fragmentes wurden über die Oligonukleotidprimer während der PCR eingefügt. Die Enzyme wurden immer so gewählt, dass ihre Schnittsequenz sowohl in der Sequenz des Vektors als auch in der Sequenz des DNA-Fragmentes nur einmal vorkam.

Ligation: Dafür wurden etwa 0,1 µg Vektor mit etwa 1 µg Fragment, 1-2 units T4-DNA-Ligase und 2 µl 10x Ligasepuffer in einem 20 µl Ansatz inkubiert. Die Inkubation erfolgte meist bei 16°C über Nacht oder mittels eines PCR-Programms, bei der die Temperatur bei insgesamt 70 Zyklen alle 10 Minuten zwischen 10°C und 30°C wechselte. Eine Temperatur von 10°C begünstigt eine Zusammenlagerung der komplementären Einzelstrangenden des DNA-Fragmentes und des Vektors. Bei 30°C hat die T4-DNA-Ligase ihr Temperaturoptimum. Eine Inaktivierung der Ligase ist nach 15 minütiger Inkubation bei 65°C gegeben. Von diesem Ligationsansatz setzt man 1-3 µl für die Elektroporation in 50 µl kompetente Zellen ein. (Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten an das grün fluoreszierende Protein (GFP, pXG-10 Vektor) wurde nach dem Protokoll von Urban verfahren (Urban *et al.*, 2007).

Elektroporation: Die Elektroporation ist eine sehr effiziente Transformationsmethode und eignet sich besonders zur Transformation von Ligationsansätzen. Als Vorgehensweise für die Elektroporation diente die Anleitung von Calvin und Hanavalt, 1988. Nach der phänotypischen Expression für eine Stunde bei 37°C wurde der Ansatz auf Selektionsplatten ausplattiert. Von den erhaltenen Kolonien wurden dann eine Plasmidpräparation, ein Kontrollrestriktionsenzymverdau und eine Sequenzierung des klonierten Inserts durchgeführt.

Sequenzierung: Die Sequenz jedes klonierten DNA-Fragmentes sowie die Fusionspunkte des Vektors wurden durch die Firma AGOWA (Berlin) oder GATC (Konstanz) bestimmt.

5.10. Konstruktion von Plasmiden (*lacZ*, *gfp*)

Als Ausgangsplasmide für die Konstruktion von translationalen *lacZ*-Fusionen wurden pJL- 29 Derivate (Lucht, 1994) und für transkriptionale *lacZ*-Fusionen der pCAB6-Vektor (Barembuch *et al.*, 2007) verwendet. Die Konstruktion der *gfp*-Fusionsplasmide erfolgte mit dem pXG-10 Vektor nach Anleitung von Urban (Urban *et al.*, 2007).

5.11. Kreuzung von transkriptionalen und translationalen *lacZ*-Fusionen ins Chromosom von *Escherichia coli*

Die auf den jeweiligen Plasmiden klonierten Konstrukte wurden in einem ersten Schritt durch *in vitro*-Rekombination auf die Phagen λRS45 oder λRS74 übertragen, wobei nach der Anleitung von Simons (Simons *et al.* 1987) vorgegangen wurde. Das Prinzip des Transfers beruht auf einer doppelten homologen Rekombination der Gene *lacZ* (β-Galaktosidase) und *bla'* (β-Laktamase) des Phagen mit den auf dem Fusionsplasmid divergent orientierten Genen *lacZ* und *bla*. Über die Integration des Phagen an der att-site der

jeweiligen Stämme (meist MC4100 und W3110 Δ lacU169) wurde die gewünschte Fusion stabil ins Chromosom gekreuzt. Um eine Mehrfachintegration des Phagen auszuschließen, wurden die konstruierten Stämme mit einem PCR-Test auf Einzellysogenie hin untersucht (Powell *et al.* 1994).

5.12. Konstruktion von Mutanten (nach Datsenko und Wanner, 2000)

Die *torR*-, *torS*-, *evgA*-, *rcaA*- und *cpxR*-Deletionsmutanten wurden mit Hilfe der „One-Step“-Inaktivierung von chromosomalen Genen erzeugt (Datsenko und Wanner, 2000). Die grundlegende Strategie beruht darauf, dass chromosomale Gene durch Resistenzkassetten ersetzt werden. Hierfür stehen drei Plasmide (pKD3, pKD4 und pKD13) mit unterschiedlichen Resistenzen (*cat*, *kan* und *kan*) zur Verfügung. Die für die Amplifikation der Antibiotikakassetten (*cat* oder *kan*) verwendeten Primer enthalten die flankierende Region des zu deletierenden Gens (H1 bzw. H2) und die Bindestellen (P1 bzw. P2 oder P4) der als Matrize verwendeten Plasmide pKD3 (*cat*), pKD4 (*kan*) oder pKD13 (*kan*). Die so generierten PCR-Produkte tragen homologe Sequenzen zu chromosomalen Bereichen, die das zu ersetzende Gen flankieren, Erkennungsstellen für die FLP-Rekombinase und die Antibiotikakassette in der Mitte. Dieses PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend aus dem Gel gereinigt (siehe unter Punkt 5.5.) und mittels Elektroporation in kompetente Zellen transformiert, die das Helferplasmid pKD46 tragen. Um die homologe Rekombination zu ermöglichen wird die λ Red-Rekombinase vom Plasmid pKD46 unter dem Arabinose-induzierbaren Promoter P_{araB} exprimiert.

Für die Herstellung von diesen kompetenten Zellen wurden MC4100 pKD46 oder W3110 pKD46 Zellen in SOB-Medium mit 10 mM Arabinose und 100 μ g/ml Ampicillin bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 kultiviert, mit eiskaltem Wasser und eiskalter 10%iger Glycerinlösung gewaschen und 500fach aufkonzentriert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in SOC-Medium über Nacht bei 30°C inkubiert und am folgenden Tag auf Selektionsplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden mehrere Kolonien nicht-selektiv gereinigt. Parallel dazu erfolgte der Test auf Ampicillin-Sensitivität, um sicher zu stellen, dass die Kolonien das temperatursensitive Helferplasmid pKD46 verloren haben. Die korrekte Insertion der Antibiotikakassette wurde in einer PCR-Reaktion überprüft, bei dem je nach Resistenzkassette kassetteninterne Primer mit Primern, die sich im angrenzenden chromosomalen Bereich des deletierten Gens befinden, miteinander kombiniert wurden.

Die chromosomal integrierte Resistenzkassette kann dann später durch die temperatursensitive Expression der FLP-Rekombinase vom Plasmid pCP20 entfernt werden. Dazu wurde der Stamm mit dem Plasmid pCP20 transformiert und bei 42°C inkubiert. Dies führt zur Induktion der FLP-Rekombinase und zum Ausschneiden der Antibiotikaresistenz.

Die drei Plasmide pKD3, pKD4 und pKD13 unterscheiden sich zum einen in ihrer Antibiotikaresistenz und zum anderen durch das Vorhandensein einer optimalen Ribosomenbindestelle bei pKD3 und pKD4. Durch diese Ribosomenbindestelle soll gewährleistet werden, dass das nachfolgende Gen, wenn es zusammen mit dem deletierten Gen in einem Operon lokalisiert ist, auf jeden Fall translatiert wird.

5.13. Präparation von Gesamt-RNA [Heiße Phenol-Chloroform-Methode, SV Total RNA Isolation Kit (Z3100) von Promega]

Für die Mikroarray- und Northernblotanalysen erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA über die heiße Phenol-Chloroform Methode. Dafür wurden die Kulturen bis zur gewünschten OD₅₇₈ aerob in LB-Medium wachsen gelassen, 10-15 ml abgenommen und mit 1,875 ml bzw. 1,25 ml Stopplösung (5% Phenol in Ethanol) versehen (Bernstein *et al.* 2002). Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 4°C und 5000 rpm kann das Pellet bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Zelllyse und RNA Isolation erfolgte nach dem Protokoll von Tani (Tani *et al.* 2002). Der anschließende DNA-Verdau erfolgte mit RNase-freier DNaseI (10 u/µl von Boehringer Mannheim, Roche) bei 37°C für 20 Minuten. Unter Verwendung von phase-lock-tubes (Biozym) erfolgte im Anschluss die Isolation der RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und einer Alkoholfällung (Sambrook *et al.* 1989). Die gefällte RNA wurde dann in 50 µl RNase freiem Wasser bei 4°C für mindestens 2 Stunden gelöst.

Die RNA für Northernblotanalysen unter Verwendung von 6 % PAA-Gelen wurde mit dem SV Total RNA Isolation Kit von Promega (Z3100) und entsprechend der Kitanleitung isoliert.

5.14. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt (Sambrook und Gething 2002). Phenol absorbiert bei 230 nm, Proteine bei 280 nm und RNA bei 260 nm. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte bei einem ausreichenden Reinheitsgrad der RNA zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Zur Berechnung der

RNA-Konzentration wird davon ausgegangen, dass bei einer OD₂₆₀ von 1, 40 µg/ml RNA enthalten sind. Des Weiteren wurde die Qualität der RNA (eventuelle DNA-Verunreinigungen oder Degradation der RNA) auf einem denaturierenden, formaldehydhaltigen Agarosegel überprüft. Dazu wurden etwa 20 µg RNA in 10 µl mit 30 µl Ladepuffer 2 (siehe Punkt 5.15) versetzt und 15 min bei 65°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,2 %igen Agarosegel mit 6,7% Formaldehyd und 1x MOPS bei 80 Volt in ebenfalls 1x MOPS-Puffer. Nach der Auftrennung wurde das Gel im Ethidiumbromidbad angefärbt und die RNA-Banden anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht.

5.15. Northernblotanalysen (mit Agarosegelen und PAA-Gelen)

Agarosegel-Formaldehyd-Northernblot:

10 bzw. 20 µg zuvor isolierte Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 µl wurde mit 30 µl Ladepuffer 2 versetzt und bei 65°C 15 min lang erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die RNA-Proben in die noch trockenen Taschen des Formaldehydgel pipettiert. Durch Anlegen einer Stromstärke von 100 mA für etwa 5 min liefen die Proben in das Gel ein. Die weitere Auftrennung erfolgte wie unter Abschnitt 5.14 beschrieben in einem 1,2% Agarosegel mit 6,7% Formaldehyd bei 80 V in 1X MOPS-Puffer für 3-4 h (je nach Größe des zu detektierenden Fragmentes).

Nach der Auftrennung der RNA erfolgten mehrere Waschschrte mit DEPC-Wasser und 20-fachem SSC (2 X 15 min), um das Formaldehyd wieder aus dem Gel zu entfernen. Dies ist notwendig, da Formaldehyd den Blotvorgang behindert. Die nun aufgetrennte RNA wurde mit einem Vakuum Blotgerät (Semi Dry) für 1-2 Stunden bei 5 Hg auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) transferiert. Nach der Fixierung der RNA auf die Membran durch UV-Bestrahlung für 10 min wurde in einem nächsten Schritt das Anfärben der übertragenen RNA mit Methylblau vollzogen, um den Transfer der RNA aus dem Gel auf die Membran quantitativ zu überprüfen. Anschließend wurde die Membran mit einem Bleaching Puffer (2 X 15 min) wieder entfärbt und zweimal mit 2 X SSC für 5 Minuten gewaschen.

Hybridisierung:

Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, mit 10 ml Dig Easy Hybridisierungslösung (Roche) versehen und im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation bei 50°C für eine Stunde prähybridisiert. Währenddessen wurden 10-15 µl der spezifischen, Digmarkierten (zuvor über PCR-generiert), DNA Sonde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von insgesamt 50 µl gebracht. Anschließend 15 min bei 95°C denaturiert und 5 min lang in

einer NaCl-Eis-Vertiefung schnell abgekühlt. Die nun denaturierte Sonde wurde zu 10 ml vorgewärmter neuer Dig Easy Hyb-Lösung gegeben und nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung in das Hybridisierungsröhrchen überführt. Die Membran wurde über Nacht bei der anhand der Sondensequenz berechneten Hybridisierungstemperatur inkubiert (54°C für *csgD*- und *gfp*-Sonde).

Waschen:

Am nächsten Tag erfolgten mehrere Waschschrte bei unterschiedlichen Temperaturen und unter Verwendung zweier unterschiedlicher Waschpuffer, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen (2 X 5 min Waschpuffer 1 bei 37°C; 2 X 15 min Waschpuffer 2 bei 68°C oder 46°C). *csgD* (68°C), *gfp* (46°C)

Detektion:

Für die Detektion wurde die Membran kurz in Detektionspuffer 1 geschwenkt, anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mittels Blocking-Puffer geblockt und dann 90 Minuten mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten für jeweils 15 Minuten im Detektionspuffer 1 und dem kurzen Spülen der Membran im Detektionspuffer 2 erfolgte durch Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP-Star (Roche) der Nachweis der an die entsprechenden RNA-Bereiche gebundenen Sonde. Dieser wird durch eine Schwärzung auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Ladepuffer 2 (400 µl): 250µl deionisiertes Formamid **5l DEPC-Wasser:** (0,1% DEPC)

83µl 37% Formamid
50µl 10x MOPS
4µl 1% Bromphenolblau
13µl DEPC Wasser

10xMOPS: 0,4M MOPS
0,05M NaAcetat
0,01M EDTA
0,1% DEPC
auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen und autoklavieren

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

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

Detektionspuffer 1: 0,1M Maleinsäure
0,15M NaCl
auf pH-Wert von 7,5 einstellen

Detektionspuffer 2: 0,1M Tris (pH9,5)
0,1M NaCl
0,05M MgCl₂

20XSSC: 3M NaCl
0,3M Natriumcitrat
0,1% DEPC
auf pH-Wert von 7,0 einstellen und dann autoklavieren

Methylenblaulösung: 0,02% Methylenblau 0,3M NaAcetat (pH5,5) 0,1% DEPC autoklavieren	Bleaching Puffer: 0,2x SSC 1% SDS 0,1% DEPC autoklavieren
--	---

Waschpuffer 1: 2x SSC 0,1% SDS 0,1% DEPC autoklavieren	Waschpuffer 2: 0,1x SSC 0,1% SDS 0,1% DEPC autoklavieren
--	--

Polyacrylamidgel (PAA)-Northernblot:

Für die Auftrennung kleinerer RNA Bereiche (z.B. RprA) wurden kleine Polyacrylamidgele verwendet. Die Konzentration der zuvor mit Hilfe des SV Total RNA Kits von Promega (Z3100) isolierten RNA wurde wie unter Abschnitt 5.14 bestimmt. Bei einer zu geringen Konzentration wurde das Probenvolumen gegebenenfalls in der Speedvac verringert und die RNA-Proben somit aufkonzentriert.

Etwa 3 µg Gesamt-RNA (in einem Volumen von 5 µl) wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C erhitzt. Die RNA wurde dann in einem 6 % PAA-Gel bei etwa 10 mA in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotten (Übertragen) auf eine positiv geladene Nylonmembran (bei 15 V in kaltem 1 X TBE) erfolgte die Fixierung der RNA auf der Membran für 4 min unter UV-Licht-Einfluss (sog. UV-Crosslinking). Die folgenden Hybridisierungs- und Detektionsschritte sind bereits oben beschrieben worden.

Zur Überprüfung der aufgetragenen RNA-Mengen wurde die zuvor verwendete Sonde mit heißem Wasser (3 x spülen) und mit 2 x SSC bei 75°C (über Nacht) abgewaschen. Die Membran wurde dann erneut prähybridisiert und mit der 5S RNA-Sonde als Kontrolle inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend dem vorangegangenen Abschnitt durchgeführt. Hybridisierung: 46°C für RprA und 5S RNA, Waschen: 42°C für RprA und 5S RNA

6% PAA:	7M Urea 6% Gel 40 1 x TBE APS 80 µl TEMED 10,6 µl mit bidest. H ₂ O auf 10 ml	Probenpuffer: 95% 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 10 mM	Formamid Xylencyanol Bromphenolblau EDTA
----------------	---	---	---

10 x TBE: 108g Tris
55g Borsäure
40 ml 500 mM EDTA, pH8
mit bidestilliertem H₂O auf 1l

5.16. mRNA-Stabilitätsanalysen (Rifampicin-Abbau)

Rifampicin ist ein Antibiotikum, welches bei Bakterien die DNA-abhängige RNA Polymerase hemmt und somit spezifisch die Transkription unterbindet. Für die Bestimmung der Halbwertszeit der *csgD*-mRNA, als ein Beispiel, wurden die zu untersuchenden Bakterienstämme in LB-Medium, aerob bis zur gewünschten OD₅₇₈ kultiviert. Direkt vor der Zugabe des Antibiotikums Rifampicin (in einer Endkonzentration von 500 µg/ml) zu den Kulturen wurden 10 ml als Probe für die anschließende RNA-Präparation und Northernblotanalyse (siehe unter Punkt 5.13-5.15) abgenommen. Nach der Zugabe von Rifampicin erfolgte die Probenahme üblicherweise in 2 Minuten-Schritten. Im Falle der RprA-RNA wurde die Probenahme in 2 Minuten-Schritten und nach 10, 15 und 30 Minuten durchgeführt. Danach folgt, wie bereits unter Abschnitt 5.13 bis 5.15 beschrieben, die Isolierung der RNA mit anschließender Northernblotanalyse.

5.17. Transkriptomanalysen-Mikroarrayanalysen (MWG-Protokoll, Kit Amersham)

1. *Mikroarrays*: Die in dieser Arbeit für die Transkriptomanalysen verwendeten Mikroarrays wurden durch das MPI für Infektionsbiologie, Berlin (AG Mollenkopf) gespotet. Die dafür verwendeten 4288 genspezifischen 50mer Oligonukleotide sind im Vorfeld durch die Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert worden und repräsentieren das gesamte *E.coli* Genom auf diesem Mikroarray.

2. *Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA*: Gleiche Mengen (20 µg) an zuvor über die heiße Phenol-Chloroform-Methode isolierter RNA, der zu untersuchenden Bakterienstämme (meist Vergleich von Wildtyp mit einer Mutante), wurden für die Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA eingesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte mit zufällig bindenden random Nona-meren, der reversen Transkriptase und dem für die Markierung notwendigen Nukleotid Amino-allyl(AA)-dUTP. Nach der cDNA-Synthese erfolgte die Markierung mit

Cy3-HNS Ester oder Cy5-HNS Ester, die in der Lage sind an die in der cDNA eingebauten Aminoallylgruppe zu binden. Alle Schritte wurden unter Verwendung und Anleitung des CyScribe Post-Labeling Kit von Amersham (GE Healthcare, GB) durchgeführt. Die anschließende Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte mit dem CyScribe GFX Purification Kit (GE Health-care, GB).

3. *Hybridisierung, Detektion, Auswertung*: Die beiden fluoreszenz-markierten Ansätze wurden nun miteinander vermischt, auf ein Volumen von etwa 10 µl in der Vakuumzentrifuge eingengt und nach Zugabe von 6 µl H₂O 5 min bei 95°C erhitzt. Nach einer weiteren Minute auf Eis wurde der Ansatz mit vorgewärmtem (68°C) 35 µl SlideHybTM-Puffer (Ambion) versetzt und auf den Mikroarray, der mit einem speziellen Deckglas versehen wurde, pipettiert. In einer Hybridisierungskammer (Biozym) wurde der Mikroarray 20-24 Stunden bei 45°C inkubiert. Die anschließenden Waschschrte erfolgten nach der im nachfolgenden beschriebenen Reihenfolge: A1-Puffer 50°C-10min, 42°C-10min; A2-Puffer 42°C-10min, 37°C-10min; A3-Puffer 2x 10min bei Raumtemperatur. Vor dem Scannen wurde die überschüssige Waschflüssigkeit auf dem Mikroarray durch Zentrifugation bei 500g für 7 min entfernt. 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.

Jedes Mikroarrayexperiment wurde mindestens zweimal 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 Unterschiede (Ratio) >2 bzw. <0,5.

A1-Puffer: 2x SSC
0,5% SDS

A2-Puffer: 0,5x SSC
0,5% SDS

A3-Puffer: 0,1x SSC

6. Biochemischen Methoden

6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. Das anionische Detergenz SDS, welches im Probenpuffer enthalten ist, bindet an die Proteine, führt damit dessen Entfal-

tung herbei und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Es entstehen Micellen mit konstanter ne-gativer Ladung pro Masseneinheit. Die Proteine wandern also bei Anlegen eines Stromflusses gemäß ihrer Größe durch das Gel. Die wesentliche Vorgehensweise ist in Laemmli (1970) beschrieben.

Bei einer bestimmten OD_{578} nm erfolgte die Probenahme aus einer wachsenden Bakterienkultur. Dabei wurde die entnommene Menge so gewählt, dass der Gesamtproteingehalt 40 μ g betrug. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde folgende Beziehung verwendet: 1 ml einer Zellsuspension mit einer OD_{578} von 1,0 enthält 107 μ g Protein (R. Hengge, unveröffentlichte Daten). Die Proben wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) versetzt, mindestens 20 min auf Eis gefällt und anschließend 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend mit Aceton gewaschen, getrocknet und in 1x Probenpuffer aufgenommen. In den meisten Fällen wurde die Konzentration auf 1 μ g Protein/ 1 μ l Probenpuffer eingestellt. Nach fünf minütigem Kochen wurde die Probe kurz abzentrifugiert und entweder direkt auf das SDS-Gel aufgetragen oder bis zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Mini-PROTEAN II-Apparatur (BioRad). Dabei wurde ein feinporiges 12 %iges Trenngel mit einem großporigen 4 %igen Sammelgel überschichtet. Von jeder Probe wurden 5 bzw. 10 μ g Protein mit Hilfe einer 10 μ l Pipettenspitze aufgetragen. Nach dem Auftrennen der Proteine bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder es erfolgte das Blotten auf eine PVDF (Polyvinylidenflourid)-Membran.

1x Probenpuffer:

0,06 M Tris pH 6,8
2 % SDS
10 % Glycerin
3 % β -Mercaptoethanol
0,005 % Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris
0,19 M Glycin
0,1 % SDS

Sammelgel:

1,25 ml Upper Gelbuffer (6,06g Tris, 0,8g SDS in 100ml Wasser; pH 6,8)
0,65 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
3,07 ml Wasser
5 μ l TEMED
25 μ l 10% APS

Trenngel:

2,5 ml Lower Gelbuffer (36,34g Tris, 0,8g SDS in 200ml Wasser; pH 8,8)
4 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
3,45 ml Wasser
5 µl TEMED
50 µl 10% APS

6.2. Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Fairbanks-Färbung)

Zur schnellen und sensitiven Coomassiefärbung von SDS-Gelen wurden diese nach der Methode von Fairbanks behandelt (Fairbanks *et al.* 1971). Hierfür wurden die Gele zunächst in Lösung A (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250) gegeben, in der Mikrowelle aufgeköcht und 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Abweichend von der Fairbanks-Methode wurden die Gele sofort in Lösung D (10% Essigsäure) überführt und dort inkubiert bis alle Proteinbanden sehr gut sichtbar waren.

6.3. Immunoblotanalyse (sog. Westernblot)

Der Nachweis von Proteinen erfolgte mittels der Immunoblotanalyse. Hierbei werden Proteine, die zuvor in einem SDS-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Im Anschluss daran wird das Protein von Interesse mit einem spezifischen primären Antikörper markiert. Die Detektion erfolgt über einen sekundären Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt vorliegt.

Die Transfer-Membran wurde erst in Methanol equilibriert, dann in Wasser und Transblotpuffer geschwenkt, bevor sie luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt wurde. Gel und Membran wurden zwischen zwei Whatmanpapiere (Roth) positioniert und in der Blotapparatur (Mini-PROTEAN II, BioRad) fixiert. Der Blotvorgang erfolgte in kaltem Transblotpuffer für eine Stunde bei 100 Volt und maximaler Stromstärke.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in TBSTM inkubiert, um unspezifische Bindestellen mit Milchproteinen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen primären Antikörper für 2 Stunden unter ständigem Schwenken auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für ein bis zwei Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut mit TBST und AP-Puffer gewaschen, um im Anschluss daran mit einer Färbelösung entwickelt zu werden. Diese Färbelösung enthält ein chromogenes Substrat (NBT/BCIP) der alkalischen Phosphatase. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte durch den Austausch der Färbelö-

sung gegen Wasser. Dem Trocknen der Membran zwischen zwei Whatmanpapieren folgte die fotografische Aufnahme, mit anschließender Auswertung über das Grafikprogramm Image Gauge Version 3.45 (Fuji Photo Film). Hierbei wurde die relative Schwärzung der Banden als Maß für die auf dem Blot enthaltene Proteinmenge ermittelt. Nach Abzug der Hintergrundschwärzung und unter Berücksichtigung der Standardbande wurden dadurch die Verhältnisse der z.B. RpoS-Bande verschiedener Stammhintergründe bestimmt und untereinander verglichen.

verwendete primäre polyklonale Antikörper gegen: CsgD, σ^S , GFP

Transblotpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

TBST:

20 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
0,05 % Tween-20

TBSTM:

TBST
5 % Magermilchpulver

AP-Puffer:

100 mM Tris, pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Färbelösung:

10 ml AP-Puffer
66 μ l NBT (50 mg/ml in 70% DMF)
33 μ l BCIP (50 mg/ml in DMF)

6.4. Überproduktion und Reinigung von ArcB, BarA, BaeS, RstB, RcsB und RcsB^{D56E}

Die Reinigung der Proteine, mit denen Auto- und Transphosphorylierungsexperimente durchgeführt wurden, erfolgte unter nativen Bedingungen entsprechend des Qiagen-Standardprotokolls (8, 9 und 12) unter Verwendung von Ni-NTA-Säulchen.

(Plasmidbeschreibungen siehe Tabelle 5)

Die Lagerung der Proteine ArcB, BarA, BaeS, RstB, RcsB und RcsB^{D56E} erfolgte bei -20°C in

Lagerungspuffer A: 10 mM Tris (pH 8)
0,1 mM EDTA
10 mM MgCl₂
200 mM KCl
50 % Glycerin

6.5. Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Pierce)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit“ der Firma Pierce verwendet.

6.6. β -Galaktosidase-Aktivitätstest

Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität von Zellsuspensionen wurde nach Miller (1972/1992) bestimmt und in μmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Abweichend vom Protokoll wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei 578 nm und die Absorption des Produktes o-Nitrophenol bei 405 nm gemessen. Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden Zellen der Kultur entnommen und geeignete Aliquots in Z-Puffer (Endvolumen 1 ml) überführt. Die Zellen wurden durch Zugabe von einem Tropfen 0,1 %igem SDS und zwei Tropfen Chloroform aufgeschlossen. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μl ONPG (4 mg/ml) gestartet. Bei Erreichen einer geeigneten Gelbfärbung oder nach spätestens 1 Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt. Die Reaktionsansätze wurden 10 Minuten abzentrifugiert und anschließend die Absorption bei 405 nm gemessen. Als Referenz diente ein Testansatz, bei dem anstelle der Bakteriensuspension Z-Puffer eingesetzt wurde. Die spezifische Aktivität eines Enzyms ist definiert als umgesetzte Stoffmenge pro Zeit und Menge an Protein. Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ($\Delta E = \Delta c \cdot d \cdot \epsilon$) lässt sich die Formel für die spezifische β -Galaktosidaseaktivität herleiten, wenn in 1 ml Zellsuspension bei einer OD_{578} von 1 0,107 mg Protein enthalten sind.

$$\begin{aligned} \text{spezif. } \beta\text{-Gal.-Aktivität [}\mu\text{mol/min/mg Protein]} &= \Delta n / (\Delta t / m_{\text{Protein}}) \\ &= V / (\epsilon \cdot c_p) \cdot [\Delta E_{405} / (\Delta t \cdot V_B \cdot \text{OD}_{578})] \\ &= 3,38 \cdot E_{405} / (\Delta t \cdot V_B \cdot \text{OD}_{578}) \end{aligned}$$

Δc = Konzentrationsänderung

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol bei 405 nm; $\epsilon = 4860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Δn = Änderung der Stoffmenge

m_{Protein} = Proteingehalt [mg]

V = Endvolumen des Testansatzes (1,7 ml)

c_p = Gesamtproteingehalt einer Bakteriensuspension bei $\text{OD}_{578} = 1 \approx 0,107 \text{ mg/ml}$

ΔE_{405} = Extinktionsänderung bei 405 nm

Δt = Reaktionszeit [min]

V_B = Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension [ml]

OD_{578} = optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

6.7. In vitro Phosphorylierungsassay (Autophosphorylierung, Transphosphorylierung)

Um den Einfluss von zum Beispiel Lysophosphatidylglycerin (LPG) und Palmitinsäure auf die Auto- und Transphosphorylierungsfähigkeit verschiedener Sensorkinasen zu untersuchen wurden radioaktive in *vitro* Phosphorylierungsstudien mit gereinigten Sensorkinaseproteinen und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. Prinzipiell wurde dabei nach der von Mika beschriebenen Methode vorgegangen (Mika *et al.* 2005). Die Lipide (z.B. LPG) wurden dafür in 1ml LPG-Puffer (13,4 mM Stammlösung) gelöst, gevortext, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, weitere 15-30 min bei 30°C geschüttelt und dann mit Ultraschall (3 mal 15 s bei einer relativen Intensität von 65%) behandelt. Die weiteren Verdünnungen der Lipide erfolgten ebenfalls in LPG-Puffer. Die Palmitinsäure Stammlösung (13,4 mM) wurde durch Lösen der Palmitinsäure in LPG-Puffer bei 62°C für 30 Minuten hergestellt.

Autophosphorylierung: Die zuvor unter nativen Bedingungen gereinigte Sensorkinase (ArcB, BarA, BaeS oder RstB) wurde gleichzeitig mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (1,66 mM, 6000 Ci/mmol) und der entsprechenden Konzentration des LPG oder der Palmitinsäure für 10 min bei 30°C in Transphosphorylierungspuffer (TP; Jeon, 2001) inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 4 μl 4x Proteinprobenpuffer, eine kurze Lagerung auf Eis und das Auftrennen auf einem 12 %igen Acrylamidgel bei 25 mA für etwa 1 Stunde. Nach dem Trocknen des Gels für 2h bei 80°C wurde durch Auflegen von IP-Platten (für 10 min bis 1h) die radioaktive Markierung der Proteine übertragen. Das Einlesen der IP-Platten erfolgte mit dem Phosphoimager FLA-2000G (Fuji Photo Film) und der dazugehörigen Software ImageReader. Die Stärke der Banden und deren Schwärzungsgrad wurden mit dem Grafikprogramm Image Gauge 3.45 (Fuji Photo Film) bestimmt.

Transphosphorylierung: Hierzu wurde gereinigtes ArcB (0,065 μM) mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (1,66 mM, 6000 Ci/mmol) in Transphosphorylierungspuffer (TP) für 10 min bei 30°C vorinkubiert. Innerhalb dieser 10 min erfolgt die effiziente Autophosphorylierung von ArcB.

Gereinigtes RssB (1 μM) im TP-Puffer wurde zusammen mit den unterschiedlichen Konzentrationen des LPG vermischt. Zu diesem Ansatz wurden dann 4 μl des vorinkubierten ArcB/ATP-Gemischs hinzugefügt, um die Transphosphorylierungsreaktion zu starten. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 30°C für 10min. Alle folgenden Schritte (Abstoppen der Reaktion, Gel, Visualisierung) sind mit denen des Autophosphorylierungsexperimentes identisch.

Die hierfür verwendete Radioaktivität Redivue Adenosin 5'-[^{32}P]-triphosphate, AA0018 wurde zuerst von Amersham Bioscience und dann von Perkin-Elmer bezogen.

LPG-Puffer:**fer:**

40mM Tris-HCl, pH 7,5
 6mM NaN₃
 1% Triton-X-100

4x Proteinprobenpuffer:

0,24 M Tris, pH6,8
 8 % SDS
 40% Glycerin
 400 mM DTT
 0,02 % Bromphenolblau

Transphosphorylierungspuffer:

33 mM Hepes-KOH, pH 7,4
 70 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 0,1 mM EDTA
 2 mM DTT
 10% Glycerin

6.8. Messung freier Fettsäuren (Aurass P. RKI, Wernigerode)

Zur Überprüfung, ob Cardiolipin ebenfalls von RssA gespalten wird, wurde die Phospholipase RssA zusammen mit Cardiolipin inkubiert und im Anschluss das Entstehen freier Fettsäuren durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Der Inkubationsansatz erfolgte unter folgenden Bedingungen: Das Substrat (Cardiolipin) wurde unter Zusatz von 3 mM NaN₃, 0,5% Triton X-100 in 20 mM Tris-HCl (pH 7,2) bei 37°C 15 Minuten lang geschüttelt und somit gelöst. Anschließend wurde das gelöste Substrat in einer Mikrotiterplatte zusammen mit dem gereinigten RssA-Protein in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unter Schütteln (100 rpm) bei 37°C inkubiert. RssA wurde dabei stets im Verhältnis 1:5 in Tris-HCl oder Dialysepuffer verdünnt in die Reaktion eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 40 mM Tris-HCl.

Die Detektion der freien Fettsäuren erfolgte mit dem Nefa-C-Test Kit. Hierbei wurden 10 µl des zuvor beschriebenen Inkubats unter 15 minütiger Schüttelinkubation bei Raumtemperatur mit 50 µl Farbreagenz A und anschließend weitere 15 Minuten mit Farbreagenz B unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Der Farbumschlag, der bei Vorhandensein freier Fettsäuren erfolgte, wurde im Mikrotiterplattenreader durch Bestimmung der OD_{550 nm} gemessen. Anhand einer zuvor generierten Eichkurve eines Ölsäurestandards des Kits wurde dann die Konzentration der freien Fettsäuren errechnet.

6.9. Protein-DNA-Bindestudien (Electrophoretic Mobility Shift-Experimente EMS)

Um der Fragestellung nachzugehen, ob RcsB direkt an die *csuD*-Promotorregion bindet wurden EMS-Experimente (Electrophoretic Mobility Shift) modifiziert nach der Methode von Fried und Crothers durchgeführt (Fried und Crothers 1981). Bei Entstehung eines Pro-

tein-DNA-Komplexes wandert dieser Komplex mit geringerer Geschwindigkeit durch das Gel, als die entsprechende freie, ungebundene DNA.

7. Computerprogramme und Internetadressen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich die folgenden Programme verwendet.

Datenverarbeitung: Microsoft Office 1998, DNA-StriderTM1.3fl6, Amplify

Visualisierungssoftware: Kaleidagraph 3.6, Image Gauge V3.1, GenePix Pro 4.1 und Acuity (Axon).

Die Funktion und die Zugehörigkeit zu Transkriptionseinheiten der in den Mikroarrays als differentiell reguliert identifizierten Gene wurden mit den folgenden Datenbanken ermittelt:

- EcoCyc (ecocyc.org)
- EcoGene (ecogene.org)
- ColiBase (colibase.bham.ac.uk)
- Colibri (genolist.pasteur.fr/Colibri)
- NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Strukturvorhersagen für RprA wurden mit dem Programm der Fa. MFOLD, Quickfold (Zuker M., 2003) (mfold.bioinfo.rpi.edu) getroffen. Mögliche Ziel-mRNAs dieser kleinen RNA wurden mit dem Programm TargetRNA (snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/) (Tjaden, 2008) gesucht und potentielle Bindestellen von RprA innerhalb der Ziel-mRNA ermittelt.

1. Die Rolle der patatin-ähnlichen Phospholipase RssA bei der Kontrolle des ArcB/ArcA/RssB-Systems und anderer Zweikomponentensysteme

Die im Folgenden beschriebenen intensiven Voruntersuchungen zur Funktion von RssA sind durch M. Marquardt in der Arbeitsgruppe von R. Hengge und in Kooperation mit P. Aurass und Dr. A. Flieger des Robert-Koch-Instituts in Berlin/Wernigerode durchgeführt worden (Marquardt, 2007).

RssA wurde nach Sequenzhomologie-Untersuchungen in die Familie der patatin-ähnlichen Proteine eingeordnet. Einige dieser patatin-ähnlichen Proteine weisen *in vitro* Phospholipase-Aktivität auf, durch die Phospholipide in Lysophospholipide und freie Fettsäuren gespalten werden können. Das bislang am besten untersuchte Beispiel stellt das Toxin ExoU aus *Pseudomonas aeruginosa* dar. ExoU besitzt ebenfalls Phospholipaseaktivität und bereits minimal exprimierte Mengen verursachen die Zerstörung von Membranen verschiedener Organellen (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003). Nach dem Zellkontakt des Bakteriums mit einer eukaryontischen Zelle wird ExoU zusammen mit anderen Effektorproteinen über das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle injiziert. Innerhalb der Wirtszelle kommt es dann zur Aktivierung von ExoU und zum Abtöten der Wirtszelle (Sato *et al.*, 2003).

Eine Phospholipase-Aktivität konnte durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen bezüglich der entstehenden Spaltungsprodukte und eines Enzymassays zur Bestimmung freier Fettsäuren auch für RssA beschrieben werden. RssA spaltet dabei spezifisch Phosphatidylglycerin (PG), ein Lipid welches 20 % aller Phospholipide in der bakteriellen Membran ausmacht, hydrolytisch in Lysophosphatidylglycerin (LPG) und freie Fettsäuren. Für seine Aktivität ist das G-X-S-X-G Motiv mit dem Serin an Position 41 essentiell.

Neben diesen Befunden wurde des Weiteren beobachtet, dass RssA die σ^S -Proteolyse verlangsamt und dafür phosphorylierbares RssB benötigt. Allerdings beruhen diese Schlussfolgerungen auf sehr kompliziert konstruierten Stämmen und sollten weiter überprüft werden.

rssA und *rssB* sind zusammen in einem Operon lokalisiert und unterliegen somit derselben Regulation. Die Genprodukte von in Operonen lokalisierten Genen sind meist an denselben zellulären Prozessen beteiligt, indem sie zum Beispiel ihre Aktivität gegenseitig beeinflussen oder miteinander interagieren können. Dies könnte also auch für *rssA* und *rssB* zutreffen. Für RssB ist die Funktion als Responseregulator, der in seinem phosphorylierten Zustand an den generellen Stress-Sigmafaktor σ^S bindet und diesen dem Abbau durch die ClpXP-Protease zuführt, bereits sehr lange bekannt (Hengge-Aronis, 2002). Durch die

Modulation seines Phosphorylierungsstatus könnte also die σ^S -Proteolyse beeinflusst werden.

Untersuchungen zeigten jedoch, dass RssA nicht direkt mit RssB und auch nicht mit σ^S interagiert (Kampmann, 2001; Marquardt, 2007). Des Weiteren konnte kein Einfluss von RssA auf die RssB-Phosphorylierung *in vitro* durch zum Beispiel Modulation der Sensorkinase ArcB beobachtet werden. Demnach ist der beobachtete Effekt der verlangsamten σ^S -Proteolyse in Anwesenheit von RssA nicht direkter Natur. Möglicherweise üben die bei der Spaltung von PG durch RssA entstehenden Produkte (Lysophosphatidylglycerin, freie Fettsäuren) einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von RssB aus. RssB kann *in vivo* durch Acetylphosphat und durch die Sensorkinase ArcB (Mika *et al.* 2005) phosphoryliert werden. Die σ^S -Halbwertszeit einer *arcB*-Mutante im Vergleich zur Wildtypsituation ist mit der einer *RssA*^{+/-} Situation vergleichbar, weshalb ein möglicher Einfluss auf die Sensorkinase ArcB postuliert wurde.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die RssA-Spaltungsprodukte (LPG, freie Fettsäuren) die Sensorkinase für RssB (ArcB) modulieren können.

Erste Experimente dazu sind ebenfalls von M. Marquardt durchgeführt worden und in der folgenden Arbeit fortgeführt und erweitert worden. Ein weiterer Kernpunkt der Untersuchungen war herauszufinden, welchen Einfluss die Patatin-ähnliche Phospholipase RssA von *E.coli in vivo* ausübt.

1.1. Das aus der enzymatischen Aktivität von RssA hervorgehende Spaltungsprodukt

LPG hemmt die Autophosphorylierung von ArcB, RstB, BaeS und BarA *in vitro*

Die Phospholipase RssA spaltet Phosphatidylglycerin in Lysophosphatidylglycerin und freie Fettsäuren. Durch Autophosphorylierungsexperimente sollte geklärt werden, ob diese Spaltungsprodukte die Sensorkinase ArcB modulieren können. Dafür wurde gereinigtes ArcB (Mika *et al.* 2005) zusammen mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und steigenden Konzentrationen von LPG gleichzeitig für 10 Minuten bei 30°C inkubiert, auf einem 12% Acrylamidgel aufgetrennt und durch eine anschließende Autoradiographie die Intensität der Autophosphorylierung sichtbar gemacht. In Abbildung 1A ist die Autophosphorylierung von ArcB bei steigender LPG-Menge dargestellt.

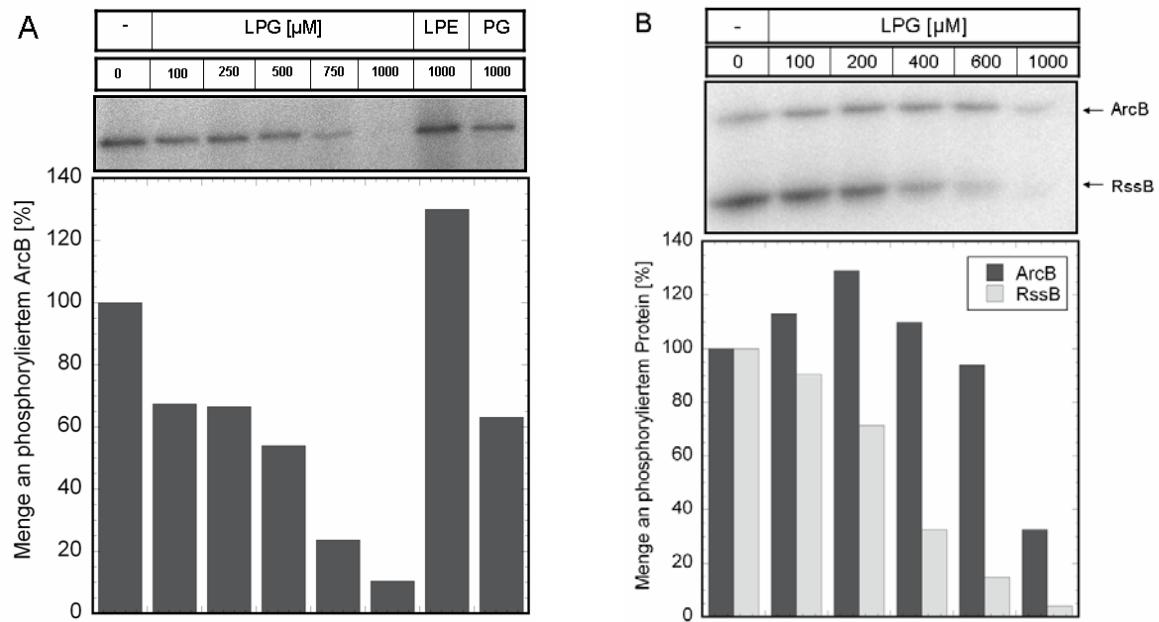


Abbildung 1: LPG reduziert die Autophosphorylierung von ArcB (A) und die Transphosphorylierung von ArcB auf RssB (B)

Das gereinigte Protein ArcB ($0,067 \mu\text{M}$) und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurden gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPG (A) bzw. zusätzlich dazu mit gereinigtem RssB-Protein ($10 \mu\text{M}$) (B) versehen. Nach einer Inkubation bei 30°C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt und die Proben auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen.

Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass ArcB mit steigender Konzentration an LPG in seiner Phosphorylierungsfähigkeit gehemmt ist. Hohe Mengen an LPE und PG haben jedoch keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB (Abb. 1A). LPG übt folglich einen Einfluss auf die Phosphorylierung der Sensorkinase ArcB aus. Dieser Effekt wird ebenfalls sichtbar, wenn zusätzlich der Responsregulator RssB mit in den Ansatz gegeben wird. Wie in Abbildung 1B ersichtlich, hat die Reduzierung der ArcB-Phosphorylierung auch einen reduzierten Phosphotransfer auf RssB zur Folge.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob nur der ArcB/RssB Weg beeinflusst wird oder auch andere Sensorkinasen auf LPG reagieren und LPG eine eher generelle Rolle bei der Aktivitätskontrolle von Zweikomponentensystemen spielt. Dazu wurden speziell solche Kinasen ausgesucht, die durch vorangegangene Untersuchungen eine effiziente Autophosphorylierung *in vitro* aufweisen (Yamamoto *et al.*, 2005), gereinigt und ebenfalls mit unterschiedlichen LPG-Konzentrationen und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. In Abbildung 2 ist der Einfluss von LPG auf die Sensorkinasen RstB, BaeS und BarA dargestellt.

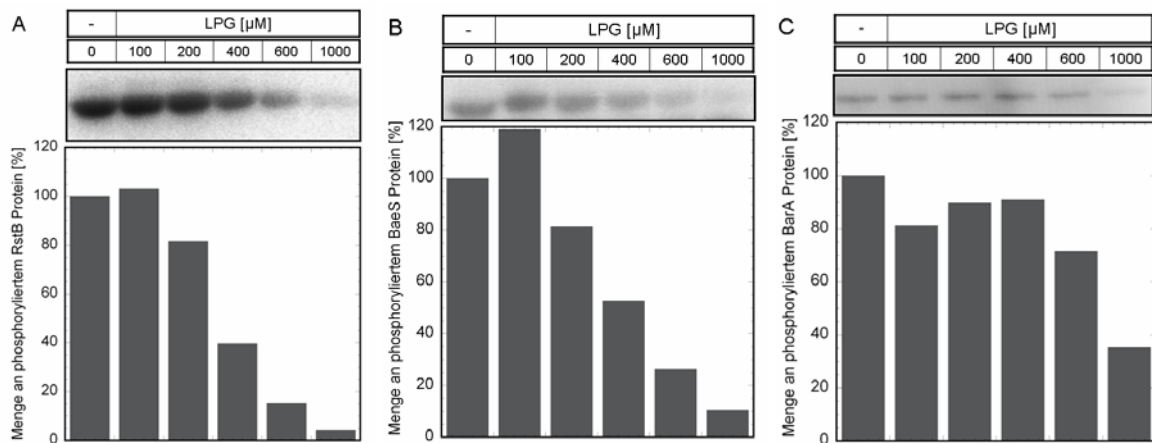


Abbildung 2: LPG reduziert die Autophosphorylierung der Sensorkinasen RstB (A), BaeS (B) und BarA (C)

Das gereinigte Protein RstB ($2,89\mu\text{M}$) (A), BaeS ($2,3\mu\text{M}$) (B) bzw. BarA ($0,67\mu\text{M}$) (C) wurde gleichzeitig mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und unterschiedlichen Konzentrationen an LPG versehen. Nach einer Inkubation bei 30°C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt und die Proben auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms Image Gauge.

Alle drei Kinasen zeigen mit Zunahme der LPG-Konzentration eine Reduzierung der Autophosphorylierung, wobei die Kinasen RstB (Abb. 2A) und BaeS (Abb. 2B) bereits bei einer Konzentration von $400\mu\text{M}$ LPG eine 50fache Reduktion aufweisen. Bei BarA (Abb. 2C) hingegen sind höhere LPG-Mengen nötig, trotzdem wird auch diese Kinase durch LPG in ihrer Phosphorylierungsfähigkeit gehemmt. Der Grund hierfür könnte im Aufbau der Kinasen liegen. BarA stellt eine Hybridsensorkinase dar, die dadurch auch als eine Phosphatase fungieren kann. Das durch die Phospholipase-Aktivität von RssA generierte Spaltungsprodukt LPG hemmt also nicht nur ArcB in seiner Phosphorylierung, sondern spielt möglicherweise eine generelle Rolle bei der Aktivitätskontrolle von Zweikomponentensystemen, indem es wie hier dargestellt auch in der Lage ist, andere Sensorkinasen zu hemmen.

1.2. Die ebenfalls aus der Spaltung hervorgehende freie Fettsäure – Palmitinsäure hat keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB *in vitro*

Das zweite Spaltungsprodukt, was bei der durch die Phospholipase-Aktivität von RssA in Bezug auf die Hydrolyse von PG entsteht, sind freie Fettsäuren. In dem folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, inwieweit auch freie Fettsäuren an der Modulation von ArcB-Autophosphorylierung beteiligt sind. Dafür wurde, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, das gereinigte ArcB-Protein mit verschiedenen Palmitinsäurekonzentrationen und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert, aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar ge-

macht. Palmitinsäure (Hexadekansäure) ist eine gesättigte organische Säure, die zu den Fettsäuren zählt. In Abbildung 3 ist die Autophosphorylierung von ArcB in Anwesenheit steigender Palmitinsäurekonzentrationen dargestellt.

