

**Regulatorische Module innerhalb des σ^S -Netzwerkes
von *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
Harald Weber
aus Mainz

März, 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 03. Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 σ^S und die generelle Streßantwort	1
1.1.1 σ^S , der Sigmafaktor der generellen Streßantwort	1
1.1.2 Die Regulation der σ^S -Expression	2
1.1.2.1 Regulation der <i>rpoS</i> -Transkription	2
1.1.2.2 Relationgu der <i>rpoS</i> -Translation	3
1.1.2.3 Regulation der σ^S -Proteolyse	3
1.1.3 σ^S -abhängige Genexpression	5
1.1.3.1 Eigenschaften von σ^S -kontrollierten Promotoren	5
1.1.3.2 Weitere Faktoren, die σ^S -abhängige Transkription beeinflussen	6
1.2 Cyclisches di-Guanosinmonophosphat, ein bakterielles Signalmolekül	7
1.2.1 C-di-GMP als Signalmolekül in Bakterien	7
1.2.2 Guanylatcyclasen, Phosphodiesterasen und c-di-GMP bindende Proteine	8
1.2.3 C-di-GMP abhängige Regulation und Phänotypen	10
1.2.4 Die Rolle von c-di-GMP bei der Regulation bakterieller Virulenz	13
1.3 Die Regulation der Curli-Expression in <i>E. coli</i>	14
1.3.1 Struktur und biologische Bedeutung von Curli	14
1.3.2 Die Regulation der Curli-Expression	14
1.4 Die Glutamat-abhängige Säurestreßantwort	16
1.4.1 Säureresistenz in <i>E. coli</i>	16
1.4.2 Die Regulation der Glutamat-abhängigen Säureresistenz	17
2 Material und Methoden	21
2.1 Grundlagen und allgemeine Methoden	21
2.1.1 Medien und Kultivierung	21
2.1.2 Stammhaltung	22
2.1.3 Phänotypische Untersuchungen	22
2.1.3.1 Kongorot-Assay zum Nachweis von Curli	22
2.1.3.2 Sedimentationsassay	22
2.1.4 Plasmid-Transformation	22
2.1.5 Herstellung eines P1-Phagenlysates	22
2.1.6 P1-Phagentransduktion	23

2.1.7 Elektronenmikroskopie	23
2.1.8 Detektion mit Phosphoimaging	23
2.2 DNA-Analytik	23
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.2 Mutagenese mit Zwei-Schritt-PCR	23
2.2.3 Präparation von genomischer DNA und Plasmiden	24
2.2.4 Klonierung	24
2.2.4.1 Restriktionsverdau, Ligation	24
2.2.4.2 Herstellung kompetenter Zellen, Elektroporation	24
2.2.4.3 Plasmidpräparation, Sequenzierung	25
2.3 RNA-Analytik	25
2.3.1 RNA-Präparation	25
2.3.1.1 Zellernte und Zellaufschluß	25
2.3.1.2 RNA-Aufreinigung	25
2.3.1.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und -Qualitätskontrolle	26
2.3.2 Microarray-Technik	26
2.3.2.1 Reverse Transkription mit fluoreszierenden Nukleotiden („Labeling“) .	26
2.3.2.2 Hybridisierung, Detektion und Auswertung	26
2.3.3 Transkriptionsstartanalyse mit Primer Extension	27
2.3.3.1 Reverse Transkription mit genspezifischem Primer	27
2.3.3.2 DNA-Sequenzierung	27
2.3.3.3 Denaturierendes Sequenziergel	28
2.3.4 Northern Analyse zur Bestimmung der mRNA	28
2.4 Protein-Analytik	28
2.4.1 Immunoblot-Analyse (Westernblot)	28
2.4.1.1 Proteinprobenpräparation	28
2.4.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.4.1.3 Blotten des Proteingels und Immunodetektion	29
2.4.2 Bestimmung der Proteinstabilität von CsgD	29
2.4.3 Gelretardations-Assay	29
2.4.4 Proteinüberexpression und Proteinaufreinigung	30
2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.5 Genetische Methoden	31
2.5.1 Herstellung von Deletionsmutanten	31

2.5.2 Konstruktion von chromosomalen lacZ-Reporterfusionen	31
2.6 Biochemische Methoden	31
2.6.1 Bestimmung der β -galaktosidase Aktivität	31
2.6.2 Nachweis der Diguanylatcyclase-Aktivität	31
2.6.3 Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität	32
2.6.4 UV-Crosslinking	32
2.6.5 Gleichgewichtsdialyse	32
2.7 Bioinformatische Analysen	33
2.7.1 Genannotationen und Gensequenzen	33
2.7.2 Analyse der Promotorregionen der 140 Kerngene	33
2.7.3 Verteilung RpoS-abhängiger Gene auf dem Chromosom	33
2.8 Materialliste	33
2.8.1 Chemikalien, Apparaturen und sonstiges Material	33
2.8.2 Stämme, Plasmide, Primer	34
2.8.2.1 Stämme	34
2.8.2.2 Plasmide	35
2.8.2.3 Primer	36
3 Ergebnisse	39
3.1 Globale Transkriptionsanalyse des σ^S -Regulons	39
3.1.1 Vorversuche zur DNA Microarrayanalyse	39
3.1.2 Circa 10% aller Gene in E. coli sind σ^S -abhängig	41
3.1.3 Die 140 Kerngene der generellen Streßantwort	42
3.1.4 Funktionelle Charakterisierung der σ^S -abhängigen Gene	47
3.1.5 σ^S kontrolliert Gene des zentralen Energiestoffwechsels	48
3.1.6 σ^S -abhängige Gene sind über das gesamte Genom verteilt	50
3.1.7 Das -10 Erkennungsmotiv von σ^S ist in den Promotorregionen der 140 Kerngene konserviert	51
3.1.8 Das Histon-ähnliche Protein Lrp moduliert das σ^S -Regulon	52
3.2 Die Rolle von cyclischem di-GMP im σ^S -Netzwerk	55
3.2.1 σ^S kontrolliert die Expression von GGDEF/EAL-Genen	55
3.2.2 YdaM und YciR kontrollieren die Expression von Curli	55
3.2.3 YdaM und YciR kontrollieren die Expression von CsgD, dem zentralen Regulator der Curlisynthese	59
3.2.4 YdaM und YciR kontrollieren die CsgD Expression auf der Ebene der	

