

## Zusammenfassung

$\sigma^S$  ist ein Sigmafaktor der RNA Polymerase und aktiviert die Expression von Genen der generellen Streßantwort in *Escherichia coli*. Über viele Jahre hinweg wurden Gene des  $\sigma^S$ -Netzwerkes identifiziert, aber der volle Umfang  $\sigma^S$ -abhängiger Gene sowie die Details ihrer Regulation blieben weitgehend unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung aller  $\sigma^S$ -abhängigen Gene in *E. coli* mittels globaler Transkriptionsanalyse und die Bestimmung von regulatorischen Untergruppen im  $\sigma^S$ -Netzwerk. Ausgehend von den Ergebnissen der globalen Transkriptionsanalyse sollten  $\sigma^S$ -abhängige Gene mit regulatorischer Funktion identifiziert und die durch diese Faktoren kontrollierten Gene sowie die Details ihrer Regulation bestimmt werden. Ein  $\sigma^S$ -abhängiger Regulator wurde, gemeinsam mit den durch ihn kontrollierten  $\sigma^S$ -abhängigen Effektorgenen, als ein sogenanntes 'regulatorisches Modul' definiert. Zum Verständnis der sehr komplexen regulatorischen Zusammenhänge im  $\sigma^S$ -Netzwerk ist das Konzept der regulatorischen Module ein Ansatz, der die vielen Gene der generellen Streßantwort in überschaubare und leichter zu analysierende Untergruppen auflöst.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels globaler Transkriptionsanalyse (Microarrayanalyse) die Gene des  $\sigma^S$ -Regulons in *Escherichia coli* identifiziert. Der Wildtypstamm MC4100 wurde mit der isogenen *rpoS* Mutante unter drei verschiedenen  $\sigma^S$ -Aktivität induzierenden Wachstumsbedingungen (Übergang in die stationäre Phase, osmotischer Streß, Säurestreß) verglichen. Insgesamt zeigten 481 Gene  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter mindestens einer Wachstumsbedingung. Davon waren 140 Gene  $\sigma^S$ -abhängig unter allen drei getesteten Bedingungen, weshalb sie auch als 'Kerngene' der generellen Streßantwort bezeichnet wurden. In den Promotorregionen der Kerngene konnte das bereits zuvor beschriebene DNA-Konsensusmotiv der -10 Erkennungsregion von  $\sigma^S$  gefunden und anhand dieser Daten die Sequenz des Motivs genauer definiert werden.

Mit den Kerngenen *ydaM* und *yciR* wurden erstmalig GGDEF/EAL-Proteine und damit das bakterielle Signalmolekül cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) als Komponenten im  $\sigma^S$ -Netzwerk identifiziert. YdaM und YciR regulieren in antagonistischer Weise die Expression von aggregativen Fimbrien (Curli). Dabei wirkt YdaM positiv und YciR negativ auf die Transkription von *csgD*, dem zentralen Aktivator der Curliexpression. Untersuchungen *in vitro* bestätigten, daß YdaM eine Diguanylatcyclase (synthetisiert c-di-GMP) bzw. YciR eine Phosphodiesterase (degradiert c-di-GMP) ist. Microarrayanalysen definierten YdaM und YciR als spezifische Regulatoren der Curliexpression und nicht als Globalregulatoren. Für MlrA, einem weiteren  $\sigma^S$ -abhängigen Aktivator der Curliexpression, wurde die Bindestelle in der stromaufwärts gelegenen DNA-Region von *csgD* auf einen Bereich von ungefähr 40 Basenpaaren eingegrenzt. Insgesamt bilden die Regulatoren YdaM, YciR, MlrA und CsgD sowie die Curlistrukturgene ein regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk.

Als ein weiteres regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk wurden die Gene der Säurestreßantwort (*gadA*, *gadBC*, *hdeAB*, *hdeD*, *slp*, *ybaS*, *ybaT*, *yhiM*) und andere, sowie deren Regulatoren GadX, und GadE identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß *gadE* (der zentrale Regulator der Glutamat-abhängigen Säurestreßantwort in *E. coli*) ein  $\sigma^S$ - und GadX-abhängiges Gen ist. Auch der Transkriptionsstart von *gadE* wurde identifiziert. Außerdem wurden weitere  $\sigma^S$ -, GadX- und GadE-abhängige Gene, die bisher nicht im Zusammenhang mit der Säurestreßantwort standen, bestimmt und dem Säurestreßmodul im  $\sigma^S$ -Netzwerk zugeordnet. Die Gene des Säurestreßmoduls konnten aufgrund unterschiedlicher GadX- und GadE-Abhängigkeit in regulatorische Untergruppen eingeordnet werden. Dabei wurde eine Gruppe von Genen definiert, die nur GadX- aber nicht GadE-abhängig exprimiert wird und zwei weitere Gruppen, die in unterschiedlicher Weise durch GadX und GadE reguliert werden. Das Säurestreßmodul zeigt damit eine komplexe Binnenregulation, die erstmalig in dieser Form gezeigt wurde.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende Bestandsaufnahme aller  $\sigma^S$ -abhängigen Gene vorgenommen. Anhand der Definition zweier regulatorischer Module (Curli- und Säurestreßmodul) wurde exemplarisch ein Ansatz gezeigt, wie die Regulation innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes verstanden werden kann. Die Vielzahl neuer bis dato unbekannter  $\sigma^S$ -abhängiger Gene, insbesondere die Menge der 140 Kerngene, bildet eine Basis für künftige Untersuchungen zur generellen Streßantwort. Erstmalig wurden GGDEF/EAL Proteine und das bakterielle Signalmolekül c-di-GMP mit dem  $\sigma^S$ -Netzwerk assoziiert. Damit ist diese Arbeit auch Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in *E. coli* an dem zur Zeit sehr aktuellen Thema 'c-di-GMP'.