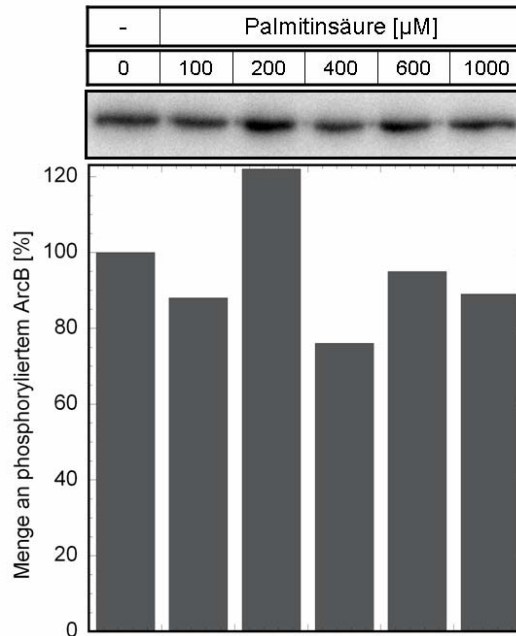


Abbildung 3: Die Fettsäure Palmitinsäure hat keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB

Das gereinigte Protein ArcB (0,067 µM) und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurden gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen an Palmitinsäure versehen. Nach einer Inkubation bei 30°C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt und die Proben auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms Image Gauge.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, hat die Fettsäure Palmitinsäure keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB. ArcB wird in seiner Autophosphorylierungsfähigkeit nicht durch die freie Fettsäure Palmitinsäure gehemmt. Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die patatin-ähnliche Phospholipase RssA über ihr spezifisches Spaltungsprodukt LPG die σ^S -Proteolyse verlangsamt, indem es die ArcB und folglich auch die RssB-Phosphorylierung hemmt und somit den Abbau des generellen Stress-Sigmafaktors σ^S durch die ClpXP-Protease verhindert. Neben ArcB/RssB wird auch die Phosphorylierung dreier weiterer Sensorinasen (Abb. 2A bis C) *in vitro* durch LPG beeinflusst. LPG ist somit nicht spezifisch für ArcB, sondern könnte eine generelle Rolle bei der Regulation von Zweikomponentensystemen spielen.

1.3. RssA zeigt Auswirkungen auf die genomweite Genexpression *in vivo*

Die vorangegangenen Erkenntnisse basieren alle auf *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von RssA/LPG. Es stellt sich deshalb die Frage: Welche Rolle spielt RssA tatsächlich *in*

vivo? Die dazu durchgeführten Experimente und Ergebnisse sind im nachfolgenden Abschnitt dargestellt.

Das durch RssA generierte Spaltungsprodukt LPG hemmt *in vitro* - aber nicht vollständig - die Sensor kinase ArcB. Demzufolge ist der Phosphattransfer auf RssB (Abb. 1B) und den Responseregulator ArcA reduziert. Zum einen resultiert dies in erhöhten σ^S -Spiegeln und zum anderen könnte dies einen Einfluss auf ArcA-regulierte Gene haben. Zusätzlich dazu hat RssA/LPG auch einen Einfluss auf die Aktivität anderer Zweikomponentensysteme (Abb. 2A bis C). Somit könnten eben nicht nur solche Gene, die unter der Kontrolle des ArcB/ArcA- und ArcB/RssB/ σ^S -Systems stehen, sondern auch Gene unter Kontrolle anderer Zweikomponentensysteme beeinflusst sein.

Diese Hypothese wurde den nachfolgend beschriebenen Mikroarrayanalysen zugrunde gelegt. Wie bereits eingangs beschrieben sind das *rssA*-Gen und das *rssB*-Gen in einem Operon lokalisiert. Ausgehend von einem σ^S -abhängigem Promoter stromaufwärts vom *rssA*-Transkriptionsstart werden also beide Gene in einer polycistronischen RNA transkribiert (Pruteanu *et al.*, 2002). Eine Deletion des *rssA*-Gens im Chromosom von *E.coli* hat zur Folge, dass das *rssB*-Gen näher an den Promoter rückt und somit verstärkt exprimiert wird (Marquardt, 2002; Diplomarbeit). Dies wiederum resultiert in einer verstärkten σ^S -Proteolyse, denn RssB in seiner phosphorylierten Form führt σ^S der ClpXP-Protease zu. Zu Beginn dieser Arbeit war keine Methode nutzbar, die es erlaubte eine Deletions- oder Punktmutation im *rssA*-Gen auf Chromosomebene zu generieren, welche keine Beeinflussung der Expression des nachfolgenden Gens *rssB* zur Folge hat. Aus diesem Grund wurden folgende Stämme für die Mikroarrayanalysen miteinander verglichen:

- a) *rssB::Tn10*-Mutationsstamm ($RssA^+RssB^-$; dieser Stamm besitzt ein intaktes *rssA*-Gen im Chromosom, aber eine Insertionsmutation im *rssB*-Gen) und
- b) $\Delta rssAB::cat$ -Deletionsstamm ($RssA^-RssB^-$); bei diesem Stamm handelt es sich um eine Doppelmutante in den Genen *rssA* und *rssB*).

Die *rssB*-Mutation/Deletion wurde hierfür nicht durch die ektopische Expression von RssB von einem Plasmid kompensiert. Das heißt konkret, dass beide Stämme kein RssB aufweisen und somit auch der von Marquardt (2007) beschriebene RssA/LPG-Effekt auf den σ^S -Abbau in beiden Stämmen ausbleibt. Dieses Experiment wurde in einem zweiten Mikroarrayansatz zusätzlich im *arcA*⁻-Hintergrund durchgeführt um herauszufinden, ob RssA-Effekte auftreten, die eventuell unabhängig vom ArcB/ArcA-Signaltransduktionsweg sind. Die jeweils erhaltenen signifikanten Mikroarrayergebnisse wurden miteinander verglichen und sind in Abbildung 4 dargestellt, wobei nur die Gene mit einer dreifachen differentiell-

len Expression ausgewählt wurden. Die Bedingungen (LB, 37°C, OD₅₇₈ 2) für den Mikroarray wurden so gewählt, dass sowohl RssA in der Zelle exprimiert war, als auch das ArcB/ArcA-System aktiv sein konnte.

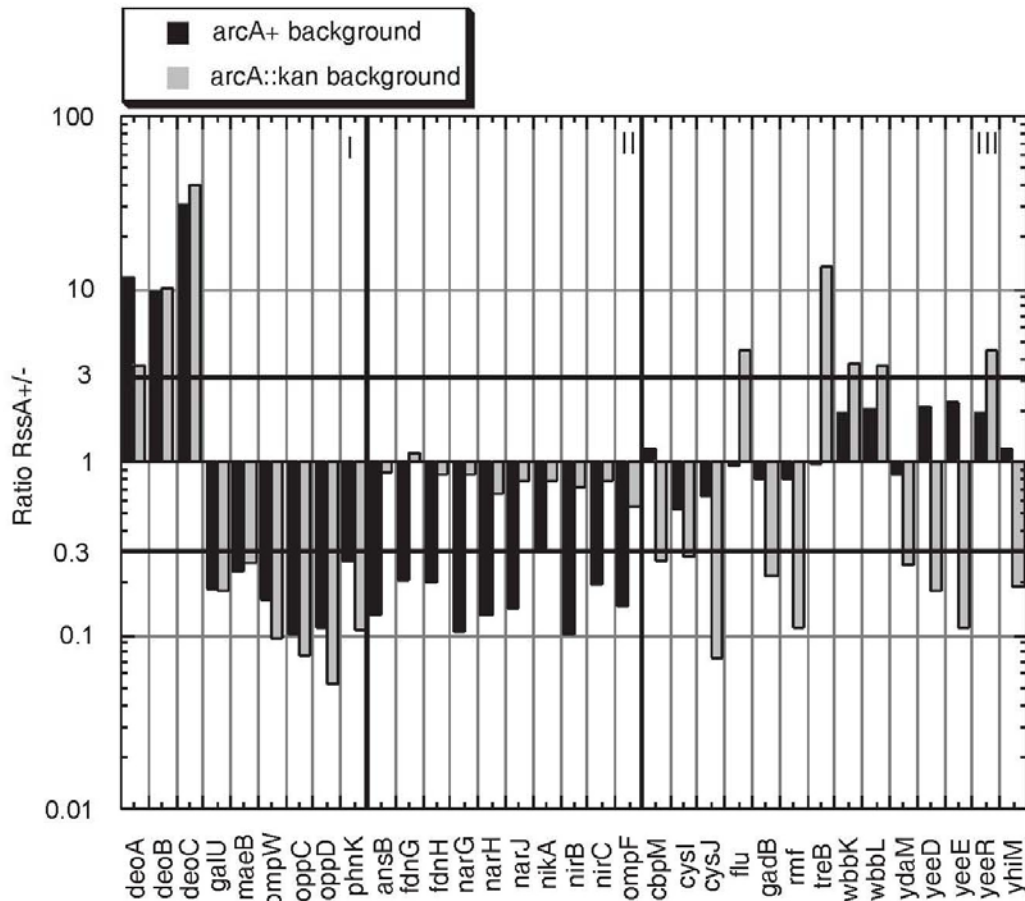


Abbildung 4: RssA hat einen Einfluss auf die genomweite Genexpression in *E.coli*

Die Mikroarrayanalysen wurden mit den Stämmen MC4100 *rssB::Tn10* ($RssA^+$) und MC4100 Δ *rssAB::cat* ($RssA^-$) durchgeführt. Die differentiell regulierten Gene beim Vergleich dieser beiden Stämme auf ein und demselben Mikroarray sind als schwarze Balken gekennzeichnet. Im Vergleich dazu wurde ein weiterer Mikroarrayansatz dieser beiden Stämme im zusätzlichen *arcA::kan* Hintergrund durchgeführt (graue Balken). Ein Balken repräsentiert den Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten. Es sind nur die Gene gezeigt, die eine mindestens dreifache differentielle Expression aufweisen. Die Ratiomittelwerte sind im Anhang unter Punkt I aufgelistet.

Zusätzlich zeigt RssA in Abwesenheit von RssB einen eindeutigen Effekt auf die Expression zahlreicher Gene (33) von *E.coli*. Diese durch RssA beeinflussten Gene können in 3 Gruppen eingeteilt werden. Gruppe I sind Gene, die eine differentielle Genexpression in $RssA^+$ und $RssA^-$ -Stämmen aufweisen, die jedoch unabhängig von ArcA sind. Sowohl im 1. Mikroarrayansatz ($ArcA^+$ Hintergrund, schwarze Balken in Abb.4), als auch im 2. Mikroarrayansatz ($ArcA^-$ Hintergrund, graue Balken in Abb.4) sind diese Gene reguliert. RssA wirkt also, möglicherweise über weitere Zweikomponentensysteme, auf die Expression

vieler Gene. Dies untermauert die im Abschnitt 1.1. beschriebenen RssA/LPG-Effekte auf die Autophosphorylierungsfähigkeit anderer Sensorkinasen.

Zu den Genen der Gruppe I zählen: *deoABC* (Enzyme des Desoxyribosephosphat-Abbaus), *galU* (UTP-Glukose-1-Phosphat Uridyltransferase), *maeB* (Malatdehydrogenase), *ompW* (Aussenmembranprotein), *oppCD* (Oligopeptidtransporter) und *phnK* (carbon-phosphorus lyase). Eine Verifizierung konnte mittels Northernblotanalyse für *deoB* als ausgewähltes Target erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Gene, die durch RssA reguliert sind, deren Regulation jedoch in Abwesenheit von ArcA verloren geht. Hier wirkt RssA also über das ArcB/ArcA-Phosphorelaysystem. Neben den bereits als ArcA-abhängig bekannten Genen wie *ansB* (Asparaginase), *narGHJ* (Nitratreduktase), sind auch *fdnGH* (Formathydrogenase), *nikA* (Nickeltransporter), *nirB* (Nitritreduktase), *nirC* (Nitrittransporter) und *ompF* (Aussenmembranporin) durch RssA reguliert. Mit zusätzliche Westernblotanalysen, mit einem Antikörper gerichtet gegen die hauptsächlichen Aussenmembranproteine (inklusive OmpF) konnte beim Vergleich der Stämme RssA⁺RssB⁻ und RssA⁻RssB⁻ eine reduzierte OmpF-Proteinmenge im RssA⁺-Hintergrund detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt die Mikroarrayergebnisse hinsichtlich der negativen Regulation von *ompF* durch RssA.

In die Gruppe III sind schließlich diejenigen Gene eingeordnet, die ausschließlich im ArcA⁻-Hintergrund einer Regulation durch RssA unterliegen, nicht jedoch im ArcA⁺-Hintergrund. Hierbei handelt es sich um Gene, die möglicherweise unter Kontrolle eines anderen Responseregulators stehen, der unter diesen Umständen (Abwesenheit von ArcA) möglicherweise durch die Sensorkinase ArcB beeinflusst wird. Dabei handelt es sich um folgende Gene: *cbpM* (Chaperon-modulator Protein), *cysIJ* (Sulfitreduktase), *flu* (Antigen 43), *gadB* (Glutamatdecarboxylase), *rmf* (Ribosomen-Modulationsfaktor), *treB* (EITre), *wbbKL* (putative Transferase und Creatinase), *yeeD* (hypothetisches Protein), *yeeE* (putative Permease), *yeeR* (hypothetisches Protein), *yhiM* (Innenmembranprotein). Interessanterweise ist hier auch das Gen *ydaM* einzuordnen, welches durch RssA negativ reguliert wird. YdaM ist eine Diguanylatcyclase mit positivem Einfluss auf die Curli Expression. Bei Curli Fimbrien handelt es sich um Biofilmkomponenten, deren phänotypischer Nachweis mit Hilfe des Farbstoffes Kongorot möglich ist. Mittels dieser schnellen Methode konnte der für RssA (im zusätzlichen ArcA⁻-Hintergrund) reprimierende Einfluss auf die Expression der Curli Fimbrien bei 37°C bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die meisten Gene (mit Ausnahme des *deo*-Operons) sind durch RssA negativ reguliert. RssA ist vermutlich mit verantwortlich diverse Signaltransduktionssysteme zu hemmen. Aus der Vielzahl der durch RssA beeinflusster Gene (33) mit ganz unterschiedlichen Funktionen kann dem RssA-Protein durchaus eine globale Rolle in *E.coli* zugesprochen werden. Aus den bisherigen Daten kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei RssA, um die erste bakterielle Phospholipase mit signaltransduzierender und genregulierender Wirkung handelt. Dieses Prinzip ist bei Eukaryoten von ganz zentraler Bedeutung zur Genregulation, bei Bakterien jedoch bislang nicht gefunden worden.

Mit diesen und den vorangegangenen Daten zeichnet sich eine weitreichende Kommunikation und Abstimmung zwischen verschiedenen Stressantworten ab: Über RssA und sein Produkt LPG, inhibiert die generelle σ^S -abhängige Stressantwort die Aktivität anderer stressspezifischer Stressantworten, die über Zweikomponentensysteme vermittelt werden.

1.4. Zeigt RssA enzymatische Aktivität in Bezug auf andere Membrankomponenten wie Cardiolipin *in vitro*?

Wie bereits eingangs in Abschnitt 1 erwähnt, ist RssA in der Lage Phosphatidylglycerin in Lysophosphatidylglycerin und freie Fettsäuren zu spalten. PG ist mit 20% neben Phosphatidylethanolamin (PE) 70% eines der Hauptphospholipide der bakteriellen Membran. Cardiolipin (CL) hingegen macht nur 1-5% der gesamten Phospholipide in *E.coli* aus (Cronan, 2003). Wie bereits in der Arbeit von M. Marquardt beschrieben ist RssA spezifisch für PG und nicht in der Lage PE und PS zu hydrolysieren. Doch wie verhält es sich mit dem zu PG sehr ähnlichen Cardiolipin? Diese Fragestellung und die dafür notwendige Untersuchung wurde zusammen mit P. Aurass und Dr. A. Flieger des Robert Koch-Instituts in Wernigerode bearbeitet.

Cardiolipin oder Di-Phosphatidylglycerol ist ein Phosphatidylglycerinderivat, das hauptsächlich an den Zellpolen und am Septum anzutreffen ist. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Cardiolipin eine Rolle bei der Lokalisierung und Rekrutierung von Proteinen (Bsp. Transportprotein für Prolin – ProP) zum Zellpol spielt (Romantsov *et al.* 2008).

Das Substrat Cardiolipin wurde in dem bereits erwähnten Testverfahren zur Messung freier Fettsäuren eingesetzt und auf dessen mögliche Hydrolyse durch RssA hin untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 5 veranschaulichen, dass auch Cardiolipin durch RssA gespalten wird, diese Spaltung aber in der RssA-Serinmutante aufgehoben ist.

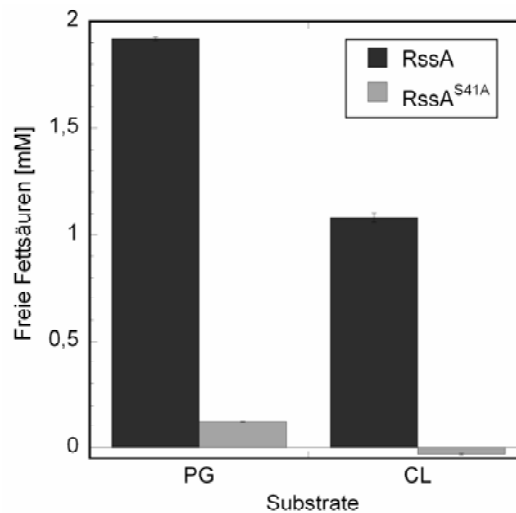


Abbildung 5: Messung des Gehaltes an abgespaltenen freien Fettsäuren von Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL)

Die als Substrat dienenden Lipide Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) wurden jeweils mit gereinigtem RssA oder RssA^{S41A} für 18h inkubiert. Die Detektion der entstandenen freien Fettsäuren erfolgte mit dem Nefa-Testkit durch einen Farbumschlag, der dann photometrisch bei OD₅₅₀ nm vermessen wurde.

Das hauptsächliche Substrat für RssA scheint jedoch PG zu sein, denn es wird mit einer höheren Effizienz gespalten als CL. Cardiolipin dient ebenfalls als Substrat, wird jedoch im Vergleich zu PG mit geringerer Effizienz gespalten. Beim Einsatz der RssA^{S41A} – Variante hingegen ist in beiden Fällen keine Entstehung freier Fettsäuren zu verzeichnen. Damit konnte erneut gezeigt werden, dass RssA für seine Aktivität tatsächlich das Serin an Position 41 benötigt und das aktive Zentrum demnach im G-X-S-X-G-Motiv enthalten ist. Neben dem Substrat PG wurde dadurch ein zweites, das dem PG sehr ähnliche Substrat Cardiolipin identifiziert.

2. Die Rolle des Zweikomponentensystems RcsCDB und der kleinen RNA RprA bei der Expression des Biofilm-Regulators CsgD und der adhäsiven Curli-Fimbrien in *E.coli*

Zweikomponentensysteme gehören, wie schon erwähnt, zu den wichtigsten Systemen, um eine Anpassung an sich ständig ändernde Umweltverhältnisse zu gewährleisten. Ein bei *E.coli* besonders gut untersuchtes Phosphorelaysystem stellt das Rcs (regulator of colanic capsular biosynthesis) dar. Die Sensor kinase RcsC kann sowohl als Kinase und auch als Phosphatase wirken und stellt den Phosphotransfer über eine zwischengeschaltete Hpt-Domäne (RcsD) zum dazugehörigen Responseregulator RcsB sicher. Dieser Responseregulator kann zusammen mit einem Cofaktor (RcsA) oder aber auch allein über seine Funktion als Transkriptionsfaktor die Expression vieler Gene von *E.coli* beeinflussen. Zielgene des Rcs-Systems sind zum Beispiel der Masterregulator der Flagellensynthese (*flhDC*), die Kapselsynthesegene (*cps*), der Biofilm modulierende Faktor (*bdm*), Gene der Säureresistenz (*gad*) und die kleine RNA RprA (Gottesman *et al.*, 1985; Takeda *et al.*, 2001; Francez-Charlot *et al.*, 2003; Francez-Charlot *et al.*, 2005; Castanie-Cornet *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Einfluss des Rcs-Systems auf die Expression der Curlisynthesegene (*csgDEFG*, *csgBA*) beobachtet: Die künstliche Aktivierung des Rcs-Systems durch die Überproduktion des DnaJ-ähnlichen Proteins DjlA zeigte in Makroarrayanalysen beim Vergleich des Wildtypstammes (RcsC⁺) mit einer RcsC-Mutante eine deutliche Reduktion der Expression des *csgD*-Gens in Anwesenheit der aktivierten RcsC-Sensor kinase (Ferrieres *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen bei denen transkriptionale β -Glukuronidase Fusionen zu den Genen *csgA* und *csgD* im RcsB-Mutanten hintergrund im Vergleich zum Wildtyp (RcsB⁺) gemessen wurden, zeigten RcsB als moderaten Repressor für *csgD* und als starken Repressor für *csgA* (Vianney *et al.*, 2005). Obwohl eine Bindestelle für RcsB innerhalb des Promotorbereichs von *csgD* vermutet wurde, konnte diese weder identifiziert werden, noch eine direkte Bindung des Responseregulators RcsB an den Promotorbereich von *csgD* oder *csgBA* nachgewiesen werden (Vianney *et al.*, 2005). Diese Beobachtung und der eindeutige Befund, dass die Expression der kleinen RNA RprA durch den Responseregulator RcsB aktiviert wird (Majdalani *et al.*, 2002), legten die Vermutung nahe, dass auch die kleine RNA RprA an der Regulation der Curlisynthesegene beteiligt sein könnte. Als Zielgen der kleinen RNA RprA ist bislang nur der Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS beschrieben. Unter Osmoschockbedingungen stabilisiert RprA die *rpoS*-mRNA und stimuliert die Translation, indem es die Ribosomenbindestelle zugänglich

für die Ribosomen macht (Majdalani *et al.*, 2002). Da das Rcs-System wie bereits oben beschrieben eine Vielzahl von Genen in ihrer Expression beeinflusst, könnte möglicherweise auch die RcsB-abhängige RprA-RNA neben *rpoS* weitere Gene beeinflussen.

In dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluss von RprA auf die Curlisynthesegene und weitere Komponenten der SigmaS/CsgD Kaskade näher untersucht.

2.1. Das Rcs-System übt seinen Einfluss auf die Curli-Expression über die kleine RNA RprA aus

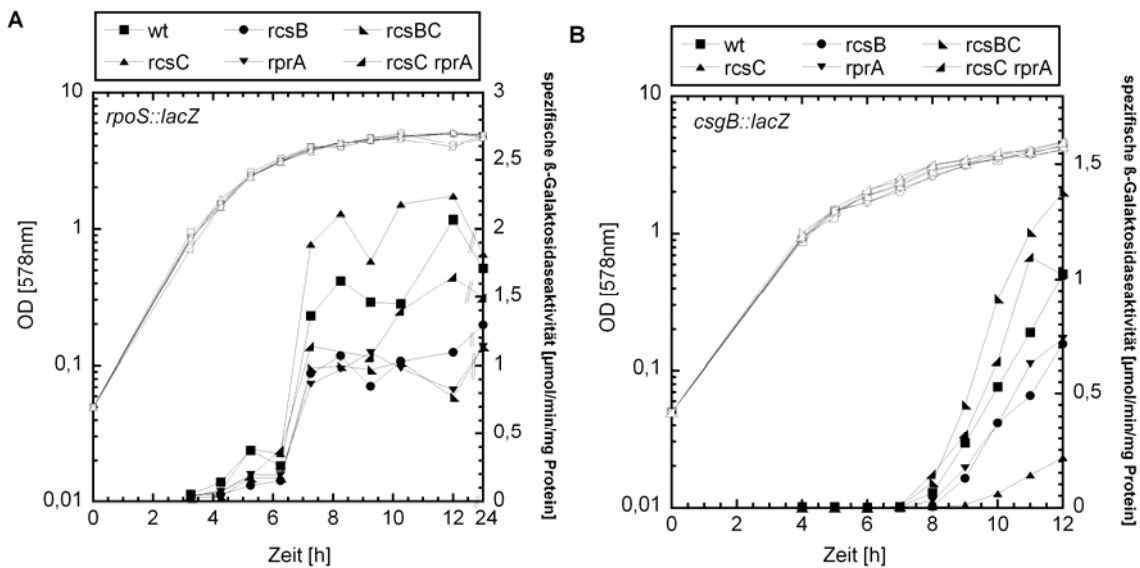
Viele Effekte auf Zielgene, die durch das Rcs-System vermittelt werden, sind unter nicht physiologischen Bedingungen (z.B. Überproduktion von z.B. DjlA) beobachtet worden. Das tatsächliche aktivierende Signal für die Sensorkinase RcsC gilt bis heute als nicht identifiziert. Obwohl dem Rcs-System bei der Reifung von Biofilmen eine Rolle zugeschrieben wird (Majdalani und Gottesman, 2005), kann man es auch unter normalen Wachstumsbedingungen im flüssigen Medium untersuchen. Diesen Befund lieferten vergleichende Untersuchungen die auf einer festen Oberfläche (Agarplatte) sowie in flüssigem LB-Medium durchgeführt wurden und identische Ergebnisse lieferten. Im Folgenden werden deshalb nur die Daten präsentiert, die im Flüssigmedium (LB) erzielt worden.

CsgD als essentieller Regulator der Curlisynthesegene (*csgBC*, *csgA*) und anderer Biofilmkomponenten (*yaiC*) unterliegt selbst einer komplexen Regulation auf Ebene der Transkription. *csgD* wird verstärkt in der späten stationären Phase bei einer Temperatur von 28°C exprimiert (Weber *et al.*, 2006), wobei die temperaturintegrierende Komponente bislang nicht bekannt ist. Zusätzlich wirken unter verschiedenen Bedingungen: SigmaS (Untereinheit der RNA-Polymerase) (Weber *et al.*, 2006), die Transkriptionsfaktoren MlrA und OmpR aktivierend; das Signalmolekül c-di-GMP ebenfalls aktivierend und zwei weitere Transkriptionsfaktoren CpxR und RcsB reprimierend (Weber *et al.*, 2006; Jubelin *et al.*, 2005). Ob nun dieser reprimierende Effekt von RcsB auf die *csgD* Expression direkt oder indirekt über die RcsB-abhängige kleine RNA RprA erfolgt und welche Komponenten des SigmaS/CsgD regulatorischen Netzwerkes möglicherweise ebenfalls durch das Rcs-System beeinflusst sind, wird deshalb im Folgenden näher untersucht.

2.1.1. Erhöhte RprA-Level in der Zelle führen zu einer Aktivierung der *rpoS* – Genexpression und zu einer Inhibierung der *csgB*, *yaiC* und *ydaM* – Genexpression

Dafür wurden bereits konstruierte translationale *lacZ* Reporterfusionen zu den Genen *rpoS*, *csgB*, *yaiC*, *mlrA*, *yciR*, und *ydaM* verwendet, die als Einzelkopie an der chromosomalen att-site der Stämme MC4100 und W3110 integriert vorlagen (Stämme siehe Stammliste Tab.3, Vorgehensweise siehe Material und Methoden Abschnitt 5.11.). Mittels P1-Transduktion wurden danach zusätzliche Einzelmutationen in den Genen *rscC*, *rscB* und *rprA*, sowie Doppelmutationen (*rscBC*, *rscC rprA*) erzeugt. Die Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C kultiviert, da bei dieser Temperatur die Curlisynthesegene verstärkt exprimiert werden (Weber *et al.*, 2006). Zu bestimmten Zeiten entlang der Wachstumskurve wurden Proben zur Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität entnommen.

In Abbildung 6 A-D sind die Fusionsaktivitäten von *rpoS*, *csgB*, *yaiC* und *ydaM* in den jeweiligen *rsc*-Mutantenhintergründen dargestellt, welche im Folgenden diskutiert werden:



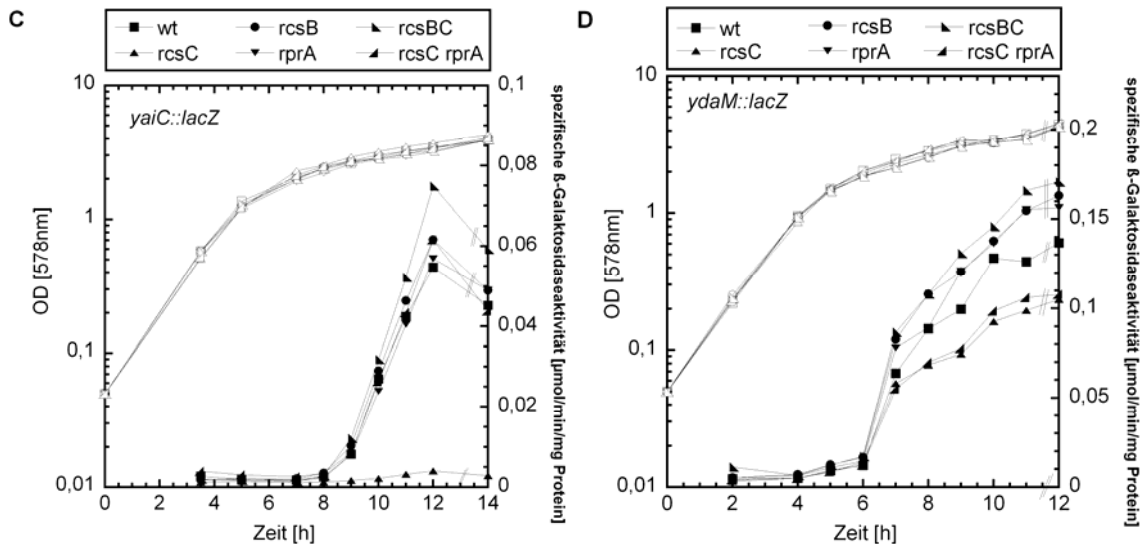


Abbildung 6: Expressionsprofil der *rpoS::lacZ* (A), *csgB::lacZ* (B) *yaiC::lacZ* (C) und *ydaM::lacZ* (D) Fusionen und deren verschiedene *rcs*-Mutantenhintergründe

(A) Die Stämme RO91 (MC4100 *rpoS742::lacZ*) (Viereck), SB124 (MC4100 *rpoS742::lacZ rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach oben), SB125 (MC4100 *rpoS742::lacZ rcsB::kan*) (Kreis), SB126 (MC4100 *rpoS742::lacZ rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach unten), SB128 (MC4100 *rpoS742::lacZ rcsBC::kan*) (Dreieck Spitze nach links), SB131 (MC4100 *rpoS742::lacZ rprA::kan rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach rechts) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

(B) Die Stämme GB350 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ*) (Viereck), SB134 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach oben), SB135 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ rcsB::kan*) (Kreis), SB136 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach unten), SB137 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ rcsBC::kan*) (Dreieck Spitze nach links), SB138 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ rcsC::cat rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach rechts) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

(C) Die Stämme NS153 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ*) (Viereck), SB238 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach oben), SB264 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ rcsB::kan*) (Kreis), SB245 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach unten), SB265 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ rcsBC::kan*) (Dreieck Spitze nach links), SB239 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ rcsC::cat rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach rechts) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

(D) Die Stämme NS123 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ*) (Viereck), SB139 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach oben), SB150 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ rcsB::kan*) (Kreis), SB140 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach unten), SB151 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ rcsBC::kan*) (Dreieck Spitze nach links), SB147 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ rcsC::cat rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach rechts) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

Untersuchungen der *rpoS::lacZ* Expression (Abb.6A):

In Abbildung 6A ist der Einfluss des Rcs-Systems auf die translationale *rpoS::lacZ* Fusion gezeigt, wobei ein kleiner Anstieg der Expression in einer *rcsC*-Mutante (geschlossene Dreiecke mit der Spitze nach oben gerichtet) im Vergleich zum Wildtyp (geschlossene Quadrate) zu verzeichnen ist. Alle weiteren *rcs*-Mutanten liefern im Vergleich zum Wildtyp eine leicht verringerte *rpoS*-Expression. Diese Aktivierung der *rpoS*-Expression in ei-

ner *rscC*-Mutante ist auf die hier vorhandenen höheren Mengen der kleinen RNA RprA im Vergleich zur Wildtypsituation zurückzuführen. Sie kommen dadurch zustande, dass durch das Ausschalten der Sensorkinase RcsC auch deren Phosphataseaktivität eliminiert wurde. Der noch vorhandene Responseregulator wird nun durch Acetylphosphat oder aber möglicherweise auch durch Sensorkinasen anderer Zweikomponentensysteme phosphoryliert. Er ist in dieser Situation also „hyperaktiv“ und somit in der Lage die Expression der kleinen RNA RprA stark zu aktivieren, was wiederum zu höheren RprA Mengen in der Zelle führt. Die stabilisierende Wirkung auf die *rpoS*mRNA und die Stimulierung deren Translation ist hier also auf erhöhte RprA Mengen zurückzuführen (Majdalani *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die Einzelmutationen im Responseregulatorgen *rscB* oder der kleinen RNA RprA selbst, als auch die Doppelmutationen im Responseregulator- und Sensorkinasegen (*rscBC*) bzw. dem Sensorkinasegen und der kleinen RNA (*rscC rprA*) eine leicht verringerte *rpoS*-Expression. Dies ist zum einen mit der fehlenden Wirkweise von RprA selbst (in der *rprA*-Einzel- und der *rscC rprA*-Doppelmutante) und zum anderen mit der ausbleibenden Expressionsaktivierung von RprA durch den Responseregulator RcsB (in der *rscB* Einzel- und *rscBC*-Doppelmutante) zu begründen. Der nicht sehr stark ausgeprägte Einfluss von RprA auf die *rpoS* Expression in LB-Medium bei 28°C ist mit früheren Beobachtungen, die unter Nicht-Osmoschockbedingungen gewonnen wurden zu vergleichen (Majdalani *et al.*, 2001).

Dass tatsächlich erhöhte Mengen an RprA in der RcsC-Sensorkinase mutante vorhanden sind wurde bereits durch S. Gottesman und Mitarbeiter beschrieben (Majdalani *et al.*, 2002) und für die hier verwendeten Untersuchungsbedingungen (LB, 28°C) in Abschnitt 2.1.3 bestätigt.

Untersuchungen der *csgB::lacZ* (Abb. 6B) und *yaiC::lacZ* (Abb. 6C) Expression:

Betrachtet man die *csgB* und *yaiC* Fusionsaktivitäten der einzelnen *rsc*-Mutationen (Abb. 6B bis C) so zeigt sich im Gegensatz zu *rpoS* ein deutlich anderes Expressionsprofil. In einer *rscC*-Mutante zeigen beide Fusionen im Vergleich zum Wildtyp eine sehr stark verminderte Expression (drei- bis vierfach) in der stationären Phase. Die Einzelmutationen in den Genen *rscB* oder *rprA* führen zu einer nur sehr leicht reduzierten *csgB* Expression, sie üben aber keinen Einfluss auf die *yaiC* Expression aus. Interessanterweise bewirkt die zusätzliche Mutation des Responseregulators RcsB bzw. der kleinen RNA RprA zur bereits bestehenden RcsC-Sensorkinase mutation die Suppression, der durch die RcsC-Einzelmutation verursachten starken Repression der *csgB* und *yaiC* Expression, bis hin zum Wildtypniveau. Das heißt konkret, dass die stark reduzierte *csgB* und *yaiC* Expression

in einer *rscC*-Mutante auf erhöhte RprA-Mengen und dessen Wirkung zurückzuführen ist. Beide Doppelmutantenstämme (*rscBC* und *rscC rprA*) weisen eine wildtypähnliche Expression von *csgB::lacZ* bzw. *yaiC::lacZ* auf. Würde die Repression der *csgB* und *yaiC* Expression in einer *rscC*-Mutante auf die Wirkung des in diesen Stämmen vorhandenen hyperaktiven Responseregulators RcsB zurückzuführen sein, dann sollte dieser Effekt auch in einer *rscC rprA* Doppelmutante auftreten. In dieser Doppelmutante ist der Responseregulator RcsB nach wie vor präsent und könnte also auch hier eine Reprimierung der *csgB* bzw. *yaiC* Expression bewirken. Dies ist jedoch, wie in Abb. 6B bis C sichtbar, nicht mehr der Fall. Deshalb ist dieser beobachtete Effekt also nicht auf RcsB direkt zurückzuführen, sondern stellt einen Einfluss von RprA dar. Dass auch die *rscBC* Doppelmutante ein wildtypähnliches Expressionsmuster für *csgB::lacZ* und *yaiC::lacZ* aufweist, ist mit der fehlenden Expressionsaktivierung von RprA durch den in dieser Mutante mutierten Response-regulator RcsB zu begründen.

Untersuchungen der *csgD::lacZ* Expression (Abb. 7):

Da es sich bei *csgB* und *yaiC* um zwei Zielgene des Regulators CsgD handelt, sollte ebenfalls untersucht werden, ob bereits eine Regulation auf CsgD-Ebene durch RprA zu verzeichnen ist. Das Expressionsprofil der dafür verwendeten *csgD::lacZ* Fusion (AP90) in den verschiedenen *rsc*-Mutanten hintergründen ist, wie in Abbildung 7 ersichtlich, identisch zum *csgB::lacZ* und *yaiC::lacZ* – Expressionsprofil. Bei der hier verwendeten *csgD::lacZ* Fusion handelt es sich um eine in der kodierenden Region verkürzte Variante, die die Temperaturabhängigkeit der *csgD*-Expression eindeutig zeigt, aber die σ^S - und MlrA – Abhängigkeit nicht mehr so stark ausgeprägt sind. Ein erster Hinweis dafür, dass RprA möglicherweise nicht über diese Regulatoren auf die *csgD*-Expression Einfluss nimmt.

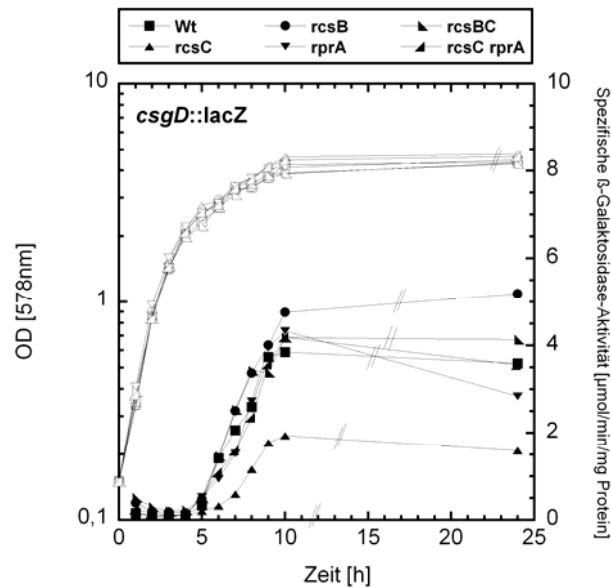


Abbildung 7: Expressionsprofil der *csgD::lacZ* Fusion und deren verschiedene *rcs*-Mutantenhintergründe

Die Stämme AP90 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ*) (Viereck), SB162 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ rcsC::cat*) (Dreieck Spitze nach oben), SB163 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ rcsB::kan*) (Kreis), SB164 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach unten), SB165 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ rcsBC::kan*) (Dreieck Spitze nach links), SB167 (W3110ΔlacU169 *csgD::lacZ rcsC::cat rprA::kan*) (Dreieck Spitze nach rechts) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

Auch hier wurde eine verminderte *csgD* Expression (2 fach) in einer *rcsC*-Mutante in der stationären Phase beobachtet. Die Doppelmutanten (*rcsBC*, *rcsC rprA*) hingegen wiesen eine Expression vergleichbar zum Wildtyp auf. Ebenso verhielten sich die Einzelmutanten *rcsB* und *rprA*. Damit zeichnet sich bereits ab, dass entweder CsgD selbst schon der Regulation durch RprA unterliegt oder andere Komponenten, die an der Regulation von CsgD beteiligt sind, einer Regulation durch RprA unterliegen. Aus diesem Grund wurden der Transkriptionsaktivator MlrA, die Diguanylatcyclase YdaM und die Phosphodiesterase YciR hinsichtlich eines Einflusses von RprA näher untersucht.

Untersuchungen der *mlrA::lacZ*, *yciR::lacZ* (Daten nicht gezeigt) und *ydaM::lacZ* (Abb. 6D) Fusionen:

Dabei konnte sowohl für die *mlrA::lacZ* Fusion als auch für die *yciR::lacZ* Fusion kein Einfluss der *rcs*-Komponenten auf dessen Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte die *ydaM::lacZ* Fusion in einer *rcsC*-Mutante eine leichte Repression der Expression (Abb. 6D). Diese Repression blieb hier, im Gegensatz zu den vorangegangenen Beobachtungen, die für *csgB*, *yaiC* und *csgD* erzielt wurden, in der *rcsC rprA* Doppelmutante erhalten. Die Einzelmutationen in *rcsB*, *rprA* und die Doppelmutation

in *rscBC* zeigten eine reproduzierbare minimale Expressionsaktivierung der *ydaM::lacZ* Fusion. Diese leichte Repression der *ydaM::lacZ* Expression in einer *rscC*-Mutante wird hier offenbar nicht durch höhere RprA-Mengen verursacht, sondern direkt durch den dort im hyperaktiven Zustand vorliegenden Responseregulator RcsB. Dieser ist in einer *rscC rprA* Doppelmutante nach wie vor aktiv und kann deshalb seine reprimierende Wirkung auf die *ydaM::lacZ* Expression ausüben. Durch das Ausschalten von RcsB (vgl. *rscB*-Einzelmutante und *rscBC*-Doppelmutante) kommt es deshalb zu einer leichten Aktivierung der *ydaM::lacZ* Expression. Unter diesen physiologischen Bedingungen scheint RcsB einen reprimierenden Einfluss auf YdaM auszuüben, während chromosomal exprimierte hohe RprA-Mengen keinen Einfluss haben (Abb. 6D). Dem gegenüber stehen spätere Beobachtungen, die mit überexprimiertem RprA vom Plasmid erzielt worden. Hier ist eine deutliche Repression der *ydaM::lacZ* Expression durch überexprimiertes RprA zu erkennen (siehe Abschnitt 2.2.1. und 2.2.2.). Möglicherweise können unter noch nicht bekannten physiologischen Bedingungen noch höhere RprA-Mengen in der Zelle vorliegen und erst dann eine Repression von YdaM verursachen. Oder aber der beobachtete reprimierende Effekt auf YdaM durch überexprimiertes RprA beruht auf einem indirekten Mechanismus, bei dem andere YdaM regulierende Faktoren durch RprA beeinflusst werden. YdaM wird somit möglicherweise sowohl von RcsB direkt als auch durch RprA reguliert, wobei Letzteres erst durch eine starke Überproduktion sichtbar wird.

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Ergebnissen geschlossen werden, dass hohe Mengen an RprA (vorhanden in einer *rscC*-Mutante) einen positiven Einfluss auf die Expression des Stationärphasen Sigmafaktors (*rpoS*) ausüben, aber einen gegensätzlichen, nämlich reprimierenden Effekt auf die Expression des Curlisyntheseogens *csgB*, des Diguanylatcyclasegens *yaiC* und dessen übergeordneten Transkriptionsregulator CsgD zeigen. Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass RprA an der Regulation der Curlisynthese beteiligt ist und neben dem bereits bekannten Zielgen *rpoS* auch andere Gene beeinflussen kann. Eine weitere Komponente des SigmaS/CsgD regulatorischen Netzwerkes, die Diguanylatcyclase YdaM, wird unter diesen getesteten Bedingungen wahrscheinlich hauptsächlich durch den Responseregulator RcsB direkt reprimiert. Eine Rolle von RprA bei der Regulation von YdaM zeichnet sich jedoch mit den in Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2. beschriebenen Ergebnissen ab und bedarf deshalb weiterführenden Untersuchungen.

2.1.2. RpoS-Proteinmengen und CsgD-Proteinmengen in *rsc*-Mutanten spiegeln die Genexpressionsdaten wider

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigen eine inverse Regulation der *rpoS* und *csgD* Expression in Anwesenheit erhöhter RprA-Mengen (in einer *rscC*-Mutante). Ob diese Aktivierung der *rpoS* Expression und die Reprimierung der *csgD* Expression durch RprA sich auch auf Proteinebene beobachten lassen, sollte im Folgenden näher untersucht werden. Dafür wurden die Zellen in LB bei 28°C angezogen und Westernblotproben in der späten stationären Phase gezogen. Mit polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen RpoS bzw. CsgD wurden die verschiedenen *rsc*-Mutanten im Immunoblot analysiert.

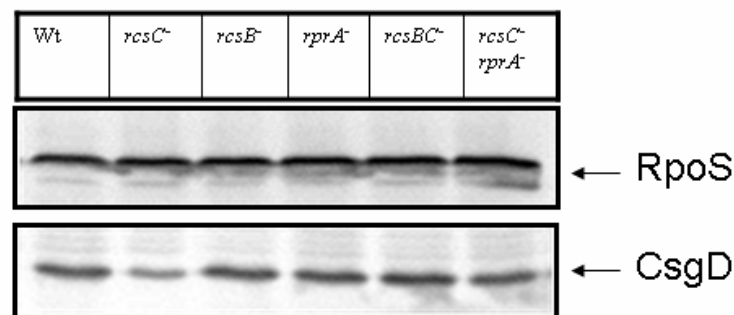


Abbildung 8: Einfluss des Rcs-Systems/RprA auf Proteinebene von RpoS und CsgD (eine Mutation in *rscC* reduziert die Menge an CsgD-Protein)

Die Stämme GB350 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ), SB134 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rscC*::cat), SB135 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rscB*::kan), SB136 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rprA*::kan), SB137 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rscBC*::kan), SB138 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rscC*::cat *rprA*::kan) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Nach Wachstum über Nacht (14h) wurden Proben für die Immunoblotanalysen entnommen. 10μg Protein wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. RpoS wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen RpoS und CsgD mit einem polyklonalen Antikörper gegen CsgD detektiert.

Wie in Abbildung 8A eindeutig ersichtlich ist, sind die RpoS-Proteinmengen in allen *rsc*-Mutantenhintergründen nahezu gleich. Leicht erhöhte RpoS-Proteinmengen weisen die Doppelmutanten (*rscBC*, *rscC rprA*) auf. Anders verhält es sich für die CsgD-Proteinmengen. Hier ist eine deutliche Reduktion der CsgD-Proteinmenge in einer *rscC*-Mutante zu verzeichnen. Wildtypähnliche CsgD-Proteinmengen weisen hingegen die *rscB* und *rprA*-Einzelmутanten, sowie die *rscBC*- und *rscC rprA*-Doppelmutanten auf (siehe Abb.8). Damit spiegeln die Ergebnisse auf Proteinebene exakt die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Expressionsdaten für die *rpoS* und *csgD*-Fusionsstämme in den jeweiligen *rsc*-Mutantenhintergründen wider. Die 2fach reduzierte Proteinmenge des Transkriptionsaktivators CsgD in einer *rscC*-Mutante (Abb.8) hat zur Folge, dass die Zielgene *csgB* und *yaiC* in ihrer Expression ebenfalls reduziert sind. Somit kristallisierte sich

csgD als mögliches direktes Zielgen der kleinen RNA RprA heraus, wohingegen die Effekte auf die *csgB*- und *yaiC*-Expression indirekt - durch CsgD vermittelt - sind.

2.1.3. Die RprA-RNA Mengen steigen beim Übergang in die stationäre Phase an und sind in den verschiedenen *rsc*-Mutanten unterschiedlich ausgeprägt

Bei der Untersuchung der Expression der Curlisynthesegene wurden wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, Wachstumsbedingungen von 28°C gewählt, da diese Gene bei dieser Temperatur verstärkt exprimiert werden. Erhöhte RprA-Mengen in einer *rscC*-Mutante wurden jedoch bislang nur bei logarithmisch wachsenden Zellen (OD₆₀₀ nm ca. 0,7), die bei 32°C bzw. 37°C angezogen wurden, beobachtet (Majdalani *et al.*, 2002). Um sicher zu stellen, dass dies auch bei den hier verwendeten Untersuchungsbedingungen von 28°C der Fall ist, wurden die verschiedenen *rsc*-Mutanten Northernblotanalysen mit einer Digoxigenin-markierten Sonde, gerichtet gegen RprA, unterzogen. Nach 12 Stunden Wachstum (OD₅₇₈ nm ca. 4) bei 28°C in LB-Medium weist der Wildtypstamm geringe RprA-Mengen auf (Abb. 9A). Diese RprA-Mengen sind in einer *rscC*-Mutante um mehr als das Doppelte erhöht. In allen anderen Mutanten ist kein RprA detektierbar (Abb. 9A). Damit ist gezeigt, dass auch bei einer Temperatur von 28°C in einer *rscC*-Mutante erhöhte RprA-Mengen in der Zelle vorhanden sind und bei fehlendem Responseregulator RcsB eine Aktivierung der *rprA* Expression ausbleibt, demzufolge auch kein RprA in Northernblots nachzuweisen ist. Die geringen Mengen an RprA im Wildtyp sind auf die hier vorherrschende Phosphataseaktivität der RcsC-Sensorkinase zurückzuführen. Nur einige wenige RcsB-Proteine scheinen hier phosphoryliert, demzufolge aktiv und können die *rprA*-Expression aktivieren.