Transkriptionsinitiation	60
3.2.5 YdaM und YciR kontrollieren spezifisch die Curliexpression und sind keine globalen Regulatoren	61
3.2.6 YdaM ist eine Diguanylatcyclase (DGC)	63
3.2.7 YciR ist eine Phosphodiesterase und eine Diguanylatcyclase	65
3.2.8 YdaM und YciR haben keinen Einfluß auf die Stabilität von CsgD	66
3.2.9 Die Transkription von <i>csgB</i> erfolgt σ^S -unabhängig	67
3.3 Untersuchungen zu MlrA, einem Regulator der Curliexpression	68
3.3.1 MlrA ist kein globaler Regulator	68
3.3.2 MlrA wird sowohl bei 37°C als auch bei 28°C exprimiert	69
3.3.3 MlrA-Expression ist unabhängig von YdaM und YciR	69
3.3.4 MlrA bindet an die DNA der <i>csgD</i> Promotorregion	70
3.3.5 Die palindromische Sequenz in der MlrA Binderegion ist nicht die Bindestelle von MlrA	73
3.3.6 Untersuchungen zum Transkriptionsstart von <i>csgD</i>	74
3.3.7 Untersuchung der Bindung von c-di-GMP an MlrA	75
3.3.7.1 UV-Crosslinking	76
3.3.7.2 Gleichgewichtsdialyse	77
3.3.7.3 Gelretardationsanalysen	78
3.4 Die Säurestressantwort ist ein regulatorisches Modul im σ^S -Netzwerk	79
3.4.1 Säureresistenzgene bilden eine Untergruppe im σ^S -Regulon	79
3.4.2 Expression und σ^S -Abhängigkeit von <i>gadA/B</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.	80
3.4.3 GadE, der zentrale Regulator der Glutamat-abhängigen Säureresistenz, wird σ^S - und GadX-abhängig exprimiert	81
3.4.4 Bestimmung des Transkriptionsstartes von <i>gadE</i>	82
3.4.5 Das System der Säureresistenzgene als regulatorisches Modul beim Übergang in die stationäre Phase	83
3.4.6 YjjU ist eine RpoS-, GadX- und GadE-abhängige Patatin-ähnliche Phospholipase	88
3.5 Untersuchungen zu σ^S -abhängigen Regulatoren	89
3.5.1 YeaG, eine putative Serin Proteinkinase	89
3.5.2 YjgH, eine putative mRNA Endoribonuclease	91
3.5.3 YiaG, ein putativer Transkriptionsregulator	93

4 Diskussion	97
4.1 Die Globalanalyse des σ^S Regulons	97
4.1.1 Anzahl und Funktion σ^S -abhängiger Gene in <i>E. coli</i>	97
4.1.2 Faktoren der Sigmaselektivität	100
4.1.2.1 Die σ^S -Promotor Konsensussequenz	100
4.1.2.2 Die Rolle von Lrp bei der Sigmaselektivität	101
4.1.3 Regulatorische Module innerhalb des σ^S -Netzwerks von <i>E. coli</i>	103
4.2 C-di-GMP vermittelte Regulation im σ^S -Netzwerk	105
4.2.1 GGDEF/EAL Proteine im σ^S -Netzwerk	105
4.2.2 YdaM und YciR kontrollieren die Curliexpression und sind Teil eines regulatorischen Moduls im σ^S -Netzwerk	107
4.2.3 Wo liegt der Wirkort von c-di-GMP bei der YdaM/YciR-abhängigen Regulation der <i>csgD</i> Transkription?	110
4.3 Das System der Säureresistenz als regulatorisches Modul im σ^S -Netzwerk	112
4.3.1 σ^S kontrolliert den zentralen Regulator der Säurestressantwort	112
4.3.2 Die σ^S -Abhängigkeit der Säurestressantwort wird von der spezifischen Stresssituation beeinflusst	114
4.3.3 Die Säurestressantwort als regulatorisches Modul im σ^S -Netzwerk	116
5 Anhang	119
A.1 σ^S -abhängige Gene, welche nicht zur Kerngruppe gehören	120
A.2 σ^S -reprimierte Gene	127
Literaturverzeichnis	129

Abkürzungen

A	Ampere
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basepaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	3'-5'-zyklisches AMP
c-di-GMP	cyclisches di-Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
CRP	cAMP-Rezeptorprotein
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreol
E	RNA-Polymerase Kernenzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
LB	Lysis Broth
m	milli
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethan-sulfonsäure
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte

ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
ppGpp	Guanosin-3',5'-bipyrophosphat
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt