

1 Einleitung

1.1 σ^S und die generelle Streßantwort

1.1.1 σ^S , der Sigmafaktor der generellen Streßantwort

σ^S (RpoS) ist eine Sigmauntereinheit der RNA Polymerase und der zentrale Regulator der generellen Streßantwort in *Escherichia coli*. Beim Übergang in die stationäre Phase oder unter anderen Streßbedingungen aktiviert σ^S die Expression einer Vielzahl von Genen, welche der Zelle in der Gegenwart von unterschiedlichen Streßfaktoren einen Überlebensvorteil verschaffen. Die generelle Streßantwort ist charakterisiert durch eine multiple, unspezifische und präventive Resistenz gegen die Folgen von ungünstigen Umweltbedingungen. Ohne zuvor mit so unterschiedlichen Stressoren wie z.B. oxidativen Streß, hohe Osmolarität, niedrigen pH-Wert, hohe und niedrige Temperatur konfrontiert gewesen zu sein, verleiht die generelle Streßantwort der Zelle eine Resistenz gegen diese und andere Streßfaktoren. σ^S ist nah verwandt mit dem vegetativen Sigmafaktor σ^{70} (RpoD) und erkennt sogar ähnliche Promotorsequenzen wie dieser. Aus diesem Grund wird σ^S eher als sekundärer vegetativer Sigmafaktor anstatt als alternativer Sigmafaktor betrachtet.

1.1.2 Die Regulation der σ^S -Expression

σ^S -Expression wird kontrolliert durch eine Vielzahl von Stimuli und auf praktisch jeder Ebene der Genexpression (Abbildung 1). Daran sind viele unterschiedliche regulatorisch wirkende Faktoren wie z.B. Responseregulatoren, kleine RNAs, Proteasen, RNA-Chaperone etc. beteiligt.

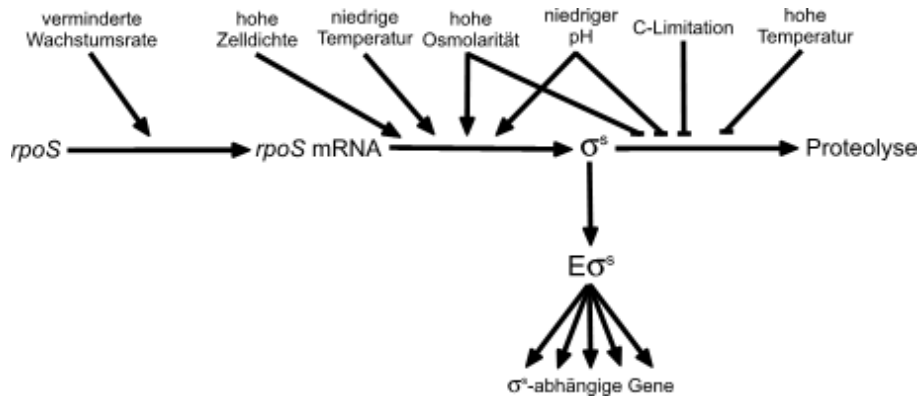


Abbildung 1: Verschiedene Ebenen der σ^S -Regulation werden durch unterschiedliche Stressbedingungen kontrolliert. Der zelluläre σ^S Spiegel wird auf der Ebene der $rpoS$ Transkription, der Translation der $rpoS$ mRNA sowie der Proteolyse von σ^S reguliert (nach Hengge-Aronis, 2002a).

1.1.2.1 Regulation der $rpoS$ -Transkription

Die Gene *nlpD* (codierend für ein Lipoprotein unbekannter Funktion) und *rpoS* bilden ein Operon, welches σ^{70} -abhängig exprimiert wird. Ausgehend von den Promotoren *nlpD*_{1,2} wird eine bicistronische RNA transkribiert, welche zum Basalniveau der *rpoS*-Expression in der exponentiellen Wachstumsphase beiträgt (Lange et al., 1994a). Innerhalb des *nlpD*-Gens befindet sich ein weiterer σ^{70} -abhängiger Promotor, von dem die monocistronische *rpoS*-mRNA mit einem 567 Nucleotide langen und nichttranslatierten 5'-Abschnitt synthetisiert wird. Die Expression vom Promotor *rpoSp*₁ ist durch die Wachstumsrate kontrolliert und kann beim Übergang in die stationäre Phase das Basalniveau um das 5- bis 10-fache übersteigen (Lange et al., 1995; Takayanagi et al., 1994). In der *rpoSp*₁-Region befinden sich zwei putative Bindestellen für cAMP-CRP, die eine in Position -61,5 (der Aktivatorposition für Klasse I-Promotoren [Busby et al., 1999]), die andere in Position +54 relativ zum Startpunkt der Transkription (Mika et al., 2005). Die Aktivität von *rpoS::lacZ* Fusionen ist in *crp* und *cya* Mutanten in der exponentiellen Wachstumsphase deutlich erhöht, wobei *cya* durch Zugabe von cAMP komplementiert werden kann (Lange et al., 1994b). Im Kontext von *rpoSp*₁ wirkt cAMP-CRP also untypisch als Repressor. Der Responseregulator ArcA bindet in der phosphorylierten Form an zwei Stellen in der *rpoS*-Promotorregion und reprimiert unabhängig von ArcB die *rpoS*-Transkription. Eine Bindestelle von ArcA überlappt mit der cAMP-CRP-Bindestelle stromaufwärts von *rpoSp*₁, die andere befindet sich unmittelbar stromabwärts

vom selben Promotor (Mika et al., 2005). Das Signalmolekül der stringenten Kontrolle, ppGpp, stimuliert die Expression von *rpoS*. Doppelmutanten in *relA* und *spoT* zeigen verminderte β -Galaktosidase-Aktivität, gemessen von transkriptionellen *rpoS::lacZ* Fusionen. Allerdings deuten Promotorstudien darauf hin, daß nicht die Transkriptionsinitiation, sondern Transkriptionselongation und Transkriptstabilität durch ppGpp beeinflußt werden (Lange et al., 1995; Hirsch et al., 2002). Möglicherweise stimuliert ppGpp indirekt über die Akkumulation von Polyphosphat die Transkription von *rpoS* (Shiba et al., 1997). Weitere Faktoren, welche die Transkription von *rpoS* stimulieren, sind die Sensorikine BarA (Mukhopadhyay et al., 2000), verminderte NADH/NAD⁺-Ratios (Sevcik et al., 2001), sowie Acetat und schwache Säuren (Mulvey et al., 1990).

1.1.2.2 Regulation der *rpoS*-Translation

Für die Translation von *rpoS* ist Hfq, ein Chaperon für mRNAs, von essentieller Bedeutung. Die *hfq* Mutante zeigt keine Induktion von σ^S in der stationären Phase und stark verminderte σ^S -Level unter verschiedenen anderen Wachstumsbedingungen (Brown et al., 1996; Muffler et al., 1996). LrhA, ein globaler Regulator der Flagellensynthese, inhibiert die σ^S -Synthese über einen Hfq-vermittelten Mechanismus (Peterson et al., 2006). Die nichttranslatierte 5'-Region der *rpoS* mRNA bildet eine Stem-Loop-Struktur aus, welche die Translationsinitiationsregion maskiert und somit die Translation negativ beeinflußt (Takayanagi et al., 1994; Cuning et al., 1998). Die kleinen nichttranslatierten RNAs DsrA und RprA stimulieren die Translation der *rpoS* mRNA indem sie diese Sekundärstruktur über einen Anti-Anitsense-Mechanismus auflösen (Sledjeski et al., 1996; Majdalani et al., 1998; Majdalani et al., 2001; Majdalani et al., 2002). Die kleine RNA OxyS bindet Hfq und reprimiert die Translation der *rpoS* mRNA (Zhang et al., 1998). HU, ein Nucleoidprotein, stimuliert die Translation von RpoS (Balandina et al., 2001), wohingegen das Histon-ähnliche Protein H-NS als Repressor der *rpoS* Translation diskutiert wird (Barth et al., 1995; Yamashino et al., 1995). Für LeuO wurde eine indirekte Wirkung auf die Translation der *rpoS* mRNA gezeigt (Klauck et al., 1997). Auch für DnaK und DksA (Rockabrand et al., 1998; Muffler et al., 1997; Brown et al., 2002), EIIA(Glc) (Ueguchi et al., 2001), CspC und CspE (Phadtare et al., 2001) sowie UDP-Glucose (Böhringer et al., 1995) gibt es Hinweise auf eine indirekte Kontrolle der Translation von *rpoS* durch diese Faktoren.

1.1.2.3 Regulation der σ^S -Proteolyse

Auch in exponentiell wachsenden Zellen wird σ^S exprimiert, aber in Abhängigkeit von der C-Quelle beträgt seine Halbwertszeit nur zwischen 1 bis 4 min (Lange et al., 1994b; Muffler et al., 1997; Schweder et al., 1996; Takayanagi et al., 1994). Unter Streßbedingungen wie z.B. C-Limitation (Lange et al., 1994b; Takayanagi et al., 1994), Absenkung des pH-Wertes (Bearson et al., 1996) oder erhöhter Osmolarität (Muffler et al., 1996b) kommt es zu einer deutlichen Stabilisierung von σ^S innerhalb weniger Minuten. Ohne zeitliche Verzögerung

durch Transkription und Proteinsynthese erlaubt diese Art der Regulation der Zelle eine sehr schnelle Antwort auf Stressbedingungen. Verantwortlich für den Abbau von σ^S ist die Protease ClpXP. Mutationen in *clpX* oder *clpP* führen zur Stabilisierung des Sigmafaktors *in vivo* und Abbauprodukte *in vitro* mit gereinigten Proteinen zeigten, daß σ^S vom ClpXP-Komplex degradiert wird (Schweder et al., 1996; Zhou et al., 1998; Stüdemann et al., 2003). Im Gegensatz zu anderen Proteolyse substraten wird σ^S nicht direkt von ClpXP erkannt (Muffler et al., 1996a; Studemann et al., 2003). Stattdessen wird, wie in Abbildung 2 näher erläutert, die Interaktion zwischen der Protease und dem Sigmafaktor durch das Adapterprotein RssB vermittelt (Muffler et al., 1996a; Becker et al., 1999).

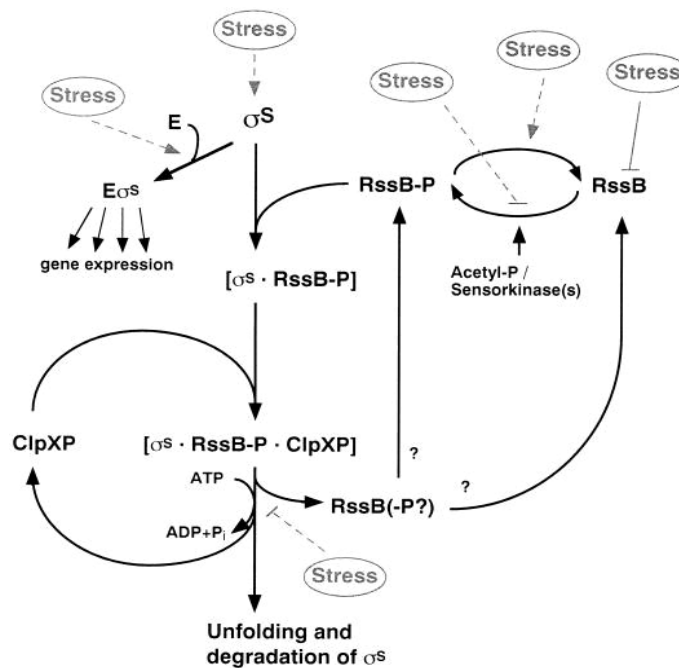


Abbildung 2: Die Rolle von RssB und ClpXP und der Einfluß putativer Stresssignale bei der Proteolyse von σ^S . Phosphoryliertes RssB liefert σ^S an die ClpXP Protease, wo σ^S entfaltet und vollständig degradiert wird. Stresssignale beeinflussen (i) die Phosphorylierung von RssB und damit die Bildung des RssB- σ^S Komplex; (ii) die zellulären Level von RssB (welche in wachsenden Zellen die Proteolyse rate für σ^S limitiert); (iii) die Synthese von σ^S , so daß RssB bei σ^S überproduktion austitriert werden kann; (iv) die Bindung von σ^S an das RNA Polymerase Kernenzym, was vor der Bindung an RssB schützt; (v) die Funktion der ClpXP Protease (nach Hengge-Aronis, 2002a)

Mutationen in *rssB* stabilisieren σ^S in der exponentiellen Phase (Muffler et al., 1996a; Pratt et al., 1996) und Abbaustudien zeigten, daß σ^S nur in Gegenwart von RssB degradiert wird, wobei RssB aber nicht abgebaut wird (Studemann et al., 2003). RssB gehört zur Familie der Responseregulatoren und seine Aktivität wird durch den Phosphorylierungsstatus von der Aminosäure Aspartat an Position 58 (D58) in der Receiverdomäne kontrolliert (Becker et al., 2000; Bouche et al., 1998; Klauck et al., 2001). RssB wird von ArcA phosphoryliert und unterliegt damit vermutlich direkt der Kontrolle durch den Energiestatus der Zelle, welcher

durch den Redoxzustand der Quinone und den Phosphorylierungsstatus von ArcA reflektiert wird (Yamamoto et al., 2005; Mika et al., 2005). Experimente *in vitro* zeigten, daß die Phosphorylierung von RssB essentiell ist für die Bindung und Degradation von σ^S (Stüdemann et al., 2003). Die Interaktion zwischen RssB und σ^S wird auf der Seite des Sigmafaktors durch ein sogenanntes „turnover element“ vermittelt. Dieses befindet sich in der Region 2.5 von σ^S und ist durch die Aminosäure Lysin an Position 173 (K173) charakterisiert (Becker et al., 1999). LacZ-Reporterfusionen von σ^S mit verkürzter oder fehlender Region 2.4 zeigten hohe β -Galaktosidase-Aktivität, in langen Fusionskonstrukten war die Aktivität niedrig (Schweder et al., 1996; Muffler et al., 1996b). K173 ist die zentrale Aminosäure im „turnover element“, denn die Mutation K173S eliminiert die Proteolyse von σ^S vollständig, im Gegensatz zu Mutationen von benachbarten Aminosäuren in der gleichen Region (Becker et al., 1999). Weitere Detailstudien zeigten, daß die Interaktion zwischen RssB und dem „turnover element“ notwendig aber nicht hinreichend für die Proteolyse von σ^S ist (Stüdemann et al., 2003). Im N-terminus von σ^S , im Bereich zwischen den Aminosäuren 7 und 35, befindet sich ein Element, welches an ClpX bindet und essentiell für die Proteolyse ist (Stüdemann et al., 2003). Zusammen mit der Beobachtung, daß weder RssB noch σ^S alleine an ClpX binden, folgte die Hypothese, daß die Bindung von RssB eine Konformationsänderung in σ^S bewirkt, bei der die zuvor kryptische ClpX-Bindestelle im N-terminus von σ^S exponiert wird. Insgesamt wurde folgendes Modell der Proteolyse von σ^S postuliert: Die Interaktion von phosphoryliertem RssB mit dem „turnover element“ von σ^S bewirkt die Exposition eines N-terminalen Teils des Sigmafaktors, der direkt an ClpX bindet. Der ternäre Komplex RssB-P/ σ^S /ClpX₆ assoziiert schließlich mit der proteolytischen Unter-einheit ClpP und wird schließlich degradiert (Stüdemann et al., 2003). Neuere Studien ergaben, daß die Aktivität von RssB und damit die Stabilität von σ^S auch durch einen Anti-Adaptormechanismus kontrolliert werden kann. Spezifisch bei Phosphat- nicht aber bei Kohlenstofflimitation bindet IraP an RssB (unabhängig vom Phosphorylierungsstatus) und verhindert damit dessen Interaktion mit σ^S (Bougdour et al., 2006). Vermutlich existieren noch weitere Anti-Adaptoren von RssB deren Expression unter negativer Kontrolle von H-NS steht (Zhou et al., 2006).

1.1.3 σ^S -abhängige Genexpression

1.1.3.1 Eigenschaften von σ^S -kontrollierten Promotoren

Im Gegensatz zu anderen Sigmafaktoren in *E. coli* erkennt σ^S *in vitro* identische -35 und -10 Promotorsequenzen wie der vegetative Sigmafaktor σ^{70} (Gaal et al., 2001). Weiterhin zeigt σ^S eine deutlich niedrigere Affinität zum RNA-Polymerase Kernenzym und kommt im Vergleich mit σ^{70} in der Zelle in wesentlich geringeren Mengen vor. Da σ^S und σ^{70} unterschiedliche Regulone kontrollieren, ergibt sich die Frage, auf welche Weise *in vivo* spezifisch σ^S -abhängige Transkription erreicht wird. Tatsächlich begünstigen eine Vielzahl von Faktoren die σ^S -spezifische Genexpression. Da sind zunächst verschiedene Elemente in der

Promotorregion, welche die Selektivität für den Sigmafaktor kontrollieren: (i) die Nukleotide C und T an den den Positionen -13 und -14 der erweiterten -10-Region begünstigen die σ^S -abhängige Transkription, wobei C (-13) gleichzeitig kontraselektiv für σ^{70} ist (Becker et al., 2001); (ii) eine AT-reiche Region stromabwärts der -10-Box begünstigt σ^S -Transkription (Pruteanu et al., 2002); (iii) Degenerierung der -35 und der -10 Region wird von σ^S besser toleriert (Gaal et al., 2001; Lacour et al., 2003); (iv) der distale Teil eines UP-Elements in Gegenwart eines -35 Hexamers kann zur Begünstigung von σ^S beitragen, wohingegen der proximale Teil nur von σ^{70} genutzt werden kann (Typas et al., 2005); (v) und Abweichungen von der optimalen Spacerlänge (17 Basenpaare) zwischen der -10 und -35 Region werden von σ^S besser toleriert (Typas et al., 2006).