Betrachtet man die RprA-Mengen entlang der Wachstumskurve in Abbildung 9B, so kann man auch bei 28°C einen deutlichen Anstieg beim Übergang in die stationäre Phase erkennen. Auch bei 37°C ist dieser deutliche Anstieg in der stationären Phase zu verzeichnen und bestätigt bereits frühere Untersuchungen, die ebenfalls einen Anstieg von RprA in der stationären Phase beschreiben (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001). Die kleine RNA RprA könnte demzufolge eine hauptsächliche Rolle in der späten stationären Phase spielen, oder unter Bedingungen, bei denen der Responseregulator RcsB in seiner phosphorylierten Form vorliegt und die Expression von *rprA* stark aktivieren kann (vgl. *rscC*-Mutante).

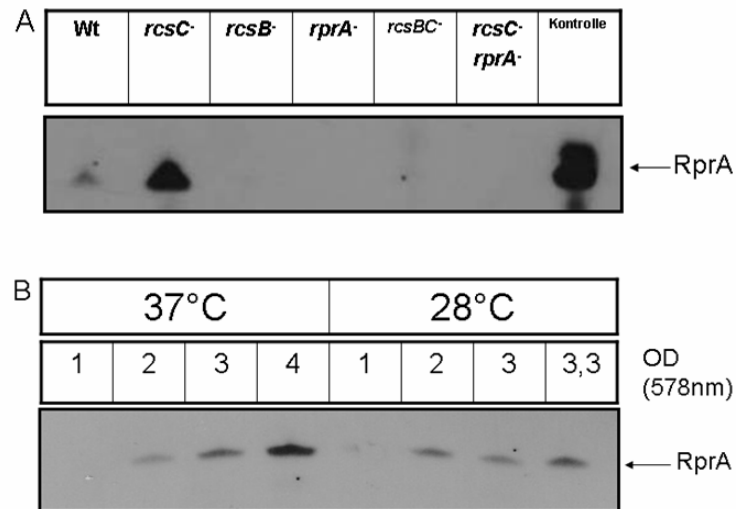


Abbildung 9: RprA-Mengen in den verschiedenen *rcs*-Mutanten (A) und entlang der Wachstumskurve (B)

(A) Die Stämme GB350 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ), SB134 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rcsC*::cat), SB135 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rcsB*::kan), SB136 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rprA*::kan), SB137 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rcsBC*::kan), SB138 (W3110ΔlacU169 *csgB*::lacZ *rcsC*::cat *rprA*::kan) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Nach 12 h Wachstum (OD₅₇₈ nm ca. 4) wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen und mit dem Promega Z3100 Kit die RNA isoliert. 3 µg RNA wurden auf ein 6 % Polyacrylamidgelen (PAA) aufgetragen und bei 10 mA laufen gelassen. Nach dem Blotten bei 15V für 1 h wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten RprA-Sonde bei 46°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm.

(B) Der Laborwildtypstamm W3110 wurde sowohl bei 37°C als auch bei 28°C in LB-Medium inkubiert. Bei einer definierten optischen Dichte (bei 578 nm) wurden Proben für die anschließende Northernblotanalyse entnommen. 2,5 µg RNA wurden auf ein 6 %iges PAA-Gel aufgetragen und wie unter A beschrieben weiter behandelt.

2.1.4. Das RcsB-Regulon überlappt mit dem RprA-Regulon

Nachdem *csgD* als ein weiteres mögliches Zielgen von RprA identifiziert wurde, stellte sich die Frage ob weitere Gene durch diese kleine RNA beeinflusst werden. Mit Hilfe von Mikroarrayanalysen sollte deshalb untersucht werden, welche Gene einer möglichen Regulation durch RprA unterliegen und welche Gene möglicherweise nur durch den Responsregulator RcsB beeinflusst werden. Um das RcsB-Regulon von dem RprA-Regulon unterscheiden zu können wurden zwei verschiedene Mikroarrayansätze miteinander verglichen. Im ersten Mikroarrayansatz wurde eine *rcsC*-Einzelmutante (RcsB⁺ und „hyperaktiv“, RprA⁺) mit einer *rcsBC*-Doppelmutante (RcsB⁻, RprA⁻) auf ein und demselben Mikroarray miteinander verglichen. Die mit diesem Array als differentiell reguliert identifizierten Gene unterliegen der Kontrolle durch den Responseregulator RcsB oder indirekt der kleinen RNA RprA und sind in Tabelle 7 Spalte 3 dargestellt.

In einem weiteren Mikroarrayansatz wurde eine *rcsC*-Einzelmutante (RcsB⁺,hyperaktiv und demzufolge hohe RprA-Mengen in der Zelle) mit einer *rcsC rprA*-Doppelmutante (RcsB⁺,hyperaktiv, aber kein RprA in der Zelle) auf ein und demselben Mikroarray mitein-

ander verglichen. Die hier als differentiell reguliert identifizierten Gene unterliegen folglich der Kontrolle durch die kleine RNA RprA und sind in Tabelle 7 Spalte 4 dargestellt. Stellt man nun die Ergebnisse beider Mikroarrayansätze gegenüber so können die Gene die ausschließlich durch den Responseregulator RcsB reguliert werden von denen, die einer Kontrolle durch die kleine RNA RprA unterliegen, unterschieden werden. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht werden alle differentiell regulierten Gene sowohl durch RcsB, als auch durch RprA kontrolliert. Das RcsB-Regulon überlappt unter den getesteten Bedingungen (28°C, späte stationäre Phase – 12 h) also vollständig mit dem RprA-Regulon. Mit Ausnahme des *araF*-Gens, welches tendenziell eine Regulation durch RprA aufweist aber die Auswahlkriterien von einer mindestens 2fachen Regulation nicht erfüllt bzw. leicht unterschreitet (Tab.7 grau unterlegt). RcsB reguliert somit sehr viele Gene hauptsächlich indirekt über RprA, wobei aber eine zusätzliche direkte Wirkung von RcsB auch nicht ausgeschlossen werden kann (positiver feed forward loop).

Mit diesen Mikroarrayuntersuchungen bestätigt sich die bereits beobachtete Repression der Curlisynthesegene (*csgBA*, *csgDEFG*) durch RprA (siehe Abschnitt 2.1.1.). Eine weitere große Anzahl von Genen, die durch RprA reguliert werden, ist in der Diplomarbeit von J. Berkholz ebenfalls als CsgD-abhängig beschrieben worden (Berkholz, 2009) und sind hier in Tabelle 7 mit einem Stern versehen. Da das Zielgen *csgD* durch RprA in seiner Expression vermindert ist, wirkt sich dies auch negativ auf die Expression CsgD-regulierter Gene aus.

Zu den durch RprA hauptsächlich positiv regulierten Genen zählen die *gad*- und *hde*-Gene. Beide Gengruppen spielen bei der Säureresistenz eine Rolle (Castanie-Cornet *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2007). Als mögliches direktes Zielgen von RprA könnte hier der Transkriptionsaktivator GadE in Frage kommen.

Betrachtet man das Ausmaß der Regulation (angegeben als Ratio) so lassen sich weitere Regulationsschlüsse ziehen. Bei der Regulation der Curlisynthesegene sind die Ratios beider Mikroarrayansätze sehr identisch (vgl. *csgD*-Ratios 0,064 mit 0,068). Dies lässt vermuten, dass hier tatsächlich RprA die regulatorische Komponente darstellt.

Die Expressionaktivierung der *hdeA* und *hdeB*-Gene zum Beispiel unterscheidet sich deutlich beim Vergleich der beiden Mikroarrayansätze (vgl. *hdeA*-Ratios 106,567 mit 2,582). Hier scheint RprA nicht die alleinige Regulationskomponente darzustellen. Möglicherweise agieren der Responseregulator RcsB und die kleine RNA RprA zusammen in einem positiven feed forward loop. Im Falle des ersten Mikroarrayansatzes (*rcsC*-Mutante im Vergleich zur *rcsBC*-Mutante), bei dem in einer *rcsC*-Mutante der Responseregulator RcsB in

hyperaktiver Form vorliegt und demzufolge auch die RprA-RNA stark exprimiert ist, mit einer *rcsBC*-Doppelmutante ($RcsB^-$ und $RprA^-$) verglichen wurde, erfolgt eine starke Aktivierung der *hde*-Gene (Bsp. *hdeA*-Ratio 106,567). Diese starke Regulation ist im zweiten Mikroarrayansatz (*rcsC*-Mutante im Vergleich zur *rcsC rprA*-Mutante) nicht mehr so deutlich ausgeprägt (*hdeA*-Ratio 2,582). Dies könnte darin begründet liegen, dass in diesen beiden Mutantenhintergründen der Responseregulator RcsB nach wie vor in seiner hyperaktiven Form vorliegt und somit Regulationsunterschiede bedingt durch RcsB selbst hier nicht sichtbar werden.

Tabelle 7: Zusammenstellung aller durch RcsB/RprA differentiell regulierter GeneBedingungen: LB, 28°C, nach 12 h Wachstum (OD₅₇₈ nm ca. 4)1. Mikroarrayansatz: SB193 (*rscC*⁻) vs. SB197 (*rscC*⁻ *rscB*⁻)2. Mikroarrayansatz: SB193 (*rscC*⁻) vs. SB198 (*rscC*⁻ *rprA*⁻)

Die angegebenen Ratios sind Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine zweifache differentielle Regulation aufweisen.

Name	b-Nummer	Ratio <i>rscC</i> ⁻ vs. <i>rscB</i> ⁻	Ratio <i>rscC</i> ⁻ vs. <i>rscC</i> ⁻ <i>rprA</i> ⁻	Beschreibung
dsbC	b2893	21,563	2,415	subunit of disulfide isomerase/disulfide oxidoreductase
gadB	b1493	21,707	12,828	glutamate decarboxylase isozyme
gadC	b1492	16,275	6,682	GABA APC transporter
gadE	b3512	11,064	7,362	transcriptional activator
glfF	b3214	8,265	3,247	regulator of gltBDF operon, induction of Ntr enzymes
glyS	b3559	6,015	3,100	glycine tRNA synthetase, beta subunit
hdeA	b3510	106,567	2,582	acid-resistance protein, possible chaperon
hdeB	b3509	69,372	2,878	acid stress chaperone
hdeD	b3511	2,717	2,122	acid-resistance membrane protein
rpsS	b3316	4,655	2,405	30S ribosomal subunit protein S19
tdcC	b3116	54,209	2,843	threonine STP transporter
ygjD	b3064	9,070	2,607	predicted peptidase
argD	b3359	0,358	0,321	subunit of N-succinyl-diaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase
araF	b1901	0,368	0,589	subunit of arabinose ABC transporter
artQ	b0862	0,112	0,120	arginine 3rd transport system permease protein
csgA	b1042	0,115	0,106	curlin major subunit CsgA
csgB	b1041	0,060	0,066	minor curlin subunit precursor, similar to CsgA
csgD	b1040	0,064	0,068	putative 2-component transcriptional regulator for 2nd curli operon
csgE	b1039	0,174	0,177	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
csgF	b1038	0,183	0,190	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
csgG	b1037	0,236	0,423	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon
dgoA	b3692	0,199	0,280	2-oxo-3-deoxygalactonate 6-phosphate aldolase and galactonate dehydratase
fiil	b1941	0,340	0,355	flagellum-specific ATP synthase
ftsW	b0089	0,135	0,129	cell division; membrane protein involved in shape determination
fxsA	b4140	0,321	0,262	inner membrane protein, overproduction inhibits F exclusion of bacteriophage T7
gidA	b3741	0,385	0,308	protein involved in a tRNA modification pathway
lrp	b0889	0,271	0,230	transcriptional dual regulator
mdlB	b0449	0,299	0,268	predicted multidrug transporter subunit of ABC superfamily: ATP binding component
mmnA	b1133	0,225	0,210	(5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase
nagE	b0679	0,241	0,203	PTS system, N-acetylglucosamine-specific enzyme IIABC
rluC	b1086	0,162	0,132	23S rRNA pseudouridine synthase
rtcB	b3421	0,362	0,304	conserved protein
solA	b1059	0,457	0,429	N-methyltryptophan oxidase
sthA	b3962	0,134	0,105	subunit of pyridine nucleotide transhydrogenase
tolR	b0738	0,084	0,068	putative inner membrane protein, involved in the tonB-independent uptake of group A colicins
wcal	b2050	0,104	0,107	putative colanic biosynthesis glycosyl transferase
ybjK	b0846	0,120	0,109	putative DEOR-type transcriptional regulator
ycfQ	b1111	0,208	0,199	predicted DNA-binding transcriptional regulator
ycfT	b1115	0,156	0,138	orf, hypothetical protein
yihV	b3883	0,303	0,325	predicted sugar kinase
ymfE	b1138	0,070	0,066	orf, hypothetical protein
yohL	b2105	0,380	0,318	RcnR transcriptional repressor
yphD	b2546	0,286	0,295	subunit of YphD/YphE/YphF ABC transporter

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Daten geschlossen werden, dass unter den getesteten Bedingungen (LB, 28°C, im *rca*⁻ - Hintergrund, späte stationäre Phase) das RcsB-Regulon vollständig (bis auf das *araF*-Gen) mit dem RprA-Regulon überlappt, was darauf hindeutet, dass die Regulation der Genexpression durch RcsB hauptsächlich über RprA vermittelt wird. Wobei entweder beide Komponenten (RcsB und RprA) im Zusammenspiel (positiv feed forward loop) möglicherweise eine Regulation vornehmen (Bsp. *hde*-Gene) oder nur die kleine RNA RprA als regulatorische Komponente wirkt (Bsp. *csg*-Gene). Weiterhin liefern diese Ergebnisse erste Hinweise auf mögliche andere Zielgene der kleinen RNA. Als ein Kandidat wird in Abschnitt 2.4. der Transkriptionsaktivator GadE näher untersucht.

2.1.5. RprA hat einen Einfluss auf die Menge an *csgD*mRNA, nicht jedoch auf deren Stabilität

Mit den vorangegangenen Untersuchungen zur Rolle von RprA bei der Curliexpression kristallisierte sich *csgD* als direktes Zielgen für RprA heraus. Welchem Regulationsmechanismus CsgD jedoch dabei unterliegt wurde im Folgenden deshalb näher untersucht. Die kleine RNA RprA zählt zu den in trans-kodierten RNAs. Diese RNAs sind im Gegensatz zu den in cis-kodierten RNAs an anderer Stelle im Genom lokalisiert und weisen keine vollständige Komplementarität zu ihren Zielgenen auf. Ihre Bindung an z.B. die 5' untranslatierte Region der Ziel-mRNA verhindert in den meisten Fällen die Bindung der Ribosomen und demzufolge auch die Translation. Dem kann im Anschluss (muss aber nicht notwendigerweise) ein Abbau durch das RNaseE-Enzym folgen (zusammengefasst in Waters und Storz, 2009; Repoila und Darfeuille, 2009). RprA könnte also direkt einen Einfluss auf die Translation von *csgD* und/oder die *csgD*mRNA-Stabilität ausüben. Um dies zu überprüfen wurden a) Northernblotanalysen mit den verschiedenen *rca*-Mutanten durchgeführt und b) Stabilitätsanalysen des Wildtypstammes mit einer *rprA*-Mutante verglichen. Für diese nichtradioaktiven Abbauxperimente wurde Rifampicin als Antibiotikum verwendet.

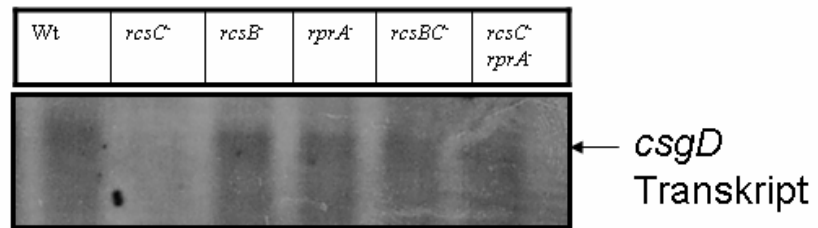


Abbildung 10: *csgD*-Transkriptmengen der verschiedenen *rsc*-Mutanten

Die Stämme GB350 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ*), SB134 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rscC::cat*), SB135 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rscB::kan*), SB136 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rprA::kan*), SB137 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rscBC::kan*), SB138 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rscC::cat rprA::kan*) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Nach 12 h Wachstum (OD_{578} nm ca. 4) wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen und mit der heißen Phenol-Chloroform-Methode die RNA isoliert. 10 μ g RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotting für 1 h wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten *csgD*-Sonde bei 54°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm.

Bei der Analyse der verschiedenen *rsc*-Mutanten hinsichtlich ihrer *csgD*-Transkriptmenge in der späten stationären Phase, nach Wachstum bei 28°C ist eine deutliche Reduktion (2-fach) in einer *rscC*-Mutante, also im Fall erhöhter RprA-Mengen zu beobachten. Alle anderen Einzelmutanten (*rscB*, *rprA*) und Doppelmutanten (*rscBC*, *rscC rprA*) weisen hingegen wildtypähnliche *csgD*-Transkriptmengen auf. Erhöhte RprA-Mengen in der Zelle (*rscC*-Mutante) führen also zur Verringerung der *csgD*-Transkriptmengen (Abb.10). Die nachfolgenden Stabilitätsanalysen sollen Aufschluss darüber geben, ob durch die Wirkung von RprA möglicherweise der Abbau der *csgD*mRNA gefördert wird und deshalb eine Verringerung der Transkriptmengen zu verzeichnen ist. Beim Vergleich des Wildstammes mit einer *rprA*-Mutante würde man dementsprechend eine Stabilisierung der *csgD*-Transkriptmenge in der *rprA*-Mutante erwarten. Hingegen würde bei erhöhten RprA-Mengen (*rscC*-Mutante) in der Zelle möglicherweise ein noch schnellerer Abbau der *csgD*mRNA als im Wildtyp zu verzeichnen sein.

Wie jedoch aus Abbildung 11 und 12 und den dazugehörigen Quantifizierungen eindeutig ersichtlich, ist weder ein Unterschied in der Abbaurrate beim Vergleich des Wildtypstammes mit einer *rprA*-Mutante zu verzeichnen, noch kristallisiert sich ein Unterschied heraus, wenn erhöhte RprA-Mengen in der Zelle vorhanden sind (*rscC*-Mutante).

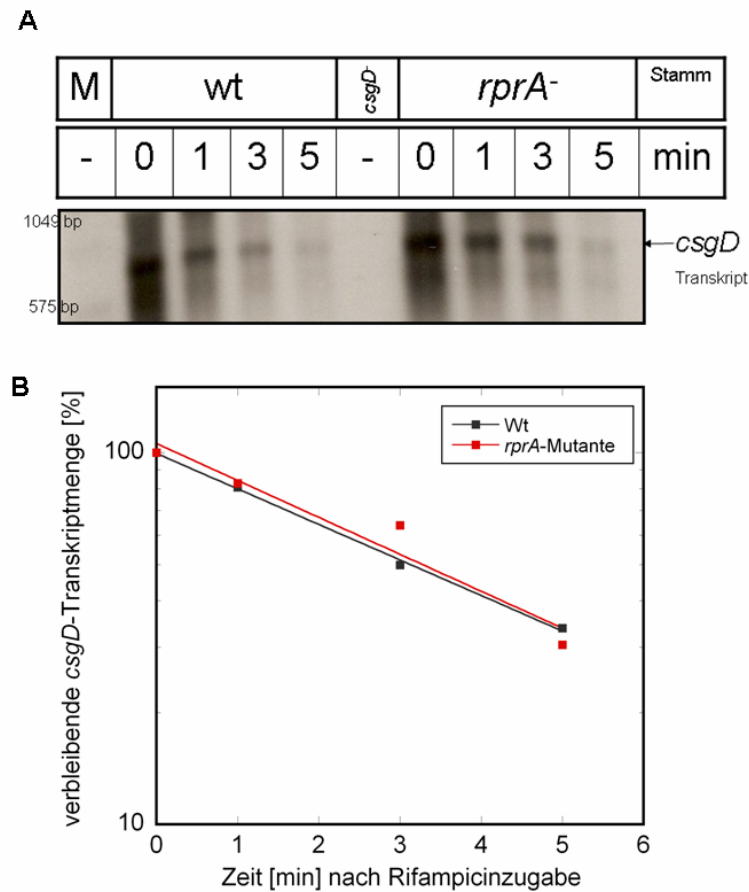


Abbildung 11: *csgD*-Stabilitätsuntersuchungen des Wildtyps im Vergleich zur *rprA*-Mutante

Die Stämme GB350 (Wildtyp) und SB136 (*rprA*-Mutante) wurden in LB-Medium bei 28°C inkubiert. Nach 12 h Wachstum (OD_{578} nm ~4) wurden Proben vor Rifampicinzugabe (0,5 mg/ml), sowie 1, 3, und 5 min nach Rifampicinzugabe für die RNA-Präparation entnommen und mit der heißen Phenol-Chloroform-Methode die RNA isoliert. 20 µg RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotten für 1 h wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten *csgD*-Sonde bei 54°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszens Reaktion auf einem Röntgenfilm. Die Original-Northernblotdaten sind in (A) und die Quantifizierungen dieser Daten sind (B) dargestellt.

Obwohl die *csgD*-Transkriptmengen in der *rprA*-Mutante leicht erhöht sind, lässt sich keine Stabilisierung dieser Transkriptmengen feststellen. RprA hat offenbar keinen Einfluss auf dessen Stabilität. Die Halbwertszeit der *csgD*mRNA beträgt für den Wildtypstamm und die *rprA*-Mutante ca. 3 Minuten.

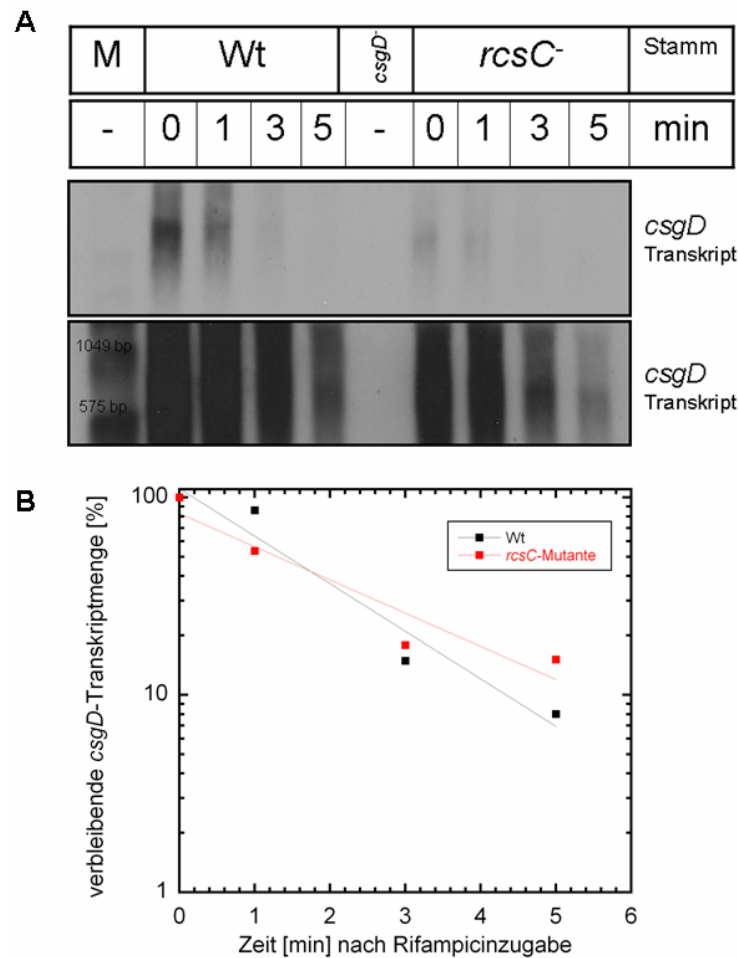


Abbildung 12: *csgD*-Stabilitätsuntersuchungen des Wildtyps im Vergleich zur *rcsC*-Mutante

Die Stämme W3110 (Wildtyp) und SB193 (*rcsC*-Mutante) wurden in LB-Medium bei 28°C inkubiert. Nach 12 h Wachstum (OD_{578} nm ~4) wurden Proben vor Rifampicinzugabe (0,5 mg/ml), sowie 1, 3, und 5 min nach Rifampicinzugabe für die RNA-Präparation entnommen und mit der heißen Phenol-Chloroform-Methode die RNA isoliert. 15 µg RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotting für 1 h wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten *csgD*-Sonde bei 54°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm. Die Original-Northernblotdaten sind in (A) und die Quantifizierungen dieser Daten sind (B) dargestellt.

Auch in Abbildung 12 sind Unterschiede in der *csgD*-Transkriptmenge beim Vergleich des Wildtypstammes mit einem Stamm, der erhöhte RprA-Mengen (*rcsC*-Mutante) aufweist, deutlich sichtbar. Erhöhte RprA-Mengen reduzieren die *csgD*-Transkriptmengen zwar um das 2,5-fache, aber es kommt auch hier nicht zu einem beschleunigten *csgD*mRNA-Abbau. Die Halbwertszeit der *csgD*mRNA beträgt für beide Stämme 1 bis 2 Minuten.

RprA hat unter diesen getesteten Bedingungen also keinen Einfluss auf die Stabilität der *csgD*mRNA, aber reduziert die Transkriptmenge sehr deutlich. Somit scheint RprA auf Transkriptionsebene von *csgD* zu wirken und könnte indirekt über einen möglichen anderen Regulator die Transkriptionsinitiation beeinflussen oder aber direkt die Transkriptionselongation verhindern.

2.2. Die durch RprA vermittelte Regulation innerhalb der SigmaS/CsgD-Kaskade

Unter Verwendung eines Hochkopienvektors (pZE-luc-Derivat), auf dem RprA unter der Kontrolle eines anderen Promotors (pLacO) kloniert vorlag, sollte der Einfluss von konstitutiv überexprimiertem RprA auf die Expression ausgewählter Gene der SigmaS/CsgD-Kaskade untersucht werden.

2.2.1. Die konstitutive, ektopische Expression von RprA reduziert die Expression von *csgB*, *yaiC* und *ydaM*

Wie bereits im Abschnitt 2.1. beschrieben, übt RprA einen reprimierenden Einfluss auf die Expression von *csgD* und damit auch indirekt auf dessen Zielgene *csgB* und *yaiC* aus. Wie sich deren Expression bei einer konstitutiven Überexpression von RprA vom Plasmid (pJV100IA-T4) verhält, wurde im Folgenden untersucht.

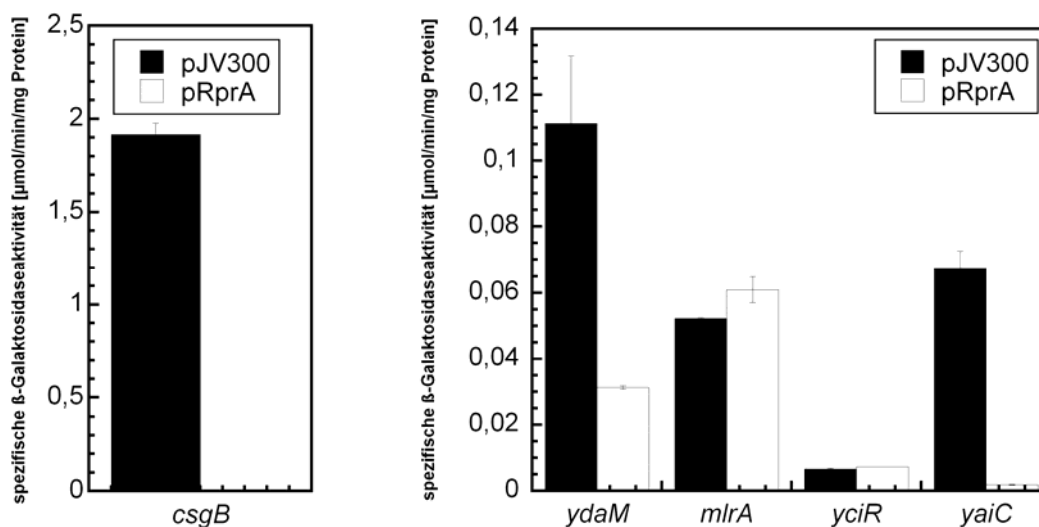


Abbildung 13: Einfluss von überexprimiertem RprA auf *csgB::lacZ*, *ydaM::lacZ*, *mlrA::lacZ*, *yciR::lacZ*, *yaiC::lacZ*

Die Stämme GB350 (W3110ΔlacU169 *csgB::lacZ*), NS123 (W3110ΔlacU169 *ydaM::lacZ*), NS125 (W3110ΔlacU169 *mlrA::lacZ*), NS149 (W3110ΔlacU169 *yciR::lacZ*), NS153 (W3110ΔlacU169 *yaiC::lacZ*) wurden in Anwesenheit des Plasmides pRprA (weiße Balken) oder pJV300 (schwarze Balken) in LB-Medium bei 28°C wachsen gelassen. Nach Wachstum über Nacht (14 h) wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte (578 nm) und der spezifischen β-Galaktosidaseaktivität entnommen. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

pRprA = pJV100IA-T4, Hochkopienvektor der RprA ektopisch vom PLacO-Promoter aus exprimiert
 pJV300= Kontrollplasmid exprimiert eine nonsense RNA ektopisch vom PLacO-Promoter aus

Eine eindeutige starke Reduktion (fast vollständige Aufhebung) der Expression in Anwesenheit von überexprimiertem RprA ist wie erwartet für *csgB* und *yaiC* zu erkennen. Diese Befunde sind konsistent zu den in Abschnitt 2.1. erzielten Ergebnissen mit chromosomal

erhöhten RprA-Mengen (in einer *rscC*-Mutante), die ebenfalls eine Reduktion von *csgB* und *yaiC* aufwiesen. Anders verhält es sich im Fall von YdaM: Bei konstitutiver Überexpression von RprA ist auch die *ydaM* Expression stark reprimiert. RprA in sehr hohen Mengen hat offenbar auch einen regulatorischen Einfluss auf die *ydaM* Expression. Chromosomal erhöhte RprA-Mengen jedoch beeinflussen die *ydaM*-Expression nicht sondern hier erfolgt die leichte Repression höchstwahrscheinlich über den Responseregulator RcsB (siehe Abschnitt 2.1.).

2.2.2. Die ektopische Expression von CsgD::Gfp und YdaM::Gfp ist in Anwesenheit von konstitutiv exprimiertem RprA ebenfalls reduziert

Ein sehr anschauliches, wenn auch recht künstliches System zur Untersuchung der Translationsregulation von Zielgenen durch kleine RNAs *in vivo*, ist das von J. Urban entwickelte und in der Arbeitsgruppe von J.Vogel etablierte Gfp-Fusionssystem (Urban *et al.*, 2007). Dabei wird die ausgewählte kleine RNA (wie bereits unter 2.2.1. verwendet) mit ihrem Transkriptionsstart unter die Kontrolle eines ektopischen Promotors (pLacO) auf einen Hochkopienvektor kloniert (pJV100IA-T4 = pRprA). Das zu untersuchende Zielgen wird auf einen Niedrigkopienvektor an das grün fluoreszierende Protein (Gfp) kloniert und steht ebenfalls unter der Kontrolle eines ektopischen Promotors (pLtet). Mittels TSS-Transformation oder Elektroporation werden beide Plasmide in Wildtypzellen eingebracht. Nach 8 Stunden Wachstum bei 37°C in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Chloramphenicol und Ampicillin) wurden Westernblotproben gezogen und mit einem Antikörper gerichtet gegen Gfp untersucht. In Abbildung 14 ist der Einfluss von ektopisch überexprimiertem RprA auf die ebenfalls ektopisch exprimierten CsgD, YdaM und MlrA::Gfp-Fusionsproteine gezeigt. Dafür erfolgte die Klonierung der drei untersuchten Gene auf den Gfp-Fusionsvektor mit dem Transkriptionsstart als Anfang. Im Fall von *csgD* wurde der Bereich von -148 Nukleotide (Nt) bis +90 Nt (ausgehend vom Translationsstart) kloniert und enthält, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben, beide potentiellen RprA-Bindestellen. Für *ydaM* wurde der Bereich von -75 Nt bis +60 Nt und für *mlrA* von -25 Nt bis + 90 Nt kloniert.

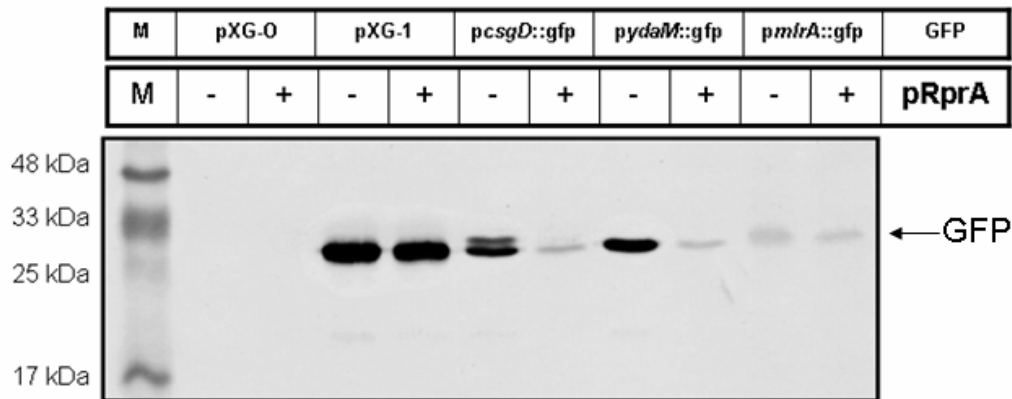


Abbildung 14: Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu CsgD, YdaM und MlrA (Westernblot)

Für die Transformation mit den jeweiligen Plasmiden wurde der Stamm MC4100 benutzt. Die Gfp-Fusionen zu CsgD (pSB25), YdaM (pSB30) und MlrA (pSB24) wurden von einem Niedrigkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters pLtet konstitutiv exprimiert. Die kleine RNA-RprA wurde gleichzeitig von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters PLacO konstitutiv exprimiert (pRprA, bzw. Kontrollplasmid mit nonsense RNA =pJV300). Nach 8 h Wachstum ($OD_{578nm} \sim 4$) in LB-amp¹⁰⁰-cm²⁰-Medium bei 37°C wurden Proben für die Westernblotanalyse entnommen und anschließend auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen (aufgetragene Proteinmengen: pXG-0 5 µg; pXG-1 0,5 µg; pcsgD::gfp 5 µg; pydaM::gfp 5 µg; pmlrA::gfp 10 µg). Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem Antikörper gerichtet gegen Gfp.

pXG-0 = Negativkontrolle (exprimiert Luciferase)

pXG-1 = Positivkontrolle (exprimiert Gfp vollständig)

pcsgD::gfp (pSB25) Klonierung von -148 Nt bis +90 Nt

pydaM::gfp (pSB30) Klonierung von -75 Nt bis +60 Nt

pmlrA::gfp (pSB24) Klonierung von -25 Nt bis +90 Nt

Eine eindeutige Reduktion der Proteinmengen in Anwesenheit von überexprimiertem RprA ist auch hier für das CsgD::Gfp (5-fache Reduktion) und YdaM::Gfp (9-fache Reduktion) Fusionsprotein zu verzeichnen. Da hier die Expression dieser Gene von einem ektopischen Promoter aus erfolgt, kann der beobachtete reprimierende Effekt von überexprimiertem RprA nicht mit einem indirekten Einfluss auf die Transkriptionsinitiation begründet werden. Entweder werden hier also die Transkriptionselongation und/oder doch die Translation von *csgD* und *ydaM* durch RprA beeinflusst. MlrA bleibt auch in Anwesenheit von überexprimiertem RprA unbeeinflusst und bestätigt die vorangegangenen mittels translationalen lacZ-Fusionen erzielten Ergebnisse. Dennoch sind für MlrA geringere Absolutproteinmengen im Vergleich zu CsgD und YdaM in Abwesenheit von RprA zu beobachten. Diese beruhen möglicherweise auf Abbauereignissen oder auf einer ineffizienten Translationsinitiation per se, die im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurden.

2.3. Die Rolle der *csgD* 5' UTR bei der RprA-vermittelten Regulation

Das Kürzel UTR steht für nicht übersetzte Region (engl. untranslated region) und umfasst den Bereich vom Transkriptionsstart bis zum Translationsstart eines Gens. Diese 5' UTR

kann 100 oder mehr als 100 Nukleotide lang sein und beinhaltet die Ribosomenbindestelle. Außerdem befinden sich in diesem Bereich regulatorische Sequenzen, an die a) z.B. Proteine binden könnten, die die Stabilität der mRNA oder deren Translation beeinflussen oder an denen b) eine Regulation durch Bindung kleiner regulatorischer RNA's erfolgen kann.

2.3.1. Innerhalb der *csgD* 5'UTR befinden sich zwei potentielle Bindestellen für RprA

Da es sich bei *csgD* um ein neues Zielgen für RprA handelt sollten im weiteren Verlauf die potentiellen Bindestellen identifiziert werden und dann durch geeignete Mutationen sowohl innerhalb der kleinen RNA als auch im Zielgen die direkte Bindung von RprA an die *csgD*mRNA nachgewiesen werden. Nach dem bisherigen Kenntnisstand befinden sich die Bindestellen kleiner RNA's hauptsächlich im 5'untranslatierten Bereich in der Nähe der Shine-Dalgarno Sequenz, aber auch Bindestellen weiter stromaufwärts sind bereits beschrieben worden (Sharma *et al.*, 2007; Vecerek *et al.*, 2007). Unter Zuhilfenahme des computergestützten Anwenderprogramms TargetRNA sollten mögliche Bindestellen von RprA innerhalb der *csgD*mRNA identifiziert werden. In Abbildung 15 sind die von diesem Programm vorhergesagten potentiellen Bindestellen innerhalb der 5'UTR von *csgD*mRNA dargestellt. Eine dieser Bindestellen umfasst den Bereich von -14 Nt bis +7 Nt (ausgehend vom Translationsstart) und überlappt mit dem Bereich der Shine-Dalgarno Sequenz. Die andere Bindestelle liegt sehr weit stromaufwärts und umfasst den Bereich von -96 Nt bis -84 Nt (ausgehend vom Translationsstart). Betrachtet man den bindenden Bereich innerhalb von RprA, so werden die beiden potentiellen Bindestellen offenbar durch einen jeweils anderen Bereich innerhalb von RprA gebunden. Dies könnte bedeuten, dass entweder zwei Moleküle gleichzeitig in der Lage sind an die 5'UTR der *csgD*mRNA zu binden oder aber auch nur ein RprA-Molekül beide Bindestellen abdeckt.

TargetRNA vorhergesagte Bindestellen in *csgD* und RprA

1. potentielle Bindestelle

sRNA (RprA)	60	-- AUUGCUGUGUGUAGU	74
		:	
mRNA (<i>csgD</i>)	-82	CG UGACGACACACA UCA	-98

2. potentielle Bindestelle

sRNA (RprA)	18	UAUUGAUUU-A- UAGCAUGG -- AAAUCCC -CU	45
		: : :	
mRNA (<i>csgD</i>)	19	AUACCUGAAGUA AUUUGUACUACUUUGGGG CGA	-14

+1 Transkriptionsstart (ca)

atcagatgtaatccattagttttatattttaccattagggctgatta

erste RprA-Bindestelle

ttactacacacagcagtgcaacatctgtcagtacttctggtgcttctatt

zweite RprA Bindestelle

ttagaggcagctgtcaggtgtgcatcaataaaaaaagcggggtttcac

Translationsstart (atg)

atgttaatgaagtcacatagattcatggtcatacattattgttgatcac

Abbildung 15: Die mit dem Programm „TargetRNA“ vorhergesagten Bindestellen für RprA in *csgD* und deren Lokalisation zwischen dem Transkriptionsstart und Translationsstart

Die erste potentielle Bindestelle ist stromaufwärts an Position -96 Nt bis -84 Nt (ausgehend vom Translationsstart) innerhalb der 5' UTR von *csgD* lokalisiert. Der bindende Bereich in RprA erstreckt sich von Position 60 Nt bis 73 Nt ausgehend vom Transkriptionsstart.

Die zweite potentielle Bindestelle befindet sich im Translationsinitiationsbereich und überlappt mit der Shine-Dalgarno Sequenz (Ribosomenbindestelle) (-14 Nt bis +7 Nt ausgehend vom Translationsstart). Der bindende Bereich in RprA erstreckt sich hier von 28 Nt bis 43 Nt ausgehend vom Transkriptionsstart.

Welche Bindestelle tatsächlich von Bedeutung ist und welche Art der Regulation an diesen Bindestellen durch RprA vermittelt wird soll anschließend näher untersucht werden.

2.3.2. Eine translationale Kontrolle durch RprA erfolgt über die Bindestelle im Translationsinitiationsbereich von *csgD*

Zur Untersuchung der Rolle der stromaufwärts liegenden Bindestelle innerhalb der *csgD*mRNA wurde in einem ersten Schritt eine verkürzte Form der 5'UTR von *csgD* (-36 Nt bis +90 Nt) auf den Gfp-Fusionsvektor kloniert und mittels Westernblot analysiert. Diese verkürzte Version enthält jetzt nur noch die zweite potentielle RprA-Bindestelle, welche mit dem Translationsinitiationsbereich überlappt. Handelt es sich bei der stromaufwärts liegenden potentiellen RprA-Bindestelle um eine tatsächliche Bindestelle von RprA, dann wäre in deren Abwesenheit keine oder eine stark verminderte Regulation durch überexprimiertes RprA zu erwarten. In Abbildung 16 ist neben den Kontrollen der Einfluss von überexprimiertem RprA auf die Proteinmengen des langen *csgD*::gfp-Konstruktes (-148 Nt bis +90 Nt) im Vergleich zum kurzen *csgD*::gfp/ Δ site1-Konstrukt (-36 Nt bis +90 Nt) gezeigt.

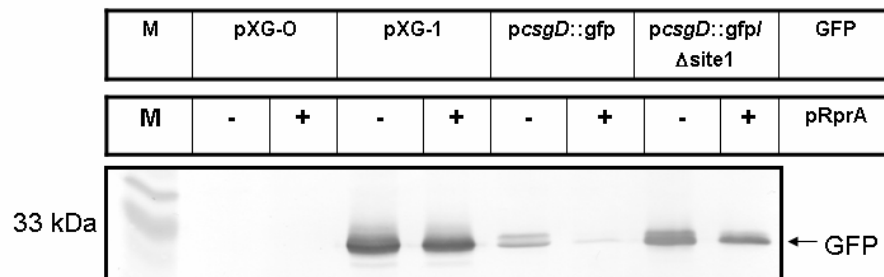


Abbildung 16: Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu CsgD und einer verkürzten CsgD-Version (Westernblot)

Für die Transformation mit den Plasmiden wurde der Stamm MC4100 benutzt. Die Gfp-Fusionen zu CsgD (pSB25) und der verkürzten CsgD-Version (pSB29) wurden von einem Niedrigkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters pLtet konstitutiv exprimiert. Die kleine RNA-RprA wurde gleichzeitig von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters PLacO konstitutiv exprimiert (pRprA bzw. Kontrollplasmid mit nonsense RNA = pJV300). Nach 8 h Wachstum ($OD_{578nm} \sim 4$) in LB-amp¹⁰⁰-cm²⁰-Medium bei 37°C wurden Proben für die Westernblotanalyse entnommen und anschließend auf einem 12 % igen Polyacrylamidgel aufgetragen (aufgetragene Proteinmengen: pXG-0 10 μ g; pXG-1 5 μ g; pcsgD::gfp 10 μ g; pcsgD::gfp/ Δ site1 10 μ g). Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem Antikörper gerichtet gegen Gfp.

pXG-0 = Negativkontrolle (exprimiert Luciferase)

pXG-1 = Positivkontrolle (exprimiert Gfp vollständig)

pcsgD::gfp (pSB25) Klonierung von -148 Nt bis +90 Nt

pcsgD::gfp/ Δ site1 (pSB29) Klonierung von -36 Nt bis +90 Nt

Hier ist ebenfalls eine deutlich verminderte Proteinmenge (5-fach) des langen CsgD::Gfp Fusionsproteins in Anwesenheit von überexprimiertem RprA ersichtlich. Anders verhält es sich für die verkürzte *csgD*::gfp Version. Die mit dem langen *csgD*::gfp-Konstrukt beobachtete starke Regulation durch RprA ist in Abwesenheit der stromaufwärts liegenden Bindestelle nicht mehr so deutlich ausgeprägt, aber dennoch teilweise vorhanden. In An-

wesenheit von überexprimiertem RprA kann nur noch eine einfach verminderte Proteinmenge des verkürzten CsgD::Gfp Fusionsproteins detektiert werden. Damit scheint die stromaufwärts liegende potentielle Bindestelle bzw. der Bereich der 5`UTR stromaufwärts vom -36 -sten Nukleotid für eine Regulation durch RprA von großer Bedeutung zu sein. Dieser Effekt ist unabhängig vom *csgD*-Originalpromoter zu beobachten. Auffällig sind zudem die generell erhöhten Proteinmengen (2-fach) des kurzen CsgD::Gfp Fusionsproteins (*csgD::gfp/Δsite1*-Konstrukt -36 Nt bis +90 Nt), die möglicherweise bereits auf veränderte Transkriptmengen zurückzuführen sind. Weitere Untersuchungen dazu sind unter Abschnitt 2.3.3. dargestellt.

Im Folgenden wurde die Rolle der zweiten, mit der Ribosomenbindestelle überlappenden, Bindestelle näher untersucht. Durch gezielten Basenaustausch innerhalb dieser Bindestelle in *csgD* sollte eine mögliche Rolle dieser Bindestelle bei der translationalen Kontrolle durch RprA untersucht werden. Dafür wurden zusätzliche Mutationen in zwei verschiedenen Regionen der potentiellen zweiten Bindestelle eingefügt, um somit die Bindung von RprA zu stören und die zwar geringe einfache, aber reproduzierbare Regulation gänzlich aufzuheben. Die spezifischen Mutationen wurden so gewählt, dass die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno Sequenz) erhalten bleibt und eine optimale Translation gewährleistet ist. Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, dass beim Austausch von zwei Cytosinen (C) an Position -1 Nt und -4 Nt (ausgehend vom Translationsstart) zu Guanin (G) keine Regulation des kurzen CsgD::Gfp Fusionsproteins mehr durch überexprimiertes RprA erfolgen kann (Abb. 7 vgl. 6. und 7. Spalte im WB). Die Proteinmengen in Anwesenheit überexprimierten RprAs sind zu denen identisch, die eine nonsense RNA überexprimieren (Kontrollplasmid). Offenbar ist RprA jetzt nicht mehr in der Lage an diesen Bereich der *csgD*mRNA zu binden, die Ribosomenbindestelle wird also nicht mehr blockiert und eine effiziente Translation kann erfolgen. Ebenso verhält es sich, wenn an Position -5 Nt bis -7 Nt (ausgehend vom Translationsstart) in *csgD* drei Thyminen (T) zu Adeninen (A) ausgetauscht werden. Auch hier ist die Regulation durch RprA nicht mehr möglich (Abb. 17 vgl. Spalte 8 und 9).

Damit zeichnet sich eine direkte Bindung von RprA an diese zweite potentielle Bindestelle der *csgD*mRNA ab, bei der offenbar die Ribosomenbindestelle verdeckt bzw. unzugänglich für die Ribosomen gemacht wird. Diese Bindung von RprA, die überlappend mit dem Translationsinitiationsbereich der *csgD*mRNA ist, verursacht somit eine ineffiziente Translation. Somit spielt die zweite Bindestelle eine Rolle bei Translationsregulation von *csgD* durch RprA. Betrachtet man auch hier die absoluten Proteinmengen, so erscheinen diese

im Vergleich zum kurzen CsgD::Gfp Fusionsprotein, ohne zusätzliche Punktmutationen und in Abwesenheit von RprA ebenfalls erhöht (ca. 1,2-fach) (Abb. 17 – vgl. Spalte 4 mit 6 bzw. 8).

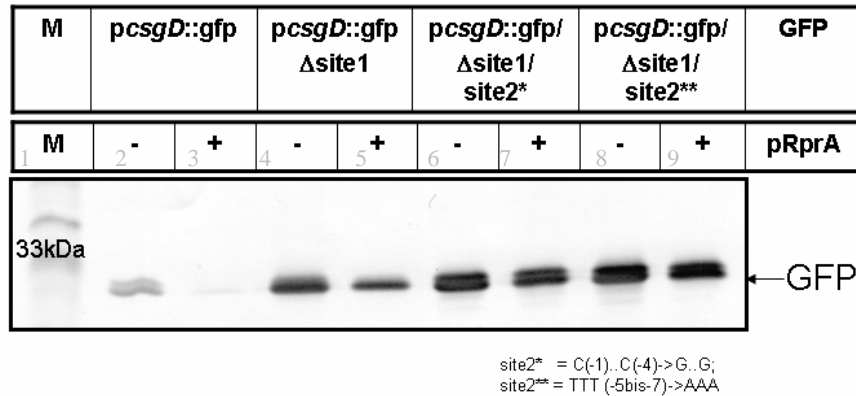


Abbildung 17: Die translationale Kontrolle von *csgD* durch RprA erfordert die zweite Bindestelle und kann durch spezifische Basenaustausche innerhalb von *csgD* unterbunden werden. (Westernblot)

Für die Transformation mit den jeweiligen Plasmiden wurde der Stamm MC4100 benutzt. Die Gfp-Fusionen zur verkürzten CsgD-Version (pSB29) und den zusätzlichen Basenaustauschen im Translationsinitiationsbereich (pSB42, pSB43) wurden von einem Niedrigkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters pLtet konstitutiv exprimiert. Die kleine RNA-RprA wurde gleichzeitig von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters PLacO konstitutiv exprimiert (pRprA bzw. Kontrollplasmid mit nonsense RNA = pJV300). Nach 8 h Wachstum (OD_{578nm} ca. 4) in LB-amp¹⁰⁰-cm²⁰-Medium bei 37°C wurden Proben für die Westernblotanalyse entnommen, aufbereitet und anschließend 5 µg Gesamtprotein auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem Antikörper gerichtet gegen Gfp.

pXG-0 = Negativkontrolle (exprimiert Luciferase)

pXG-1 = Positivkontrolle (exprimiert Gfp vollständig)

pcsgD::gfp/Δsite1 (pSB29) Klonierung von -36 Nt bis +90 Nt

pcsgD::gfp/Δsite1site2* (pSB42) Klonierung von -36 Nt bis +90 Nt und Basenaustausche C(-1)..C(-4)→G..G

pcsgD::gfp/Δsite1site2** (pSB43) Klonierung von -36 Nt bis +90 Nt und Basenaustausche TTT(-5bis-7)→AAA

2.3.3. Die weiter stromaufwärts in der *csgD* 5'UTR liegende potentielle RprA-Bindestelle spielt möglicherweise eine Rolle bei der Transkriptionselongation

Drastische regulatorische Effekte von überexprimiertem RprA sind wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben mit dem langen *csgD*::gfp-Konstrukt, welches beide potentiellen Bindestellen enthält, zu verzeichnen (vgl. Abb. 17 Spalte 2 und 3). Verkürzt man dieses *csgD*::gfp-Konstrukt (Δsite1), so ist die Regulation durch RprA teilweise aufgehoben. Interessanterweise sind jedoch die Proteinmengen des langen CsgD::Gfp Fusionsprotein in Abwesenheit von RprA um das 2-fache geringer, als das kurze CsgD::Gfp Fusionsprotein in Abwesenheit des RprA-Plasmids liefert (vgl. Abb. 17 Spalte 2 und 4). Dies könnte auf bereits geringere Transkriptmengen zurückzuführen sein. Deshalb wurden durch Northernblotanalysen mit einer Sonde gerichtet gegen gfp die Transkriptmengen

dieser beiden Konstrukte in An- oder Abwesenheit von überexprimiertem RprA untersucht. In Anwesenheit beider potentiellen RprA-Bindestellen (langes *csgD::gfp* Konstrukt) ist eine deutliche Reduktion (5-fach) der Transkriptmengen bei Überproduktion von RprA zu verzeichnen (vgl. Abb. 18 Spalte 2 und 3). Dem gegenüber stehen jedoch nahezu identische und sehr hohe Transkriptmengen des kurzen *csgD::gfp*-Konstruktes in An- und Abwesenheit von überexprimiertem RprA (Vgl. Abb. 18 Spalte 4 und 5). Die Deletion der ersten RprA Bindestelle bzw. des Bereiches der 5'UTR stromaufwärts vom -36. Nukleotid führt zum dramatischen Anstieg der *csgD::gfp*-Transkriptmengen (2 bis 3 fach). Da die Transkription von *csgD* hier nicht vom *csgD*-Originalpromotor sondern von einem ekto- pischen Promotor aus erfolgt, kann man diesen Effekt auf die Transkriptmengen nicht mit einer veränderten Transkriptionsinitiation erklären. Möglicherweise spielt diese Bindestelle bzw. dieser Bereich eine Rolle bei der Transkriptionselongation. Aber nicht nur die Deletion der ersten Bindestelle führt zu erhöhten *csgD::gfp* Transkriptmengen sondern auch die Deletion des chromosomalen *rprA*-Gens (Abb. 18 Spalte 6) selbst. Damit sind die reduzierten Transkriptmengen des langen *csgD::gfp* Konstruktes (Abb. 18 Spalte 2) hier womöglich auf das noch Vorhandensein chromosomal kodierter RprA-RNA und deren Bindung an die hier ebenfalls vorhandene erste (stromaufwärts liegende) Bindestelle zurückzuführen.

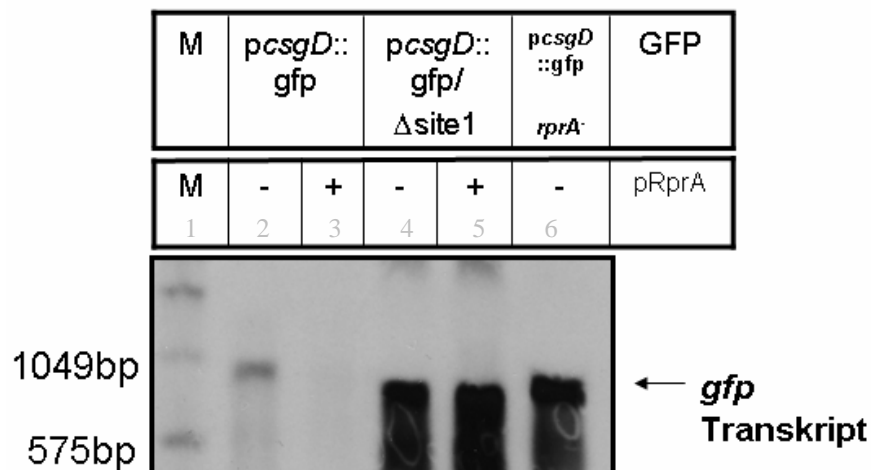


Abbildung 18: Das Vorhandensein der potentiellen ersten Bindestelle führt zu Verminderung der *csgD::gfp* Transkriptmenge (Northernblot)

Für die Transformation mit den Plasmiden wurde der Stamm MC4100 bzw. der Stamm SB123 mit chromosomal deletiertem *rprA*-Gen (MC4100*csgB::lacZ rprA::kan*) benutzt. Die Gfp-Fusionen zu CsgD (pSB25=*pcsgD::gfp*) und der verkürzten CsgD-Version (pSB29=*pcsgD::gfp/Δsite1*) wurden von einem Niedrigkopienvektor unter Kontrolle des ekto- pischen Promoters pLtet konstitutiv exprimiert. Die kleine RNA-RprA wurde gleichzeitig von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ekto- pischen Promoters PLacO konstitutiv exprimiert (pRprA bzw. Kontrollplasmid mit nonsense RNA = pJV300). Nach 8 h Wachstum

(OD_{578nm} ca. 5) in LB-amp¹⁰⁰-cm²⁰-Medium bei 37°C wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen und mit der heißen Phenol-Chloroform-Methode die RNA isoliert. 14 µg RNA wurden auf ein Agarose-Formaldehydgel aufgetragen und bei 80V laufen gelassen. Nach dem Semi-Dry-Blotting für 1 h wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten *gfp*-Sonde bei 54°C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm.

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Daten geschlossen werden, a) dass es sich bei *csgD* um ein neues, direktes Zielgen der kleinen RNA RprA handelt; b) dass innerhalb der 5'UTR der *csgD*-mRNA wahrscheinlich zwei Bindestellen für RprA vorhanden sind und diese für möglicherweise zwei verschiedene Regulationsmechanismen durch RprA verantwortlich sind. RprA beeinflusst also die *csgD*-Expression auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen wird möglicherweise die Transkriptionselongation beeinflusst, indem RprA an die erste Bindestelle bzw. den Bereich stromaufwärts vom -36sten Nukleotid bindet und die *csgD*-Transkriptmengen dadurch reduziert.

Zum anderen zeigt RprA einen Einfluss auf die *csgD*-mRNA Translation, bei der nur die zweite Bindestelle bzw. der kurze Bereich stromabwärts vom -36sten Nukleotid von Bedeutung zu sein scheint.

2.4. Mögliche andere RprA-Zielgene

Basierend auf den Mikroarrayergebnissen, die in Abschnitt 2.1.4. in der Tabelle 7 dargestellt sind, zeichnen sich neben *rpoS* und dem in dieser Arbeit neu identifizierten *csgD* noch weitere Zielgene für die kleine RNA RprA ab.

2.4.1. Die Regulation von GadE durch RprA

Von besonderer Bedeutung könnte dabei der Transkriptionsaktivator GadE sein. GadE (Glutamic acid decarboxylase) kontrolliert die Expression von Genen, die an der Säureresistenz beteiligt sind. Dazu zählen die Isoenzyme GadA und GadB, die bei der glutamatabhängigen Säureresistenz die Hauptrolle spielen. Neben diesen beiden Genen ist auch eine Regulation der Gene *hdeA*, *hdeB* und *hdeD* durch GadE beschrieben (Ma *et al.*, 2003; Hommais *et al.*, 2004; Weber, Dissertation). Alle diese Gene erscheinen auf den Mikroarrays durch RcsB und RprA als positiv kontrolliert. Da GadE als Transkriptionsaktivator von *gadB*, *hdeA*, *hdeB* und *hdeD* beschrieben ist, könnte *gadE* ein mögliches direktes Zielgen von RcsB und/oder RprA darstellen und das Auftauchen der anderen Gene auf die indirekte Wirkung von RcsB und/oder RprA über GadE zu begründen sein. Erste Untersuchungen einer translationalen *gadB::lacZ* Fusion in der stationären Phase deuten auf eine positive Regulation der Expression in Anwesenheit von überexprimiertem RprA hin (Abb. 19). Wohingegen jedoch *gadE::gfp*-Fusionskonstrukte, die zu zwei unterschiedlichen

Transkriptionsstartpunkten vollführt wurden, in Anwesenheit von überexprimiertem RprA keinen eindeutigen Schluss auf eine positive Regulation zulassen (Abb. 20).

Ein möglicher direkter Einfluss von RcsB/RprA auf GadE konnte mit den bisherigen Untersuchungen noch nicht eindeutig geklärt werden und bedarf deshalb weiterer Experimente.

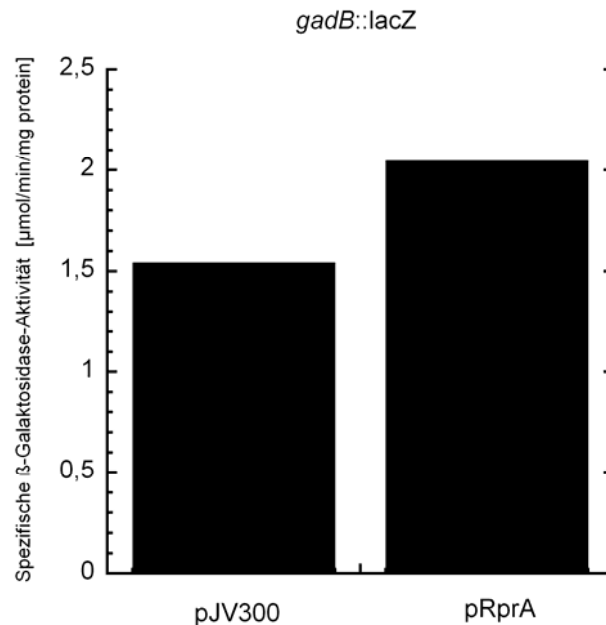


Abbildung 19: Die Expression der *gadB::lacZ* Fusion ist in Anwesenheit von RprA leicht erhöht

Der Stamm JG2 (W3110 Δ lacU169 *gadB::lacZ*) wurde in LB-amp¹⁰⁰-Medium bei 37°C in An- (pRprA) und Abwesenheit (pJV300) der kleinen RNA RprA angezogen. Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität wurde nach 12 h Wachstum bestimmt. Die kleine RNA (pRprA) bzw. die nonsense RNA (pJV300) wurden von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoter P_{LacO} konstitutiv exprimiert.

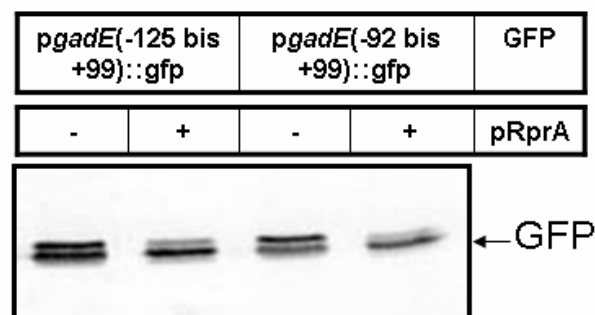


Abbildung 20: Proteinmengen von Gfp-Fusionen zu zwei GadE-Versionen in An- und Abwesenheit der kleinen RNA RprA

Für die Transformation mit den jeweiligen Plasmiden wurde der Stamm MC4100 benutzt. Die Gfp-Fusionen zu den GadE-Versionen (pSB31, pSB32) wurden von einem Niedrigkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters p_{Ltet} konstitutiv exprimiert. Die kleine RNA-RprA wurde gleichzeitig von einem Hochkopienvektor unter Kontrolle des ektopischen Promoters P_{LacO} konstitutiv exprimiert (pRprA bzw. Kontrollplasmid mit nonsense RNA = pJV300). Nach 13 h Wachstum ($\text{OD}_{578\text{nm}} \sim 4$) in LB-amp¹⁰⁰-cm²⁰-Medium bei 37°C wurden Proben für die Westernblotanalyse entnommen, aufbereitet und anschließend 5 μg Gesamtprotein auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem Antikörper gerichtet gegen Gfp.

2.5. Das degenerierte GGDEF/EAL Protein YhdA (CsrD) aktiviert die *csgD*-Expression durch die Inhibition der RprA-Expression

YhdA (CsrD) ist eine regulatorische Komponente des Csr-Systems. Es weist neben den sehr stark degeneriert vorliegenden GGDEF- und EAL-Domänen eine RNA-bindende Domäne im N-Terminus auf. Mit dieser Domäne ist CsrD in der Lage die zwei kleinen regulatorischen RNA's CsrB und CsrC zu binden und dem Abbau durch RNaseE zuzuführen (Jonas *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006). Frühere Untersuchungen mit einer *yhdA*-Mutante zeigten eine reduzierte *csgD*- und *csgB*-Expression (Sommerfeldt *et al.*, 2009). Der Befund, dass die kleine RNA RprA bei der Inhibition der *csgD*-Expression eine essentielle Rolle spielt, YhdA kleine RNA's binden kann und ebenfalls einen Einfluss auf die *csg*-Gene ausübt, legte die Vermutung nahe, dass YhdA möglicherweise RprA bindet und es dem Abbau zuführt. In den anschließenden Stabilitätsanalysen von RprA in An- oder Abwesenheit von YhdA sollte deshalb überprüft werden, ob YhdA die Stabilität von RprA beeinflusst und damit indirekt eine Wirkung auf *csgD* hat.

2.5.1. CsrD (YhdA) hat keinen Einfluss auf die Stabilität von RprA

Nachdem durch die Messung des translationalen *csgB::lacZ* Fusionsstammes in einer *yhdA*-Mutante eine deutliche Reduktion zu verzeichnen war (Sommerfeldt *et al.*, 2009) und dieser Effekt durch die zusätzliche Mutation von *rprA* wieder aufgehoben werden konnte (Abb.21 rotes Dreieck), zeichnete sich eine Rolle von YhdA bei der Kontrolle von RprA ab. Zusätzliche Northernblotanalysen zeigten außerdem, dass in einer *yhdA*-Mutante wesentlich mehr RprA-Transkript vorhanden ist als im Wildtyp (Abb. 22).

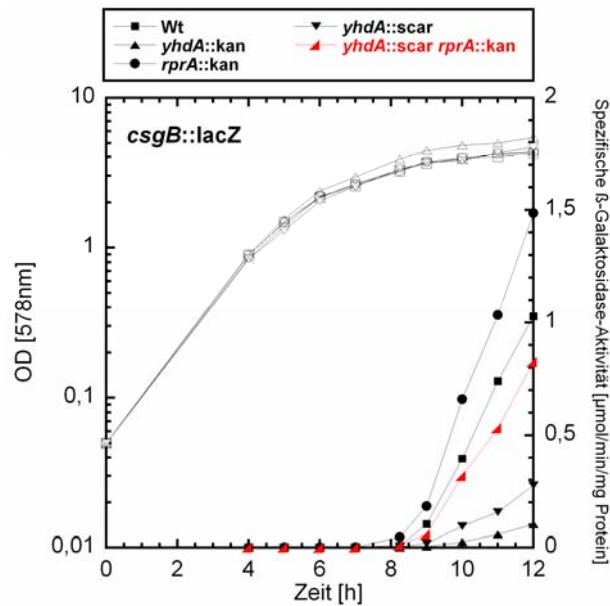


Abbildung 21: Die Mutation von *yhdA* führt zur Reduzierung der *csgB::lacZ* Expression, die durch die gleichzeitige Mutation von *rprA* wieder aufgehoben werden kann.

Die Stämme GB350 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ* = Wildtyp, Vierecke), NS122 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::kan*, Dreieckspitze nach oben zeigend), SB136 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rprA::kan*, Kreis), SB 156 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::scar*, Dreieckspitze nach unten zeigend), SB157 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::scar rprA::kan*, Dreieckspitze nach rechts zeigend – rotes Symbol) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β -Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

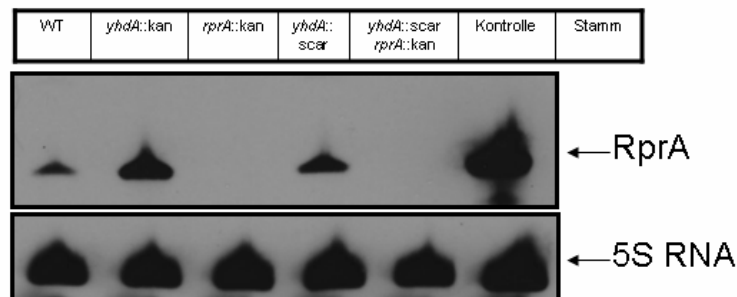


Abbildung 22: Eine *yhdA*-Mutante hat erhöhte RprA-Mengen

Die Stämme GB350 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ* = Wildtyp), NS122 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::kan*), SB136 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ rprA::kan*), SB 156 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::scar*), SB157 (W3110 Δ lacU169 *csgB::lacZ yhdA::scar rprA::kan*) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Bei einer optischen Dichte bei 578 nm von 3 wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen und mit dem Promega Z3110 Kit die RNA isoliert. 3 μ g RNA wurden auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel (mit Harnstoff) aufgetragen und bei 10-15 mA laufen gelassen. Nach dem Blotting für 1 h bei 15V und dem anschließenden Crosslinking wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gerichtet gegen RprA bei 46 °C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm. Nach der RprA-Detektion wurde die Sonde mit heißem Wasser abgewaschen und die Membran wurde erneut mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gerichtet gegen die 5S RNA (als Ladekontrolle) bei 46°C inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter behandelt. Bei der Kontrolle handelt es sich um Salmonella RprA, welches vom Plasmid (pKP15-13) exprimiert wurde.

Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob YhdA möglicherweise die RNA RprA bindet und dem Abbau zuführt, also einen Einfluss auf dessen Stabilität ausübt. Abbildung 23

zeigt ein nicht-radioaktives Abbauexperiment der RprA-RNA in An- oder Abwesenheit von YhdA. Auffällig hier sind wiederum die unterschiedlichen Transkriptmengen von RprA. Deutlich mehr RprA-Transkript ist im Vergleich zum Wildtyp in einer *yhdA*-Mutante zu verzeichnen. Darüber hinaus kann jedoch kein deutlicher Einfluss auf die Stabilität von RprA beobachtet werden. Die Abbauraten in An- oder Abwesenheit von YhdA sind nahezu identisch. In der stationären Phase (OD_{578} nm ca. 3) ist RprA sehr stabil und wird vermutlich durch das Hfq-Protein vor dem Abbau geschützt. In der logarithmischen Phase jedoch wird RprA sehr schnell abgebaut und weist hier eine Halbwertszeit von 7-8 min auf (Majdalani *et al.*, 2001), weshalb ein Einfluss von YhdA auf die Stabilität von RprA in der logarithmischen Phase möglich wäre. In der stationären Phase jedoch sind die erhöhten RprA-Transkriptmengen in einer *yhdA*-Mutante nicht mit einer Stabilisierung durch das Ausbleiben der Bindung und der Abbaufuhr zu begründen.

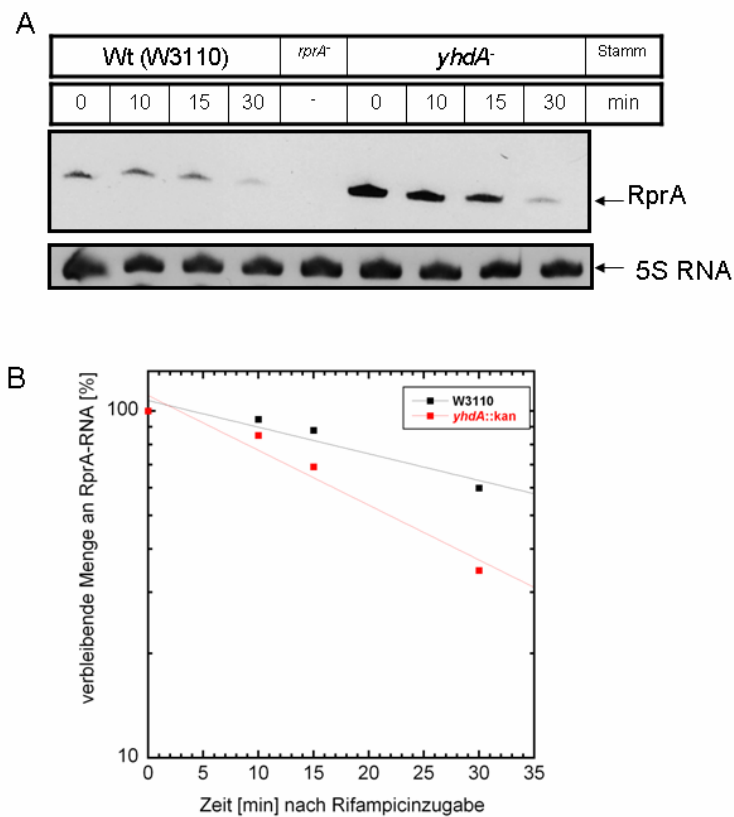


Abbildung 23: YhdA zeigt einen nahezu identischen Einfluss auf die Stabilität von RprA

Die Stämme W3110 (Wildtyp) und NS32 (W3110 *yhdA::kan*) wurden in LB-Medium bei 28°C angezogen. Bei einer OD_{578} nm von 3 wurden vor Rifampicinzugabe (0,5 mg/ml) sowie 10, 15 und 30 min nach Rifampicinzugabe Proben für die RNA-Präparation entnommen und mit dem Promega Z3100 Kit die RNA isoliert. 3 µg RNA wurden auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel (mit Harnstoff) aufgetragen und bei 10-15 mA laufen gelassen. Nach dem Blotting für 1 h bei 15V und dem anschließenden Crosslinking wurde die Membran mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gerichtet gegen RprA bei 46 °C inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Chemilumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm. Nach der RprA-Detektion wurde die Sonde mit heißem Wasser abgewaschen und die Membran wurde erneut mit einer Digoxigenin-markierten Sonde gerichtet gegen die 5S RNA (als Ladekontrolle) bei 46°C inkubiert und wie zuvor beschrieben weiter behandelt. Die Original-Northernblotdaten sind in (A) und die Quantifizierung dieser Daten sind in (B) dargestellt.

2.5.2. CsrD (YhdA) reprimiert die *rprA*-Expression

Da die vorangegangenen Ergebnisse nicht auf eine Stabilisierung von RprA durch YhdA hinweisen, wurde mit Hilfe einer transkriptionalen *rprA::lacZ* Fusion ein möglicher Einfluss von YhdA auf die Expression von *rprA* näher untersucht. Aus Abbildung 24A und B ist dabei eindeutig ersichtlich, dass YhdA einen reprimierenden Effekt auf die *rprA::lacZ* Expression ausübt. Das heißt, dass eine *yhdA*-Mutante also höhere *rprA::lacZ* Fusionsaktivitäten als der Wildtyp aufweist. Diese Beobachtungen waren bei 28°C besonders in der stationären Phase deutlich ausgeprägt (Abb. 24A), wohingegen bei 37°C die maximale Fusionsaktivität der *yhdA*-Mutante in der späten logarithmischen Phase (OD₅₇₈ nm ca. 2) zu verzeichnen war und danach stetig abfiel (Abb. 24B). Dieses Expressionsprofil könnte auf eine Abhängigkeit vom flagellaren Sigmafaktor FliA hindeuten.

Eine deutlich geringere *rprA::lacZ* Expression lieferte eine *rscB*-Mutante. Dies bestätigt die bereits bekannte Aktivierung von *rprA* durch den Responseregulator RcsB (Majdalani *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den Einflüssen von YhdA und RcsB wurde auch ein möglicher Einfluss von RpoS auf die *rprA*-Expression untersucht. Da RprA die *rpoS*mRNA stabilisiert, könnte ebenso RpoS die Expression von *rprA* in der stationären Phase positiv beeinflussen und in einem so genannten positiven feedbackloop wirken. Wie in Abbildung 24 ersichtlich scheint RpoS jedoch einen reprimierenden Einfluss auf die *rprA::lacZ* Expression auszuüben, denn in einer *rpoS*-Mutante ist die *rprA::lacZ* Fusionsaktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht. Ein reprimierender Effekt von RpoS ist äußerst ungewöhnlich und lässt die Vermutung der Sigmafaktor-Kompetition zu. In Abwesenheit von RpoS müssen andere Sigmafaktoren wie z.B. der vegetative Sigmafaktor RpoD oder der flagellare Sigmafaktor FliA nicht mehr mit dem Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS um die RNA-Polymerase konkurrieren und können ungehindert die Expression ihrer Zielgene herbeiführen. Betrachtet man das Expressionsprofil der *yhdA*-Mutante näher, so entspricht dieser Verlauf einem typischen flagellaren Genexpressionsprofil mit einer maximalen Aktivierung in der späten logarithmischen Phase und dem anschließenden stetigen Abfall. Eine abschließende Aussage, ob es sich bei *rprA* um ein FliA-abhängiges Gen handelt, kann auf Grund der dafür noch fehlenden Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden.

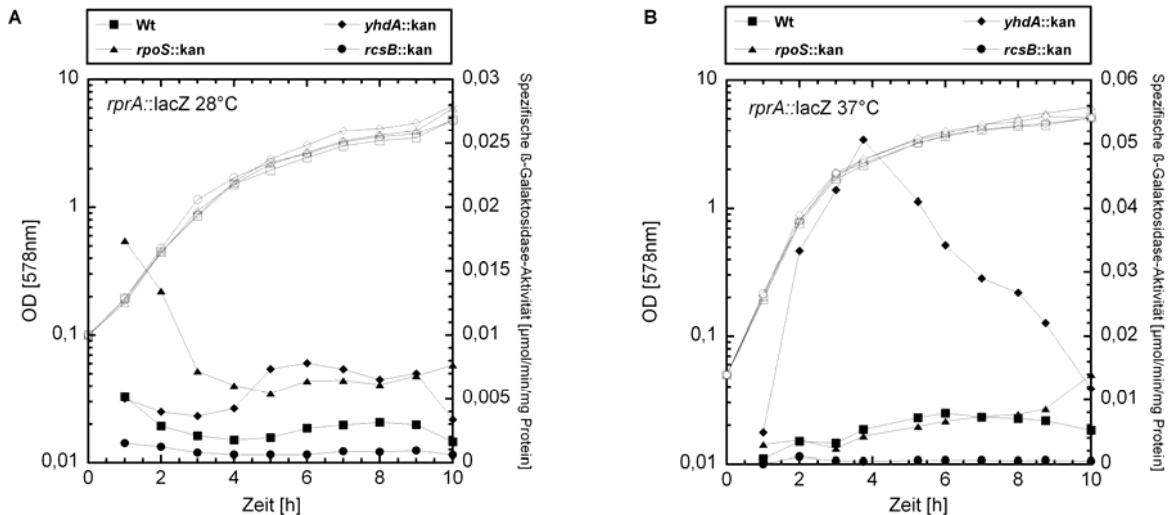


Abbildung 24: YhdA reprimiert die *rprA::lacZ* Expression

Die Stämme SB254 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ* =Wt, Viereck), SB255 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ rpoS::kan*, Dreieck), SB256 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ yhdA::kan*, Raute), SB257 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ rcsB::kan*, Kreis) wurden in LB-Medium bei 28°C (A) und 37°C (B) angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

2.5.3. CsrD (YhdA) reprimiert die *rprA*-Expression nicht über RcsB

Um zu klären, ob YhdA seine Wirkung direkt auf die *rprA*-Expression ausübt oder möglicherweise indirekt über den Transkriptionsaktivator RcsB, wurde das Verhalten der Einzelmutanten in *yhdA* und *rpsB* im Vergleich zur Doppelmutante (*yhdA rpsB*) in Bezug auf die *rprA*-Expression näher untersucht. Wie in Abbildung 25A und B eindeutig ersichtlich ist, verhält sich die Doppelmutante sowohl bei 28°C als auch bei 37°C entlang der Wachstumskurve exakt wie die *yhdA*-Einzelmutante. Damit beruht der Effekt der *yhdA*-Mutation nicht auf einer verstärkten *rpsB*-Expression oder RcsB-Aktivität. Entweder wirkt YhdA direkt auf die *rprA*-Expression oder auf ein System, das unabhängig von RcsB die *rprA*-Expression beeinflusst.

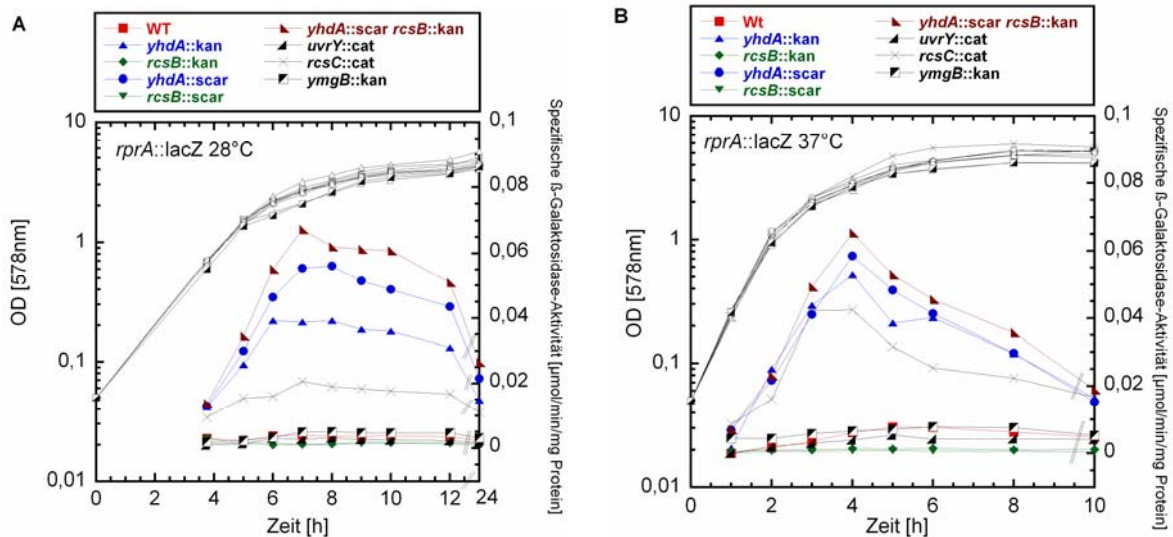


Abbildung 25: YhdA reprimiert die *rprA::lacZ* Expression nicht über RcsB

Die folgenden Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C (A) und 37°C (B) angezogen. Die optische Dichte (OD_{578nm} offene Symbole) und die spezifische β-Galaktosidaseaktivität (geschlossene Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve bestimmt.

- SB254 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ* =Wt) - rotes Viereck
- SB256 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ yhdA::kan*) - blaues Dreieck
- SB257 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ rcsB::kan*) - grüne Raute
- SB260 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ yhdA::scar*) - blauer Kreis
- SB261 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ rcsB::scar*) - grünes Dreieck
- SB263 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ yhdA::scar rcsB::kan*) - dunkelrotes Dreieck
- SB269 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ uvrY::cat*) - schwarzes Dreieck
- SB270 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ rcsC::cat*) - Kreuz
- SB271 (W3110ΔlacU169 *rprA::lacZ ymgB::kan*) Schwarz-weißes Viereck

Auf der Suche nach anderen Faktoren, die ebenfalls einen Einfluss auf die *rprA*-Expression ausüben könnten, wurde der Responseregulator UvrY näher untersucht. Die Expression der kleinen RNAs CsrB und CsrC sind in *E.coli* als positiv UvrY-abhängig beschrieben worden (Suzuki *et al.*, 2002). Da ein Zusammenhang zwischen dem Zweikomponentensystem BarA/UvrY und dem Csr-System besteht, wurde ebenfalls untersucht, ob die *rprA*-Expression möglicherweise auch durch das BarA/UvrY-System beeinflusst wird. Man könnte vermuten, dass in Abwesenheit des Responseregulators UvrY die Expression von CsrB und CsrC vermindert oder ganz ausbleibt und infolgedessen die Aktivität von CsrA nicht beeinflusst wird und eine Stabilisierung oder Destabilisierung seiner mRNA hervorgerufen könnte. Zum anderen könnte UvrY auch als direkter Transkriptionsfaktor an der Regulation der *rprA*-Expression beteiligt sein. In Abbildung 25A und B ist jedoch eindeutig ersichtlich, dass die *rprA*-Expression einer *uvrY*-Mutante zur Wildtypexpression vergleichbar ist. UvrY als Responseregulator übt also keinen Einfluss auf die *rprA*-Expression aus.

Die Messung der *rprA*-Expression einer *rscB*-Mutante, *rscC*-Mutante und *ymgB*-Mutante wurden als Kontrollen mitgeführt. Erwartungsgemäß zeigt sich auch hier im Vergleich zum Wildtyp eine leicht geringere *rprA*-Expression in einer *rscB*-Mutante, die auf die fehlende Aktivierung durch den nicht vorhandenen Transkriptionsaktivator RcsB zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu liefert eine *rscC*-Mutante erhöhte *rprA*-Fusionsaktivitäten. Unter diesen Bedingungen liegt der Responseregulator RcsB in hyperaktiver Form vor und kann deshalb eine stärkere Aktivierung herbeiführen.

Das YmgB-Protein als Konnektor des YcgE/F-Systems und RcsC/D/B-Systems, wobei die Funktion von YmgB als Aktivitätsmodulator des Responseregulator RcsB innerhalb dieser Arbeit beschrieben ist, spielt hier offenbar keine Rolle. Eine *ymgB*-Mutante weist eine wildtypähnliche *rprA::lacZ* Expression auf. Dies deutet auf geringe YmgB-Proteinmengen unter diesen Bedingungen im Wildtyp hin und würde erklären, warum kein Unterschied zu erkennen ist. Vermutlich wird ein Einfluss von YmgB über die Aktivitätsmodulation von RcsB auf die *rprA*-Expression erst nach einer verstärkten Aktivierung von *ymgB* bzw. erhöhten YmgB-Proteinmengen sichtbar (z.B. unter anderen Untersuchungsbedingungen wie z.B. niedere Temperatur und Blaulicht).

Zusammenfassend kann bislang festgehalten werden, dass a) die reduzierte *csgD*-Expression in einer *yhdA*-Mutante durch die erhöhte RprA-Expression bedingt ist, b) diese erhöhte RprA-Expression in einer *yhdA*-Mutante aber nicht durch RcsB vermittelt wird und c) dass das BarA/UvrY nicht hierin involviert ist. Demnach bleibt die Frage, auf welche Art und Weise -direkt oder indirekt über CsrA- die *rprA*-Expression durch YhdA beeinflusst wird weiterhin offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

3. Der Einfluss des Konnektors YmgB auf den „Output“ des Rcs-Systems

Eine der Hauptfunktionen des Rcs-Systems besteht darin, die Expression der Kapsel-synthesegene zu regulieren. Zellen bei denen die Expression der Kapselsynthesegene durch das Rcs-System stark aktiviert werden weisen einen mukoiden Phänotyp auf. Dieser mukoiden Phänotyp wird durch die Produktion des extrazellulären Polysaccharids Kolansäure (colanic acid) verursacht und schützt die Zelle vor ungünstigen Umwelteinflüssen.

Ein solcher mukoider Phänotyp wurde interessanterweise bei Untersuchungen zur molekularen und physiologischen Funktion des YcgF/YcgE regulatorischen Signalweges beobachtet. Das BLUF-EAL Protein YcgF bindet unter Blaulicht als so genannter Antirepressor direkt an den MerR-ähnlichen Repressor YcgE und verhindert somit dessen Bindung an die Operator-DNA. Als Konsequenz werden acht kleine Proteine stark induziert. Zu diesen kleinen Proteinen zählt YmgB, das bei der Expression von einem Niedrigkopienvektor ohne Zugabe eines Inducers den oben beschriebenen mukoiden Phänotyp auf Platte (bei 28°C und 16°C) zeigt. Gleichzeitig hat es auch eine Reduktion der Expression der Curli Fimbrien Strukturgene zur Folge (Tschowri *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse und Beobachtungen führten zur Hypothese, dass das Rcs-System möglicherweise hierin involviert ist. Weiterführende Untersuchungen zeigten eindeutig, dass sowohl die Ausbildung des mukoiden Phänotyps als auch die Repression der Curli Fimbrien Strukturgene bei Expression des kleinen YmgB Proteins von einem Niedrigkopienvektor (ohne Induktion, bei 28°C) von der Anwesenheit des Responseregulators RcsB abhängen (Tschowri *et al.*, 2009). YmgB agiert oberhalb von RcsB. Doch auf welcher Ebene wird der Responseregulator RcsB durch das kleine Protein YmgB beeinflusst? Zur Klärung dieser Fragestellung sollte durch Mikroarrayanalysen zuerst ein möglicher Einfluss auf die Expression des *rscB*-Gens untersucht werden. Dabei wurde der Wildtypstamm MC4100 verwendet und zum einen mit dem Leerplasmid (pCAB18) versehen und zum anderen mit dem pYmgB-Plasmid (pNAT26). Die Proben für den Mikroarray wurden in LB bei 28°C bei einer OD₅₇₈ von 3,5 gezogen. In Tabelle 8 sind die durch pYmgB differentiell regulierten Gene dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenstellung aller durch YmgB regulierten Gene

Bedingungen: LB, 28°C, OD_{578 nm} von 3,5; Vgl. MC4100pNAT26 (pYmgB) mit MC4100pCAB18 (Leerplasmid); Die angegebenen Ratios sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es sind nur solche Gene angegeben, die mindestens eine dreifache differentielle Regulation aufweisen.

Name	ID	Beschreibung	Ratio
aceB	b4014	Malatsynthase A	0,202
aphA	b4055	Diadenosine-Tetraphosphatase	0,194
aroC	b2329	Chorismatsynthase	0,249
aroL	b0388	Shikimatkinase II	7,664
bdm	b1481	Biofilm-abhängiges modulierendes Protein	7,399
cbpA	b1000	curved DNA-bindendes Protein	3,564
clcB	b1592	putativer Chloridkanal	0,248
csgE	b1039	Curli Produktion Zusammenbau/Transport Komponente	0,171
csgF	b1038	Curli Zusammenbau-Komponente	0,136
csgG	b1037	Curli Produktion Komponente	0,152
dnaK	b0014	Chaperon Hsp70	4,041
emrE	b0543	Methylviologen Resistenz	4,785
exbB	b3006	Aufnahme von Enterochelin	10,324
exbD	b3005	Aufnahme von Enterochelin	10,773
ftn	b1905	cytoplasmisches Ferritin (Eisenspeicherprotein)	0,106
gadB	b1493	Glutamatdecarboxylase-Isozym	13,194
gadC	b1492	GABA APC Transporter	12,013
gadE	b3512	Transkriptionsaktivator	8,311
gatB	b2093	galactitol-specific enzyme IIB of phosphotransferase system	0,237
gatZ	b2095	putative tagatose 6-phosphate kinase 1	0,264
gcvH	b2904	in glycine cleavage complex	0,083
gcvT	b2905	aminomethyltransferase	0,083
glnG	b3868	response regulator for gln	0,095
gltA	b0720	Citratsynthase	0,222
gltF	b3214	Regulator des gltBDF Operon, Induction von Ntr Enzymen	7,673
gltI	b0655	Untereinheit des gltIJKL Glutamat ABC Transporters	0,254
hdeA	b3510	orf, hypothetisches Protein	4,987
iscR	b2531	orf, hypothetisches Protein	4,177
ivy	b0220	Inhibitor des vertebrate C-type lysozyme	5,772
lrp	b0889	Regulator des Leucin (or lrp) Regulon	0,194
malE	b4034	periplasmatisches Maltose-bindendes Protein	0,088
malK	b4035	ATP-bindende Komponente des Transportsystems für Maltose	0,120
melB	b4120	Melibiosepermease	0,243
metH	b4019	B12-dependent homocysteine-N5-methyltetrahydrofolate transmethylase	0,154
mgIB	b2150	Galactose-bindendes Transportprotein	0,211
mlc	b1594	putative NAGC-like transcriptional regulator	5,145

mngA	b0731	subunit of 2-O- α -mannosyl-D-glycerate transporting phosphotransferase system	0,187
mnmA	b1133	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	7,960
nrdH	b2673	Glutaredoxin-ähnliches Protein	18,417
ompX	b0814	Aussenmembranprotein X	10,155
osmB	b1283	osmotisch induzierbares Lipoprotein	6,186
osmY	b4376	hyperosmotically inducible periplasmic protein	3,838
otsB	b1897	Trehalose-6-phosphate-phosphatase	7,542
pphB	b2734	Protein Phosphatase 2	0,092
puuA	b1297	putative Glutaminsynthetase	8,434
rbsB	b3751	D-ribose periplasmic binding protein	0,216
slp	b3506	outer membrane protein induced after carbon starvation	4,953
spy	b1743	periplasmic protein related to spheroblast formation	5,832
tnaA	b3708	tryptophanase	0,115
wcaJ	b2047	putative colanic acid biosynthesis UDP-glucose lipid carrier	0,196
ybdR	b0608	putative Oxidoreduktase	21,671
ybgS	b0753	putatives Homeoboxprotein	11,428
ybhI	b0770	putative membrane pump protein	0,153
yccT	b0964	orf, hypothetical protein	5,671
ycgV	b1202	putative adhesion and penetration protein	14,726
yciE	b1257	orf, hypothetical protein	14,966
yciF	b1258	putative structural proteins	19,635
yciG	b1259	orf, hypothetical protein	13,389
ycjW	b1320	putative LACI-type transcriptional regulator	4,907
ydeI	b1536	orf, hypothetical protein	13,590
ydiT	b1700	orf, hypothetical protein	10,080
yebV	b1836	orf, hypothetical protein	6,759
yfaA	b2230	orf, hypothetical protein	0,267
yfdE	b2371	putative enzyme	3,777
yfiA	b2597	putative yhbH sigma 54 modulator	0,276
ygdI	b2809	orf, hypothetical protein	5,281
yhbO	b3153	orf, hypothetical protein	9,928
yhcO	b3239	orf, hypothetical protein	3,735
yciL	b3660	putativer Permeasetransporter	0,276
yjiV_1	b4343	orf, hypothetical protein	0,211
ymgA	b1165	orf, hypothetical protein	0,257
ymgB	b1166	orf, hypothetical protein	19,605
ynjC	b1755	putatives Transportsystem, Permeaseprotein	4,360

Mit diesen Mikroarrayergebnissen wird unter anderem bestätigt, dass die Anwesenheit von pYmgB die Expression der Curligene stark reduziert. Eine Reihe von Säureresistenzgenen wird durch pYmgB aktiviert (*gadB*, *gadC*, *gadE*). Zu weiteren in ihrer Expression aktivier-

ten Genen zählen auch der Biofilm-modulierende Faktor (*bdm*) und *ybgS* (ein bislang nicht näher charakterisiertes konserviertes Protein). Eine Vielzahl dieser regulierten Gene sind bereits als RcsB-kontrollierte Gene beschrieben (Hagiwara *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2002; Ferrieres und Clarke, 2003; Francez-Charlot Castanie-Cornet 2005, diese Arbeit Tabelle 7) und in der Tabelle rot markiert. Jedoch konnte eine differentielle Regulation der Gene des Rcs-Systems selbst (*rscB*, *rscC*, *rscD*) nicht beobachtet werden. Damit scheint die Induktion von YmgB keinen Einfluss auf die Expression der Rcs – Phosphorelay-systemkomponenten auszuüben, sondern moduliert möglicherweise dessen Aktivität.

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Daten geschlussfolgert werden, dass das YcgF/YcgE-System die Expression kleiner regulatorischer Proteine (wie zum Beispiel YmgB) kontrolliert und YmgB als möglicher „Konnektor“ über die Aktivitätsmodulation des Rcs-Systems seinen Einfluss auf die Biofilmbildung und die Säureresistenz ausübt.

4. Globale Analyse von Zweikomponenten-Phosphorelay-Systemen hinsichtlich ihrer Vernetzung (Crosstalk) untereinander und deren Einfluss auf den Stationärphasen-Sigmafaktor Sigma^S

Unter Prokaryoten sehr weit verbreitete Mechanismen zur Adaption an schwankende Umweltverhältnisse stellen die Signaltransduktion und Regulation durch Zweikomponentensysteme sowie durch Sigmafaktoren dar. Obwohl Signaltransduktionswege in der Zelle zu ganzen Netzwerken verschaltet sind, die multiple Informationen integrieren und letztlich die Expression aller Gene koordinieren, werden diese Signaltransduktionswege traditionell isoliert betrachtet und analysiert. Zu Beginn dieser Arbeit gab es jedoch erste Hinweise darauf, dass ein Teil der Zweikomponentensysteme in einem regulatorischen Netzwerk organisiert ist und ein so genannter Crosstalk/Crossregulation zwischen den einzelnen Systemen besteht. Neben den *in vitro* Beobachtungen, dass einige Sensorkinasen neben ihren zugehörigen Responseregulatoren auch andere Responseregulatoren phosphorylieren können (Yamamoto *et al.*, 2005), konnte für die Phosphorylierung des Responseregulators RssB die Nichtpartner-Sensorkinase ArcB identifiziert werden (Mika *et al.* 2005). Zusätzlich dazu können Responseregulatoren aber auch durch Acetylphosphat phosphoryliert werden und unabhängig von ihrer Kinase Zielgene beeinflussen (Shin und Park, 1995).

Des Weiteren haben sich Hinweise ergeben, dass die Zweikomponentensysteme ArcB/ArcA, BarA/UvrY und das RcsCDB-System ebenfalls an der Regulation des generellen Stress-Sigmafaktors σ^S beteiligt sind (Mika *et al.*, 2005; Majdalani *et al.*, 2002; Pruteanu, Dissertation). Diese Zweikomponentensysteme zählen wie auch das TorS/TorR und

das EvgS/EvgA zu den so genannten „unorthodoxen“ also komplexen Multistep-Phosphorelaysystemen. Sie zeichnen sich durch den Besitz von Hybridsensorkinasen mit Inputdomäne, Transmitter, Receiver und HPT-Domäne aus. Da die HPT-Domäne Phosphogruppen zwischen verschiedenen Receiver-Domänen überträgt, erscheinen diese Phosphorelaysysteme besonders gut für den Crosstalk geeignet.

Innerhalb dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden: a) welche Gene durch die Zweikomponenten-Phosphorelay-Systeme reguliert werden, b) wie diese Systeme mit der durch den Stress-Sigmafaktor SigmaS kontrollierten generellen Stressantwort verknüpft sind und c) inwieweit ein Crosstalk stattfindet, diese Systeme also in einem Phosphotransfer-Netzwerk organisiert sind.