1.1.3.2 Weitere Faktoren, die σ^S -abhängige Transkription beeinflussen

Über die Eigenschaften der Promotorregion hinaus, existieren weitere Faktoren, welche auch in Abwesenheit der im vorhergehenden Abschnitt zitierten Promotorelemente die σ^S -abhängige Transkription begünstigen können. Manche dieser Faktoren sorgen für Sigmaselektivität indem sie prinzipiell hemmend auf die Transkription wirken, aber σ^S besser als σ^{70} diese Wirkung toleriert. So wurde für CRP-cAMP, Lrp und IHF gezeigt, daß sie *in vitro* die Transkription am *osmY* Promotor inhibieren, aber σ^S dadurch deutlich geringer beeinflusst wird als σ^{70} (Colland et al., 2000). Am *csiD* Promotor wird die Transkription von CRP-cAMP generell stimuliert, aber in Gegenwart von Lrp und H-NS kann nur σ^S davon profitieren (Germer et al., 2001). Auch für Fis wurde gezeigt, daß es spezifisch die σ^S -abhängige Transkription am *proP* Promoter aktiviert (Xu et al., 1995c; Typas et al., 2007b). Das Molekül der stringenten Kontrolle, (p)ppGpp, verschafft σ^S einen kompetitiven Vorteil gegenüber σ^{70} bei der Rekrutierung des RNA Polymerase Kernenzym (Jishage et al., 1997). Das kleine Protein Crl stimuliert durch direkte Bindung an die RNA Polymerase insbesondere bei niedrigen zellulären σ^S -Spiegel die σ^S -abhängige Transkription (Pratt et al., 1996; Bougdour et al., 2004; Nassos Typas, in press). Vermindertes Supercoiling der DNA wirkt sich generell negativ auf die Transkription aus, aber wird von σ^S besser toleriert als von σ^{70} . Negatives Supercoiling der DNA reflektiert einen niedrigen Energiestatus der Zelle wie er in der stationären Phase auftritt und dies ist konsistent mit Rolle von σ^S als der Sigmafaktor der stationären Phase (Kusano et al., 1996; Bordes et al., 2003). Eine umfassende Darstellung aller *cis*- und *trans*-Elemente, die σ^S -abhängige Transkription begünstigen, wurde von (Typas et al., 2007a) publiziert.

1.2 Cyclisches di-Guanosinmonophosphat, ein bakterielles Signalmolekül

1.2.1 C-di-GMP als Signalmolekül in Bakterien

Cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) ist ein bakterielles Signalmolekül (Abbildung 3) und wurde zuerst als allosterischer Aktivator der Cellulosesynthese in *Gluconacetobacter xylinus* beschrieben (Ross et al., 1989). C-di-GMP wird von Diguanylatcyclasen aus zwei Molekülen GTP gebildet und kann von Phosphodiesterasen zum linearen Dinukleotid bzw. 2 Molekülen GMP degradiert werden. Diguanylatcyclasen sind charakterisiert durch eine GGDEF-Domäne, welche zuerst als neuartige Output-Domäne des Responseregulators PleD in *Caulobacter crescentus* und weiteren bakteriellen Proteinen beschrieben wurde (Hecht et al., 1995). Die Arbeit von (Tal et al., 1998) zeigte, daß verschiedene Proteine in *G. xylinus* mit Diguanylatcyclase-Aktivität stets eine GGDEF-Domäne haben und sagte voraus, daß Phosphodiesterase-Aktivität mit dem 'EAL'-Motiv assoziiert ist. Eine Analyse aller bis dahin sequenzierten bakteriellen Genome ergab, daß Proteine mit GGDEF- oder EAL-Domäne ubiquitär im Reich der Bakterien vertreten sind und daß im Genom einer Bakterienspecies Dutzende von diesen Proteinen codiert sein können (Galperin et al., 2001a). Daraus folgte, daß c-di-GMP ein generelles Signalmolekül in Bakterien ist.

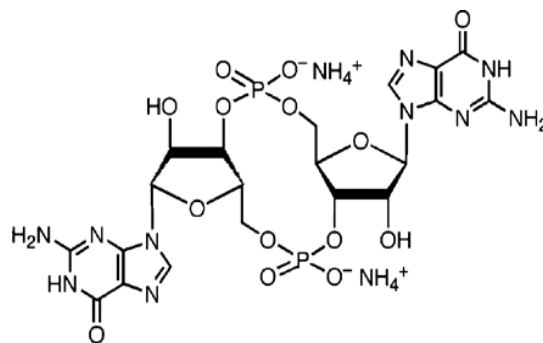


Abbildung 3: Die chemische Struktur des intrazellulären Signalmoleküls bis-(3'-5')-cyclisches di-GMP (c-di-GMP) (aus Ryan et al., 2006b).

C-di-GMP ist beteiligt an der Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse in den verschiedenen Bakterienspezies und spielt dabei vor allem eine allgemeine Rolle beim Übergang zwischen einerseits Motilität und planktonischer Lebensform und andererseits Sessilität und Biofilmbildung. Die generelle Rolle bei der Biofilmbildung, sowie die spezifische Funktion bei der Regulation weiterer Virulenzfaktoren wie z.B. bei *Vibrio cholerae* (Tischler et al., 2005) machen c-di-GMP auch zu einem neuen und attraktiven Gegenstand der Forschung zur bakteriellen Pathogenität.

1.2.2 Guanylatcyclasen, Phosphodiesterasen und c-di-GMP bindende Proteine

Diguanylatcyclasen (DGC) sind durch ein GGDEF-Motiv (in den Domänenbanken COG, Pfam und SMART als COG2199, PF01590 oder DUF1 notiert) und Phosphodiesterasen (PDE) durch ein EAL-Motiv (DUF2, COG2200, PF00990) charakterisiert. Die Bezeichnung 'GGDEF' steht für eine hochkonserviertes Sequenzmotiv innerhalb der insgesamt 170 Aminosäuren langen Domäne. Das gleiche trifft auf 'EAL' zu, wobei diese Domäne etwa 250 Aminosäuren umfasst (Galperin et al., 2001a). DGC und PDE sind im gesamten Reich der Eubakterien (mit Ausnahme von z.B. Bacteroidetes, Chlamydiales und Fusobacteria) nicht aber in Archaeen oder Eukaryonten vertreten. Die Anzahl dieser Proteine variiert stark zwischen den Species, wobei sie im allgemeinen in *Firmicutes* weniger stark vertreten sind. Den 66 GGDEF- und 33 EAL-Proteinen des derzeitigen Rekordhalters *Vibrio vulnificus* stehen z.B. jeweils nur ein Protein in *Borrelia burgdorferii* entgegen (Galperin et al., 2001a). In *Escherichia coli* K12 (MG1655) gibt es 19 GGDEF- und 17 EAL-Proteine, allerdings fehlt dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stamm MC4100 das für ein GGDEF-Protein codierende Gen *yahA* (b0315) (Peters et al., 2003). HD-GYP ist eine weitere Domäne (COG2206) mit Phosphodiesterase-Aktivität und gehört zur Superfamilie der metallabhängigen Phosphohydrolasen, zu der auch die ppGpp(p) Hydrolase SpoT gehört (Galperin et al., 2001a; Ryan et al., 2006). Diese Domäne ist deutlich weniger verbreitet als GGDEF oder EAL und kommt in *E. coli* überhaupt nicht vor.

Experimentelle Daten zeigen, daß GGDEF und EAL als lösliche Domänen im Cytoplasma existieren, das Protein aber über Transmembranhelices in der periplasmatischen Membran verankert sein kann. GGDEF und EAL kommen überwiegend als Teil von Multidomänen-Proteinen vor, treten allerdings auch als Proteine mit nur einer einzigen Domäne auf. Beide Domänen können auch gemeinsam im gleichen Protein auftreten, wobei die GGDEF-Domäne sich immer N-terminal relativ zur EAL-Domäne befindet. Oft befindet sich N-terminal von einer GGDEF- oder EAL-Domäne eine oder mehrere sensorische Domänen. Diese Sensordomänen können von sehr unterschiedlichem Typ sein, wie z.B. die in *E. coli* vorkommenden REC, PAS, GAF, MASE1, HAMP, HTH-LUX und BLUF (Galperin et al., 2001a).

Die Kristallstruktur von PleD (Chan et al., 2004), einem GGDEF-Protein aus *C. crescentus*, konnte im Komplex mit c-di-GMP von aufgeklärt werden (Abbildung 4). Dabei zeigte die DGC-Domäne, wie von (Pei et al., 2001) vorhergesagt, die identische topologische Struktur wie das katalytische Zentrum von Adenylcyclasen. Adenylcyclasen und DGC sind insofern miteinander verwandt, als beide 3'-5'-Phosphodiester-Bindungen knüpfen. Zwei Untereinheiten PleD dimerisieren zu einem symmetrischen Komplex, bei dem sich ihre katalytischen Zentren (A-site) gegenüber stehen. Für die Katalyse orientieren sich die beiden mit GTP beladenen PleD Untereinheiten in eine antiparallele Konformation, so daß nach Deprotonierung der 3'-OH-Gruppe der nukleophile Angriff auf das α -Phosphat stattfindet und es zur Cyclisierung kommt.

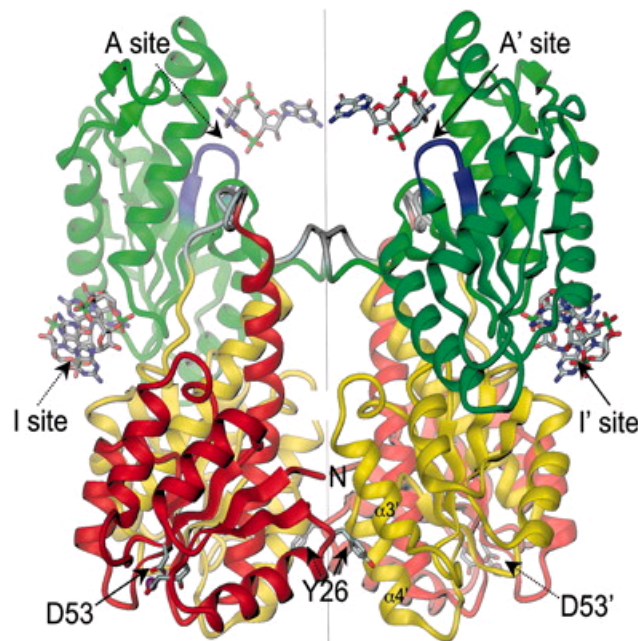


Abbildung 4: Kristallstruktur von PleD. Zwei asymmetrische Untereinheiten bilden ein Dimer. Das katalytische Zentrum (A bzw. A') jeder Untereinheit ist jeweils mit einem Molekül GTP dargestellt. Die allosterisch inhibitorischen Regionen (I bzw. I') haben jeweils ein Dimer aus c-di-GMP gebunden (aus Chan et al., 2004).

Die Aminosäuren des Sequenzmotivs GGDEF sind Teil des katalytischen Zentrums, wobei Glutamat (E) Mg^{2+} bindet und Aspartat (D) als Base wahrscheinlich die Deprotonierung katalysiert (Chan et al., 2004). Weitere Daten aus der Strukturanalyse erklären die Substratspezifität für GTP (andere Nukleotide werden nicht umgesetzt) und bestätigen die essentielle Bedeutung der GGDEF-Sequenz innerhalb der gesamten Domäne. Es wurde eine Kollektion von 75 Mutanten mit Aminosäureaustauschen in der GGDEF-Sequenz der Diguanylatcyclase WspR aus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Alle Substitutionen, mit der Ausnahme GGDEF zu GGDEF, eliminierten die DGC-Aktivität des Proteins (Malone and Rainey, unpubliziert nach [Jenal et al., 2006]). Etwa 90% aller bekannten DGC- und 62% der DGC/EAL-Proteine zeigen Konservierung des GG[DE]EF-Motivs in der A-site (Jenal et al., 2006) und daraus ergibt sich die Frage, welche Funktion eine Domäne mit degeneriertem GGDEF-Motiv hat. Ein Beispiel ist das GGDEF/EAL-Protein CC3396 in *C. crescentus*, welches eine degenerierte GGDEF-Domäne (GEDEF) hat. In diesem Protein zeigt die GGDEF-Domäne keine DGC-Aktivität und übernimmt stattdessen eine die PDE-Aktivität allosterisch aktivierende Funktion (Christen et al., 2005). Möglicherweise existieren damit zwei Klassen von GGDEF-Domänen, katalytisch aktive DGC (A⁺) und Proteine mit regulatorischer Funktion (A). Die Kristallstruktur von PleD zeigte eine weitere Bindestelle (I-site) für c-di-GMP, welche sich N-terminal vom katalytischen Zentrum (A-site) befindet. Die hohe Substrataffinität dieser Bindestelle für c-di-GMP, tatsächlich ist es ein Komplex aus zwei interkalierenden Molekülen c-di-GMP, ist verantwortlich für die zuvor beobachtete nicht-

kompetitive Produkthemmung der DGC-Aktivität (Chan et al., 2004). Selektionsexperimente *in vivo* und kinetische Analysen von evolvierten I-site Mutanten führten zur Definition eines RXXD-Bindemotivs, welches sich im Abstand von 5 Aminosäuren von der A-site befindet (Christen et al., 2006). Das I-site Motiv ist in den meisten bekannten DGC konserviert, so daß allosterische Produkthemmung wahrscheinlich ein allgemeines Prinzip der c-di-GMP vermittelten Regulation ist (Jenal et al., 2006).