Sowohl das TorS/TorR als auch das EvgS/EvgA-System haben keinen direkten Einfluss auf die Transkription des Stationärphasen-Sigmafaktor SigmaS (Daten nicht gezeigt), weshalb der Untersuchungsschwerpunkt auf die Phosphorelaysysteme BarA/UvrY, ArcB/ArcA und RcsCDB gelegt wurde. Die Hinweise, dass Phosphorelaysysteme nicht in sich geschlossene Signaltransduktionswege darstellen, sondern vielmehr eine Kommunikation via Phosphotransfer mit anderen Systemen besteht, konnte bereits für die Sensorkinase ArcB nachgewiesen werden. Sie ist in der Lage neben ihrem Responseregulator ArcA auch RssB zu phosphorylieren (Mika *et al.*, 2005).

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz der „globalen Genetik“ basiert auf dem direkten Vergleich von Einfachmutanten mit Mehrfachmutanten. Der getestete Phänotyp ist hierbei nicht ein einziges Merkmal, sondern vielmehr die gesamtgenomische Genexpression, die mit Hilfe von Mikroarraydaten ermittelt wird und im so genannten Scatterplot dargestellt wird. Diese Vorgehensweise erlaubt die Klärung der Fragestellung welche Phosphorelaysysteme einen linearen Signaltransduktionsweg verfolgen oder mit anderen Systemen kommunizieren.

Bei einem linearen Signaltransduktionsweg kontrolliert A (Sensorkinase) die Komponente B (Responseregulator) und diese wiederum die Expression von bestimmten Zielgenen. Zeigt sich für eine A-negative Mutante der gleiche Phänotyp (gesamtgenomische Genexpression) wie für die B-negative Mutante, erhält man bei der Auftragung der beiden Mutanten gegeneinander, eine im Scatterplot ersichtliche klare diagonale Linie. Eine saubere Diagonale beim Vergleich einer Sensorkinase-Mutante im Vergleich zur Responseregulator-Mutante auf ein und demselben Mikroarray bedeutet dann, dass dieses System nicht mit anderen Systemen vernetzt ist und dass die Sensorkinase nur Kinaseaktivität und keine Phosphataseaktivität für ihren Responseregulator besitzt.

In einem verzweigten Signaltransduktionsweg (Crosstalk) hingegen ist eine breite Streuung zu erwarten, da sich der phänotypische Output der A-Mutante von der B-Mutante unterscheidet. Dieser Unterschied kann aber auch darin begründet liegen, dass eine Sensorkinase in Bezug auf ihren Responseregulator nicht nur Kinase, sondern auch Phosphataseaktivität besitzt. In solchen Fällen erlaubt der SK⁻ vs. RR⁻ Mikroarray eine erste Identifizierung von RR-Zielgenen. Eine eindeutigere Aussage über die tatsächlichen RR-Zielgene würde dann durch die Überprüfung von SK⁻ vs. SK⁻RR⁻ auf ein und demselben Mikroarray möglich sein.

Besteht kein reverser Phosphotransfer, so scheint das System tatsächlich mit anderen Systemen vernetzt zu sein. Eine zusätzliche Mutation in einem Zweig des Signaltransduktionsweges oder die Veränderung der Bedingungen, unter denen Zweige des Netzwerkes nicht aktiv sind, führt dann zur Reduzierung des verzweigten Signaltransduktionsweges zum linearen Weg. Dies ist durch klare Veränderungen im Scatterplot hin zu einer diagonalen Linie erkennbar.

Diese Vorgehensweise wurde insbesondere auf das RcsCDB-System, BarA/UvrY- und das ArcA/ArcB-System angewendet, dessen Ergebnisse in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

4.1. Das Rcs-System und dessen Zielgene

Erste Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit zum Crosstalk des Rcs-Systems wurden unter der speziellen Bedingung des hyperosmotischen Schocks durchgeführt. Für diese Bedingung ist bereits bekannt, dass das Rcs-System aktiv ist und einen Einfluss auf Gene der Kapselsynthese, Motilität und Chemotaxis sowie osmoregulierte Gene und Zellteilungsgene ausübt (Gottesman *et al.*, 1985; Takeda *et al.*, 2001; Frances-Charlot *et al.*, 2003; Carballes *et al.*, 1999; Boulanger *et al.*, 2005). Das Ziel bestand vorerst darin, zu überprüfen, ob differentiell regulierte Gene bei dem Vergleich von Responseregulatormutante (*rscB*) versus Sensorkinase mutante (*rscC*) auf ein und demselben Mikroarray auftauchen und ob diese Gene identisch oder unterschiedlich sind, wenn man Osmoschockbedingungen und normale Bedingungen miteinander vergleicht. Tatsächlich konnten einige solcher differentiell regulierter Gene sowohl unter Osmoschock (M9-Medium, 0,4 % Glycerin, 0,3 M NaCl) als auch unter Nicht-Osmoschockbedingungen (M9-Medium, 0,4 % Glycerin) identifiziert werden. Außerdem unterscheidet sich das Genexpressionsmuster bei den gewählten Untersuchungsbedingungen (hohe vs. normale Osmolarität) voneinander. Unter Nicht-Osmoschockbedingungen unterliegen die Gene des Masterregulators der Fla-

gellensynthese (*flhDC*), ein Außenmembran-Lipoprotein (*slyB*) und drei weitere bislang noch nicht näher charakterisierte Gene (*yeoR*, *ymgG*, *ymgD*) einer starken differentiellen Regulation durch RcsC-SK und RcsB-RR. Hingegen zeigten sich unter Osmoschockbedingungen die Gene *hdeA* und *hdeB*, sowie *bdm* (biofilm modulation factor) als besonders stark differentiell reguliert (Scatterplots und Tabellen siehe Anhang unter Punkt II).

Die typischen Gene, die für die Kapselsynthesepoteine kodieren sind unter diesen Bedingungen gleichermaßen durch Kinase und Responseregulator reguliert und unterliegen deshalb dem linearen Signaltransduktionsweg.

Eine abschließende Aussage über die Art und Weise der Regulation der oben angeführten differentiell regulierten Gene kann mit diesen bislang erlangten Erkenntnissen noch nicht vorgenommen werden und erfordert zusätzliche Experimente. Dennoch zeichnet sich für das Rcs-System ab, dass es sich nicht um ein in sich abgeschlossenes lineares Signaltransduktionssystem handelt, sondern eine, noch im Einzelnen zu klärende, Vernetzung mit anderen Systemen aufweist.

4.2. Das BarA/UvrY – Zwei-Komponentensystem als ein hauptsächlich linear wirkendes System

Sowohl für die Sensorkinase BarA, als auch für den Responseregulator UvrY wurde ein aktivierender Einfluss auf die *rpoS*-Transkription in der stationären Phase beschrieben (Mika, Dissertation 2006). Die Befähigung des BarA/UvrY-Systems zum Crosstalk wurde nach dem oben beschriebenen Ansatz der globalen Genetik in der logarithmischen Phase und in der stationären Phase in Vollmedium (LB) untersucht. Unter beiden Wachstumsbedingungen scheint das BarA/UvrY-System aktiv zu sein, wobei sich aber das Genexpressionsmuster in beiden Wachstumsphasen voneinander unterscheidet. Eingehendere Untersuchungen des Systems in der stationären Phase zeigten, dass relativ wenig Gene durch BarA und UvrY reguliert sind und dass die Mehrzahl dieser Gene durch den linearen Signaltransduktionsweg (BarA-> UvrY-> Zielgene) kontrolliert wird. Einige wenige Gene reagieren dennoch leicht differentiell auf Mutationen in *barA* und *uvrY*. Hierzu zählen die Gene *lsrB*, *lsrF*, und *lsrG*. Die *lsrBFG*-Gene kodieren für eine periplasmatisch bindende Komponente (LsrB), eine mögliche Aldolase (LsrF) und ein Autoinducer 2 abbauendes Protein (LsrG) kodieren und eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation (Quorum sensing) spielen (Xavier und Bassler, 2005). Der Responseregulator übt hierbei einen aktivierenden Einfluss auf die Expression diese drei Gene aus (Daten siehe Anhang Punkt III). Daraus ergibt sich, dass das BarA/UvrY-Phosphorelaysystem ein hauptsächlich linear

wirksames Signaltransduktionssystem ist und zumindest unter den getesteten Bedingungen (LB, logarithmische und stationäre Phase) nicht mit anderen Zweikomponentensystemen vernetzt ist. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der Expression einer *rpoS::lacZ* Reporterfusion einer *barA* und *uvrY*-Mutante. Sensor kinase und Responseregulator zeigen hier eine gleich stark ausgeprägte Aktivierung der *rpoS*-Transkription (Mika, Dissertation 2006).

4.3. Das ArcB/ArcA – Zwei-Komponentensystem als ein Kandidat für Crosstalk

Die umfangreichsten Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Vernetzung mit anderen Systemen wurden mit dem ArcB/ArcA-Phosphorelaysystem durchgeführt. Die Untersuchungsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass sowohl das Arc-System aktiv ist, als auch RpoS in der Zelle exprimiert wird (Vollmedium, OD1). In einem ersten Schritt wurden durch den Vergleich des Wildtypstammes mit der Sensor kinasemutante (*arcB*) bzw. der Responseregulormutante (*arcA*) auf ein und demselben Mikroarray die Zielgene dieses Systems identifiziert. Unter der Vielzahl der regulierten Gene finden sich z.B. *suc*, *sdh* (TCA-Zyklus, aerobe Atmung), *mgl* (Galaktosetransporter), *glp* (Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase), *cyd*, *cys* (Cytochromoxidase), *csp* (Kälteschockproteine). Daneben konnten auch einige σ^S -abhängige Gene wie z.B. *gabDT* (involviert in γ -Aminobuttersäure), *osmY* (hyperosmotisch induziertes Protein) und *hdeAB* (Säureresistenzgene) identifiziert werden.

In einem nächsten Schritt wurden dann durch den Vergleich von Sensor kinasemutante (*arcB*) mit einer Responseregulormutante (*arcA*) auf ein und demselben Mikroarray differentiell regulierte Gene identifiziert. Hierbei zeigten sich die *csp*-Gene (cold shock protein) als besonders stark differentiell reguliert. Neben den *csp*-Genen werden zahlreiche andere Gene differentiell reguliert, die zum Teil auch zu den σ^S -abhängigen Genen zählen.

Zusätzlich zu dieser Einzelmutantenuntersuchung wurde das Genexpressionsmuster einer Doppelmutante (*arcB* und *arcA*) im Vergleich zu der jeweiligen Einzelmutante (*arcB* oder *arcA*) ermittelt. Ergibt sich hierbei ein Unterschied in der Genexpression, so besteht die Möglichkeit, dass im Falle der Einzelmutation in der Sensor kinase ArcB die auftauchenden Gene durch den in diesem Stammhintergrund noch vorhandenen Responseregulator ArcA beeinflusst werden. Möglicherweise wird ArcA hier durch eine andere Sensor kinase oder durch Acetylphosphat aktiviert und kann dann seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben. Befindet sich die Mutation jedoch in dem Responseregulator ArcA, werden die Gene vermutlich durch einen anderen Responseregulator beeinflusst, der seinerseits durch die Sensor kinase ArcB aktiviert wird. Letztgenanntes trifft auf die *csp*-Gene zu und deutet auf

einen Crosstalk mit anderen Systemen hin. Wie bereits beschrieben, ist die Sensorkinase ArcB in der Lage den Responseregulator RssB zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung von ArcA durch ArcB ist sehr effizient, während RssB weniger effizient bedient wird. Um RssB als zweiten Responseregulator auszuschließen und im Anschluss daran durch einen weiteren Mikroarray (Doppelmutante *arcB rssB* vs. Dreifachmutante *arcA arcB rssB*) zu überprüfen, ob auch jetzt noch differentiell regulierte Gene sichtbar werden, wurde das *rssB*-Gen zusätzlich mutiert. Die Anzahl der durch die ArcB-Kinase differentiell regulierten Gene reduzierte sich sehr stark, trotzdem sind auch hier die *csp*-Gene anzutreffen. Offenbar ist die Sensorkinase ArcB in der Lage noch einen dritten Responseregulator zu phosphorylieren, der dann wiederum die *csp*-Gene in seiner Expression negativ reguliert. Möglicherweise erfolgt die Regulation über diesen dritten Responseregulator durch ArcB erst dann, wenn sowohl ArcA als auch RssB nicht mehr bedient werden können. Aus den vorangegangenen Untersuchungen kann bislang geschlussfolgert werden, dass das ArcB/ArcA-Phosphorelaysystem als ein Kandidat für Crosstalk anzusehen ist und möglicherweise mit anderen Systemen, die durchaus auch andere Zweikomponentensysteme darstellen können, vernetzt ist.

Die Regulation der Kälteschockproteine ist abhängig von der Sensorkinase ArcB, aber unabhängig vom zugehörigen Responseregulator ArcA und dem orphanen Responseregulator RssB. Welche Komponente jedoch hierbei durch die Sensorkinase beeinflusst wird und somit die Kälteschockproteine reguliert bleibt noch zu klären (Scatterplots und Tabellen siehe Anhang Punkt IV).

5. Beziehungen des Responseregulators RssB zu anderen Zweikomponentensystemen

Bei dem RssB Protein handelt es sich um einen Responseregulator ohne eigene zugehörige Sensorkinase. *rssB* ist zusammen mit *rssA* in einem Operon lokalisiert, wobei die Expression dieser beiden Gene vom Stationärphasen-Sigmafaktor σ^S abhängig ist.

Der Responseregulator RssB (regulator of SigmaS) ist der Erkennungsfaktor für RpoS, der σ^S bindet und es dem Abbau durch die ClpXP-Protease zuführt (Klauck *et al.*, 2001). Strukturell zählt RssB zu der Familie der Responseregulatoren (Mizuno *et al.*, 1997) mit einer konservierten N-terminalen Receiver-Domäne, mit dem Aspartat an Position 58 als Phosphorylierungsstelle. Die Outputdomäne von RssB weist jedoch keine Homologien zu bekannten DNA-bindenden Motiven oder zu anderen Proteinen auf (Hengge-Aronis *et al.*, 2000b). RssB kann *in vitro* sowohl durch Acetylphosphat als auch durch die Sensorkinase

ArcB phosphoryliert werden (Mika *et al.*, 2005). Doch einiges spricht dafür, dass es weitere Phosphodonoren gibt, die in der Lage sind RssB zu phosphorylieren. So wurde z.B. beobachtet, dass eine Mutante, die sowohl defizient in der Sensorkinase ArcB, als auch in den Acetylphosphat bildenden Komponenten (*pta-ackA*) immer noch einen Abbau von σ^S aufweist. Was daraufhin deutet, dass RssB möglicherweise durch andere Sensorkinasen phosphoryliert werden kann und σ^S der Proteolyse zuführt oder aber eine Aktivitätsmodulation von RssB durch so genannte Adaptorproteine (Bsp. IraP) die σ^S -Proteolyse beeinflusst (Bougdour *et al.*, 2006; Bougdour *et al.*, 2008). Für die Sensorkinasen EvgS, BarA und RcsC wurde dies bereits getestet, doch keine dieser drei Sensorkinasen ist an der Regulation der σ^S -Proteolyse beteiligt (Mika *et al.*, 2005). Bei der Suche nach weiteren Phosphodonoren für RssB wurde im speziellen die UhpB Sensorkinase untersucht, die *in vitro* RssB phosphorylieren kann (Yamamoto *et al.*, 2005). Unter Standardwachstumsbedingungen (LB, 37°C) konnte kein Einfluss der Kinase UhpB auf die *rpoS*-Transkription beobachtet werden. Hinsichtlich der RpoS-Proteolyse verhält es sich gleichermaßen. Eine Mutante sowohl defekt in den bislang bekannten Phosphodonoren für RssB (Acetylphosphat und ArcB) als auch defekt in UhpB, zeigt immer noch einen Abbau von RpoS. Nichtradioaktive Abbauxperimente (LB, 37°C, OD₅₇₈ 2,5, Spektinomycinzugabe) von σ^S einer Dreifachmutante (*pta-ackA201 zfa::Tn10 arcB::kan uhpB::cat*) im Vergleich zur Doppelmutante (*pta-ackA201zfa::Tn10 arcB::kan*) zeigten keine zusätzliche Stabilisierung des Stationärphasen-Sigmafaktors σ^S in Abwesenheit der UhpB Sensorkinase (Abb.26).

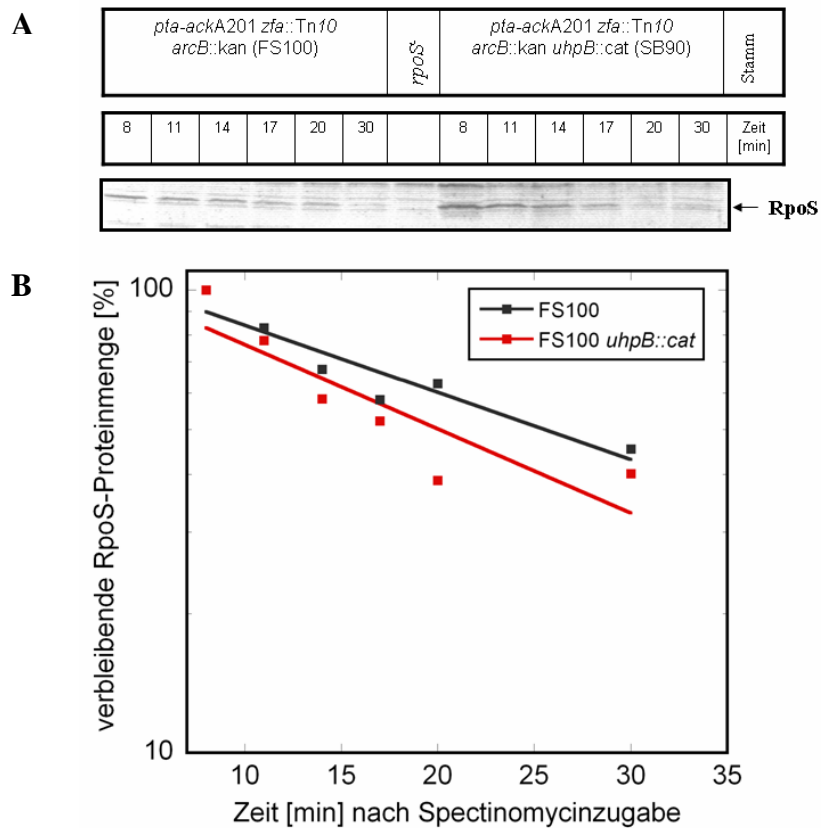


Abbildung 26: Eine *uhpB*-Mutation zeigt keine zusätzliche Stabilisierung von σ^S

Nichtradioaktives Abbauxperiment (in LB, bei 37°C, OD_{578nm} 2,5) der Doppelmutante FS100 (*pta-ackA201zfa::Tn10 arcB::kan*) im Vergleich zur Dreifachmutante SB90 (*pta-ackA201 zfa::Tn10 arcB::kan uhpB::cat*). Bei einer OD_{578nm} von 2,5 (Übergang zur stationären Phase) wurde den Kulturen Spectinomycin (Endkonzentration 1,5 mg/ml) zugesetzt und Immunoblotproben nach 8, 11, 14, 17, 20 und 30 min entnommen. 10µg Protein wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. RpoS wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen RpoS detektiert. Originalimmunoblotdaten (A) sowie ihre Quantifizierungen (B) sind gezeigt.

Unter diesen getesteten Bedingungen scheinen also eine andere Sensorkinase oder kleine Moleküle als Phosphodonoren für RssB zu fungieren, resultierend in einem weiteren RpoS-Abbau. Möglicherweise ist aber auch das UhpB/UhpA Zweikomponentensystem unter diesen getesteten Bedingungen nicht aktiv und zeigt infolgedessen keinen Einfluss auf die *rpoS*-Transkription und Proteolyse. Hierfür bleibt deshalb zu testen, ob unter anderen Wachstumsbedingungen (Minimalmedium oder auch Stresssituationen) ein Effekt der UhpB-Kinase ersichtlich wird.

Denkbar wäre aber auch, dass Acetylphosphat und ArcB die einzigen Phosphodonoren für RssB darstellen. In nicht-phosphorylierter Form könnte RssB durch die reduzierte Affinität an σ^S zu binden aber dennoch eine Art Basalrate der σ^S Proteolyse verursachen.

1. Zweikomponentensysteme: „Crosstalk“ und „unorthodoxe“ Regulation

Ein besonders wichtiger Mechanismus zur Anpassung von Mikroorganismen an die verschiedensten Umweltbedingungen stellt die Signaltransduktion und Regulation durch Zweikomponentensysteme dar. Lange Zeit wurden diese Zweikomponentensysteme als in sich geschlossene Signaltransduktionssysteme betrachtet, die auf einen bestimmten Stimulus reagieren und eine sehr spezifische Antwort auslösen. In den letzten Jahren häuften sich jedoch die Erkenntnisse, dass verschiedene Signaltransduktionswege miteinander kommunizieren können und damit in ein zelluläres Netzwerk integriert sind (Tschowri *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2006; McCleary *et al.*, 1993; Wanner 1992, Yaku *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 2007; Kato und Groisman, 2004; Szurmant *et al.*, 2008). In *Bacillus subtilis* zeigten Untersuchungen, dass jedes charakterisierte Zweikomponentensystem mindestens mit einem weiteren Phosphotransferweg interagiert (Msadek, 1999).

Ein prominentes Beispiel in *E.coli* stellt die Crossregulation zwischen ArcB, ArcA und RssB dar, welches höchstwahrscheinlich nur ein Modul des gesamten zellulären Netzwerkes repräsentiert. Hier erfolgt eine Vernetzung des ArcB/ArcA-Systems mit der generellen Stressantwort. Nachdem auch für das BarA/UvrY und das RcsC/D/B ein Einfluss auf die Transkription des Masterregulators der generellen Stressantwort (σ^S) zu beobachten war (Mika *et al.*, 2005), nicht jedoch für das EvgS/EvgA- und TorS/TorR-System, wurden innerhalb dieser Arbeit weitere Untersuchungen zur Crosstalk-/Crossregulationsbefähigung insbesondere mit dem ArcB/ArcA-, BarA/UvrY- und dem RcsC/D/B-System durchgeführt. Unter Anwendung des Ansatzes der globalen Genetik (ausführlich in Ergebnisteil 4 beschrieben) kristallisierte sich insbesondere das ArcB/ArcA-System zur Befähigung des Crosstalks heraus. Das BarA/UvrY- und RcsC/D/B-System schienen unter den getesteten Bedingungen einen eher linearen Signaltransduktionsweg zu verfolgen. Die mit diesen Mikroarrayanalysen erzielten Ergebnisse lieferten generell erste Hinweise auf eine differentielle Genregulation, die jedoch sowohl direkt oder aber auch indirekt sein kann. Eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse ist deshalb äußerst schwierig. Zusätzlich dazu führt das Ausschalten eines Responseregulators fast immer zu einem größeren Output. Beim Ausschalten der Sensorkinase hingegen kann der noch vorhandene Responseregulator durch Acetylphosphat oder möglicherweise auch durch andere Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert werden. Einige Kinasen fungieren unter bestimmten Bedingungen auch als Phosphatasen für ihren Partnerresponseregulator und erschweren dadurch die Interpretation der Mikroarrayergebnisse zusätzlich. Deshalb kann es sein, dass beim Ausschalten

der Sensorkinase ebenso ihre Phosphataseaktivität eliminiert ist, dem zugehörigen RR das Phosphat nicht mehr entzogen wird und er in dieser Situation eigentlich aktiv ist. Eine gezielte Aktivierung der Kinasen ist bislang nicht möglich, da in den meisten Fällen der physiologisch relevante Stimulus unbekannt ist.

Trotzdem konnten für das BarA/UvrY-System die *lsr*-Gene als differentiell reguliert identifiziert werden. Diese differentielle Regulation könnte darin begründet liegen, dass unter den getesteten Bedingungen (LB, stationäre Phase) BarA als Phosphatase an UvrY wirkt (Tomenius *et al.*, 2005). In einer *barA*-Mutante, der RR also im phosphorylierten aktiven Zustand vorliegt und die Expression der *lsr*-Gene beeinflussen kann. Bei dem direkten Vergleich einer *barA*-Mutante mit einer *uvrY*-Mutante auf ein und demselben Mikroarray würde man demzufolge eine UvrY(aktiv) versus UvrY⁻ Situation miteinander vergleichen. Konsistent mit diesen Daten aus *E.coli* sind zeitgleich gewonnene Untersuchungsergebnisse von *Photobacterium luminescens*. Dieses Bakterium gehört wie auch *E.coli* der Familie der Enterobacteriaceae an. Innerhalb der Arbeit von Krin wurden Transkriptomanalysen mit einem Wildtypstamm im Vergleich zur *uvrY*-Mutante durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte in Schneiders Medium in der späten exponentiellen Phase. UvrY übt auch hier einen positiven Effekt auf die *lsr*-Gene aus (Krin *et al.*, 2008). Um eine direkte Bindung des RR UvrY an den Promoterbereich des *lsr*-Operons nachzuweisen, wurde mit Bandschicht-Analysen begonnen. Dabei waren jedoch keine distinkten Shiftbanden zu erkennen, was auf einen indirekten Effekt von UvrY auf die *lsr*-Gene hindeutet. Eine Möglichkeit der indirekten Regulation der *lsr*-Gene könnte über das Csr (carbon storage regulator)-System verlaufen. Der RR UvrY wurde bereits als Aktivator der kleinen RNA CsrB beschrieben (Suzuki *et al.*, 2002). CsrB bindet an das RNA-bindende Protein CsrA und verhindert dessen regulatorischen Einfluss an anderen mRNAs (Liu *et al.*, 1997). Die Quorum sensing Gene könnten demnach unter regulatorischer Kontrolle von CsrA stehen. Der Effekt von UvrY auf die *lsr*-Gene in *Photobacterium luminescens* konnte bereits als indirekt über das Csr-System laufender Weg identifiziert werden (Krin *et al.*, 2008). In *Vibrio cholerae* induziert das VarS/VarA (Homolog zu *E.coli* BarA/UvrY) die Expression von drei kleinen RNAs CsrB/C/D, die ihrerseits an CsrA binden, dessen Aktivität inhibieren und darüber einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation (Quorum sensing) ausüben (Lenz *et al.*, 2005). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *Pseudomonas species* gemacht (Aarons *et al.*, 2000; Heeb *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2003; Burrowes *et al.*, 2005). Auch in *E.coli* spricht alles für die BarA/UvrY – CsrA/CsrB vermittelte Regulation der *lsr*-Gene. Dem-

nach ist das BarA/UvrY-System unter den getesteten Bedingungen mit dem Quorum sensing –System vernetzt, nicht jedoch mit einem anderen Zweikomponentensystem.

Ähnlich schwierig ist die Interpretation der Mikroarrayergebnisse für das ArcA/ArcB-System. Einer besonders starken differentiellen Regulation unterlagen hier die *csp*(cold shock protein)-Gene, die innerhalb dieser Arbeit als ArcB-abhängig aber ArcA- und RssB-unabhängig beschrieben werden konnten. Welche durch die Sensorkinase ArcB regulierte Komponente hier beeinflusst wird, ist bislang ungeklärt. Über die Regulation von z.B. CspB ist wenig bekannt. Die Expression des *cspB*-Gens wird durch eine so genannte „cold box“ innerhalb der 5`UTR reguliert und ist demnach kälteinduziert (Fang *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1994; Etchegaray *et al.*, 1996). Einen Hinweis, dass auch andere Zweikomponentensysteme an der Regulation der *csp*-Gene beteiligt sind lieferten Transkriptomanalysen aller Zweikomponentensysteme von Mizuno (Oshima *et al.*, 2002). In LB-Medium in der logarithmischen Phase war ein Einfluss des BasS/R-, BaeS/R-, EvgS/A, YehU/T und von ArcB insbesondere auf das *cspB*-Gen zu verzeichnen (Oshima *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde hier ein positiver Einfluss auf die Expression von *cspB* nur von der Sensorkinase ArcB beobachtet. Damit deutet sich ebenfalls an, dass ArcB neben ArcA andere Komponenten beeinflusst, die ihrerseits dann die Genexpression steuern. Diese Beobachtungen stehen jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, die einen negativen Einfluss von ArcB, der unabhängig von ArcA und RssB ist, beschreiben. Die Sensorkinase ArcB ist vermutlich erst dann in der Lage einen anderen Responseregulator zu bedienen, wenn ihre Partner ArcA und RssB nicht mehr bedient werden können. Dafür sprechen auch Untersuchungen zur Phosphorylierungskinetik. ArcB weist höchste Präferenz für ihren Partner ArcA auf und phosphoryliert diesen sehr schnell. RssB hingegen wird weniger schnell phosphoryliert (Mika *et al.*, 2005). Auch für andere Kinasen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass jeweils die Partnerresponseregulatoren sehr effizient und schnell phosphoryliert werden und Nichtpartner-Responseregulatoren weniger schnell bedient werden (Yamamoto *et al.*, 2005). Dies könnte auch auf ArcB und den noch nicht identifizierten dritten RR zutreffen. Der Grund für einen langsameren Phosphattransfer auf Nichtpartner-Responseregulatoren könnte darin liegen, dass dadurch ein ungewollter Crosstalk/Crossregulation in der Zelle verhindert wird (Groban *et al.*, 2009, Siryaporn *et al.*, 2008). Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des *in vivo* Crosstalks zwischen dem CpxA/CpxR-System und dem EnvZ/OmpR-System gemacht. Die Sensorkinase EnvZ ist erst in der Lage die Expression des *cpxP*-Promoters über den RR-CpxR zu

induzieren, wenn die Zelle Mutationen in den Genen *ompR*, *cpxA* und für die Acetylphosphatbildung trägt (Groban *et al.*, 2009).

Die beschriebene Crossregulation von RssB durch ArcB stellt in gewisser Weise einen „Sonderfall“ dar, da für RssB selbst keine zugehörige Kinase bekannt ist und RssB nicht wie die typischen RR mit einem Helix turn Helix Motiv ausgestattet ist, somit also eine Bindung an die DNA ausgeschlossen werden kann. RssB fungiert damit nicht als Transkriptionsaktivator oder –repressor. Seine Funktion als Targetingfaktor für den Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS übt RssB in phosphorylierter Form aus. Neuere Untersuchungen ergaben auch, dass kleine Proteine (Bsp. IraP) direkt an unphosphoryliertes RssB binden können und damit dessen Aktivität inhibieren (Bougdour *et al.*, 2006; Bougdour *et al.*, 2008). Zusätzlich haben in *vitro* Untersuchungen gezeigt, dass RssB ebenfalls in nicht phosphorylierter Form den Phosphattransfer innerhalb einiger Zweikomponentensysteme inhibiert. Der Mechanismus könnte in der Stimulierung der Dephosphorylierung der Sensorkinase liegen, wobei RssB selbst unphosphoryliert bleibt (Yamamoto *et al.*, 2005). Kommt diese in *vitro* Beobachtung tatsächlich in *vivo* zum Tragen, dann würde RssB eine globale Rolle bei der Regulation von Zweikomponentensystemen spielen. In den letzten Jahren sind eine Reihe von regulatorischen Komponenten, die entweder Sensorkinasen oder Responseregulatoren beeinflussen, beschrieben worden. Dazu zählen neben den Molekülen D-Laktat (Stimulierung der ArcB-Autophosphorylierung) und LPG (Inhibierung der Autophosphorylierung einiger Kinasen/diese Arbeit-Ergebnisteil 1) auch kleine Proteine (Roudriguez *et al.*, 2004; Szurmant *et al.*, 2008; Eguchi *et al.*, 2007; Kato und Groisman, 2004). Vorangegangene Untersuchungen und Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit beschreiben das kleine Protein YmgB als Konnektor des YcgF/E-Systems und des RcsC/D/B-Zweikomponentensystems (Tschowri *et al.*, 2009). YmgB (Zielgen des YcgF/E-Systems) exprimiert von einem Niedrigkopienvektor führte zur Reduktion der Expression der adhäsiven Curli-Fimbriengene (*csgEFG*), zur Stimulierung der Expression der Säureresistenzgene (*gadB*, *gadC*, *gadE*, *hdeA*) und einer Reihe anderer Gene. Diese Ergebnisse sind konsistent mit kürzlich beschriebenen Ergebnissen, die ebenfalls einen reprimierenden Einfluss von YmgB auf die Curlisynthesegene und einen aktivierenden Einfluss auf die Säureresistenzgene zeigten (Lee *et al.*, 2007). Eine Vielzahl der durch YmgB regulierten Gene, wie z.B. die Curlisynthesegene (*csg*), die Säureresistenzgene (*gad*), der Biofilmmodulierende Faktor (*bdm*), die Ausbildung des mukoiden Phänotyps durch die Kolansäureproduktion und andere stehen unter direkter oder indirekter Kontrolle des RcsC/D/B-Zweikomponenten-Phosphorelaysystems (Gottesman *et al.*, 1985; Hagiwara *et al.*, 2003;

Francez-Charlot *et al.*, 2005; Vianney *et al.*, 2005; Castanie-Cornet *et al.*, 2007; diese Arbeit Tabelle 8). Nachdem die Effekte von YmgB in einer *rscB*-Mutante aufgehoben waren (Tschowri *et al.* 2009), bestand deshalb die Vermutung, dass YmgB oberhalb von RcsB oder an dem RR selbst zu wirken scheint. Wie die Mikroarrayanalysen zeigten, hat YmgB keinen Einfluss auf die Expression der Gene des Rcs-Systems selbst. Es findet also keine Aktivierung von *rscC*, *rscB* und *rscD* durch YmgB statt. Schlussfolgernd daraus spielt YmgB möglicherweise eine Rolle bei der Aktivitätsmodulation von RcsB. YmgB ist ein kleines drei Helix-Protein und strukturell homolog zu Hha (Thermo- und Osmomodulator der Expression des Toxins α -Hemolysins). Untersuchungen von Hha zeigten, dass es mit dem DNA-bindenden Protein H-NS interagieren kann (Nieto *et al.*, 2000; Juarez *et al.*, 2000). Für YmgB wurde unter anderem deshalb spekuliert, dass es sich um eine Art Transkriptions-Koregulator handelt (Lee *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass YmgB jedoch an der Aktivitätsmodulation des Responseregulators RcsB beteiligt ist, lässt eher die Beschreibung von YmgB als so genannten Konnektor zu, der spezifisch das Rcs-Phosphorelaysystem aktiviert. Konnektoren wurden erst kürzlich identifiziert und stellen mittlerweile eine stetig wachsende Gruppe kleiner Proteine dar, die die Aktivität spezifischer Zweikomponentensysteme beeinflussen. Sie erlauben die Integration zusätzlicher Signale, die nicht durch die sensorische Inputdomäne der Sensorkinase wahrgenommen werden und vernetzen dadurch Zweikomponentensysteme mit anderen Systemen. Beispiele dafür stellen das kleine Protein B1500 in *E.coli* und PmrB in *Salmonella* dar. Das EvgS/EvgA Zweikomponentensystem aktiviert bei niedrigem pH-Wert die Expression von b1500 (Eguchi *et al.*, 2007). Als kleines integrales Membranprotein interagiert es mit der Sensorkinase PhoQ und aktiviert diese. Die Expression von *pmrD* ist PhoQ/PhoP-abhängig. Das zytosolische kleine Protein PmrD bindet an den N-Terminus des RR PmrA und verhindert dessen Dephosphorylierung (Kato und Groisman, 2004). Die funktionelle Wirkweise von Konnektoren kann also an verschiedenen Reaktionsschritten innerhalb des Zweikomponentensystems anzutreffen sein. Sie können neben der Phosphorylierung auch den Phosphattransfer und Dephosphorylierungsreaktionen innerhalb von Zweikomponentensystemen beeinflussen. YmgB moduliert RcsB so, dass es im aktiven oder sogar hyperaktiven Zustand vorliegt. Das würde bedeuten, dass YmgB entweder die Aktivierung bzw. Phosphorylierung von RcsB stimuliert oder aber die Dephosphorylierung von RcsB durch die Kinase RcsC verhindert. YmgB könnte z.B. eine Konformationsänderung innerhalb der Sensorkinase RcsC verursachen und diese in ihren Kinasemodus überführen, was dann zur Aktivierung von RcsB führt. Oder aber YmgB agiert an RcsB selbst und verhindert dessen

Dephosphorylierung. Ein weiterer Angriffspunkt könnte auch die Hpt-Domäne RcsD darstellen. An welcher Stelle YmgB tatsächlich angreift erfordert weitere Untersuchungen und bleibt deshalb an dieser Stelle noch ungeklärt. Kürzliche Untersuchungen der *ycgZ-ymgABC* Gene zeigten, dass eine erhöhte Expression dieser Gene bei der Entwicklung (Reifung) eines Biofilms zu verzeichnen war (Domka *et al.*, 2007). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass der Signaltransduktionsweg YcgF/E/YmgB das Rcs- Phosphorelay-system aktiviert, unterstützen die Rolle des Rcs-Systems bei der Biofilmreifung (Majdalani *et al.*, 2005; Beloin *et al.*, 2008).

Aus der Vielzahl der durchgeführten Untersuchungen von Zweikomponentensystemen und deren Möglichkeit miteinander kommunizieren zu können, kann geschlussfolgert werden, dass Zweikomponentensysteme sehr wohl mit anderen Systemen vernetzt sind (BarA/UvrY/CsrB – Quorum sensing System; YcgF/E/YmgB – Rcs-System), die aber in den meisten Fällen keine anderen Zweikomponentensysteme darstellen. Eine solche Vernetzung kann zum Beispiel über kleine Proteine erfolgen, die durch ein System induziert werden und einen modulierenden Einfluss an einem zweiten System ausüben (YcgF/E/YmgB – Rcs-System). Damit wird eine zusätzliche Signalintegration erreicht, die nicht über die sensorische Inputdomäne der Sensorkinase verläuft und dem Bakterium erlaubt, auf verschiedene Stresssituationen zu reagieren. Eine direkte Vernetzung von zwei unterschiedlichen Zweikomponentensystemen *in vivo*, bei der die Sensorkinase einen Nichtpartner-Responseregulator durch Phosphorylierung aktiviert ist mit wenigen Ausnahmen (ArcB/ArcA/RssB) offenbar nicht in der Zelle anzutreffen. Die Zelle verhindert somit einen ungewollten Crosstalk bzw. eine ungewollte Crossregulation, die schädliche Auswirkungen für die Zelle haben könnte.

2. Die Rolle der Phospholipase RssA bei der Kontrolle von ArcB/ArcA/RssB und anderen Zweikomponentensystemen

2.1. Das RssA Spaltungsprodukt LPG hemmt neben ArcB auch BarA, BaeS und RstB in ihrer Autophosphorylierung

Mit der Identifizierung von RssA als eine bakterielle patatin-ähnliche PhospholipaseA₂, die hauptsächlich Phosphatidylglycerin (PG) in Lysophosphatidylglycerin (LPG) und freie Fettsäuren spalten kann, eröffneten sich eine Reihe von Fragen bezüglich der physiologischen Rolle von RssA/LPG (Marquardt M. Dissertation 2007). Zu Beginn dieser Arbeit konnte durch *in vitro* Phosphattransferexperimente bereits ein Einfluss des Spaltungsproduktes LPG auf den Phosphattransfer von der Sensorkinase ArcB auf den Responseregulator RssB nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Phosphatübertragung mit steigender LPG-Konzentration sinkt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein weiterer Versuchsansatz mit ArcB und LPG durchgeführt, bei denen beide Komponenten gleichzeitig mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert wurden. In diesem Fall fand also keine Vorphosphorylierung der Sensorkinase statt und die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes lieferten demzufolge eine Aussage über die Autophosphorylierungsfähigkeit von ArcB in Anwesenheit von LPG. Auch hier war eine reduzierte Phosphorylierung von ArcB mit Zunahme der LPG-Konzentration zu verzeichnen, die auch zu einem reduzierten Phosphattransfer auf den Responseregulator RssB führte. Betrachtet man den Phosphattransfer von ArcB auf RssB genauer, so ist der Effekt auf der RssB-Ebene deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 1). Dies könnte zum einen damit zu erklären sein, dass die Autophosphorylierung von ArcB nicht vollständig durch LPG gehemmt wird und nach dem Übertragen des Phosphatrestes auf RssB erneut eine teilweise Autophosphorylierung von ArcB stattfinden könnte. Zum anderen könnte die Autophosphataseaktivität von ArcB durch LPG stimuliert werden und somit zur sichtbar reduzierteren RssB-Phosphorylierung durch den Abzug des Phosphatrestes von RssB führen.

Eine Hemmung der Autophosphorylierung in Anwesenheit von LPG konnte auch für drei weitere Kinasen BarA, BaeS und RstB beobachtet werden (Abb. 2). Demzufolge könnte LPG eine generelle Rolle bei der Beeinträchtigung von Zweikomponentensystemen bzw. deren Sensorkinasen spielen.

Doch auf welche Art und Weise kann LPG überhaupt die Aktivität von ArcB und der anderen Kinasen kontrollieren?

ArcB ist (ebenso wie BarA) eine sogenannte Hybridsensorkinase, die mit ihren zwei Transmembranhelices in der Zytoplasmamembran verankert ist. Interessanterweise wird dieser Membrananker weder für die Autophosphorylierung noch für die Phosphattransferreaktionen benötigt (Georgellis *et al.*, 1997, Kwon *et al.*, 2000). Auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Phosphorylierungsexperimente wurde die lösliche ArcB-Variante benutzt, bei der dieser Membrananker fehlt. Das deutet auf ein Wirken von LPG am hydrophilen, zytosolischen Teil der Sensorkinase hin. In Wildtypsituationen ist dieser, in das Zytoplasma ragende Teil durch die Verankerung nahe der Zytoplasmamembran lokalisiert. Dies ist genau der Ort, an dem die lösliche Phospholipase RssA die Spaltung der Membrankomponente Phosphatidylglycerin zu Lysophosphatidylglycerin und freie Fettsäuren vornimmt. Diese räumliche Nähe von LPG und Kinase *in vivo* lässt ebenfalls vermuten, dass unter diesen Bedingungen sehr geringe Mengen des Spaltungsproduktes LPG für eine Beeinflussung der Kinase ausreichend sind. Die in den *in vitro* Experimenten verwendeten hohen Mengen an LPG sind vermutlich deshalb nötig, da eben gerade diese räumliche Nähe in Lösung nicht gegeben ist. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass ähnlich hohe Konzentrationen von Quinonen und D-Laktat nötig waren, um deren Effekt auf die lösliche Form von ArcB zeigen zu können (Georgellis *et al.*, 2001, Malpica *et al.*, 2004, Rodriguez *et al.*, 2004). In Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt eine Inhibition der Kinase ArcB durch die in der Membran teilweise frei beweglichen Elektronentransporter, die Quinone. Wenn hohe Sauerstoffmengen verfügbar sind und/oder unter energielimitierenden Bedingungen liegen die Quinone in oxidiertem Zustand vor. In diesem Zustand können sie auch den zwei Cysteinen der zwei ArcB-Monomere die Elektronen entziehen, was zur Auflockerung der Anordnung der zwei ArcB-Monomere zueinander führt und die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht. Die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücken innerhalb des ArcB-Homodimers führt dann zur Inaktivierung der Kinase (Malpica *et al.*, 2004).

Die Autophosphorylierung einer Histidin-Kinase ist abhängig von deren Input- und Dimerisierungsdomäne, denn sie wird in *trans* vollzogen. Im Fall von ArcB bildet sich ein Homodimer, bei dem die zwei zytosolischen Reste der Monomere so zueinander gedreht angeordnet sind, dass die Cysteinreste auf gegensätzlichen Seiten relativ zueinander lokalisiert sind. Diese Anordnung führt zum Zustand einer aktiven ArcB-Kinase und ist unter anaeroben Bedingungen anzutreffen. ArcB ist dann unter ATP-Verbrauch zur Autophosphorylierung befähigt und kann seinen Responseregulator ArcA und auch RssB

transphosphorylieren (Malpica *et al.*, 2004, Mika *et al.*, 2005). Sauerstoffverfügbarkeit und/oder Nährstoffmangelbedingungen sind entscheidend für die Aktivierung von ArcB.

Eine Membranverankerung der Kinase ist also *in vivo* vermutlich auch entscheidend für die Interaktion mit dem membranlokalisierten Effektor-Molekül LPG. Interessant wäre deshalb die Fragestellung, ob auch eine nicht membrangebundene Sensorkinase wie zum Beispiel NtrB auf LPG anspricht oder ob tatsächlich nur membrangebundene Sensorkinasen durch LPG beeinflusst werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich membrangebundene Kinasen untersucht.

Hybridsensorkinasen bewerkstelligen ihren Phosphattransfer über die Transmitterdomäne (H1), gefolgt vom Receiver-Modul (D1) auf eine Hpt-Domäne (H2). Die Hpt-Domäne (H2) besitzt keine katalytische Aktivität sondern präsentiert dem Responseregulator das Phosphat.

LPG könnte als allosterischer Effektor wirken. Eine solche Regulation von ArcB wurde bereits mit D-Laktat beobachtet (Rodriguez *et al.*, 2004). Der unter anaeroben Bedingungen gebildete fermentative Metabolit D-Laktat wirkt an der bereits aktiven Kinase ArcB zusätzlich stimulierend. Während Quinone ein direktes Signal für ArcB darstellen, fungiert D-Lactat also eher als allosterischer Effektor.

In *vitro* Untersuchungen zum Einfluss von D-Laktat auf verschiedene ArcB-Varianten lassen vermuten, dass die mögliche Bindung des Effektormoleküls D-Laktat in der Receiverdomäne D1 von ArcB lokalisiert ist oder das Vorhandensein dieser Receiverstruktur dem Effektormolekül erlaubt an die Transmitterdomäne H1 zu binden (Georgellis *et al.*, 1999). Diese Möglichkeiten könnten auch auf LPG zutreffen. Als eine Möglichkeit, den Wirkort von LPG einzugrenzen könnten verkürzte Versionen und Mutationen in den konservierten Phosphorylierungsstellen innerhalb von ArcB herangezogen werden.

Doch wie verhält es sich für die anderen in dieser Arbeit getesteten Kinasen. Bei BarA handelt es sich ebenfalls um eine Hybridsensorkinase, weshalb hier die Wirkweise ähnlich wie bei ArcB von statten laufen könnte. BarA unterscheidet sich zu ArcB lediglich durch das Vorhandensein einer HAMP-Domäne, während ArcB eine PAS-Domäne besitzt. PAS-Domänen sind in vielen Signalproteinen anzutreffen und fungieren als Signalsensor. HAMP-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltweiterleitung. Sie verbinden den extrazellulären Teil mit dem intrazellulären Teil der Signalproteine und sind in der Lage über Rotationsbewegungen eine Konformationsänderung zu vollziehen (Hulko *et al.*, 2006). Da beide Kinasen (ArcB, BarA) gleichermaßen durch LPG in ihrer Autophosphory-

lierung gehemmt werden scheinen diese beiden Domänen nicht unbedingt ausschlaggebend für die Rolle von LPG zu sein.

Die zwei anderen Kinasen BaeS und RstB sind einfach aufgebaute Kinasen und weisen neben den ebenfalls vorhandenen Transmembranhelices und der HAMP-Domäne, nur die Transmitterdomäne H1 auf, von der aus direkt das Phosphat auf den jeweiligen Response-regulator übertragen wird. Trotzdem erfolgt auch hier eine Hemmung dieser Kinasen in Anwesenheit von LPG, die zudem deutlich stärker ausgeprägt ist als im Fall von ArcB und BarA. Der Wirkort von LPG könnte also möglicherweise innerhalb der Transmitterdomäne H1 liegen. Ob LPG direkt an die Kinasen bindet und welche Regionen tatsächlich von Bedeutung sind bedarf weiterer Untersuchungen.

2.2. Die Wirkung auf Sensorkinasen ist spezifisch durch LPG vermittelt, Palmitinsäure zeigt keine Autophosphorylierungshemmung

Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert ist LPG in der Lage neben ArcB auch BarA, BaeS und RstB in ihrer Autophosphorylierung zu hemmen. Neben LPG entstehen jedoch als zweites Produkt aus der RssA vermittelten Spaltung von PG die freien Fettsäuren. Die Vermutung, dass die Wirkung auf die Sensorkinasen spezifisch durch LPG vermittelt wird beruht auf der Tatsache, dass RssA spezifisch die strukturell sehr ähnlichen Substrate PG und CL spalten kann. Das in der Membran mit ca. 75% vertretene Phosphatidylethanolamin (PE) jedoch bleibt durch RssA/LPG unbeeinflusst (Marquardt, Dissertation 2007). Wären freie Fettsäuren die regulatorische Komponente, dann würde man erwarten, dass RssA eher unspezifisch an den Membrankomponenten angreift, um freie Fettsäuren zu generieren. Dies würde wiederum zur Instabilität der Zytoplasmamembran führen und wäre für die Zelle vermutlich toxisch. In Eukaryoten konnte gezeigt werden, dass durch Phospholipasen generierte Fettsäuren durchaus als Signalmolekül für Kinasen dienen und dadurch z.B. den Zelltod, Differenzierungsereignisse und das Wachstum regulieren (Shinomura *et al.*, 1991). Aber auch in *Bacillus subtilis* wird eine Inhibition der Proteinkinase KinA durch freie Fettsäuren spekuliert (Strauch *et al.*, 1992). In diesen Fällen handelte es sich jedoch hauptsächlich um einen Einfluss von ungesättigten Fettsäuren. Freie Fettsäuren spielen, wie die oben angeführten Beispiele zeigen, ebenfalls eine Rolle als Signalmoleküle für Kinasen.

Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, dass spezifisch LPG als Effektormolekül für die Sensorkinasen fungiert und freie Fettsäuren keinen Einfluss haben, wurde zusätzlich der Einfluss von Palmitinsäure (gesättigte Fettsäure, Hexadekansäure) auf die ArcB-

Phosphorylierung *in vitro* untersucht. Die Spaltung von Phosphatidylglycerin (PG) durch RssA an der Position 1 des Phosphatidylrückgrat liefert neben LPG als freie Fettsäure Palmitinsäure. Autophosphorylierungsexperimente zeigten eindeutig, dass Palmitinsäure keinen Einfluss auf die Sensor kinase ArcB ausübt und untermauern damit die Spezifität von LPG (Abb. 3). Die bei der durch RssA-vermittelten Spaltungsreaktion zusätzlich entstehenden freien Fettsäuren werden vermutlich abgebaut und dienen dabei der Zelle als Energiequelle.

2.3. RssA hat globale Auswirkungen auf die genomweite Genexpression

Nicht immer sind *in vitro* beobachtete Effekte auch *in vivo* nachzuweisen, weshalb eine Schlussfolgerung basierend auf *in vitro* Beobachtungen nicht immer die tatsächliche *in vivo*-Situation widerspiegelt.

Dass RssA tatsächlich auch eine Rolle *in vivo* spielt konnte mit gesamtgenomischen Mikroarrayanalysen gezeigt werden. Obwohl RssA hier abgekoppelt von dessen Rolle bei der σ^S -Kontrolle untersucht wurde, waren Effekte auf die globale Genexpression zu verzeichnen. Auch in Abwesenheit von RssB beeinflusst RssA die Expression vieler Gene, wobei die meisten dieser Gene (mit Ausnahme des *deo*-Operons) herunterreguliert erschienen (Abb. 4). Die durch RssA regulierten Gene können dabei in drei verschiedene Gruppen, die je ein spezifisches Regulationsmuster repräsentieren, eingeteilt werden. In Gruppe II fallen die Gene, deren Regulation durch RssA im zusätzlichen *arcA*⁻-Hintergrund vollständig aufgehoben war. Durch das zusätzliche Ausschalten des Responseregulators ArcA wird der Einfluss von RssA/LPG auf die Sensor kinase ArcB nicht mehr sichtbar. Hier wirkt RssA/LPG also eindeutig über das ArcB/ArcA-System. Einige dieser regulierten Gene sind bereits als ArcA kontrollierte Gene beschrieben worden (Liu and de Wulf, 2004; Salmon *et al.*, 2005).

Ein komplexeres Regulationsmuster wurde für die Gengruppe III beobachtet. Diese Gene sind nur durch RssA reguliert, wenn der Responseregulator ArcA fehlt bzw. dessen Gen deletiert wurde. Möglicherweise sind diese Gene durch einen weiteren Responseregulator X reguliert, der durch Crosstalk von der ArcB-Sensor kinase phosphoryliert werden kann. ArcB jedoch erst dann diesen noch nicht identifizierten möglichen Responseregulator bedient, wenn die beiden zugehörigen Responseregulatoren ArcA und RssB nicht vorhanden sind. Ob eine solche Situation tatsächlich in einer Zelle vorkommt oder ob es sich hierbei um einen künstlich herbeigeführten Effekt handelt bleibt eher spekulativ. Es kann aber durch eventuelle spontane Mutationsereignisse in beiden Genen nicht ausgeschlossen wer-

den, dass eine solche Situation tatsächlich erreicht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden bei *in vivo* Crosstalk Untersuchungen der Zweikomponentensysteme CpxA/CpxR und EnvZ/OmpR gemacht. Auch hier konnte erst ein Crosstalk der Sensorkinase EnvZ mit dem Responseregulator CpxR festgestellt werden, nachdem der RR OmpR und die SK CpxA deletiert wurden und die Zelle kein Acetylphosphat mehr bilden konnte (Groban *et al.*, 2009).

Die letzte Gruppe(I), der durch RssA regulierten Gene sind völlig unabhängig vom ArcB/ArcA-Signalweg. Hier findet also eine RssA/LPG Regulation sowohl im *arcA*⁺ als auch im *arcA*⁻ - Hintergrund statt. ArcB scheint also auch *in vivo* nicht das einzige Ziel von RssA/LPG zu sein.

Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass neben dem Arc-System möglicherweise noch weitere Zweikomponentensysteme oder andere Systeme durch RssA/LPG beeinflusst werden. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen der Sensorkinasen BarA, BaeS und RstB, die ebenfalls durch LPG in ihrer Autophosphorylierung gehemmt werden, unterstützt. Ob jedoch die Gene der Gruppe I unter direkter Kontrolle eines dieser Systeme (BarA/UvrY, BaeS/BaeR, RstB/RstA) stehen muss noch untersucht werden. Abschließend müssen diese Daten jedoch als vorläufig betrachtet werden. Grund hierfür ist die Verwendung sehr komplizierter Stammkonstruktionen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war es nicht möglich eine chromosomale Punktmutation in RssA zu generieren. Deshalb wurde das *rssA*-Gen vollständig deletiert. Des Weiteren wurden die *rssB*-Mutationen in den zu vergleichenden Stämmen unterschiedlich konstruiert. Der RssA⁻RssB⁻ - Stamm ist eine Deletionsmutante. In dem RssA⁺RssB⁻ - Stamm wurde die *rssB*-Mutation durch die Insertion eines Transposons (Tn10) generiert. Damit ist RssB funktionell nicht mehr in der Lage RpoS zu beeinflussen, aber es besteht aufgrund der Lage des Transposons die Möglichkeit der Ausbildung eines sehr kleinen N-terminalen Stücks von RssB. Obwohl unvollständig gebildete Proteine sehr schnell durch Proteasen abgebaut werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Stück möglicherweise hier ebenfalls *in vivo* Effekte ausübt.

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Daten deshalb nur vorläufig geschlussfolgert werden, dass die σ^S -abhängige Phospholipase RssA über ihr Spaltungsprodukt LPG einen modulierenden Einfluss auf Zweikomponentensysteme und damit deren Zielgene ausübt. Die kürzliche Entdeckung von so genannten „Konnektoren“, kleine regulatorische Proteine, die ebenfalls einen Einfluss auf die Phosphorylierung und den Phosphotransfer von Zweikomponentensystemen ausüben und somit die Genexpression steuern, zeigt, dass die

Signalintegration in Zweikomponentensysteme nicht nur über die sensorische Domäne der Kinase erfolgt (Tschowri *et al.*, 2009; Eguchi *et al.*, 2007; Kato and Groisman, 2004; Kato *et al.*, 2007). Eine Vielzahl von Zweikomponentensystemen reagiert auf ganz spezifische Stresssignale, nach deren Eintreffen eine sehr schnelle und präzise Antwort ausgelöst wird. Zellen die jedoch in die stationäre Phase eintreten werden durch die σ^S -abhängige generelle Stressantwort geschützt. Darüber hinaus werden die Zellen selbst auf noch nicht erfahrene Stresssituation vorbeugend vorbereitet. Ein Andrehen von stress-spezifischen Antworten durch Zweikomponentensysteme würde in dieser Situation zu unnötigem Energieverbrauch führen, weshalb eine Herunterregulation von Zweikomponentensystemen durch RssA/LPG in dieser Phase durchaus Sinn macht. Die Rolle von Zweikomponentensystemen bei der spezifischen Stressanpassung in wachsenden Zellen könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass keines der 62 Gene in *E.coli*, die für eine Komponente von Zweikomponentensystemen kodieren, in der stationären Phase durch σ^S induziert wird (Weber *et al.*, 2005).

Obwohl alle vorangegangenen Untersuchungen einen eindeutigen Hinweis liefern, dass über LPG die Zweikomponentensysteme beeinflusst werden, kann für die *in vivo*, beobachteten Effekte von RssA nicht ausschließlich dessen enzymatische Aktivität als Begründung herangezogen werden. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war es nicht möglich eine Punktmutation im Chromosom zu generieren, deshalb wurden diese *in vivo* Untersuchungen mit einer *rssA*-Deletionsmutante durchgeführt. Hier ist also nicht nur das für die enzymatische Aktivität von RssA so essentielle Serin an Position 41 verändert, sondern es fehlt das gesamte Protein. Demzufolge könnten auch andere Domänen von RssA regulatorische Einflüsse ausüben. Es bleibt deshalb mit einer Punktmutation im Serin 41 innerhalb von RssA im Chromosom zu klären, ob alle *in vivo* beobachteten Effekte auf die enzymatische Aktivität zurückzuführen sind. Des Weiteren ist die Ergebnisinterpretation, wie eingangs bereits erwähnt, durch die Verwendung der unterschiedlich konstruierten *rssB*-Mutationen in den beiden Stämmen als vorläufig zu betrachten und mit einheitlich konstruierten *rssB*-Mutationen zu verifizieren.

Trotzdem kann abschließend postuliert werden, dass RssA einen Einfluss auf die genomweite Genexpression in *E.coli* hat und dies vermutlich durch seine Funktion als Phospholipase über das entstehende Spaltungsprodukt LPG realisiert.

2.4. Das zu PG sehr ähnliche Cardiolipin wird ebenfalls durch RssA gespalten

Bei Cardiolipin (CL) handelt es sich um ein Phosphatidylglycerol (PG)-Derivat, welches mit ca 5% in der Membran vertreten ist (Cronan, 2003). Es ist ebenso wie PG anionisch besitzt aber im Gegensatz zu PG zwei Phosphatgruppen, weshalb der Trivialname Diphosphatidylglycerol lautet. Strukturell sind sich die beiden in der Membran vorkommenden Phospholipide sehr ähnlich. Daraus resultierte die Vermutung, dass möglicherweise auch Cardiolipin durch RssA gespalten werden kann. Diese Annahme konnte durch den biochemischen Nachweis der aus der Reaktion hervorgehenden freien Fettsäuren bestätigt werden (Abb. 5) Cardiolipin dient RssA also ebenfalls als Substrat. Da Cardiolipin hauptsächlich an den Zellpolen lokalisiert ist, könnte also auch hier die Spaltungsreaktion stattfinden. Die Verwendung von den zwei strukturell sehr ähnlichen Substraten PG und CL könnte auch darin begründet liegen, dass Zweikomponentensysteme mit Cardiolipin und Phosphatidylglycerin in der Membran kolokalisiert vorliegen. Vielleicht sind spezielle Zweikomponentensysteme vorwiegend an den Zellpolen lokalisiert, während andere über die Membran verteilt sind. Die Synthese von Cardiolipin wird bei hohen Osmolaritäten induziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cardiolipin mit dem Osmosensorischen Transporter ProP an den Zellpolen kolokalisiert vorliegt und dessen Funktion moduliert (Romantsov *et al.*, 2008; Romantsov *et al.*, 2009). Solch eine Kolokalisierung könnte also auch bei der Regulation von Zweikomponentensystemen durch das Spaltungsprodukt LPG von Bedeutung sein. Andererseits könnte die Spaltung von Cardiolipin durch RssA unter normalen Wachstumsbedingungen eine Kolokalisierung mit ProP verhindern und damit die Unterdrückung der osmotischen Stressantwort bewirken.

Die Spaltung des mit 20% in der Membran vorhandenen PG und des mit 5% vorhandene CL durch RssA bedeutet aber auch, dass die Membranzusammensetzung sehr stark gestört wird und somit für die Zelle toxisch sein könnte. Eine Überproduktion von RssA ist jedoch möglich, schädigt also die Zelle nicht und lässt einen zusätzlichen Regulationsmechanismus zur Feinkontrolle von RssA vermuten. Zusätzlich ändert sich die Membranzusammensetzung bei Überproduktion von RssA nicht (persönliche Information, A. Flieger). Eine mögliche Rolle bei der Feinkontrolle von RssA könnte dessen C-terminale Domäne spielen. Das patatin-ähnliche Protein ExoU in *Pseudomonas aeruginosa* besitzt ebenfalls Phospholipaseaktivität und wird durch einen Co-Faktor oder durch die Modifikation in der Wirtszelle aktiviert (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003). Als möglichen Angriffsort des Co-Faktors oder anderer Modifikationsereignisse wird auch hier der C-Terminus spekuliert.

E.coli besitzt ein zweites patatin-ähnliches Protein, YjjU. Erste Untersuchungen zeigten, dass eine Überproduktion dieses Proteins nicht möglich ist. Die Expression und Regulation scheint sich von RssA drastisch zu unterscheiden (unveröffentlichte Daten, Angela Paasch, Diplomarbeit).

3. Das RcsC/D/B-System wirkt pleiotrop über die kleine RNA RprA

Im Gegensatz zu anderen Zweikomponentensystemen handelt es sich bei dem RcsC/D/B-System um ein komplexes Phosphorelaysystem. Derzeit sind eine Reihe von Plasmiden (z.B. DjlA), Mutationen und bestimmte Umweltbedingungen beschrieben, die dieses System aktivieren können. Es spielt eine wesentliche Rolle unter Osmoschockbedingungen und reagiert auf Membranveränderungen (z.B. über RcsF –Außenmembranlipoprotein) (Francez-Charlot *et al.*, 2005; Castanie-Cornet *et al.*, 2006; Majdalani *et al.*, 2005). Zu den durch das Rcs-System regulierten Genen zählen die Kapselsynthesegene (Gottesman *et al.*, 1985), der Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS über die kleine RNA RprA (Majdalani *et al.*, 2002), eine Reihe von Genen, die eine Rolle bei der Biofilmbildung spielen (Francez-Charlot *et al.*, 2005; Vianney *et al.*, 2005; Ferrieres und Clarke, 2003), einige Gene, die auf Osmolaritätsveränderungen reagieren (Boulangier *et al.*, 2005; Davalos-Garcia *et al.*, 2001), sowie Gene der Säureresistenz (Castanie-Cornet *et al.*, 2007) und der Flagellensynthese (Francez-Charlot *et al.*, 2003). Dieses Phosphorelaysystem reguliert also eine Vielzahl zellulärer Funktionen, von denen die meisten eine Rolle während der Biofilmbildung spielen. Interessanterweise wird auch die kleine RNA RprA positiv durch den Responseregulator RcsB reguliert (Majdalani *et al.*, 2002). Innerhalb der letzten Jahre wurden immer mehr kleine RNAs mit regulatorischen Funktionen identifiziert. Bei RprA handelt es sich um eine in trans codierte kleine RNA, die an einer anderen Stelle im Chromosom lokalisiert ist, als ihr bisher einziges beschriebenes Zielgen *rpoS*. Die vielfältige Rolle des Rcs-Systems bei der Regulation zellulärer Funktionen und die durch dieses System induzierte kleine RNA RprA legten die Vermutung nahe, dass neben *rpoS* möglicherweise auch andere Gene durch RprA reguliert werden können.

3.1. Die globale Wirkung von RcsB ist überwiegend über die RNA RprA

Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass unter den speziellen Untersuchungsbedingungen (LB, 28°C, späte stationäre Phase) die Wirkung von RcsB tatsächlich hauptsächlich über die kleine RNA RprA ausgeübt wird. Bei dem Vergleich des durch Mikroarrayanalysen ermittelten RcsB-Regulons mit dem RprA-Regulon waren mit Ausnahme des *araF*-Gens alle differentiell regulierten Gene identisch. Damit zeichnen sich neue Zielgene für die kleine RNA RprA ab. Eine besonders große Gruppe von regulierten Genen bildeten die Curlisynthesegene und andere durch den Transkriptionsfaktor CsgD regulierten Gene. Der Transkriptionsfaktor CsgD kristallisierte sich somit als ein Kandidat für die direkte negative Regulation durch RprA heraus. Dies passt zu den Daten von

Tschowri *et al.* (2009) und Vianney *et al.* (2005), wo gezeigt wurde, dass die Curlisynthese durch das Rcs-System inhibiert wird. Eine weitere Gruppe von regulierten Genen stellen die Säureresistenzgene (*gad*, *hde*), die unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors GadE stehen, dar (Ma *et al.*, 2003; Hommais *et al.*, 2004; Weber, Dissertation). Ein weiteres direktes Zielgen von RprA könnte also auch GadE sein. Betrachtet man das Ausmaß der Regulation (Ratios) eingehender, so sind insbesondere die Ratios der *csg*-Gene des RcsB-Regulons identisch zu den Ratios des RprA-Regulons (vgl. *csgD*-Ratios 0,064 mit 0,068 in Tab.7). Daraus könnte man schlussfolgern, dass hier tatsächlich nur RprA die regulatorische Komponente darstellt. Diese Schlussfolgerung wird unter anderem durch das Nichtvorhandensein einer typischen RcsB-Box (Carballes *et al.*, 1999) innerhalb des *csgD*-Promoters bekräftigt. Vorläufige Bindestudien (Bandshift-Analysen) zeigten zusätzlich, dass die konstitutiv aktive Variante von RcsB (RcsB^{D56E}) nicht in der Lage ist an den *csgD*-Promoter zu binden (Daten nicht gezeigt). RcsB selbst scheint also offenbar nicht direkt am *csgD*-Promoter zu wirken.

Im Gegensatz dazu stehen die sehr unterschiedlichen Ratios der beiden Mikroarrayansätze für die *hde*-Gene (Vgl. *hdeA*-Ratio 106,567 mit 2,582). Eine besonders starke Aktivierung ist bei dem ersten Mikroarrayansatz [*rscC*-Mutante (RcsB⁺RprA⁺) im Vergleich zur *rscBC*-Mutante (RcsB⁻RprA⁻)] zu verzeichnen. Hier könnten beide Komponenten RcsB und RprA eine regulatorische Funktion ausüben und in einem so genannten feed forward loop wirken. Diese Aktivierung der *hde*-Gene könnte also auf zwei verschiedenen Ebenen erfolgen. Der Responseregulator RcsB könnte die Transkription der *hde*-Gene aktivieren, während die kleine RNA RprA möglicherweise die *hde*mRNA stabilisiert und die Translation effizient und ungehindert ablaufen kann. Der zweite Mikroarrayansatz [*rscC*-Mutante (RcsB⁺RprA⁺) im Vergleich zur *rscC rprA*-Doppelmutante (RcsB⁺RprA⁻)] lieferte nur noch eine 2,5-fache differentielle Regulation des *hdeA*-Gens. Diese Regulation erfolgt hier ausschließlich über die kleine RNA. Da in diesen beiden Stämmen der Responseregulator nach wie vor vorhanden ist, wird eine differentielle Genregulation, verursacht durch RcsB, hier nicht sichtbar. Ob es sich bei den eben genannten *hde*-Genen tatsächlich um direkte Zielgene für RcsB und RprA handelt oder ob ein vorgeschaltener Transkriptionsregulator durch RcsB und RprA beeinflusst wird, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Diese Erkenntnisse dienen deshalb als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Von besonderer Bedeutung könnte jedoch der Transkriptionsaktivator GadE sein. GadE selbst unterliegt ebenfalls der Regulation von RcsB und RprA. Des Weiteren erscheinen die GadE-abhängigen Gene *gadB* und *gadC* als reguliert und auch die eben disku-

tierten *hde*-Gene stehen unter der Kontrolle von GadE. Ein weiteres potentiell direktes Zielgen von RcsB und RprA könnte demnach GadE darstellen. Eine Rolle des Rcs-Systems bei der Glutamat-abhängigen Säureresistenz wurde bereits durch Arbeiten von Castanie-Cornet postuliert. Dabei scheinen basale RcsB-Mengen zusammen mit GadE diese Resistenz zu vermitteln, wohingegen eine Überproduktion von RcsB (vom Plasmid) oder dessen Aktivitätsstimulierung (durch Überproduktion von DjIA) dazu führte, dass die Zellen weniger säureresistent waren (Castanie-Cornet *et al.*, 2006). Diese Daten stehen im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, die bei chromosomaler Überproduktion von RcsB und RprA eine deutliche Aktivierung der Säureresistenzgene zeigten. Zusätzlich werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen gestützt, die in Anwesenheit des kleinen Proteins YmgB, welches den RR RcsB aktivierend moduliert, gewonnen wurden. Auch hier war eine deutliche positive Regulation der Säureresistenzgene zu verzeichnen (Tschowri *et al.*, 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsbedingungen (LB, 28°C) unterscheiden sich jedoch von den Untersuchungsbedingungen von Castanie-Cornet (LBG, 37°C) und könnten deshalb den Grund für die gegensätzlichen Daten darstellen.

3.2. Die Wirkung des Rcs-Systems und RprA auf CsgD und Curli-Expression

3.2.1. RcsB reduziert die Curli-Expression hauptsächlich über die RNA RprA

Durch die vorangegangenen Mikroarrayanalysen konnte ein reprimierender Einfluss von RcsB/RprA auf die Curlisynthesegene und deren Transkriptionsaktivator CsgD beobachtet werden. Ausgewählte Genfusionen zu dem Reporter gen β -Galaktosidase bestätigten die Mikroarrayergebnisse zusätzlich. Dass die kleine RNA RprA tatsächlich auch in Flüssigmedium bei 28°C in der späten stationären Phase akkumuliert konnte durch Northernblotanalysen in dieser Arbeit gezeigt werden. Das ist auch genau die Wachstumsphase und -temperatur, bei der die Expression der Curlisynthesegene in Flüssigkultur ihr Maximum erreicht (Weber *et al.*, 2006). Die Regulation der Curli-Fimbrien erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen unter Beteiligung einer Reihe von Regulatoren. Eine sukzessive Analyse der Curlikaskade sollte deshalb Aufschluss darüber liefern, auf welcher Ebene das Rcs-System in die Regulation der Curli-Fimbrien eingreift. Begonnen wurde daher mit Untersuchungen des Stationärphasen-Sigmafaktor RpoS, der an oberster Stelle die Expression des Transkriptionsaktivators CsgD positiv beeinflusst (Weber *et al.*, 2006). Die RcsB-abhängige kleine RNA RprA wurde bereits unter Osmoschockbedingungen als stabilisierende Komponente der *rpoSm*RNA beschrieben (Majdalani *et al.*, 2001; Majdalani *et al.*,

2002). Auch unter den in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsbedingungen (LB, 28°C) konnte ein kleiner, aber reproduzierbarer positiver Einfluss auf die *rpoS*-Expression (Abb. 6A) nachgewiesen werden. Diese positive Regulation durch RprA spiegelt sich jedoch auf Ebene von CsgD nicht wider. Mikroarrayanalysen (Tab. 7), Reporterfusionen (Abb. 7), Westernblotanalysen (Abb. 8) und Northernblotanalysen (Abb. 10) zeigen einen reprimierenden Einfluss von chromosomal überproduziertem RprA (in einer *rscC*-Mutante). Demnach liegt eine inverse Regulation von RpoS und CsgD vor. Die nachgeschalteten Zielgene des Transkriptionsaktivators CsgD, *csgB* (Abb. 6B) und *yaiC* (Abb. 6C), verhalten sich in ihrem Expressionsmuster wie *csgD* selbst. Demzufolge findet die Regulation durch RprA bereits auf der Ebene des Transkriptionsaktivators CsgD selbst statt. Oder aber dieser reprimierende Einfluss von RprA auf die *csgD*-Expression wird indirekt durch eine an CsgD wirkende regulatorische Komponente verursacht. Eine indirekte Regulation verlaufend über MlrA oder YciR konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression einer *ydaM::lacZ* Fusion hingegen war leicht vermindert in Anwesenheit von chromosomal überproduziertem RprA (in einer *rscC*-Mutante) (Abb. 6D). Das zusätzliche Ausschalten von RprA (*rscC*⁻*rprA*⁺) konnte diesen reprimierenden Effekt jedoch nicht, wie im Fall von *csgD*, *csgB* und *yaiC* beobachtet, aufheben. Hier ist offenbar nicht die kleine RNA RprA für diesen reprimierenden Einfluss verantwortlich, sondern der Responseregulator RcsB selbst (der in einer *rscC*-Mutante hyperaktiv ist). YdaM unterlag bei den Mikroarrayanalysen keiner mindestens 2-fachen differentiellen Regulation durch RcsB/RprA und ist deshalb in Tabelle 7 nicht mit aufgeführt. Tatsächlich ist YdaM in den Mikroarrayanalysen 1,5-fach negativ durch RcsB reguliert, was die Expressionsdaten bestätigt. Die Suche nach einer möglichen Bindestelle von RcsB innerhalb der *ydaM*-Promoterregion liefert an Position -76 Nt bis -66 Nt (ausgehend vom Translationsstart) eine der RcsB-Box (Carballes *et al.*, 1999) sehr ähnlichen Sequenz (AGAATT ATCT) und könnte daher als Bindestelle in Frage kommen. Der äußerst geringe negative Einfluss von RcsB auf die Expression von *ydaM* lässt darauf schließen, dass möglicherweise andere Bedingungen nötig sind, um einen signifikanten Unterschied in der Expression zu verzeichnen. Unter den hier getesteten Bedingungen (LB, 28°C) ist die mögliche Regulation von YdaM durch RcsB offenbar nicht von großer Bedeutung. Bandshift-Analysen könnten zudem Aufschluss über eine direkte Bindung von RcsB an den *ydaM*-Promoter geben. Da eine direkte Regulation bislang nicht bestätigt ist, bleibt auch die Möglichkeit einer indirekten Regulation von YdaM durch RcsB bestehen.

3.2.2. Das Haupttarget von RprA innerhalb der Curli-Kaskade ist CsgD, aber auch YdaM

Noch drastischer ist der Einfluss von RprA auf die *csgB::lacZ*- und *yaiC::lacZ* Expression nach ektoptischer Überproduktion sichtbar (Abb. 13). Interessanterweise konnte durch die Überproduktion von RprA jetzt auch ein Einfluss auf die *ydaM::lacZ* Expression beobachtet werden (Abb. 13). Chromosomal überproduziertes RprA (in einer *rscC*-Mutante) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die *ydaM::lacZ* Expression (Abb. 6D). Hierzu kann bislang nur spekuliert werden, dass unter Bedingungen, die noch höhere RprA-Mengen in der Zelle hervorrufen können, doch eine Regulation von YdaM durch RprA erfolgen kann. Eine solche Situation könnte die Reifung eines Biofilms darstellen, bei der die Curli-Fimbrien-Expression nicht mehr notwendig ist und durch die gleichzeitige negative Regulation von CsgD und YdaM verhindert wird. Konsistent mit diesen Befunden sind die Untersuchungsergebnisse von CsgD::Gfp und YdaM::Gfp Fusionsproteinen in Anwesenheit von überexprimiertem RprA. Das besondere dabei ist, dass die Expression der Gfp-Fusionen in Niedrigkopie von einem ektoptischen Promoter aus erfolgt. CsgD und YdaM also nicht unter Kontrolle ihres eigenen Promoters stehen. Damit kann eine Regulation auf Ebene der Transkriptionsinitiation grundsätzlich ausgeschlossen werden. Trotzdem sind beide Fusionsproteine in Anwesenheit von überexprimiertem RprA in ihrer Menge sehr deutlich reduziert (Abb. 14). Derzeit sind verschiedene Programme verfügbar, die eine Vorhersage von potentiellen Zielgenen kleiner RNAs erlauben. Unter Anwendung des Programmes TargetRNA konnten zudem zwei potentielle Bindestellen innerhalb der *csgD* 5'UTR (Abb. 15) und eine Bindestelle in der kodierenden Region von *ydaM* identifiziert werden. Die in dieser Arbeit nicht näher charakterisierte potentielle Bindestelle von RprA innerhalb von *ydaM* umfasst den Bereich von +3 Nt bis +13 Nt (ausgehend vom Translationsstart). Der dazu komplementäre Bereich in RprA befindet sich vom 65. Nt bis zum 75. Nt (ausgehend vom Transkriptionsstart). Bakterielle kleine RNAs binden meist in der 5'UTR ihrer Zielgene. Sie verhindern damit die Bindung der Ribosomen und demzufolge auch die Initiation der Translation. Neuere Untersuchungen in *Salmonella* zeigten jedoch, dass kleine RNAs auch in der kodierenden Region binden können. Die kleine Hfq-abhängige RNA MicC bindet an die *ompD*mRNA und beschleunigt deren Abbau durch RNaseE (Pfeiffer *et al.*, 2009). Diese Art der Regulation könnte auch auf YdaM zutreffen und kann daher als Ausgangshypothese für weitere Untersuchungen dienen.

3.2.3. Die Regulation der *csgD*-Translation erfolgt über die direkte Interaktion der kleinen RNA-RprA mit dem Translationsinitiationsbereich von *csgD*

Die Regulation des Transkriptionsaktivators der Curli-Fimbrien CsgD erfolgt durch eine Vielzahl regulatorischer Komponenten. Hauptsächlich erfolgt diese Regulation auf Ebene der Transkription durch Faktoren wie CpxR, OmpR, MlrA und dem sekundären Botenstoff c-di-GMP (Jubelin *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006). Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass CsgD auch auf posttranskriptionaler Ebene direkt durch die RcsB-abhängige kleine RNA RprA reguliert wird. Nachdem zwei potentielle Bindestellen für die kleine RNA RprA innerhalb der 5'UTR der *csgD*mRNA identifiziert werden konnten, stellte sich die Frage, welche Rolle diese bei der Regulation spielen. Eine Bindestelle befindet sich in der Translationsinitiationsregion und überlappt mit der Ribosomenbindestelle (Shine Dalgarno Sequenz). Kleine RNAs nutzen häufig diesen Bereich zur Regulation, um z.B. die Bindung der Ribosomen und damit einhergehend die Translation zu verhindern (Storz *et al.*, 2004). Oftmals erfolgt im Anschluss ein Abbau dieses sRNA-mRNA Duplexes durch RNase E. Aber es sind nicht nur Beispiele der Repression bekannt. Im Fall von RprA und deren bereits bekanntes Zielgen *rpoS*, kann RprA durch Bindung an die *rpoS*mRNA die Sekundärstruktur dahingehend verändern, dass die Ribosomenbindestelle nunmehr zugänglich wird und die Translation aktiviert wird (Majdalani *et al.*, 2002). RprA ist also in der Lage, aktivierend (*rpoS*) und auch reprimierend (*csgD*) zu wirken. Eingehendere Untersuchungen der Bindestelle im Translationsinitiationsbereich von *csgD* (= eine der von insgesamt zwei potentiellen Bindestellen) zeigten, dass diese Bindestelle von Bedeutung bei der Regulation durch RprA ist. Durch spezifische Basenaustausche innerhalb dieser Region konnte die negative Regulation von *csgD* durch RprA aufgehoben werden. Zudem lieferten diese Austausche ca. 1,2-fach höhere Proteinnengen, was auf eine effizientere Translation hindeutet (Abb. 17). Ob tatsächlich die Bindung der Ribosomen dadurch verhindert wird, könnte man zusätzlich mit *in vitro* 30S Ribosomen Toeprinting-Analysen überprüfen (Hartz *et al.*, 1988). Da die spezifischen Basenaustausche an zwei unterschiedlichen Stellen durchgeführt wurden, die jedoch nicht die Ribosomenbindestelle selbst betrafen, kann davon ausgegangen werden, dass einzelne spezifische Basenpaarungen nicht ausschlaggebend für die Bindung sind, sondern vielmehr der gesamte Bereich von Bedeutung ist.

Die Untersuchungen zur Rolle der Bindestelle im Translationsinitiationsbereich wurden in Abwesenheit der weiter stromaufwärts liegenden Bindestelle durchgeführt. Bei Vorhandensein dieser Bindestelle konnte nämlich durch spezifische Basenaustausche im Transla-

tionsinitiationsbereich die negative Regulation nicht aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Demzufolge scheint die erste stromaufwärts liegende Bindestelle von größerer Bedeutung zu sein. Eine Regulation auf Transkriptionsinitiationsebene kann generell ausgeschlossen werden, da die Expression von *csgD* von einem konstitutiven ektopischen Promoter (PLtet) aus erfolgt. Dadurch ist die Expression abgekoppelt vom *csgD*-Promoter und den dort wirkenden Komponenten (w.z.B. σ^S ; den Transkriptionsfaktoren CpxR, OmpR und MlrA sowie die c-di-GMP vermittelte Regulation). Das für die Experimente benutzte Gfp-Fusionssystem (Urban et al., 2007) erlaubt deshalb die Untersuchung der Translationsregulation von Zielgenen durch kleine RNAs.

3.2.4. An der stromaufwärts in der *csgD* 5'UTR liegenden Bindestelle für RprA wird in Anwesenheit von RprA möglicherweise die Transkriptionselongation verhindert

Das tatsächlich auch Bindestellen stromaufwärts der Translationsinitiationsregion von kleinen RNA's zur Regulation genutzt werden können, lieferten kürzliche Untersuchungen der kleinen RNA GcvB und ihrer Ziel-mRNA *gltI* in Salmonella. Diese kleine RNA bindet an eine C/A-reiche Region in Position -57 bis -45 (ausgehend vom Translationsstart) und reprimiert die Translation von *gltI* (Sharma et al., 2007). Betrachtet man die stromaufwärts lokalisierte Bindestelle (von -96 Nt bis -84 Nt) innerhalb von *csgD*, so kann man auch hier eine C/A-reiche Region erkennen. Demzufolge könnte auch diese Bindestelle für die Regulation der Translation von Bedeutung sein. Untersuchungen diesbezüglich zeigten, dass durch eine Verkürzung der 5'UTR von *csgD* bis hin zum -36. Nukleotid (ausgehend vom Translationsstart) die negative Regulation durch RprA teilweise (aber nicht vollständig) aufgehoben werden konnte. Gezielte Basenaustausche innerhalb der stromaufwärts liegenden Bindestelle führten jedoch nicht zur Aufhebung der Regulation durch RprA (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert sind jedoch die plötzlich stark erhöhten CsgD-Proteinmengen bei Fehlen der stromaufwärts lokalisierten Bindestelle. Das könnte auf bereits erhöhte Transkriptmengen zurückzuführen sein. Tatsächlich lieferten Northernblotanalysen Hinweise darauf, dass bei Vorhandensein beider Bindestellen die *csgD::gfp* Transkriptmengen deutlich niedriger sind, als bei Abwesenheit der stromaufwärts liegenden Bindestelle und aber auch in einem Stammhintergrund, der kein chromosomales RprA mehr produziert und trotzdem das *csgD::gfp* Konstrukt mit beiden Bindestellen trägt (Abb. 18). Dies könnte damit erklärt werden, dass bei Vorhandensein chromosomal exprimierten RprA's dieses in der Lage ist an die ebenfalls noch vorhandene erste Bindestelle zu binden

und die Transkriptmenge zu reduzieren. Bei Fehlen der ersten Bindestelle spielt es keine Rolle mehr, ob RprA chromosomal exprimiert wird oder nicht. Denn hier erfolgt keine Regulation der Transkriptmenge mehr, sondern es erfolgt wie bereits unter Abschnitt 3.2.3. beschrieben die Regulation auf translationaler Ebene durch RprA. Da auch hier ein Einfluss auf die Transkriptionsinitiation ausgeschlossen werden kann (siehe Abschnitt 3.2.3.), könnte möglicherweise der beobachtete Effekt auf eine verminderte Transkriptionselongation beruhen. Dieser Mechanismus der Transkriptionsattenuierung konnte bereits für die in cis-kodierte kleine RNA RNAIII bei der Plasmidreplikationskontrolle beschrieben werden. Die Replikation des Streptokokkenplasmids pIP501 wird durch das geschwindigkeitslimitierende Initiatorprotein RepR initiiert. In Anwesenheit der kleinen RNAIII und deren Bindung an die leader Region der *repM*RNA erfolgen eine Konformationsänderung und der Transkriptionsabbruch (Brantl *et al.*, 1994; Brantl *et al.*, 2007).

Für in trans-kodierte kleine RNAs ist diese Funktion bzw. dieser Wirkungsmechanismus bislang nicht beschrieben worden. Damit könnte RprA ein erstes Beispiel für eine in trans-kodierte RNA darstellen, die eine Rolle bei der Transkriptionsattenuierung spielt. Mechanistisch könnte dafür die Loopstruktur von RprA verantwortlich sein, die möglicherweise die Polymerase in ihrem Transkriptionsverlauf behindert. Für diese Art der Regulation sprechen außerdem *csgD*RNA Stabilitätsuntersuchungen. In Anwesenheit von chromosomal überproduziertem RprA (in einer *rcsC*-Mutante) konnten geringere *csgD*-Transkriptmengen als im Wildtyp beobachtet werden, doch diese chromosomale Überproduktion von RprA führte im Vergleich zum Wildtyp nicht zu einem sichtbar schnelleren Abbau (Abb. 12). Eine RprA-Mutante zeigte leicht erhöhte *csgD*-Transkriptmengen, aber die Abwesenheit von RprA führte nicht zu einer sichtbaren Stabilisierung der *csgD*RNA (Abb. 11).

3.2.5. YhdA (CsrD) reguliert CsgD über RprA

Das dem Csr-System angehörige degenerierte GGDEF/EAL-Protein YhdA weist innerhalb seines N-Terminus eine RNA - bindende Domäne auf. Mit dieser Domäne ist YhdA in der Lage die zwei kleinen RNAs CsrB und CsrC zu binden und führt diese dem Abbau der RNaseE zu. Nachdem eine *yhdA*-Mutante einen reprimierenden Einfluss auf die *csgB::lacZ* Expression aufwies und dieser reprimierende Einfluss durch die zusätzliche Mutation von *rprA* wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 21), bestand die Vermutung, dass YhdA möglicherweise auch RprA bindet und es dem Abbau zuführt. Dafür sprachen auch die sehr hohen RprA-Mengen in einer *yhdA*-Mutante (Abb. 22). Anschließend

RprA-Stabilitätsuntersuchungen hingegen zeigten keinen schnelleren Abbau von RprA in Anwesenheit von YhdA (Abb. 23). Zudem sind die Halbwertszeiten von RprA mit ca. 20 min sehr lang. Das heißt, RprA ist in der stationären Phase sehr stabil und wird vermutlich durch das Hfq Protein vor einem Abbau geschützt. Wesentlich geringere Halbwertszeiten von ca. 7-8 min sind für RprA in der logarithmischen Phase zu beobachten (Majdalani *et al.*, 2001).

Nachdem ein eindeutiger reprimierender Einfluss von YhdA auf die Expression einer transkriptionalen *rprA::lacZ* Fusion zu verzeichnen war, erhärteten sich die Vermutungen, dass diese Regulation indirekt über andere Komponenten verläuft. Eine solche indirekte Regulation könnte über den Transkriptionsaktivator von RprA, RcsB, erfolgen. In Abwesenheit von YhdA werden die kleinen RNAs CsrB und CsrC nicht mehr dem Abbau zugeführt und können an das CsrA-Protein binden. CsrA ist unter diesen Umständen inaktiv und nicht mehr in der Lage spezifisch an mRNAs, wie zum Beispiel *flhDC*, *pgaABCD* oder *glgA* zu binden. Eine Stabilisierung oder Destabilisierung dieser mRNA's bleibt aus (zusammengefasst in Romeo 1998). Demnach könnte CsrA eine Destabilisierung der *rpsB*mRNA bewirken. Befindet sich CsrA im inaktiven Zustand (in einer *yhdA*-Mutante) findet diese Destabilisierung nicht statt, *rpsB* wird effizient translatiert und könnte damit eine Aktivierung der *rprA*-Transkription auslösen. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass YhdA seinen reprimierenden Effekt nicht indirekt über RcsB ausübt. Die starke Aktivierung der *rprA*-Transkription in einer *yhdA*-Einzelmutante bleibt auch in einer *yhdA rcsB* –Doppelmutante erhalten (Abb. 25).

Damit konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass YhdA seinen aktivierenden Einfluss auf CsgD über die kleine RNA RprA ausübt, indem es die Expression von RprA inhibiert. Über den Wirkmechanismus kann bislang nur spekuliert werden. Möglicherweise existiert ein bislang noch nicht identifizierter weiterer Transkriptionsaktivator für RprA, der seinerseits durch das CsrA-Protein (und damit indirekt durch YhdA) beeinflusst wird. Oder aber der zur LysR-Familie gehörende Transkriptionsfaktor LrhA, der als Repressor der *rprA*-Synthese beschrieben wurde (Peterson *et al.*, 2006) unterliegt einer Regulation der Csr-Komponenten.

Auf computerbasierter Suche nach weiteren kleinen RNAs, die die Aktivität des CsrA Proteins beeinflussen, wurde auch die kleine RNA RprA identifiziert (Sridhar *et al.*, 2009). Diese Möglichkeit erklärt jedoch nicht den Einfluss auf die Transkription von *rprA*. Obwohl YhdA kein Helix turn Helix Motiv zur Bindung an die DNA besitzt, kann bislang eine eventuelle direkte Regulation jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin

könnte YhdA auf noch unbekannte Weise unabhängig von den anderen Csr-Komponenten einen Einfluss auf die *rprA*-Transkription ausüben.

4. Das σ^S /CsgD/Rcs regulatorische Netzwerk und seine Rolle in der generellen Stressantwort und Biofilmbildung in *E.coli*

Anhand eines Modells sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nochmals zusammengefasst und in Beziehung zu den bereits bekannten Aspekten der Regulation des Transkriptionsfaktors CsgD gesetzt werden. Diverse Stresssignale, wie zum Beispiel Temperaturveränderungen und auch der Übergang in die stationäre Phase, der mit einer Nährstofflimitation einhergeht, regulieren den Stationärphasen-Sigmafaktor σ^S . Dessen Stabilisierung in der stationären Phase hat die Expression zahlreicher Gene zur Folge (Hengge-Aronis, 2002b; Weber *et al.*, 2005). Dazu zählen auf der einen Seite Transkriptionsfaktoren wie z.B. MlrA (Brown *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006) und auch CsgD selbst, sowie die an der Regulation von CsgD beteiligten Proteine YdaM und YciR. Das GGDEF-Protein YdaM hat einen positiven Einfluss auf die Expression von *csgD*. Wohingegen YciR, welches beide Domänen GGDEF und EAL besitzt, antagonistisch wirkt (Weber *et al.*, 2006). Die Regulation von *csgD* erfolgt hier vermutlich über die Umsetzung des sekundären Botenstoffs c-di-GMP. Auch andere an der Umsetzung von c-di-GMP beteiligte Proteine (YegE und YhjH) greifen in diesen regulatorischen Prozess ein (Pesavento *et al.*, 2008).

Neben dieser, über die Aktivierung von σ^S vermittelten CsgD-Regulation, wird die Expression auch über Zweikomponentensysteme reguliert. Dadurch werden zusätzliche Signale wie zum Beispiel Osmolaritätsschwankungen integriert. Durch die Vielzahl regulatorischer Komponenten, die eine Vernetzung verschiedener Systeme miteinander gewährleisten, wird dem Bakterium eine optimale Anpassung an die verschiedensten Umweltverhältnisse oder Stresssituationen erlaubt.

An der CsgD-Regulation sind insgesamt drei Zweikomponentensysteme beteiligt, die alle auf Osmolaritätsveränderungen reagieren (EnvZ/OmpR, CpxA/CpxR, und RcsC/D/B) (Nara *et al.*, 1986; Cai und Inouye, 2002; Jubelin *et al.*, 2005; Mouslim *et al.*, 2003). Das EnvZ/OmpR-System aktiviert (Vidal *et al.*, 1998), wohingegen das CpxA/CpxR-System die *csgD*-Expression reprimiert. Für den Responseregulator OmpR konnte eine Bindestelle innerhalb des *csgD*-Promotors identifiziert werden (Prigent-Combaret *et al.*, 2001). CpxR hingegen besetzt mehrere Bindestellen, wobei eine Bindestelle mit der von OmpR überlappt (Jubelin *et al.*, 2005). Bedingungen unter denen niedrige bis moderate Osmolaritäten vorherrschen bewirken eine Aktivierung der *csgD*-Expression über das EnvZ/OmpR-System. Hohe Osmolaritäten reprimieren die *csgD*-Expression über die Aktivierung des CpxA/CpxR-Systems (Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Das RcsC/D/B-System scheint in Minimalmedium vorwiegend bei niederen Osmolaritäten die *csgD*-Expression zu reprimieren.

mieren (Vianney *et al.*, 2005; Jubelin *et al.*, 2005). Die Wahrnehmung der in der Umgebung vorherrschenden Osmolarität scheint also essentiell für die Kontrolle des Curlifimbrienregulators CsgD zu sein. Membranveränderungen werden durch das RcsC/D/B-System und das CpxA/R-System wahrgenommen und führen ebenfalls zu einer reduzierten Biofilmbildung (Hung *et al.*, 2001; Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Raivio und Silhavy, 2001; Dorel *et al.*, 1999; Otto und Silhavy, 2002; Ferrieres und Clarke, 2003). Nicht nur die Curlisynthesegene werden durch diese beiden Zweikomponentensysteme herunterreguliert sondern auch die Motilität des Bakteriums wird negativ beeinflusst (zusammengefasst in Dorel *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2001; Francez-Charlot *et al.*, 2003). Die für die vorherige planktonische Lebensweise benötigten Flagellen und die für das Anheften an Oberflächen benötigten Curlifimbrien werden, nachdem die Zellen bereits an einer Oberfläche adhärirt sind, nicht mehr länger benötigt. Damit spielen das CpxA/CpxR-System und das RcsC/D/B-System hauptsächlich eine Rolle bei der Reifung von Biofilmen. Von besonderer Notwendigkeit in reifenden Biofilmen ist die Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten, zu denen auch die Kolansäure zählt. Deren Expression wird ausschließlich über das Rcs-System realisiert, ein weiteres Indiz für die essentielle Rolle des Rcs-Systems bei der Biofilmreifung (Gottesman *et al.*, 1985). Eine weitere extrazelluläre Matrixkomponente stellt die Cellulose dar. Deren Expression wird indirekt durch CsgD über die Aktivierung des c-di-GMP synthetisierenden Proteins YaiC (GGDEF-Domänen-Protein/Diguanylatcyclyase) vermittelt (Zogaj, 2001; Brombacher *et al.*, 2003). Cellulose spielt demnach eine Rolle im frühen Stadium der Biofilmreifung (Römling, 2002), wohingegen die Kolansäuresynthese im späten Stadium von Bedeutung zu sein scheint.

Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die *csgD*-Expression auch posttranskriptional über die kleine RNA RprA reguliert wird. Deren Expression wird durch den Responsregulator RcsB aktiviert (Majdalani *et al.*, 2002). Bedingungen, die das Rcs-System aktivieren, führen also auch zur Aktivierung dieser kleinen RNA. Da bislang keine direkte Bindung von RcsB an den *csgD*-Promotor nachgewiesen werden konnte und die Wirkung von *rprA*-Mutationen genauso stark ist wie die von *rscB*-Mutationen, ist es wahrscheinlich, dass alleinig die kleine RNA RprA für die *csgD*-Repression verantwortlich ist. Zusätzlich dazu können über das YcgF/YcgE-System Signale wie niedrige Temperaturen und Blaulicht integriert werden. Das BLUF-EAL Protein YcgF bindet unter Blaulicht als so genannter Antirepressor direkt an den MerR-ähnlichen Repressor YcgE und verhindert somit dessen Bindung an die Operator-DNA. Als Konsequenz werden acht kleine Proteine stark induziert. Dazu zählt das kürzlich näher charakterisierte kleine Protein YmgB

(Tschowri *et al.*, 2009), das wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nicht die Expression der Rcs-Komponenten beeinflusst sondern als Aktivitätsmodulator am Responseregulator RcsB wirkt, indem es entweder dessen Dephosphorylierung verhindert oder die Phosphorylierung fördert. Damit ist der YcgF/YcgE regulatorische Signalweg mit dem RcsC/D/B-Phosphorelaysystem vernetzt, wobei die Induktion von YmgB zur Aktivierung von RcsB und damit auch zur Aktivierung von RprA führt. Entsprechend wird bei niedrigen Temperaturen und Blaulicht die Curliexpression ebenfalls reprimiert (Tschowri *et al.*, 2009) und die Reifung des Biofilms durch Aktivierung der Kolansäureproduktion durch das Rcs-System initiiert. Durch die Vielzahl regulatorischer Komponenten erfolgt eine fein abgestimmte Regulation der Curliexpression abhängig von den aktuell vorherrschenden Umweltbedingungen wie z.B. Osmolarität, Temperatur, Blaulicht oder Nährstofflimitation.