Die EAL-Domäne degradiert c-di-GMP, wie von (Tal et al., 1998) vorhergesagt und von (Schmidt et al., 2005; Tamayo et al., 2005; Christen et al., 2005) experimentell bestätigt. Als primäres Reaktionsprodukt der bereits von (Ross et al., 1989) beobachteten PDE-A Aktivität entsteht das lineare Dinukleotid pGpG. Die PDE-A Aktivität ist spezifisch für c-di-GMP, abhängig von Mg^{2+} oder Mn^{2+} , wird stark durch Ca^{2+} inhibiert (Ross et al., 1989) und benötigt keine Oligomerisierung des Proteins (Schmidt et al., 2005). Die EAL-Domäne katalysiert auch die Umsetzung von pGpG zu GMP, wobei diese PDE-B Aktivität um Größenordnungen niedriger und vermutlich *in vivo* nicht relevant ist (Schmidt et al., 2005). Wie bereits von (Ross et al., 1989) vorgeschlagen, ist die PDE-B-Aktivität wahrscheinlich in einem separaten Enzym lokalisiert. Da PDE-A und PDE-B Aktivität entkoppelt sind, wirkt pGpG möglicherweise als eigenständiges Signalmolekül im System der c-di-GMP vermittelten Regulation.

Die Targetproteine von c-di-GMP sind, mit wenigen Ausnahmen, unbekannt. Die Arbeitsgruppe Benziman konnte zeigen, daß die Aktivität der Cellulosesynthase in *G. xylinus* durch c-di-GMP allosterisch kontrolliert wird (Ross et al., 1990). Das Enzym besteht aus der katalytischen Untereinheit BcsB und einer regulatorischen Untereinheit BcsA. Aufgrund dieser Beobachtung und weiterer bioinformatischer Analysen wurde postuliert, daß c-di-GMP an eine C-terminale Domäne von BcsA bindet (Amikam et al., 2006). Diese PilZ-Domäne, benannt nach einem gleichnamigen Protein in *P. aeruginosa*, umfaßt ca. 118 Aminosäuren und kommt in verschiedenen Bakterien-species, sowohl als einzelnes Protein als auch in Multidomänen-Proteinen, gemeinsam mit unterschiedlichen Sensor- und Outputdomänen vor. In *E. coli* codieren zwei Gene für PilZ-Proteine: *ycgR* (b1194), ein Klasse 3 Gen der flagellären Regulationskaskade und *bcsA* (b3533), eine Untereinheit der Cellulosesynthase. Im Vergleich mit einer *hns* Einzelmutante, die drastisch in der Motilität eingeschränkt ist, zeigt die *hns ycgR* Doppelmutante deutlich verbesserte Motilität (Ko et al., 2000). Für YcgR aus *E. coli* und BcsA aus *G. xylinus* konnten (Ryjenkov et al., 2006) *in vitro* die Bindung von c-di-GMP zeigen.

1.2.3 C-di-GMP abhängige Regulation und Phänotypen

Aus den bisherigen Studien mit GGDEF/EAL Mutanten und mit GGDEF/EAL überexprimierenden Systemen geht hervor, daß c-di-GMP generell Biofilmbildung, Synthese von extrazellulärer Matrix und sessile Lebensform begünstigt, aber Motilität und planktonischer Lebensweise entgegenwirkt (z.B. Aldridge et al., 2003; Simm et al., 2004) (Abbildung 5). C-di-GMP beeinträchtigt die Fähigkeit zum Schwimmen (Ryjenkov et al., 2006), Schwärmen

(Boles et al., 2002) und Twitchen (Fortbewegung mit TypIV Pili)(Kazmierczak et al., 2006) und stimuliert die Cellulosesynthese (Ross et al., 1989; Romling et al., 2002). Ein anschauliches Beispiel für die antagonistische Wirkung von DGC und PDE ist die Differenzierung in Stalk- und Schwärmerzelle bei *C. crescentus* (Abbildung 6). In *Salmonella* steht die Synthese von Cellulose und die Ausprägung des rdar (rough dry and red) Morphotyps unter positiver Kontrolle des GGDEF-Proteins AdrA (STM0385) (Kader et al., 2006). Darüberhinaus sind noch viele andere Phänotypen in unterschiedlichen Bakterienspezies beschrieben. So werden u.a. Chemotaxis (Hickman et al., 2005), Quorum Sensing (Andrade et al., 2006), Virulenzfaktoren bei pflanzen- und humanpathogenen Bakterien (Dow et al., 2006; Tischler et al., 2005) durch c-di-GMP kontrolliert.

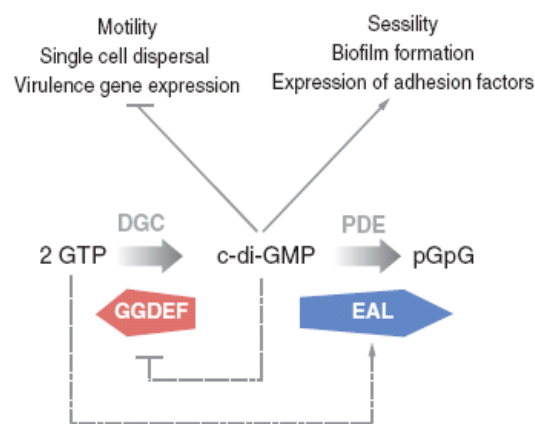


Abbildung 5: Schema der Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP. Es sind die Proteindomänen mit DGC- (rot) oder PDE-Aktivität (blau) sowie die durch c-di-GMP kontrollierten zellulären Funktionen dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen die allosterische Kontrolle der DGC- und PDE-Aktivität an (nach Jenal et al., 2006).