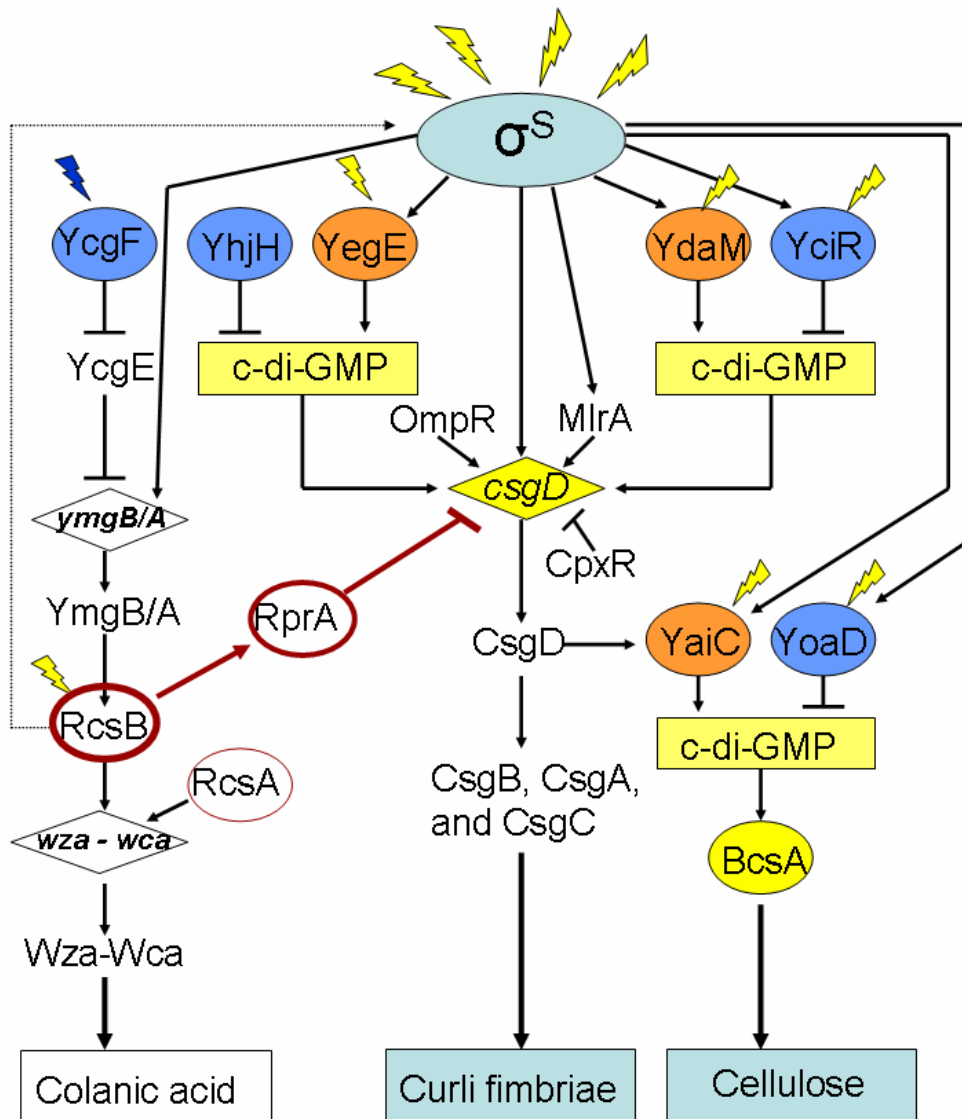


Abbildung 26: Das σ^S /CsgD/Rcs – regulatorische Netzwerk (Erläuterungen siehe Text)

5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten erstmalig, dass der Transkriptionsaktivator der Curlisynthesegene, CsgD, nicht nur der Regulation auf transkriptionaler Ebene unterliegt sondern auch posttranskriptional durch die kleine RNA RprA beeinflusst wird. In vielen Detailfragen herrscht jedoch noch Unklarheit. Interessanterweise nutzt RprA für diese Regulation zwei verschiedene Bindestellen innerhalb der 5`UTR von *csgD*. Offenbar werden dieser Regulation auch zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen zugrunde gelegt. Nachdem die Bindestelle überlappend mit dem Translationsinitiationsbereich eine Rolle bei der translationalen Kontrolle von *csgD* zu spielen scheint, ist die Rolle der stromaufwärts liegenden Bindestelle noch weitestgehend unklar. Die Vermutung, dass diese bei der Transkriptionselongation von Bedeutung ist, könnte mit in *vitro* Transkriptionsanalysen näher untersucht werden. Dieser Mechanismus ist bislang nur für in cis-kodierte RNAs beschrieben, könnte aber auch auf in trans-kodierte RNAs, wie zum Beispiel RprA zutreffen. Die Vorhersage, dass RprA mit zwei unterschiedlichen Regionen an diesen zwei Bindestellen interagiert lässt vermuten, dass ein einziges RprA-Molekül ausreichend für die Regulation an *csgD* wäre. Eine weitere Fragestellung wäre auch, ob andere kleine RNAs an der Regulation von *csgD* beteiligt sind.

Zusätzlich zu *csgD*, als ein in dieser Arbeit näher charakterisiertes direktes Zielgen der kleinen RNA RprA, konnten innerhalb dieser Arbeit eine Reihe anderer Gene als RprA-abhängig identifiziert werden. *ydaM* ist ein Gen, das sowohl direkt RcsB als auch direkt RprA-abhängig sein könnte. Eine potentielle RprA-Bindestelle liegt ungewöhnlicherweise in der kodierenden Region von *ydaM*. Mittels kompensatorischer Basenaustausche innerhalb dieser Region könnte man die direkte Interaktion von RprA und *ydaM* überprüfen. Auch der zugrunde liegende Mechanismus bleibt hier zu klären.

Ein weiteres potentielles Zielgen von RprA ist der Transkriptionsaktivator der Säureresistenzgene GadE. Auch hier sind Untersuchungen hinsichtlich der direkten Regulation und des Regulationsmechanismus nötig. Bestätigt sich GadE als Regulationsziel von RprA, bleibt zu klären, in welchem Zusammenhang die Reprimierung der Curlisynthesegene und die Aktivierung der Säureresistenzgene stehen.

Nach wie vor ist das tatsächliche physiologische Signal der RcsC-Sensorkinase unbekannt. Dennoch sind eine Reihe von meist unphysiologischen Bedingungen für die Aktivierung des Rcs-Systems beschrieben worden. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das YcgF/YcgE-System mit dem Rcs-System vernetzt ist und dadurch eine Signalintegration unabhängig von der sensorischen Inputdomäne der Kinase erfolgen kann. Diese

Vernetzung wird durch das so genannte Konnektorprotein YmgB gewährleistet, das die Aktivität des Responseregulators moduliert. Hierfür bleibt jedoch zu klären, wie und auf welcher Ebene diese Aktivitätsmodulation realisiert wird. Dabei könnte YmgB die Phosphorylierung von RcsB stimulieren oder die Dephosphorylierung verhindern. Eine Möglichkeit könnte sein, dass YmgB direkt an die Sensor kinase RcsC bindet, diese in ihren Kinasemodus versetzt oder aber auch die Phosphataseaktivität von RcsC inhibiert. Grundsätzlich stellt sich auch die Frage ob weitere kleine Proteine als Konnektoren mit dem Rcs-System interagieren.

Weitere interessante Fragestellungen stellen sich im Zusammenhang mit der Expressionsregulation von *rprA* durch YhdA (CsrD). Auf noch zu klärende Art und Weise reprimiert YhdA die *rprA*-Expression.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten unorthodoxen Wege der Aktivitätsregulation innerhalb von Zweikomponentensystemen durch das Effektormolekül LPG, den Konnektor YmgB und die kleine RNA RprA stellt sich die generelle Frage nach weiteren solcher (möglicherweise andere Zweikomponentensysteme/Systeme betreffende) Regulationsmechanismen. Gibt es also weitere Moleküle oder kleine Proteine die an der Regulation von Sensor kinasen und/oder Responseregulatoren beteiligt sind? Nach wie vor bleibt für die meisten Sensor kinasen ebenfalls zu klären, welche direkten Signale sie wahrnehmen und unter welchen physiologischen Bedingungen sie demzufolge tatsächlich aktiv sind.

Zusammenfassung

Zweikomponentensysteme sind wichtige Systeme von Bakterien, die eine Anpassung an widrige Umweltbedingungen gewährleisten. Üblicherweise erfolgt die Aktivierung eines Zweikomponentensystems, indem eine Sensorkinase (SK) ein meist externes Signal wahrnimmt, sich an ihrem konservierten Histidinrest autophosphoryliert und im Anschluss daran das Phosphat auf einen Aspartatrest innerhalb des zugehörigen Responseregulators (RR) überträgt. Der Responseregulator ändert in phosphorylierter Form seine Konformation und kann dann häufig als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen beeinflussen. Neben dieser „orthodoxen“ Aktivierung (Phosphotransfer von SK auf RR) sind in den letzten Jahren immer mehr so genannte „nicht-orthodoxe“ Wege der Aktivierung von Zweikomponentensystemen charakterisiert worden.

Eine Möglichkeit dieser „nicht-orthodoxen“ Regulation innerhalb von Zweikomponentensystemen ist der Crosstalk. Dabei sind einige Sensorkinasen unter bestimmten Bedingungen in der Lage neben ihren Partnerresponseregulatoren auch weitere Responseregulatoren zu phosphorylieren (Groban *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2005). Des Weiteren können erst kürzlich beschriebene so genannte Konnektoren vielfältig eine Wirkung auf die Aktivität von Zweikomponentensystem-Proteinen ausüben. Konnektoren sind meist kleine Proteine, die durch einen spezifischen Signaltransduktionsweg induziert werden und in die Regulation durch ein anderes System, z.B. eines Zweikomponentensystems, eingreifen.

Innerhalb dieser Arbeit wurden drei weitere dieser so genannten „nicht-orthodoxen“ Aktivierungsmechanismen innerhalb von Zweikomponentensystemen identifiziert und/oder näher charakterisiert.

Erstens wurde die Fettsäure Lysophosphatidylglycerin (LPG) als ein neues Effektormolekül, das an der Regulation von Sensorkinasen und somit von Zweikomponentensystemen beteiligt ist, identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass das aus der Spaltung von Phosphatidylglycerin durch die Phospholipase RssA generierte Lysophosphatidylglycerin *in vitro* in der Lage ist, die Sensorkinasen ArcB, BarA, BaeS und RstB in ihrer Autophosphorylierungsfähigkeit zu hemmen. Freie Fettsäuren, die ebenfalls bei der RssA-vermittelten Spaltung von Phosphatidylglycerin entstehen, zeigten keinen Einfluss auf die Autophosphorylierung von ArcB. Vorläufige Hinweise, dass LPG tatsächlich auch *in vivo* relevant ist, lieferten Mikroarrayanalysen, die eine durch RssA/LPG vermittelte globale Auswirkung auf die Genexpression zeigten. Neben Phosphatidylglycerin, als Substrat für die Phospholipase RssA, konnte außerdem das strukturell sehr ähnliche Cardiolipin als ein zusätzliches Substrat für RssA identifiziert werden.

Ein weiteres Beispiel für einen „nicht-orthodoxen“ Regulationsmechanismus, der innerhalb dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Verbindung des YcgF/YcgE-Signaltransduktionssystems mit dem Rcs-System durch das kleine Protein YmgB. YmgB steht unter Kontrolle des YcgF/YcgE – Signaltransduktionsweges. Nach Induktion des Proteins wurde ein mukoider Phänotyp und eine Reduktion der Expression der Curlisynthesegene beobachtet (Tschowri *et al.*, 2009). Dieser mukoider Phänotyp wird durch die Ausbildung der Kolansäure (ein Kapselbestandteil) hervorgerufen und resultiert aus der Aktivierung des Rcs-Systems. Mit Mikroarrayanalysen konnte gezeigt werden, dass YmgB eine Vielzahl Rcs-abhängiger Gene reguliert, zu denen auch die Curlisynthesegene zählen. Die Rcs-Komponenten selbst wurden jedoch nicht in ihrer Expression beeinflusst. Demzufolge scheint das YmgB-Protein als eine Art Konnektor die Aktivität der Rcs-Komponenten zu modulieren.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass RcsB seine Wirkung nicht nur auf direktem Wege als Transkriptionsfaktor ausübt, sondern auch indirekt über die Aktivierung der kleinen RNA RprA wirken kann. Im Falle des Transkriptionsregulators der Curlisynthesegene, CsgD, ist alleinig RprA für die Repression von *csgD* verantwortlich. Dabei werden offenbar zwei Bindestellen innerhalb der 5'UTR der *csgD*mRNA von RprA für die Regulation genutzt. Eine mit der Ribosomenbindestelle überlappende Bindestelle dient der Translationsregulation von *csgD* durch RprA. Eine wesentlich größere regulatorische Rolle scheint jedoch die weiter stromaufwärts vom Translationsstart liegende Bindestelle zu spielen. Vorläufige Untersuchungen deuten dabei auf eine Rolle bei der Transkriptionselongation. Innerhalb dieser Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator der Curlisynthesegene, CsgD, der direkten Kontrolle der kleinen RNA RprA unterliegt und dass diese posttranskriptionale Regulation offenbar durch zwei unterschiedliche Mechanismen gewährleistet wird. Damit wurde unter anderem demonstriert, dass nicht immer Responseregulatoren selbst für eine Zielgenregulation verantwortlich sind, sondern dies, wie hier gezeigt, auch über kleine RNAs realisieren können.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird einmal mehr deutlich, dass neben der „orthodoxen“ Aktivierung eine Vielzahl „nicht-orthodoxer“ Wege der Aktivitätsregulation von Zweikomponentensystemen existieren und dass durch diese komplexen Regulationsmöglichkeiten eine optimale und fein abgestimmte Anpassung der Bakterien an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen erfolgen kann.

Summary

Two component systems are important systems in bacteria, which allow an adaptation to unfavourable environmental conditions. Usually an activation of two component systems is carried out by the activation of the sensor kinase through an external signal, subsequent autophosphorylation at its conserved histidin residue, followed by the phosphotransfer to an aspartate residue within the cognate response regulator. Phosphorylation induces a conformational change in the response regulator. Many response regulators are DNA-binding proteins which, as a result of phosphorylation, function as transcription factors that influence the expression of target genes. Besides this “orthodox” activation (phosphotransfer from sensor kinase to response regulator) an increasing number of so called “unorthodox” activation pathways of two component systems have recently been characterized.

Crosstalk represents one example of “unorthodox” regulation within two component systems. In addition to the phosphotransfer to their partner response regulators, some sensor kinases are able to phosphorylate other response regulators under certain conditions (Groban *et al.*, 2009; Mika *et al.*, 2005). Furthermore, recently described so called connectors can have diverse influences on the activity of two component system proteins. Connectors are usually small proteins, which are induced by a specific signal transduction pathway and exert a regulatory influence on other systems, such as two component systems.

In this thesis three additional “unorthodox” mechanisms of regulation within two component systems could be identified and/or characterized in detail.

First, lysophosphatidylglycerol (LPG) was identified as a new effector molecule which regulates sensor kinases and therefore two component systems.

It could be demonstrated that lysophosphatidylglycerol, which is generated by RssA upon cleavage of phosphatidylglycerol, inhibits autophosphorylation of the sensor kinases ArcB, BarA, BaeS and RstB *in vitro*. Free fatty acids, which are also generated by RssA-mediated lysophosphatidylglycerol cleavage, do not influence the autophosphorylation of the sensor kinase ArcB. Preliminary evidence for an *in vivo* role of LPG was obtained by microarray analysis, which showed an RssA/LPG mediated global role in gene regulation.

In addition to phosphatidylglycerol, the phospholipase RssA can also use cardiolipin as a substrate, which shows a very similar structure to phosphatidylglycerol.

The connection of the YcgF/YcgE signal transduction pathway with the Rcs-system via the small protein YmgB, which was also investigated in this thesis, is another example of an “unorthodox” mechanism of regulation within two component systems. YmgB is under control of the YcgF/YcgE-signal transduction pathway. Induction of YmgB leads to a mucoid pheno-

type and the reduction of curli synthesis gene expression (Tschowri *et al.*, 2009). The mucoid phenotype is caused by production of colonic acid (a capsule component) as a result of an activated Rcs-system. Microarray analysis revealed many YmgB-regulated genes, including the curli synthesis genes and a large number of RcsB-dependent genes. However the expression of the Rcs-components itself was not influenced by YmgB. Thus YmgB functions as a connector which modulates the activity of the Rcs-components.

Furthermore, it could be demonstrated here that RcsB does not only exert its influence on target genes directly as a transcription factor, but also indirectly influences gene expression via activation of the small RNA RprA. In the case of the curli regulator CsgD, the repression is mediated exclusively via the small RNA RprA. Two possible binding sites within the 5'UTR of *csgD*mRNA seem to be used by RprA for this regulation. One of the binding sites is overlapping with the ribosome binding site and is responsible for translational regulation of *csgD* by RprA. The other one is located further upstream of the translational start site and seems to play the major regulatory role. Preliminary results suggest a role of this binding site in transcriptional elongation. This thesis provides the first evidence that the transcriptional regulator of the curli synthesis genes, CsgD, is under direct control of the small RNA RprA and that this posttranscriptional regulation is probably ensured by two different mechanisms. This demonstrates that the regulation of target genes by response regulators can also be mediated indirectly, for example via a small RNA.

The present study provides additional evidence for the existence of “unorthodox” pathways of activity regulation within two component systems, which act parallel to the “orthodox” pathways. These complex mechanisms of regulation ensure an optimal and fine tuned adaptation of microorganisms to diverse environmental conditions.

Literaturverzeichnis

- Aarons, S., A. Abbas, et al.** (2000). A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113." *J Bacteriol* **182**(14): 3913-9.
- Ades, S.E., Grigorova, I.L. and Gross, C.A.** 2003. Regulation of the alternative factor sigma (E) during initiation, adaptation, and shutoff of the extracytoplasmic heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185** (8): 2512-2519.
- Ahmer BM, van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F.** 1999. Salmonella SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol.* Feb;31(3):971-82.
- Alba, B. M. and C. A. Gross** (2004). Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**(3): 613-9.
- Alm, E., K. Huang, et al.** (2006). The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput Biol* **2**(11): e143.
- Alves, R. and M. A. Savageau** (2003). Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function. *Mol Microbiol* **48**(1): 25-51.
- Appleby, J. L., J. S. Parkinson, et al.** (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**(6): 845-8.
- Argaman, L., R. Hershberg, et al.** (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**(12): 941-50.
- 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.
- Atlung, T. and Ingmer, H.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
- Babitzke, P. and T. Romeo** (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 156-63.
- Baikalov, I., I. Schroder, et al.** (1998). NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry* **37**(11): 3665-76.
- Baker, C. S., I. Morozov, et al.** (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**(6): 1599-610.
- Barembuch, 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**(1): 76-89.

- Becker, G., E. Klauck, et al.** (2000). The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti-sigmaS factor. *Mol Microbiol* **35**(3): 657-66.
- Becker, G. and R. Hengge-Aronis** (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter sigma(S) dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of sigma(S). *Mol Microbiol* **39**(5): 1153-65.
- Beloin, C., A. Roux, et al.** (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 249-89.
- Berkholz, J.** 2009. Untersuchungen zur Funktion der GGDEF- und EAL- Proteine YdaM, YddV, YeaP, YegE, YhdA, YcgG und YhjH bei der Curli-Biosynthese in *Escherichia coli*. Diplomarbeit FU Berlin
- Bijlsma, J. J. and E. A. Groisman** (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**(8): 359-66.
- Blat, Y. and M. Eisenbach** (1994). Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. *Biochemistry* **33**(4): 902-6.
- Bougdoor, A., C. Cunning, et al.** (2008). Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol* **68**(2): 298-313.
- Bougdoor, A., S. Wickner, et al.** (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **20**(7): 884-97.
- Boulanger, A., A. Francez-Charlot, et al.** (2005). Multistress regulation in *Escherichia coli*: expression of osmB involves two independent promoters responding either to sigmaS or to the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol* **187**(9): 3282-6.
- Bordes, P., A. Conter, et al.** (2003). DNA supercoiling contributes to disconnect sigmaS accumulation from sigmaS-dependent transcription in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**(2): 561-71.
- Brantl, S. and E. G. Wagner** (1994). Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation occurs faster than stable antisense/target RNA pairing: an in vitro study of plasmid pIP501. *EMBO J* **13**(15): 3599-607.
- Brantl, S.** (2007). Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 102-9.
- 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. Review.
- Bren A. , Alon U.** (2009) Architecture and Dynamics of Transcriptional Networks. Chapter 2

- Brombacher, E., C. Dorel, et al.** (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.
- Brown, P. K., C. M. Dozois, et al.** (2001). MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **41**(2): 349-63.
- Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P., Hobman, J.L.** 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27** (2-3): 145-163.
- Brown, L. and Elliott, T.** 1997. Mutations that increase expression of the *rpoS* gene and decrease its dependence on hfq function in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **179**: 656-662.
- Burrowes, E., A. Abbas, et al.** (2005). Characterisation of the regulatory RNA RsmB from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* **156**(1): 7-16.
- Busby, S. and Ebright, R. H.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**: 199-213.
- Cai, S. J. and M. Inouye** (2002). EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**(27): 24155-61.
- Calvin, N. M. and Hanawalt, P.C.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**: 2796-2801.
- Carballes, F., C. Bertrand, et al.** (1999). Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol* **34**(3): 442-50.
- Carmany, D. O., K. Hollingsworth, et al.** (2003). Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol* **185**(3): 1112-5.
- Castanie-Cornet, M. P., K. Cam, et al.** (2006). RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**(12): 4264-70.
- Castanie-Cornet, M. P., H. Treffandier, et al.** (2007). The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology* **153**(Pt 1): 238-46.
- 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.* Dec;64(4):694-708. Review.
- Chirwa, N. T. and M. B. Herrington** (2003). CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **149**(Pt 2): 525-35.

- 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, D. J., S. A. Joyce, et al.** (2002). Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol **184**(4): 1204-8.
- Clarke, D. J., I. B. Holland, et al.** (1997). Point mutations in the transmembrane domain of DjlA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Rcs signal transduction pathway. Mol Microbiol **25**(5): 933-44.
- Coburn, G. A., X. Miao, et al.** (1999). Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. Genes Dev **13**(19): 2594-603.
- Costanzo, A., H. Nicoloff, et al.** (2008). ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor sigmaE in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. Mol Microbiol **67**(3): 619-32.
- Costerton, J. W.** (1995). Overview of microbial biofilms. J Ind Microbiol **15**(3): 137-40.
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. J Bacteriol. Jun;182(12):3593-6.
- D'Argenio, D. A. and Miller, S. I.,** (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. Microbiology **150**: 2497-2502.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L.** 2000. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**(12):6640-6650.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, et al.** (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science **280**(5361): 295-8.
- Deana, A. and J. G. Belasco** (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. Genes Dev **19**(21): 2526-33.
- Domka, J., J. Lee, et al.** (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. Environ Microbiol **9**(2): 332-46.
- Dorel, C., O. Vidal, et al.** (1999). Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. FEMS Microbiol Lett **178**(1): 169-75.
- Dorel, C., P. Lejeune, et al.** (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? Res Microbiol **157**(4): 306-14.
- Dove, S. L., S. A. Darst, et al.** (2003). Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. Mol Microbiol **48**(4): 863-74.

Dove, S. L., F. W. Huang, et al. (2000). Mechanism for a transcriptional activator that works at the isomerization step. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13215-20.

Ebel, W., G. J. Vaughn, et al. (1997). Inactivation of mdoH leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**(21): 6858-61.

Ebright, R. 1993. Transcription activation at class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**: 797-802.

Eguchi, Y., J. Itou, et al. (2007). B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(47): 18712-7.

Ehretsmann, C. P., A. J. Carpousis, et al. (1992). mRNA degradation in procaryotes. *FASEB J* **6**(13): 3186-92.

Ehretsmann, C. P., A. J. Carpousis, et al. (1992). Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev* **6**(1): 149-59.

Elvers, K. T., K. Leeming, et al. (2002). Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**(6): 331-8.

Enz, S., V. Braun, et al. (1995). Transcription of the region encoding the ferric dicitrate-transport system in *Escherichia coli*: similarity between promoters for fecA and for extracytoplasmic function sigma factors. *Gene* **163**(1): 13-8.

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 high-temperature gene expression." *Genes Dev* **3**(9): 1462-71.

Etchegaray, J. P., P. G. Jones, et al. (1996). Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, cspA and cspB, of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **1**(2): 171-8.

Fabret, C., V. A. Feher, et al. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**(7): 1975-83.

Fairbanks, G., T. L. Steck, et al. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10**(13): 2606-17.

Fang, L., Y. Hou, et al. (1998). Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the cspA mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**(1): 90-5.

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**(5): 1665-82.

- Fiedler, U. and V. Weiss** (1995). A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J* **14**(15): 3696-705.
- Flores, N., S. Flores, et al.** (2005). Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng* **7**(2): 70-87.
- Francez-Charlot, A., B. Laugel, et al.** (2003). RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**(3): 823-32.
- Francez-Charlot, A., M. P. Castanie-Cornet, et al.** (2005). Osmotic regulation of the *Escherichia coli* bdm (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol* **187**(11): 3873-7.
- Fraser, G. M. and Hughes, C.,** (1999). Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(6): 630-5.
- Fredericks CE, Shibata S, Aizawa S, Reimann SA, Wolfe AJ.** 2006. Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay. *Mol Microbiol.* Aug;61(3):734-47. Epub 2006 Jun 15.
- Fried, M. G. and D. M. Crothers** (1984). Equilibrium studies of the cyclic AMP receptor protein-DNA interaction. *J Mol Biol* **172**(3): 241-62.
- Gaal, T., W. Ross, et al.** (2001). Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**(4): 939-54.
- Gao, R., T. R. Mack, et al.** (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**(5): 225-34.
- Georgellis, D., O. Kwon, et al.** (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**(5525): 2314-6.
- Georgellis, D., O. Kwon, et al.** (1999). Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *J Biol Chem* **274**(50): 35950-4.
- Georgellis, D., A. S. Lynch, et al.** (1997). In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**(17): 5429-35.
- Gerstel, U., C. Park, et al.** (2003). Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol* **49**(3): 639-54.
- Gerstel, U. and U. Romling** (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ Microbiol* **3**(10): 638-48.
- Gottesman, S.** (1984). "Bacterial regulation: global regulatory networks." *Annu Rev Genet* **18**: 415-41.

- Gottesman, S., P. Trisler, et al.** (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* **162**(3): 1111-9.
- Gottesman, S.** (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**(7): 399-404.
- Grigorova, I. L., N. J. Phleger, et al.** (2006). Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5332-7.
- Grimsley, J. K., R. B. Tjalkens, et al.** (1994). Subunit composition and domain structure of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **269**(24): 16977-82.
- Groban, E. S., E. J. Clarke, et al.** (2009). Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol* **390**(3): 380-93.
- 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. Review.
- Gudapaty, S., K. Suzuki, et al.** (2001). Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(20): 6017-27.
- Guzman, L. M., D. Belin, et al.** (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J Bacteriol* **177**(14): 4121-30.
- Hagiwara, D., M. Sugiura, et al.** (2003). Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**(19): 5735-46.
- Hammar, M., A. Arnqvist, et al.** (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**(4): 661-70.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557-580.
- Hanks, S. K. and T. Hunter** (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**(8): 576-96.
- Hartz, D., D. S. McPheeters, et al.** (1988). Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. *Methods Enzymol* **164**: 419-25.

- Hayashi, K., N. Morooka, et al.** (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0007.
- Heeb, S. and D. Haas** (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(12): 1351-63.
- Heeb, S., C. Blumer, et al.** (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **184**(4): 1046-56.
- Helmann, J. D.** 1991. Alternativ sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* **5**: 2875-2882.
- 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**: 887-893.
- Hengge-Aronis, R.** 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. In: *Bacterial stress response*. pp. 161-177 (eds. Hengge-Aronis, R. and Storz, G.) ASM-Press, Washington, D.C.
- Hengge-Aronis, R.** 2000b Mechanism of σ^S regulation (Stress signal transduction and regulatory mechanism in the control of σ^S (RpoS) subunit of RNA-polymerase. *Microbiol Molec Biol Rev.* **66**: 373-95
- Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanism involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **66**: 373-395.
- Hengge-Aronis, R.** (2002). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3): 341-6.
- Hengge, R.** (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **631**: 40-53.
- Hommais, F., E. Krin, et al.** (2004). GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**(Pt 1): 61-72.
- Hoch, J. A.** (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**(2): 165-70.
- Howell, A., S. Dubrac, et al.** (2006). Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol Microbiol* **59**(4): 1199-215.
- Huala, E., J. Stigter, et al.** (1992). The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. *J Bacteriol* **174**(4): 1428-31.
- Hulko M, Berndt F, Gruber M, Linder JU, Truffault V, Schultz A, Martin J, Schultz JE, Lupas AN, Coles M.** (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in

transmembrane signaling. *Cell. Sep* 8;126(5):929-40.

Hung, D. L., T. L. Raivio, et al. (2001). Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J* **20**(7): 1508-18.

Ilag, L. L., L. F. Westblade, et al. (2004). Mass spectrometry of *Escherichia coli* RNA polymerase: interactions of the core enzyme with sigma70 and Rsd protein. *Structure* **12**(2): 269-75.

Ishige, K., S. Nagasawa, et al. (1994). A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J* **13**(21): 5195-202.

Iuchi, S. (1993). Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**(32): 23972-80.

Iuchi, S. and E. C. Lin (1988). *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6): 1888-92.

Iuchi, S., V. Chepuri, et al. (1990). Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the *arc* regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and lac fusions of *cyo* and *cyd*. *J Bacteriol* **172**(10): 6020-5.

Iuchi, S., Z. Matsuda, et al. (1990). The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. *Mol Microbiol* **4**(5): 715-27.

Jenal, U. and R. Hengge-Aronis (2003). Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol* **6**(2): 163-72.

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

Jeon, Y., Y. S. Lee, et al. (2001). Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* 276(44): 40873-9.

Jishage, M., K. Kvint, et al. (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* 16(10): 1260-70.

Jishage, M. and Ishihama, A. 1998. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major σ subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4953-4958.

Jonas, K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Römling, and O. Melefors, (2008). The RNA binding protein CsrA controls c-di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* 70:236-257.

Jonas, K., H. Tomenius, et al. (2006). Identification of YhdA as a regulator of the *Escherichia coli* carbon storage regulation system. *FEMS Microbiol Lett* **264**(2): 232-7.

Johansen, J., A. A. Rasmussen, et al. (2006). Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol* 364(1): 1-8.

Jourlin, C., M. Ansaldi, et al. (1997). Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 267(4): 770-7.

Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54: 499-518.

Ishihama, A. (1993). Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* 175(9): 2483-9.

Juarez, A., J. M. Nieto, et al. (2000). Interaction of the nucleoid-associated proteins Hha and H-NS to modulate expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 485: 127-31.

Jubelin, G., A. Vianney, et al. (2005). CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187(6): 2038-49.

Kahn, D. and G. Ditta (1991). Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol Microbiol* 5(4): 987-97.

Kato, A., A. Y. Mitrophanov, et al. (2007). A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(29): 12063-8.

Kato, A. and E. A. Groisman (2004). Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor." *Genes Dev* 18(18): 2302-13.

Kelley, W. L. and C. Georgopoulos (1997). Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 25(5): 913-31.

Kennell, D. (2002). Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria. *J Bacteriol* 184(17): 4645-57; discussion 4665.

Kern, R., A. Malki, et al. (2007). *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol* 189(2): 603-10.

Khorchid, A. and M. Ikura (2006). Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* 38(3): 307-12.

Klauck, E., M. Lingnau, et al. (2001). Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40(6): 1381-90.

- Klein, A. H., A. Shulla, et al.** (2007). The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J Bacteriol* **189**(15): 5574-81.
- Krin, E., S. Derzelle, et al.** (2008). Regulatory role of UvrY in adaptation of *Photorhabdus luminescens* growth inside the insect. *Environ Microbiol* **10**(5): 1118-34.
- Kusano, S., Ding, Q. Q., Fujita, N. and Ishihama, A.** 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes- Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.* **271**: 1998-2004
- Kustu, S., Santero, E., Keener, E., Popham, D. and Weiss, D.** 1989. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**: 367-376.
- Kwon, O., D. Georgellis, et al.** (2000). Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(13): 3858-62.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Landt, S. G., E. Abeliuk, et al.** (2008). Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **68**(3): 600-14.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R.** 1994a. The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the level of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* **8**: 1600-1612.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R.** 1994b. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* **13**: 733-743.
- Laub, M. T. and M. Goulian** (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121-45.
- Lacour, S., A. Kolb, et al.** (2003). Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial sigmaS-RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**(39): 37160-8.
- Laurie, A. D., L. M. Bernardo, et al.** (2003). The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**(3): 1494-503.
- Lee, J., R. Page, et al.** (2007). Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *J Mol Biol* **373**(1): 11-26.
- Lee, S. J., A. Xie, et al.** (1994). Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol Microbiol* **11**(5): 833-9.

- Lenz, D. H., M. B. Miller, et al.** (2005). CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **58**(4): 1186-202.
- Liu, X. and P. De Wulf** (2004). Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* **279**(13): 12588-97.
- Liu, M. Y., G. Gui, et al.** (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**(28): 17502-10.
- Lohrmann, J. and K. Harter** (2002). Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* **128**(2): 363-9.
- Lonetto, M., Gribskov, M. and Gross, C. A.** 1992. The σ^{70} family: sequence conversation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**: 3843-3849.
- Lucht, J.M., Dersch, P., Kempf, B. and Bremer, E.** 1994. Interaction of the nucleoid – associated DNA – binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 6578-6578.
- Lukat, G. S., W. R. McCleary, et al.** (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2): 718-22.
- Luppens, S. B., M. W. Reij, et al.** (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* **68**(9): 4194-200.
- Livny, J. and M. K. Waldor** (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 96-101.
- Lynch, A. S. and E. C. Lin** (1996). Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**(21): 6238-49.
- Ma, Z., S. Gong, et al.** (2003). GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**(5): 1309-20.
- Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, et al.** (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**(6477): 242-5.
- Maira-Litran, T., D. G. Allison, et al.** (2000). An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J Antimicrob Chemother* **45**(6): 789-95.
- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. and Gottesman, S.** 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an anti silencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (21): 12462-12467.

- Majdalani, N., S. Chen, et al.** (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* 39(5): 1382-94.
- 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): 813-826.
- Majdalani, N. and S. Gottesman** (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* 59: 379-405.
- Majdalani, N., M. Heck, et al.** (2005). Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187(19): 6770-8.
- Malpica, R., G. R. Sandoval, et al.** (2006). Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal* 8(5-6): 781-95.
- Malpica, R., B. Franco, et al.** (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13318-23.
- Martinez-Antonio, A. and J. Collado-Vides** (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6(5): 482-9.
- Martinez-Hackert, E. and A. M. Stock** (1997). Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol* 269(3): 301-12.
- Marquardt, M.** 2006. Regulation der σ^S -Untereinheit der RNA-Polymerase durch die patatin-ähnliche Phospholipase RssA. Dissertation FU Berlin
- Masse, E., F. E. Escorcía, et al.** (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 17(19): 2374-83.
- Masuda, N. and G. M. Church** (2003). Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48(3): 699-712.
- Mayover, T. L., C. J. Halkides, et al.** (1999). Kinetic characterization of CheY phosphorylation reactions: comparison of P-CheA and small-molecule phosphodonors. *Biochemistry* 38(8): 2259-71.
- McCleary, W. R.** (1996). The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol Microbiol* 20(6): 1155-63.
- Méndez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Membrillo-Hernández, J.** (2006). Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger cdi-GMP. *J. Biol. Chem.* 281(12): 8090-8099
- McCleary, W. R., J. B. Stock, et al.** (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* 175(10): 2793-8.

- Merrick, M. J.** 1993. In a class of its own – the RNA Polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol. Microbiol.* **10**: 903-909.
- Michael, B., J. N. Smith, et al.** (2001). SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* **183**(19): 5733-42.
- Mika, F. and R. Hengge** (2005). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev* **19**(22): 2770-81.
- Mika, F.** 2006. Regulation des generellen Streß-Sigmafaktors σ_S (RpoS) durch Zwei-Komponenten-Systeme und cAMP-CRP in *Escherichia coli*. Dissertation FU Berlin
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 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 Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mizuno, T., M. Y. Chou, et al.** (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1966-70.
- Mizuno, T.** (1997). Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**(2): 161-8.
- Mizuno, T. and I. Tanaka** (1997). Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol Microbiol* **24**(3): 665-7.
- Moll, I., T. Afonyushkin, et al.** (2003). Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**(11): 1308-14.
- Moolenaar, G. F., C. A. van Sluis, et al.** (1987). Regulation of the *Escherichia coli* excision repair gene *uvrC*. Overlap between the *uvrC* structural gene and the region coding for a 24 kD protein. *Nucleic Acids Res* **15**(10): 4273-89.
- Mousslim, C. and E. A. Groisman** (2003). Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**(2): 335-44.
- Mousslim, C., T. Latifi, et al.** (2003). Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated *ugd* gene. *J Biol Chem* **278**(50): 50588-95.
- Msadek, T.** (1999). When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* **7**(5): 201-7.
- Muffler, A., Fischer, D. and Hengge-Aronis, R.** 1996a. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β RNA replication, is essential for the translational regulation of *rpoS* in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**: 1143-1151.

- Muffler, A., Traulsen, D. D., Lange, R. and Hengge-Aronis, R.** 1996b. Posttranscriptional osmotic regulation of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**: 1607-1613.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. and Hengge-Aronis, R.** 1996c. The response regulator RssB controls stability of σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. EMBO J. **15**: 1333-1339.
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Fischer, D., Lange, R. and Hengge-Aronis, R.** 1997. Heat shock regulation of σ^S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^S and σ^{32} in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **179**: 445-452.
- Muller-Hill, B.** (1975). Lac repressor and lac operator. Prog Biophys Mol Biol **30**(2-3): 227-52.
- Mulligan, M. E., Hawlex, D. K., Entriken, R. and McClure, R. W.** 1984 *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. Nucl. Acids Res. **12**: 789-800.
- Nagasawa, S., S. Tokishita, et al.** (1992). A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **6**(6): 799-807.
- Narberhaus, F., T. Waldminghaus, et al.** (2006). RNA thermometers. FEMS Microbiol Rev **30**(1): 3-16.
- Nara, F., S. Matsuyama, et al.** (1986). Molecular analysis of mutant ompR genes exhibiting different phenotypes as to osmoregulation of the ompF and ompC genes of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet **202**(2): 194-9.
- Nguyen, L. H., D. B. Jensen, et al.** (1993). In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli* katF/rpoS gene product. Biochemistry **32**(41): 11112-7.
- Nichols, B. P., O. Shafiq, et al.** (1998). Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction. J Bacteriol **180**(23): 6408-11.
- Nieto, J. M., C. Madrid, et al.** (2000). Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. Mol Gen Genet **263**(2): 349-58.
- Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, et al.** (1993). Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. J Bacteriol **175**(21): 7024-32.
- Oka, A., H. Sakai, et al.** (2002). His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. Genes Genet Syst **77**(6): 383-91.
- Olsen, A., A. Arnqvist, et al.** (1993). Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. Infect Agents Dis **2**(4): 272-4.

- Olsen, A., A. Jonsson, et al.** (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338(6217): 652-5.
- Opdyke, J. A., J. G. Kang, et al.** (2004). GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186(20): 6698-705.
- Oshima, T., H. Aiba, et al.** (2002). Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 46(1): 281-91.
- Otto, K. and T. J. Silhavy** (2002). Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2287-92.
- O'Toole, G.A., Kaplan, H.B., and Kolter, R.,** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49–79.
- Pan, S. Q., T. Charles, et al.** (1993). Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant--*Agrobacterium* signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 9939-43.
- Parker, C. T., A. W. Kloser, et al.** (1992). Role of the rfaG and rfaP genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174(8): 2525-38.
- Parkinson, J. S. and E. C. Kofoid** (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26: 71-112.
- Pelton, J. G., S. Kustu, et al.** (1999). Solution structure of the DNA-binding domain of NtrC with three alanine substitutions. *J Mol Biol* 292(5): 1095-110.
- Pena-Sandoval, G. R., O. Kwon, et al.** (2005). Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. *J Bacteriol* 187(9): 3267-72.
- Perego, M. and J. A. Hoch** (1996). Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends Genet* 12(3): 97-101.
- Perego, M.** (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16): 8612-7.
- Perez-Rueda, E. and J. Collado-Vides** (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 28(8): 1838-47.
- Pernestig, A. K., O. Melefors, et al.** (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276(1): 225-31.
- Pernestig, A. K., D. Georgellis, et al.** (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol* 185(3): 843-53.

- Perraud, A. L., B. Kimmel, et al.** (1998). Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol* **27**(5): 875-87.
- Perraud, A. L., V. Weiss, et al.** (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**(3): 115-20.
- Pesavento, C., G. Becker, et al.** (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**(17): 2434-46.
- Pesavento, C. and R. Hengge** (2009a). Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:
- Peters, J. E., T. E. Thate, et al.** (2003). Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* **185**(6): 2017-21.
- Peterson, C. N., V. J. Carabetta, et al.** (2006). LrhA regulates rpoS translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**(9): 3175-81.
- Phillips, R. M., D. A. Six, et al.** (2003). In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **278**(42): 41326-32.
- Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, et al.** (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**(6): 865-75.
- Powell, B. S., Court, D. L., Nakamura, Y., Rivas, M. P. and Turnbough, C. L.** 1994. Rapid confirmation 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 R. Kolter** (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **2**(6): 598-603.
- 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., E. Brombacher, et al.** (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the csgD gene. *J Bacteriol* **183**(24): 7213-23.
- Pristovsek P, Sengupta K, Löhr F, Schäfer B, von Trebra MW, Rüterjans H, Bernhard F.** 2003. Structural analysis of the DNA-binding domain of the *Erwinia amylovora* RcsB protein and its interaction with the RcsAB box. *J Biol Chem.* May 16;278(20):17752-9

- Pruteanu, M. and Hengge-Aronis, R.** 2002. The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for σ^S proteolysis: implication for RssB regulation and signal transduction in σ^S turnover in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1701-1714.
- Prüß, B.M., Besemann, C., Denton, A., and Wolfe, A.J.,** (2006). A complex transcription network controls the early stages of biofilm development in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 3731–3739.
- Raina S, Missiakas D, Georgopoulos C.** 1995. The rpoE gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* Mar 1;14(5):1043-55.
- Raivio, T. L. and T. J. Silhavy** (2001). Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **55**: 591-624.
- Repoila, F. and F. Darfeuille** (2009). Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* **101**(2): 117-31.
- Pfeiffer, V., K. Papenfort, et al.** (2009). Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* **16**(8): 840-6.
- Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D.** 2004. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Apr;186(7):2085-90.
- Romantsov, T., L. Stalker, et al.** (2008). Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **283**(18): 12314-23.
- Romantsov, T., Z. Guan, et al.** (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1788**(10): 2092-100.
- Romeo, T.** (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* **29**(6): 1321-30.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. and Normark, S.** 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28**: 249-264.
- Römling, U. and M. Rohde** (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol Lett* 180(1): 91-102.
- Römling, U., M. Rohde, et al.** (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* 36(1): 10-23.
- Römling, U.** (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* 153(4): 205-12.
- Römling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M.Y.,** (2005). C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57: 629–639.

- Rouviere, P. E. and C. A. Gross** (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* **10**(24): 3170-82.
- Ross, P., H. Weinhouse, et al.** (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**(6101): 279-81.
- Sahu, S. N., S. Acharya, et al.** (2003). The bacterial adaptive response gene, *barA*, encodes a novel conserved histidine kinase regulatory switch for adaptation and modulation of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biochem* **253**(1-2): 167-77.
- Salmon, K. A., S. P. Hung, et al.** (2005). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* **280**(15): 15084-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, H., D. W. Frank, et al.** (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**(12): 2959-69.
- Sharma, C. M., F. Darfeuille, et al.** (2007). A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**(21): 2804-17.
- Sheridan, S. D., C. J. Benham, et al.** (1998). Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. *J Biol Chem* **273**(33): 21298-308.
- Shiba, Y., Y. Yokoyama, et al.** (2004). Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J Bacteriol* **186**(19): 6526-35.
- Shin, S. and C. Park** (1995). Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol* **177**(16): 4696-702.
- Shinomura, T., Y. Asaoka, et al.** (1991). Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5149-53.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W.** 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Simons, R. W., Houman, F. and Kleckner, N.** 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*. **53**: 85-96.
- Singh, P. K., M. R. Parsek, et al.** (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**(6888): 552-5.
- Siryaporn, A. and M. Goulian** (2008). Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Mol Microbiol* **70**(2): 494-506.

- Sittka, A., S. Lucchini, et al.** (2008). Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4**(8): e1000163.
- Skerker, J. M., B. S. Perchuk, et al.** (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* **133**(6): 1043-54.
- Sledjeski, D. D., Gupta, A. and Gottesman, S.** 1996. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *E.coli*. *EMBO J.* **15**: 3993-4000.
- Snyder, M. A., J. B. Stock, et al.** (1984). Carboxymethyl esterase of bacterial chemotaxis. *Methods Enzymol* **106**: 321-30.
- Sommerfeldt, N., A. Possling, et al.** (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**(Pt 4): 1318-31.
- Sridhar, J., K. Sekar, et al.** (2009). CsrA interacting small RNAs in *Haemophilus* spp genomes: a theoretical analysis. *Arch Microbiol* **191**(5): 451-9.
- Stanley NR, Lazazzera BA.** 2004Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* May;52(4):917-24. Review.
- Stevens, A. M., N. Fujita, et al.** (1999). Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J Bacteriol* **181**(15): 4704-7.
- Stock, J. and S. Da Re** (2000). Signal transduction: response regulators on and off. *Curr Biol* **10**(11): R420-4.
- Stock, J. and M. Levit** (2000). Signal transduction: hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr Biol* **10**(1): R11-4.
- Stock, J. and S. Da Re** (1999). A receptor scaffold mediates stimulus-response coupling in bacterial chemotaxis. *Cell Calcium* **26**(5): 157-64.
- Stock, A. M., J. M. Mottonen, et al.** (1989). Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* **337**(6209): 745-9.
- Storz, G., J. A. Opdyke, et al.** (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**(2): 140-4.
- Stout, V. and S. Gottesman** (1990). RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**(2): 659-69.
- Strauch, M. A., D. de Mendoza, et al.** (1992). cis-unsaturated fatty acids specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **6**(20): 2909-17.

- Suzuki, K., X. Wang, et al.** (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**(18): 5130-40.
- Suzuki, K., P. Babitzke, et al.** (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**(18): 2605-17.
- Swanson, R. V., R. B. Bourret, et al.** (1993). Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* **8**(3): 435-41.
- Szurmant, H., L. Bu, et al.** (2008). An essential sensor histidine kinase controlled by transmembrane helix interactions with its auxiliary proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5891-6.
- Takeda, S., Y. Fujisawa, et al.** (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, σ^{38} , is a second principle sigma factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3511-3515.
- Tanaka, K., Kusano, S., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H.** 1995. Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing σ^{38} (the *rpoS* gene product). *Nucl. Acids Res.* 1995.**23**: 827-834.
- 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.
- Taylor, B. L. and I. B. Zhulin** (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 479-506.
- Teplitski, M., R. I. Goodier, et al.** (2003). Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in Salmonella. *J Bacteriol* **185**(24): 7257-65.
- Tramonti, A., M. De Canio, et al.** (2008). GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gadY-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol* **70**(4): 965-82.
- Tschowri, N., S. Busse, et al.** (2009). The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**(4): 522-34.
- Tsuzuki, M., K. Ishige, et al.** (1995). Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants. *Mol Microbiol* **18**(5): 953-62.
- Tjaden, B., S. S. Goodwin, et al.** (2006). Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2791-802.