Trotz ihrer vielen unterschiedlichen Inputdomänen, sind nur für nur relativ wenige GGDEF/EAL-Proteine die Aktivität steuernden Signale beschrieben, darunter Sauerstoff (Chang et al., 2001), Licht (Hasegawa et al., 2006), Nährstofflimitation (Gjermansen et al., 2005), Antibiotika (Drenkard et al., 2002; Hoffman et al., 2005), Gallensalze (Raphael et al., 2005), interzelluläre Signalmoleküle (Johnson et al., 2005; Karatan et al., 2005; Ryan et al., 2006) und Mucin (Huang et al., 2003). Die hohe Variabilität der Inputdomänen sowie die unterschiedliche Lokalisierung sowohl im Cytoplasma als auch in der periplasmatischen Membran zeigen, daß verschiedene GGDEF/EAL völlig unterschiedliche Signale wahrnehmen können. Bei der Vielzahl von GGDEF/EAL-Proteinen, die oft in den Genomen einzelner Spezies codiert sind, stellt sich die Frage, ob c-di-GMP innerhalb der gleichen Zelle nicht nur einen sondern mehrere Phänotypen reguliert. In diesem Fall müßte die Zelle Mechanismen bereitstellen, welche die Spezifität für jeden Signalweg garantieren. So könnten z.B. bei räumlicher Kompartimentierung bestimmte GGDEF/EAL-Proteine nur lokal auf ein Ziel-system wirken oder verschiedene GGDEF/EAL-Proteinen zu unterschiedlichen Zeiten ex-

primiert sein. Die Differenzierung in Schwärmer- und Stalkzelle im Zellzyklus von *C. crescentus* wird durch sowohl zeitlich als auch räumlich unterschiedliche Expression von GGDEF/EAL-Proteinen kontrolliert (Paul et al., 2004; Huitema et al., 2006)(Abbildung 6).

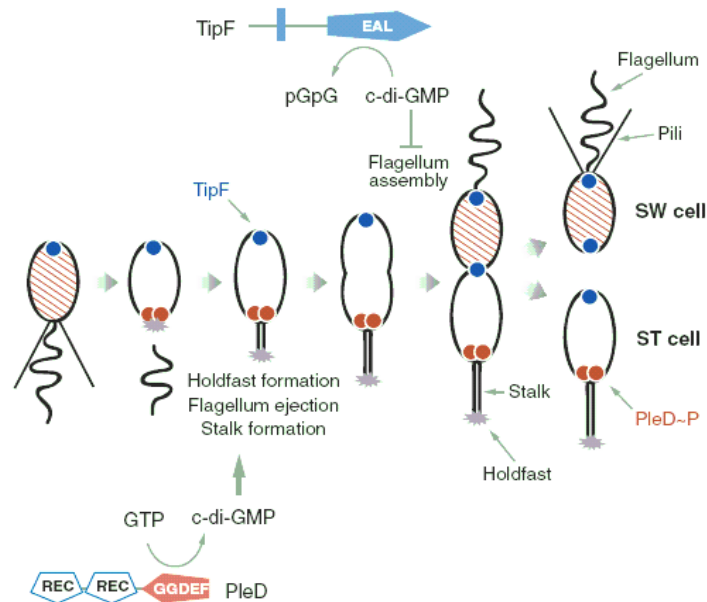


Abbildung 6: Integration von c-di-GMP vermittelter Regulation und dem Zellzyklus von *C. crescentus*. Es ist ein Schema des Zellzyklus mit der Teilung in eine motile Schwärmer- (SW) und eine sessile Stalkzelle (ST) dargestellt. Polare Anhängsel sind markiert und die subzelluläre Lokalisation von TipF (blaue Kreise) und PleD (rote Kreise) während des Zellzyklus ist angezeigt. Für PleD wurde DGC-Aktivität nachgewiesen, das Modell macht die Annahme, daß TipF (ein EAL-Protein) PDE-Aktivität besitzt. Die Ausbildung von Motilität im Schwärmerkompartiment benötigt die Absenkung des c-di-GMP Spiegels durch TipF wohingegen Verlust von Motilität, Bildung von Holdfast und Stalkbiogenese während des SW-zu-ST Überganges von PleD produziertes c-di-GMP benötigt (nach Jenal et al., 2006).

Die Integration von c-di-GMP in das gesamte regulatorische Netzwerk der Zelle ist bisher kaum verstanden. Die Expression von AdrA in *Salmonella* steht unter direkter Kontrolle des Transkriptionsregulators CsgD und ist auf diese Weise in ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk eingebunden (Zogaj et al., 2001). Insbesondere GGDEF/EAL Proteine mit Receiverdomänen sind Kandidaten für Crosstalk mit den Sensorkinasen von Zweikomponentensystemen. So interagiert in *P. aeruginosa* die DGC WspR über ihre CheY-ähnliche Receiverdomäne direkt mit dem chemosensorischen System (Hickman et al., 2005). Verschiedene EAL-Proteine mit PDE-Aktivität in Proteobakterien haben DNA-bindende Domänen und könnten Genexpression so direkt kontrollieren. Von (Ryan et al., 2006) wurde gezeigt, daß in *Xanthomonas campestris* RpfG (PDE) und verschiedene DGC mit dem Quorum Sensing assoziiert sind und (Camilli et al., 2006) diskutieren konvergierende Signalwege von c-di-GMP

und Quorum sensing. Diese Beispiele zeigen, daß c-di-GMP in globale regulatorische Zusammenhänge integriert ist und damit ein wichtiger und interessanter Gegenstand der Forschung zur Genregulation in Bakterien ist.