- Tomenius, H., A. K. Pernestig, et al.** (2006). The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. *BMC Microbiol* **6**: 27.
- Tomenius, H., A. K. Pernestig, et al.** (2005). Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *J Bacteriol* **187**(21): 7317-24.
- Typas, A., C. Barembruch, et al.** (2007). Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of sigmas activity and levels. *EMBO J* **26**(6): 1569-78.
- Typas, A. and R. Hengge** (2006). Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigmas promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**(3): 1037-51.
- Udekwi, K. I., F. Darfeuille, et al.** (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev* **19**(19): 2355-66.
- Uhl, M. A. and J. F. Miller** (1996). Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* **15**(5): 1028-36.
- Urban, J. H. and J. Vogel** (2007). Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* **35**(3): 1018-37.
- Updegrave, T., N. Wilf, et al.** (2008). Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry* **47**(43): 11184-95.
- Valentin-Hansen, P., L. Sogaard-Andersen, et al.** (1996). A flexible partnership: the CytR anti-activator and the cAMP-CRP activator protein, comrades in transcription control. *Mol Microbiol* **20**(3): 461-6.
- Van Houdt, R. and C. W. Michiels** (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* **156**(5-6): 626-33.
- Vianney, A., G. Jubelin, et al.** (2005). *Escherichia coli* tol and rcs genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* **151**(Pt 7): 2487-97.
- Vidal, O., R. Longin, et al.** (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**(9): 2442-9.
- Valverde, C., S. Heeb, et al.** (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* **50**(4): 1361-79.
- Vecerek, B., I. Moll, et al.** (2007). Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* **26**(4): 965-75.
- Volz, K.** (1993). Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* **32**(44): 11741-53.

- Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. Baker, P. Babitzke, and T. Romeo.** (2005). CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**:1648-1663.
- Wang, X., Preston, III 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, K. M., F. Repoila, et al.** (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**(13): 1637-51.
- Waters, L. S. and G. Storz** (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**(4): 615-28.
- Webber, C. A. and R. J. Kadner** (1997). Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of uhpT transcription in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**(5): 1039-48.
- Weber, H., T. Polen, et al.** (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**(5): 1591-603.
- Weber, H., C. Pesavento, et al.** (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**(4): 1014-34.
- Wei, B. L., A. M. Brun-Zinkernagel, et al.** (2001). Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**(1): 245-56.
- Weigel, N., D. A. Powers, et al.** (1982). Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Primary structure and active site of a general phosphocarrier protein (HPr) from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**(23): 14499-509.
- Weilbacher, T., K. Suzuki, et al.** (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**(3): 657-70.
- Weiss, V., F. Claverie-Martin, et al.** (1992). Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5088-92.
- West, A. H. and A. M. Stock** (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**(6): 369-76.
- Wise, A., R. Brems, et al.** (1996). Sequences in the -35 region of *Escherichia coli* rpoS-dependent genes promote transcription by E sigma S. *J Bacteriol* **178**(10): 2785-93.
- Williams, S. B. and V. Stewart** (1999). Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region

amphipathic helices in transmembrane signal transduction. *Mol Microbiol* **33**(6): 1093-102.

Williams, R.M. and Rimsky, S. 1997. Molecular aspects of the *E.coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* **156** (2): 175-185 Review.

Wolanin, P. M., P. A. Thomason, et al. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**(10): REVIEWS3013.

Wolfe, A. J. (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(1): 12-50.

Wood, T. K. (2009). Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* **11**(1): 1-15.

Wurgler-Murphy, S. M. and H. Saito (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**(5): 172-6.

Wyman, C., I. Rombel, et al. (1997). Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**(5306): 1658-61.

Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2005). Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* **437**(7059): 750-3.

Xavier, K. B. and B. L. Bassler (2005). Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**(1): 238-48.

Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A. 2005. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* Jan 14;280(2):1448-56.

Yaku, H., M. Kato, et al. (1997). Interaction between the CheY response regulator and the histidine-containing phosphotransfer (HPt) domain of the ArcB sensory kinase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **408**(3): 337-40.

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.

Zapf, J., U. Sen, et al. (2000). A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**(8): 851-62.

Zhang, Z., G. Gosset, et al. (2005). Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**(3): 980-90.

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. and Storz, G. 1998. The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.* **17**: 6061-6068.

Zhu, Y., L. Qin, et al. (2000). Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7808-13.

Zogaj, X., M. Nitz, et al. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**(6): 1452-63.

Zogaj, X., W. Bokranz, et al. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* **71**(7): 4151-8.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3406-15.

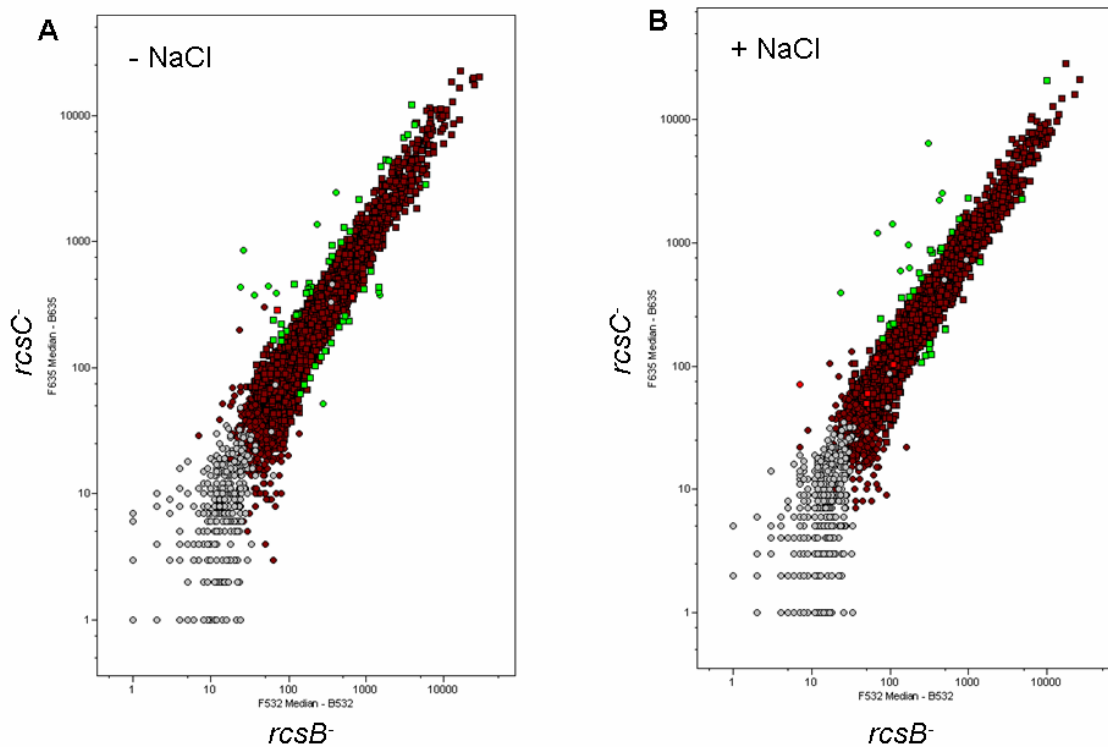
Anhang

I. Durch RssA mindestens dreifach differentiell regulierte Gene im *arcA*⁺ und *arcA*⁻-Hintergrund

Genname	Mittelwert <i>arcA</i> ⁺ Hintergrund	Mittelwert <i>arcA</i> ::kan Hintergrund
Gruppe I		
<i>deoA</i>	11.612	3.5939
<i>deoB</i>	9.5043	10.233
<i>deoC</i>	30.607	40.005
<i>galU</i>	0.18722	0.18047
<i>maeB</i>	0.23576	0.26441
<i>ompW</i>	0.16167	0.097009
<i>oppC</i>	0.10064	0.077223
<i>oppD</i>	0.11118	0.052486
<i>phnK</i>	0.26837	0.10782
Gruppe II		
<i>ansB</i>	0.12959	0.87915
<i>fdnG</i>	0.20680	1.1307
<i>fdnH</i>	0.20330	0.84899
<i>narG</i>	0.10461	0.84731
<i>narH</i>	0.13267	0.65658
<i>narJ</i>	0.14508	0.78228
<i>nikA</i>	0.31807	0.76583
<i>nirB</i>	0.10168	0.70245
<i>nirC</i>	0.19595	0.76504
<i>ompF</i>	0.14541	0.55103
Gruppe III		
<i>cbpM</i>	1.1884	0.26724
<i>cysI</i>	0.53756	0.28225
<i>cysJ</i>	0.63211	0.074923
<i>flu</i>	0.95923	4.4657
<i>gadB</i>	0.79192	0.22077
<i>rmf</i>	0.80247	0.10918
<i>treB</i>	0.97632	13.642
<i>wbbK</i>	1.9608	3.7051
<i>wbbL</i>	2.0253	3.5990
<i>ydaM</i>	0.84944	0.25218
<i>yeeD</i>	2.0950	0.18131
<i>yeeE</i>	2.2523	0.10979
<i>yeeR</i>	1.9465	4.3711
<i>yhiM</i>	1.1990	0.19334

II. Scatterplots und Tabellen der Untersuchung des Rcs-Systems unter normalen und Osmoschockbedingungen

Die mehr als zweifach differentiell regulierten Gene sind in den Scatterplots grün hervorgehoben und in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.



Arraybedingungen: M9-Medium, OD_{578nm} 0,3 + (A) / - (B) NaCl

Tabelle *rscB*⁻ vs. *rscC*⁻ ohne NaCl

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
<i>rscC</i>	B2218	0.186	RcsC sensor kinase
<i>slyB</i>	b1641	0.246	evt. äußeres Membranprotein
<i>flhD</i>	b1892	0.268	Masterregulator Flagellensynthese
<i>flhC</i>	b1891	0.299	transkriptionaler Regulator
b1979	b4497	0.397	evt. Transmembranprotein
<i>lsrG</i>	b1518	0.441	konserviertes hypoth. Protein
<i>ispA</i>	b0421	0.444	Farnesyl (geranyl) diphosphate synthase
<i>srlR</i>	b2707	0.447	Gut transkript. Repressor
<i>yhaU</i>	b3127	0.447	MFS (major facilitator superfamily) Transporter
<i>fadI</i>	b2342	0.453	FadI monomer
<i>cmtA</i>	B2933	0.466	mannitol PTS permease Komponente
<i>yhaE</i>	b3125	0.469	Tartronate semialdehyde reductase
<i>yibF</i>	b3592	0.470	Glutathione transferase-like protein (Selenium-metabolism)
<i>ycfP</i>	b1108	0.472	evt. Hydrolase
<i>malK</i>	b4035	0.476	subunit of maltose ABC transporter, Maltose/maltodextrin transporter system
<i>fliJ</i>	b1942	0.483	Flagellar biosynthese Protein
<i>rbsC</i>	b3750	0.491	subunit of ribose ABC transporter

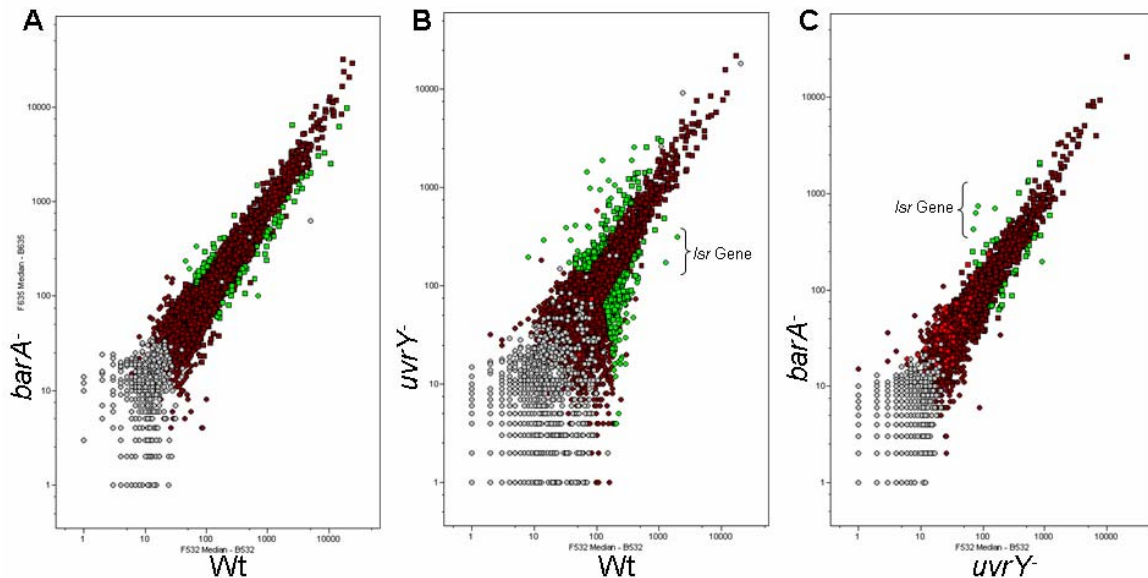
yceJ	b1057	0.492	evt. cytochrome
folC	b2315	2.003	folylpoly-g-glutamate synthetase / dihydrofolate synthetase
hns	b1237	2.017	Transkriptionsregulator
potH	b0856	2.018	Putrescine ABC transporter
dapE	b2472	2.018	N-succinyl-L-diaminopimelate desuccinylase subunit
cysG	b3368	2.035	subunit of uroporphyrinogen methyltransferase / 1,3-dimethyluroporphyrinogen III dehydrogenase / siroheme ferrochelatase
uxaB	b1521	2.050	Altronate oxidoreductase
cspI	b1552	2.098	Cold shock protein
yihI	b3866	2.121	konserviertes Protein
yojI	b2211	2.129	ABC superfamily transporter
pgpA	b0418	2.151	phosphatidylglycerophosphatase A
yqaA	b2689	2.192	evt. Integrales Membranprotein
mopB	b4142	2.228	GroES, 10 Kd chaperone binds to Hsp60 in pres. Mg-ATP, suppressing its ATPase activity
ibpA	b3687	2.244	small heat shock protein
ybaA	b0456	2.247	kons. hypoth. Protein
cspG	b0990	2.268	Cold shock protein
ynaJ	b1332	2.292	kons. hypoth. Protein
chpB	b4225	2.330	Transkriptionsregulator
cutC	b1874	2.354	Copper homeostasis protein
potC	b1124	2.445	subunit of putrescine/spermidine ABC transporter
ynaE	b1375	2.525	hypothet. Protein
fabB	b2323	2.549	FabB, subunit of beta-ketoacyl-ACP synthase I / malonyl-ACP decarboxylase
ygfO	b2882	2.570	NCS2 transporter
mgrB	b1826	2.579	hypothet. Protein
yjeB	b4178	2.582	conserved protein with a winged helix domain
hflB	b3178	2.653	FtsH , subunit of FtsH, integral membrane peptidase
ompA	b0957	3.168	outer membrane protein
cadC	b4133	3.779	Transkriptionsaktivator
yqiI	b3048	3.959	konserv. protein
ygcS	b2771	5.850	MFS transporter
yeiS	b2145	5.856	hypothet. Protein
flu	b2000	6.173	äußeres Membranprotein (fluffing)
hdeA	b3510	8.021	subunit of HdeA dimer, inactive acid-resistance protein, possible chaperon
yeeR	b2001	10.728	hypothetisches Protein
ymgD	b1171	18.150	hypothetisches Protein
ymgG	b1172	30.915	hypothetisches Protein

Tabelle *rcsB* vs. *rcsC* mit NaCl

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
hisL	b2018	0.384	operon leader peptid
thrL	b0001	0.392	operon leader peptid
dacA	b0632	0.405	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, fraction A; penicillin-binding protein 5
pqqL	b1494	0.447	evt. Zinc peptidase
ycgF	b1163	0.456	konserv. Protein
yfcM	b2326	0.482	evt. transporting ATPase
cysD	b2752	0.483	subunit of sulfate adenylyltransferase
hisI	b2026	0.491	phosphoribosyl-AMPCyclohydrolase phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase
yfcA	b2327	0.498	hypothet. Protein
mltB	b2701	2.006	membrane-bound lytic murein transglycosylase B
mopA	b4143	2.009	GroEL, chaperone Hsp60, peptide-dependent ATPase, heat shock protein
pykF	b1676	2.038	pyruvate kinase I monomer
ycgZ	b1164	2.042	hypothet. Protein
nhaA	b0019	2.051	sodium:proton NhaA transporter
yaB	b3563	2.070	inner membrane protein
valS	b4258	2.091	valyl-tRNA synthetase
ynjF	b1758	2.097	putative cytochrome oxidase
yfdC	b2347	2.103	putative Transportprotein
rpsV	b1480	2.120	30S ribosomal subunit
yhcH	b3221	2.144	conserved hypothetical protein gene is in sialic acid catabolic operon
lig	b2411	2.167	DNA ligase
rseA	b2572	2.309	anti-sigma factor that inhibits sigmaE
yciE	b1257	2.446	conserved protein with ferritin-like domain
gadB	b1493	2.469	glutamate decarboxylase
glgS	b3049	2.573	glycogen biosynthesis
rpoE	b2573	2.723	subunit of RNA polymerase sigma 24
b0609	b0609	3.199	hypothet. Protein
ygdI	b2809	3.613	hypothet. Protein
cutC	b1874	4.383	copper homeostasis protein
flu	b2000	5.296	outer membrane fluffing protein, sim. to adhesin
ybdR	b0608	5.559	putative oxidoreductase
phnL	b4096	5.642	member of phosphate regulon
hdeA	b3510	13.196	acid-resistance protein, possible chaperone
rcsB	b2217	16.880	transcriptional activator
hdeB	b3509	17.443	10K-L protein, related to acid resistance protein of <i>Shigella flexneri</i>
bdm	b1481	21.118	hypothet. Protein

III. Scatterplots und Tabellen der differentiell regulierten Gene des BarA/UvrY-Systems

Die mindestens zweifach differentiell regulierten Gene sind in den Scatterplots grün hervorgehoben und in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.



Arraybedingungen: LB, 37°C, stationäre Phase OD_{578nm} 4,5

Tabelle zu Scatterplot A: Wildtyp vs. *barA*-Mutante (SK⁻)

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
aidB	b4187	0.387	isovaleryl-CoA dehydrogenase / predicted acyl-CoA dehydrogenase
araD	b0061	2.169	L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase monomer
ybgS	b0753	0.459	conserved protein
yedQ	b1956	2.080	predicted diguanylate cyclase
casC	b2758	2.126	Cascade subunit C
ygeZ	b2873	2.213	phenylhydantoinase
ygfM	b2880	4.973	predicted oxidoreductase
ygiV	b3023	0.403	transcriptional repressor
bolA	b0435	0.454	transcriptional dual regulator
cbpA	b1000	0.352	subunit of chaperone with DnaK; curved DNA-binding protein
celC	b1736	2.134	subunit of EIIC _{hb}
clpB	b2592	0.435	chaperone
cspA	b3556	0.251	transcriptional activator
dacC	b0839	0.471	penicillin-binding protein 6
dbpA	b1343	2.381	ATP-dependent RNA helicase, specific for 23S rRNA
dps	b0812	0.451	stationary phase nucleoid protein that sequesters iron and protects DNA from damage
fbp	b4232	2.020	subunit of fructose-1,6-bisphosphatase I

fumB	b4122	2.106	fumarase B monomer
gabP	b2663	0.482	APC transporter
gabT	b2662	0.359	4-aminobutyrate aminotransferase monomer
gadB	b1493	0.489	transcriptional activator (<i>acid-responsive regulator of gadA and gadBC</i>)
glgA	b3429	0.439	glycogen synthase
glpF	b3927	3.141	subunit of GlpF glycerol MIP channel
gmd	b2053	2.433	GDP-mannose 4,6-dehydratase
hflK	b4174	0.458	HflK-HflC complex; regulator of FtsH protease
hyaA	b0972	0.427	hydrogenase 1, small subunit
hyaC	b0974	0.341	hydrogenase 1, b-type cytochrome subunit
hyaD	b0975	0.397	protein involved in processing of HyaA and HyaB proteins
ldcC	b0186	0.305	subunit of lysine decarboxylase 2
leuO	b0076	2.338	transcriptional dual activator
malM	b4037	2.047	maltose regulon periplasmic protein
mcrD	b4344	2.328	conserved protein
mdoB	b4359	2.178	phosphoglycerol transferase
mgIA	b2149	2.511	subunit of galactose ABC transporter
mgIB	b2150	2.243	subunit of galactose ABC transporter
mutS	b2733	0.396	subunit of MutHLS complex, methyl-directed mismatch repair
nuoL	b2278	0.497	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit L
ompF	b0929	2.567	subunit of outer membrane porin F
potF	b0854	2.433	subunit of putrescine ABC transporter
priA	b3935	2.134	primosome factor N'
priB	b4201	0.460	subunit of primosomal replication protein N
purC	b2476	0.355	subunit of phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
purM	b2499	0.251	subunit of phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
rpiB	b4090	2.489	allose-6-phosphate isomerase / ribose-5-phosphate isomerase B monomer
rplW	b3318	0.496	50S ribosomal subunit protein L23
rpsF	b4200	0.483	30S ribosomal subunit protein S6
sfmF	b0534	0.496	predicted fimbrial-like adhesin protein
sucA	b0726	0.426	subunit of E1(0) component of 2-oxoglutarate dehydrogenase
sucC	b0728	0.424	succinyl-CoA synthetase, β subunit
sucD	b0729	0.389	succinyl-CoA synthetase, α subunit
tdcB	b3117	4.974	subunit of catabolic threonine dehydratase
tktB	b2465	0.492	subunit of transketolase II
trkA	b3290	2.458	NAD-binding component of TrK potassium transporter
yadS	b0157	0.145	conserved inner membrane protein

yaeR	b0187	0.448	predicted lyase
ybaA	b0456	2.026	conserved protein
ybaS	b0485	0.471	glutaminase
ybbI	b0487	0.437	CueR transcriptional dual regulator
ybbU	b0506	0.500	AllR transcriptional repressor
ybdQ	b0607	0.387	universal stress protein UP12
ybjP	b0865	0.484	predicted lipoprotein
ycbR	b0939	0.427	predicted periplasmic pilin chaperone
ycdF	b1005	0.483	Phantom gene
ydcN	b1434	2.517	predicted DNA-binding transcriptional regulator
ydeV	b1511	0.409	predicted Autoinducer-2 kinase (IsrK)
ydeW	b1512	0.344	LsrR transcriptional repressor
ydeY	b1514	0.247	subunit of LsrA/LsrC/LsrD/LsrB ABC transporter
yeaQ	b1795	0.356	conserved inner membrane protein
yecG	b1895	2.002	universal stress protein
yecI	b1902	0.473	predicted ferritin-like protein
yedU	b1967	0.495	heat shock protein (Hsp) 31
yfaA	b2230	2.254	predicted protein
yfbM	b2272	2.149	predicted protein
yfeG	b2437	2.114	putative ARAC-type regulatory protein
ygbF	b2754	2.257	predicted endoribonuclease
ygeW	b2870	2.741	putative carbamoyltransferase
ygfO	b2882	3.743	NCS2 transporter
ygjE	b3063	2.342	TdtT tartrate/succinate DASS transporter
yhiM	b3491	0.401	conserved inner membrane protein
yhiV	b3514	0.419	subunit of MdtEF-TolC multidrug efflux transport system
yjcG	b4067	0.450	SSS transporter
yjcO	b4078	2.356	conserved protein
yjdI	b4126	0.477	conserved protein
yjiS	b4341	2.206	conserved protein
ykfe	b0220	0.470	inhibitor of vertebrate C-type lysozyme
ynaF	b1376	0.385	nucleotide binding filament protein
ynhD	b1682	0.498	SufC component of SufBCD Fe-S cluster scaffold complex
yqjC	b3097	0.397	conserved protein
yqjD	b3098	0.372	conserved protein

Tabelle zu Scatterplot B: Wildtyp vs. *uvrY*-Mutante (RR')

Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
aefA	b0465	2.217	Transporter
agaW	b3134	0.205	PTS system N-acetylgalactosamine-specific IIC component 2
agaY	b3137	0.317	subunit of tagatose-1,6-bisphosphate aldolase 1

aldA	b1415	3.385	subunit of aldehyde dehydrogenase A, NAD-linked
ansB	b2957	0.500	subunit of asparaginase II
argR	b3237	0.449	subunit of ArgR transcriptional dual regulator
aroP	b0112	2.216	phenylalanine/tyrosine/tryptophan APC transporter
atoC	b2220	0.446	transcriptional activator
insO-1	b0257	0.228	CP4-6 prophage
yaiX	b0359	0.105	pseudogene
yaiZ	b0380	2.038	predicted inner membrane protein
ybgS	b0753	0.225	conserved protein
gsiC	b0831	0.407	subunit of gsiABCD glutathione ABC transporter
her	b0872	0.347	NADH oxidoreductase
ymdB	b1045	0.279	subunit of regulator of RNase III activity
ymfS	b1155	0.422	e14 prophage; predicted protein
ycgQ	b1192	2.706	L,D-carboxypeptidase A
yehS	b1228	0.416	predicted protein
ycjY	b1327	0.154	hypothetical protein
ynal	b1330	0.236	conserved inner membrane protein
ydaV	b1360	2.371	putative DNA replication factor
paaY	b1400	0.426	predicted hexapeptide repeat acetyltransferase
yncE	b1452	0.284	conserved protein
lsrB	b1516	0.156	subunit of LsrA/LsrC/LsrD/LsrB ABC transporter
lsrG	b1518	0.130	Autoinducer 2-degrading protein
sad	b1525	0.233	subunit of succinate semialdehyde dehydrogenase, NAD ⁺ -dependent
rsxC	b1629	0.354	member of SoxR-reducing complex
ydhP	b1657	0.183	Polypeptide
yniA	b1725	0.437	predicted phosphotransferase/kinase
ydjN	b1729	0.429	predicted transporter
ves	b1742	0.291	conserved protein
ynjE	b1757	0.496	sulfurtransferase
ydjF	b1770	0.277	predicted DNA-binding transcriptional regulator
ydjI	b1773	3.818	predicted aldolase
yebO	b1825	0.303	predicted protein
yobG	b1826	0.323	small protein involved in the acid stress response
yebR	b1832	0.474	free methionine-(R)-sulfoxide reductase
yeeN	b1983	2.005	conserved protein
wzc	b2060	0.349	subunit of capsular polysaccharide export apparatus
yegS	b2086	3.085	lipid kinase
yfaP	b2225	0.401	conserved protein
yfdS	b2362	4.272	CPS-53 (KpLE1) prophage; predicted protein
ypdA	b2380	0.179	predicted sensory kinase in two-component system with YpdB

fryA	b2383	7.545	fused predicted PTS system enzymes: Hpr component, enzyme I component, enzyme IIA component
yfeS	b2420	0.123	conserved protein
maeB	b2463	0.475	subunit of malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP ⁺)
yfhM	b2520	2.019	α -macroglobulin
ypjC	b2650	2.329	predicted protein
ygdR	b2833	0.355	predicted protein
tas	b2834	0.362	putative NAD(P)-linked reductase that acts in starvation-associated mutation
ygeJ	b2854	0.418	predicted peptidoglycan-binding enzyme
mqsR	b3022	0.423	subunit of MqsR-YgiT complex DNA binding transcriptional repressor
b3975	b3975	0.066	phantom gene
bacA	b3057	0.074	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase
bax	b3570	3.100	putative ATP-binding protein
btuR	b1270	5.601	cobinamide adenosyltransferase / cobalamin adenosyltransferase
caiC	b0037	0.091	carnitine-CoA ligase
cchB	b2456	0.485	predicted carboxysome structural protein
chpB	b4225	2.226	toxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system
chpB	b4225	2.102	toxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system
citF	b0615	0.261	citrate lyase, citrate-ACP transferase α subunit
cmtB	b2934	2.419	subunit of CmtAB mannitol PTS permease
cpxR	b3912	0.320	transcriptional dual regulator
creA	b4397	12.602	conserved protein
creB	b4398	4.692	transcriptional regulator
crp	b3357	0.479	transcriptional dual regulator
cspA	b3556	0.282	transcriptional activator
cspB	b1557	0.207	predicted DNA-binding transcriptional regulator
cutC	b1874	2.152	copper homeostasis protein
cyoA	b0432	2.736	cytochrome <i>bo</i> terminal oxidase subunit II
cysN	b2751	0.489	subunit of sulfate adenylyltransferase
cysU	b2424	0.404	subunit of sulfate ABC transporter
dacA	b0632	0.129	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
dacB	b3182	4.162	D-alanyl-D-alanine endopeptidase
dadA	b1189	3.107	D-amino acid dehydrogenase
dadX	b1190	2.264	subunit of alanine racemase 2
dcm	b1961	0.494	DNA cytosine methylase
dctA	b3528	2.448	DctA dicarboxylate DAACS transporter
deoD	b4384	0.405	subunit of purine nucleoside phosphorylase
dmsB	b0895	3.152	dimethyl sulfoxide reductase
dnaB	b4052	0.449	subunit of replicative DNA helicase and primosome

dnaN	b3701	0.172	subunit of DNA polymerase III
dsdX	b2365	5.261	Gnt transporter
efp	b4147	0.398	protein chain elongation factor EF-P
entC	b0593	2.430	isochorismate synthase 1
entF	b0586	2.348	apo-serine activating enzyme
era	b2566	8.198	GTP-binding protein
farR	b0730	0.428	subunit of MngR transcriptional repressor
fecR	b4292	2.068	regulator for fec operon, periplasmic
fepA	b0584	3.079	outer membrane receptor for ferric enterobactin (enterochelin) and colicins B and D
fhuC	b0151	0.130	subunit of iron (III) hydroxamate ABC transporter
flgA	b1072	5.264	flagellar biosynthesis; assembly of basal-body periplasmic P ring
flgH	b1079	2.443	basal-body outer-membrane L (lipopolysaccharide layer) ring protein
fliD	b1924	0.358	filament capping protein; enables filament assembly
flxA	b1566	0.188	Qin prophage; predicted protein
ftsE	b3463	0.349	subunit of FtsE/FtsX ABC transporter
ftsX	b3462	15.446	subunit of FtsE/FtsX ABC transporter
gltK	b0653	0.181	subunit of GltIJKL glutamate ABC transporter
glyS	b3559	0.456	subunit of glycyl-tRNA synthetase
gmhA	b0222	0.422	subunit of D-sedoheptulose 7-phosphate isomerase
gntT	b3415	2.434	Gluconate Gnt transporter
gpt	b0238	3.015	subunit of xanthine-guanine phosphoribosyltransferase
greA	b3181	3.080	transcription elongation factor GreA
hcaA2	b2539	0.160	subunit of 3-phenylpropionate dioxygenase system
hisA	b2024	0.472	N-(5'-phospho-L-ribosyl-formimino)-5-amino-1-(5'-phosphoribosyl)-4-imidazolecarb oxamide isomerase
hisG	b2019	2.400	subunit of ATP phosphoribosyltransferase
hns	b1237	2.110	transcriptional dual regulator
hsdR	b4350	0.178	subunit of <i>Eco</i> KI restriction-modification system
htrB	b1054	0.122	lauroyl acyltransferase
hycD	b2722	0.023	subunit of hydrogenase 3 and formate hydrogenlyase complex
hypE	b2730	0.274	hydrogenase maturation protein, carbamoyl dehydratase
ilvC	b3774	2.183	subunit of acetohydroxy acid isomeroreductase
ilvG_1	b3767	0.225	subunit of acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase
ilvI	b0077	2.347	subunit of acetolactate synthase / acetohydroxybutanoate synthase
ilvY	b3773	5.490	DNA binding transcriptional dual regulator

ispA	b0421	0.493	geranyl diphosphate synthase / farnesyl diphosphate synthase
lacI	b0345	2.151	transcriptional repressor
lepB	b2568	2.042	leader peptidase (signal peptidase I)
lldR	b3604	0.324	transcriptional repressor
maoC	b1387	3.561	putative ring-cleavage enzyme of phenylacetate degradation
mcrD	b4344	3.092	conserved protein
mesJ	b0188	2.774	tRNA ^{Ile} -lysine synthetase
metB	b3939	0.461	subunit of O-succinylhomoserine lyase / O-succinylhomoserine(thiol)-lyase
miaA	b4171	2.035	tRNA(i ⁶ A37) synthase
modE	b0761	0.247	subunit of ModE transcriptional dual regulator
mscL	b3291	3.214	subunit of mechanosensitive channel MscL
murI	b3967	0.309	subunit of glutamate racemase
nadR	b4390	2.688	transcriptional repressor and NMN adenylyltransferase
nirC	b3367	2.453	nitrite FNT transporter
nlpA	b3661	0.285	lipoprotein-28
nrfG	b4076	0.020	Polypeptide
nth	b1633	0.323	specific for apurinic and/or apyrimidinic sites
oppC	b1245	0.313	subunit of murein tripeptide ABC transporter
osmC	b1482	0.492	osmotically inducible peroxidase
pabB	b1812	0.124	subunit of aminodeoxychorismate synthase
pbpC	b2519	0.238	putative peptidoglycan enzyme
pcm	b2743	2.318	L-isoaspartate protein carboxylmethyltransferase type II
pmrD	b2259	0.460	polymyxin B resistance protein
potA	b1126	2.257	subunit of putrescine/spermidine ABC transporter
potD	b1123	0.279	subunit of putrescine/spermidine ABC transporter
pphB	b2734	0.500	protein-tyrosine-phosphatase
pqiA	b0950	2.411	paraquat-inducible protein A
priB	b4201	0.422	subunit of primosomal replication protein N
proX	b2679	2.398	subunit of proline ABC transporter
pssR	b3763	0.242	HdfR transcriptional repressor
pstC	b3727	0.441	subunit of phosphate ABC transporter
ptxA	b4195	3.668	subunit of L-ascorbate transporting phosphotransferase system
purC	b2476	3.036	subunit of phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
purL	b2557	3.643	phosphoribosylformylglycinamide synthetase
pyrD	b0945	0.109	subunit of dihydroorotate oxidase
rcsB	b2217	0.393	subunit of RcsAB transcriptional dual regulator and RcsB
recB	b2820	0.405	subunit of recBCD
recO	b2565	20.195	subunit of RecFOR complex

rfbD	b2040	0.421	subunit of dTDP-L-rhamnose synthetase
rhsE	b1456	0.478	protein in rhs element
ribA	b1277	2.707	subunit of GTP cyclohydrolase II
ribE	b1662	0.428	subunit of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
rlpB	b0641	0.363	subunit of outer membrane LPS assembly complex
rpoB	b3987	2.342	subunit of RNA polymerase, core enzyme
rtcA	b3420	0.446	RNA 3'-terminal phosphate cyclase
sapC	b1292	2.086	subunit of peptide uptake ABC transporter
secF	b0409	0.233	subunit of SecD-SecF-YajC-YidC Secretion Complex
sgaH	b4196	3.667	subunit of 3-keto-L-gulonate 6-phosphate decarboxylase
sgbU	b3582	2.542	predicted L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase
sodA	b3908	2.271	subunit of superoxide dismutase (Mn)
speD	b0120	0.478	subunit of adenosylmethionine decarboxylase
tbpA	b0068	3.079	subunit of thiamin ABC transporter
trkG	b1363	0.169	TrkG potassium ion Trk Transporter
trpE	b1264	0.335	subunit of anthranilate synthase
trpL	b1265	0.470	trp operon leader peptide
trpS	b3384	2.006	subunit of tryptophanyl-tRNA synthetase
truA	b2318	0.491	subunit of tRNA pseudouridine synthase
udhA	b3962	2.512	subunit of pyridine nucleotide transhydrogenase, soluble
uidR	b1618	0.433	UidR transcriptional repressor
wbbJ	b2033	0.449	predicted acyl transferase
wcaK	b2045	0.228	predicted colanic acid biosynthesis pyruvyl transferase
wcaL	b2044	0.196	predicted colanic acid biosynthesis glycosyl transferase
xylH	b3568	4.835	subunit of XylF/XylG/XylH xylose ABC transporter
yaaF	b0030	0.488	ribonucleoside hydrolase 3
yabJ	b0066	3.239	subunit of thiamin ABC transporter
yabQ	b0057	0.254	predicted protein
yadB	b0144	2.727	glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase
yadC	b0135	0.205	predicted fimbrial-like adhesin protein
yadP	b0147	0.297	2'-5' RNA ligase
yaeD	b0200	2.317	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase
yaeG	b0162	4.088	CdaR transcriptional activator
yagD	b0261	0.264	homocysteine methyltransferase
yaiM	b0355	0.267	S-formylglutathione hydrolase
yaiN	b0357	2.328	regulator protein
yaiV	b0375	2.061	predicted DNA-binding transcriptional regulator
ybaA	b0456	2.961	conserved protein

ybbY	b0513	0.134	predicted uracil/xanthine transporter
ybcQ	b0551	2.520	DLP12 prophage; predicted antitermination protein
ybcV	b0558	0.324	DLP12 prophage; predicted protein
ybcX	b0561	2.160	DLP12 prophage; predicted tail fiber assembly protein
ybdR	b0608	0.185	predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-bindin
ybeD	b0631	0.261	conserved protein
ybeL	b0643	0.482	conserved protein
ybeX	b0658	0.236	predicted ion transport protein
ybfM	b0681	3.951	predicted outer membrane porin
ybgR	b0752	2.240	ZitB zinc CDF transporter
ybjH	b0843	0.335	predicted protein
ybjM	b0848	0.451	predicted inner membrane protein
ycaH	b0915	2.452	tetraacyldisaccharide 4'-kinase
ycbG	b0956	0.244	subunit of macrodomain Ter protein
ycbK	b0926	2.464	conserved protein
ycdQ	b1022	0.186	UDP-N-acetyl-D-glucosamine β -1,6-N-acetyl-D-glucosaminyl transferase
ycdW	b1033	0.492	glyoxylate reductase
yceC	b1086	2.426	23S rRNA pseudouridine synthase
ycfD	b1128	0.294	conserved protein
ycgZ	b1164	2.243	predicted protein
yciK	b1271	11.785	predicted oxidoreductase
ycjI	b1326	0.292	murein peptide amidase A
ycjM	b1309	3.085	predicted glucosyltransferase
ycjU	b1317	0.329	β -phosphoglucomutase
ycjV	b1318	0.139	predicted sugar transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily
ycjX	b1321	0.419	conserved protein
ydcG	b1424	0.430	glucan biosynthesis protein D
ydeB	b1529	0.391	predicted transporter
ydeV	b1511	0.334	predicted Autoinducer-2 kinase
ydeW	b1512	0.318	LsrR transcriptional repressor
ydeZ	b1515	0.242	subunit of LsrA/LsrC/LsrD/LsrB ABC transporter
ydjA	b1765	0.486	subunit of predicted oxidoreductase
yeaX	b1803	2.160	predicted oxidoreductase
yecC	b1917	0.469	predicted transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily
yecF	b1915	0.348	predicted protein
yecP	b1871	6.601	predicted S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
yedK	b1931	0.369	predicted protein
yeeF	b2014	2.677	YeeF amino acid APC transporter

yeeO	b1985	18.964	YeeO MATE transporter
yeeY	b2015	2.175	predicted DNA-binding transcriptional regulator
yehQ	b2122	0.489	predicted protein
yejM	b2188	22.796	predicted hydrolase, inner membrane
yfdL	b2355	0.230	CPS-53 (KpLE1) prophage; conserved protein
yfdM	b2356	0.133	CPS-53 (KpLE1) prophage; predicted methyltransferase
yfiL	b2602	0.308	putative lipoprotein
yfiN	b2604	2.130	predicted diguanylate cyclase
yfjK	b2627	0.216	CP4-57 prophage; conserved protein
yfjO	b2631	0.289	CP4-57 prophage; predicted protein
ygbP	b2747	0.306	subunit of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase
ygcM	b2765	0.183	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase
ygeF	b2850	0.054	predicted protein
ygeW	b2870	0.127	putative carbamoyltransferase
ygfF	b2902	2.160	predicted NAD(P)-binding oxidoreductase with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain
ygfG	b2919	4.057	subunit of methylmalonyl-CoA decarboxylase
ygfT	b2887	2.227	fused predicted oxidoreductase, Fe-S subunit and nucleotide-binding subunit
yggG	b2936	0.430	predicted peptidase
yggU	b2953	0.468	conserved protein
yghK	b2975	2.716	GlcA glycolate transporter
ygiC	b3038	0.443	predicted enzyme
ygjE	b3063	2.183	tartrate/succinate DASS transporter
ygjT	b3088	2.312	putative membrane-bound redox modulator that is induced by high pH
ygjV	b3090	4.531	inner membrane protein
yhaV	b3130	0.436	subunit of PrIF-YhaV antitoxin-toxin complex
yhbP	b3154	0.075	conserved protein
yhcH	b3221	0.465	conserved protein
yhcQ	b3241	0.253	subunit of AaeAB Hydroxylated, Aromatic Carboxylic Acid Efflux Transport System
yhfL	b3369	4.033	conserved secreted peptide
yhfZ	b3383	4.548	conserved protein
yhgF	b3407	2.932	predicted transcriptional accessory protein
yhhP	b3470	9.098	sulfur transfer protein
yhiD	b3508	2.912	predicted Mg(2+) transport ATPase
yhiJ	b3488	7.640	predicted protein
yhiM	b3491	0.480	conserved inner membrane protein
yhjH	b3525	0.208	c-di-GMP phosphodiesterase
yaB	b3563	2.406	conserved inner membrane protein
yigN	b3832	0.396	recombination limiting protein
yigZ	b3848	0.386	predicted elongation factor

yiiD	b3888	2.347	predicted acetyltransferase
yiiM	b3910	2.312	protein involved in base analog detoxification
yjaB	b4012	2.406	predicted acetyltransferase
yjeP	b4159	0.235	predicted mechanosensitive channel
yjeS	b4166	0.150	predicted Fe-S electron transport protein
yjfY	b4199	2.071	predicted protein
yjgP	b4261	0.257	subunit of LptABCFCG ABC transporter
yjhR	b4308	2.517	KpLE2 phage-like element; predicted frameshift suppressor
ykfA	b0253	0.072	CP4-6 prophage; predicted GTP-binding protein
ykgE	b0306	0.143	predicted oxidoreductase
ylaD	b0459	0.318	subunit of maltose acetyltransferase
ymbA	b0952	0.148	conserved protein
ymgA	b1165	2.171	protein involved in biofilm formation
ynaF	b1376	0.429	nucleotide binding filament protein
yneB	b1517	0.391	subunit of predicted class I aldolase
ynhD	b1682	0.495	subunit of SufBCD Fe-S cluster scaffold complex
yodB	b1974	0.293	predicted cytochrome
yohF	b2137	0.324	predicted acetoin dehydrogenase
yphA	b2543	2.872	predicted inner membrane protein
yphG	b2549	2.145	conserved protein
yqeH	b2846	0.057	conserved protein with bipartite regulator domain
yqgB	b2939	0.293	small protein involved in the acid stress response
yqgF	b2949	0.315	predicted Holliday junction resolvase
yrbB	b3191	2.397	subunit of phospholipid ABC transporter
ytfB	b4206	2.623	predicted cell envelope opacity-associated protein

Tabelle zu Scatterplot C: *uvrY*-Mutante (RR') vs. *barA*-Mutante (SK')

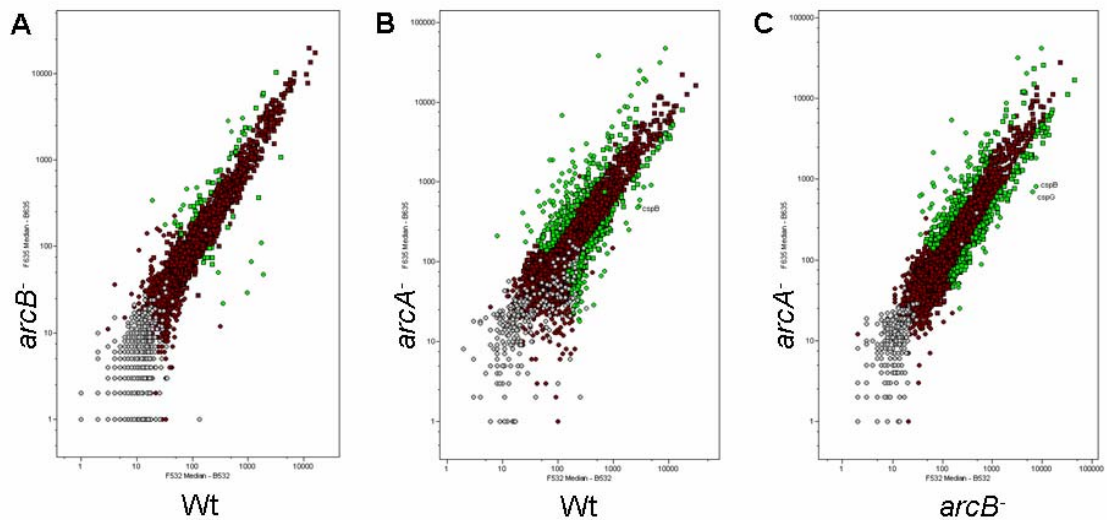
Name	b-Nummer	Ratio	Beschreibung
yfgH	b2505	0.220	predicted outer membrane lipoprotein
cyoA	b0432	0.299	cytochrome <i>bo</i> terminal oxidase subunit II
iadA	b4328	0.353	subunit of isoaspartyl dipeptidase
hflB	b3178	0.356	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
cysW	b2423	0.422	subunit of sulfate ABC transporter and thiosulfate ABC transporter
dadA	b1189	0.423	D-amino acid dehydrogenase, small subunit
dadX	b1190	0.455	subunit of alanine racemase 2, PLP-binding
nuoK	b2279	0.463	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit K
gabT	b2662	0.484	4-aminobutyrate aminotransferase monomer
cyoB	b0431	0.488	cytochrome <i>bo</i> terminal oxidase subunit I
poxB	b0871	0.491	pyruvate oxidase monomer
yjcG	b4067	0.496	SSS transporter
mgIB	b2150	2.053	subunit of galactose ABC transporter
atpB	b3738	2.053	ATP synthase, F ₀ complex, a subunit

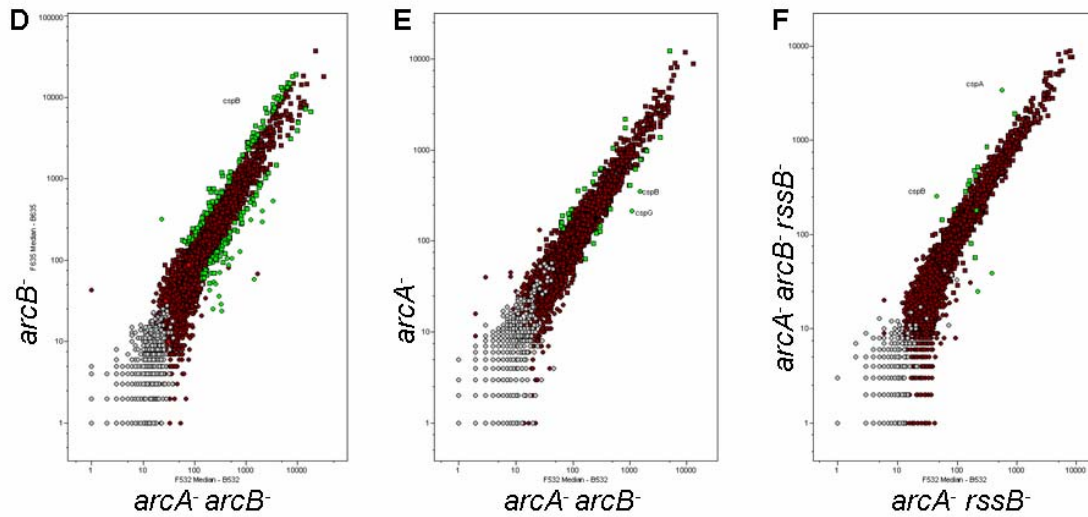
ydbL	b1383	2.066	conserved protein
putA	b1014	2.228	fused PutA transcriptional repressor
cydA	b0733	2.441	cytochrome <i>bd</i> -I terminal oxidase subunit I
ymfI	b1143	2.469	e14 prophage; predicted protein
cydB	b0734	2.515	cytochrome <i>bd</i> -I terminal oxidase subunit II
miaA	b4171	2.536	tRNA(ⁱ⁶ A37) synthase
ompF	b0929	2.564	subunit of outer membrane porin F
manX	b1817	2.591	subunit of mannose PTS permease
potC	b1124	2.672	subunit of putrescine/spermidine ABC transporter
ydeZ	b1515	3.768	subunit of LsrA/LsrC/LsrD/LsrB ABC transporter
lsrB	b1516	6.280	predicted to be the periplasmic binding protein of the AI-2 ABC transporter
yneB	b1517	8.201	predicted class I aldolase = LsrF
lsrG	b1518	8.879	enzyme involved in the degradation of the quorum-sensing regulator Autoinducer 2 (AI-2)

IV. Scatterplots und Tabellen der differentiell regulierten Gene des ArcB/ArcA -Systems

Die mindestens zweifach differentiell regulierten Gene sind in den Scatterplots grün hervorgehoben.

Arraybedingungen: LB, OD_{578nm} 1





- A) *cspB* – nicht reguliert (Ratio 0,8)
- B) *cspB* – Ratio 0,106
- C) *cspB* – Ratio 0,175
- D) *cspB* – Ratio 3,021
- E) *cspB* – Ratio 0,230
- F) *cspB* – Ratio 5,563

Hier sind nur die Ratios des *cspB*-Gens angegeben, welches die größte differentielle Regulation aufwies und innerhalb dieser Arbeit von besonderem Untersuchungsinteresse war.