1.2.4 Die Rolle von c-di-GMP bei der Regulation bakterieller Virulenz

In den meisten bisher untersuchten Bakterienspezies spielt c-di-GMP eine generelle Rolle bei der Regulation von Biofilmbildung, ein wichtiger Virulenzfaktor bei verschiedenen pathogenen Bakterien. Bei *P. aeruginosa* wird die Tobramycin induzierte Biofilmbildung von der Phosphodiesterase Arr vermittelt (Hoffman et al., 2005) und ein Screening nach Mutanten mit veränderter Biofilmbildung identifizierte die Phosphodiesterase RocR/SadR, die auch die Expression von Komponenten des Typ III- Sekretionssystems kontrolliert (Kulasekara et al., 2005; Kuchma et al., 2005). Transposon-Mutagenese von klinischen *Staphylococcus aureus* Isolaten zeigte, daß die Mutation eines Genes welches für ein GGDEF Protein codiert, die Biofilmbildung signifikant reduzierte (Tu et al., 2006). Beim Pflanzenpathogen *X. campestris* ist die Phosphodiesterase RpfG ein wichtiger Virulenzfaktor welcher die Verbreitung von Bakterien aus dem Biofilm heraus kontrolliert (Ryan et al., 2006). Über die Biofilmbildung hinaus wurden weitere durch c-di-GMP kontrolliert Faktoren der bakteriellen Pathogenität beschrieben. So wird in *V. cholerae* das Dreikomponentensystem VieSAB für die maximale Expression des von *ctxAB* codierten Cholera-toxins benötigt. Dabei hält die Phosphodiesterase VieA den c-di-GMP Spiegel auf einem niedrigen Niveau, was die Transkription von ToxT begünstigt, das seinerseits ein direkter Aktivator von *ctxAB* ist. Die VieA Mutante neigt zur verstärkten Biofilmbildung indem die Transkription der *Vibrio* Exopolysaccharid Gene *vps* stimuliert wird (Tischler et al., 2004; Tischler et al., 2005). In *Bordetella pertussis* supprimiert das EAL Protein BvgR auf unbekannte Weise die Virulenz im Mausmodell (Merkel et al., 1998). Das EAL Protein STM1344 in *Salmonella* verhindert die oxidative Abtötung in Phagozyten. Experimente *in vitro* mit Wasserstoffperoxid bestätigten die protektive Rolle von STM1344 bei oxidativem Stress (Hisert et al., 2005). Außerdem scheint STM1344 (*ydiV*) an der Abtötung von Makrophagen beteiligt zu sein, indem es die Sekretion von SipB, einer Komponente des Typ III-Sekretionssystems, supprimiert (Hersh et al., 1999). Bei einem Screening in *P. aeruginosa* zeigten verschiedene GGDEF/EAL Mutanten einen zytotoxischen Phänotyp bei der CHO-Zelllinie (Kulasakara et al., 2006).

1.3 Die Regulation der Curli-Expression in *E. coli*

1.3.1 Struktur und biologische Bedeutung von Curli

Curli wurden erstmals von (Olsen et al., 1989) als Organellen der Oberfläche von *E. coli* beschrieben. Bei einem Screening von *E. coli* Isolaten der bovinen Mastitis beobachteten die Autoren, daß etwa 50% der Isolate an Fibronectin binden konnten und diese Bindung bevorzugt bei Wachstum auf CFA-Agar und bei Temperaturen zwischen 26° C und 32° C auftrat. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß diese Isolate auf ihrer Oberfläche gekrümmte (daher der Name 'Curli'), fädige und etwa 2 nm starke Strukturen ausbildeten, die sich zu dickeren Aggregaten aneinander lagern konnten. Als Strukturprotein von Curli konnte ein 17 kDa Protein identifiziert werden, welches ohne Signalsequenz synthetisiert wird und keine Verwandtschaft zu den Pilinen aufweist. Damit sind Curli neben Flagellen und Fimbrien die dritte Form von filamentösen Oberflächenstrukturen in *E. coli* (Olsen et al., 1989). Weitere Untersuchungen ergaben, daß Curli auch an Matrix- und Serumkomponenten wie Laminin (Olsen et al., 1993b) und Plasminogen (Sjobring et al., 1994) sowie an inerte Oberflächen (Vidal et al., 1998; Cookson et al., 2002) binden und aus diesem Grund als Faktoren der Adhäsion und Biofilmbildung gelten. Experimente im Tiermodell und epidemiologische Studien zeigten, daß Curli-negative *E. coli*, insbesondere bei Vögeln, in ihrer Virulenz attenuiert sind (La_Ragione et al., 1999; La_Ragione et al., 2002). Curli begünstigen die Internalisierung in eukaryontische Zellen (Gophna et al., 2001) und modulieren das Immunsystem (Ben_Nasr et al., 1996; Bian et al., 1997; Bian et al., 2001). In *Salmonella* sind Curli und Cellulose die Hauptkomponenten der Biofilmbildung und für den 'rdar' Phänotyp bei Wachstum auf Kongorotplatten verantwortlich (Romling et al., 1998b).

1.3.2 Die Regulation der Curli-Expression

Die Curli Gene werden von zwei divergent transkribierten Operonen exprimiert (Hammar et al., 1995), welche bei ca. 24° auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert sind. Das Operon mit den Genen *csgD*, *csgE*, *csgF* und *csgG* ist durch eine 755 bp lange intergenische Region (bezogen auf die Position der Startcodons) vom Operon mit den Genen *csgB*, *csgA* und *csgC* getrennt. CsgD hat eine C-terminale HTH-LuxR Domäne und ist ein Regulator der LuxR/FixJ-Unterfamilie. CsgD ist ein essentieller Aktivator der *csgBAC* Transkription und der zentrale Regulator der Curliexpression (Hammar et al., 1995; Romling et al., 1998a). Darüber hinaus aktiviert CsgD (AgfD) in *Salmonella* via AdrA (YaiC in *E. coli*, ein GGDEF-Protein) die Expression von Cellulose (Romling et al., 2000). Weitere Untersuchungen zeigten, daß CsgD die Expression der Serin Hydroxymethyltransferase (Chirwa et al., 2003) und anderen für Biofilmbildung relevante Gene (Brombacher et al., 2003) in *E. coli* kontrolliert. CsgG ist ein Lipoprotein, welches in der äußeren Membran die Sekretion der Curli-Untereinheiten vermittelt und sehr resistent gegen Proteaseverdau ist (Loferer et al., 1997; Robinson et al., 2006). CsgA (Curlin) ist der Hauptbestandteil der Curlifasern (Olsen et al., 1989) und bildet aufgrund von Prion-ähnlichen kurzen repetitiven Peptidsequenzen, amyloide Strukturen

(Chapman et al., 2002; Cherny et al., 2005; Lundmark et al., 2005; Wang et al., 2006). CsgB ist ein Oberflächenprotein und katalysiert als 'Nukleator' die Polymerisierung von CsgA (Hammar et al., 1996; Bian et al., 1997). CsgE, CsgF und CsgC spielen vermutlich eine Rolle beim Transport und der Assemblierung der Curliuntereinheiten (zur Curliogenese siehe Barnhart et al., 2006b). Die Operonstruktur der Curligene ist in verschiedenen Gattungen der Enterobakterien konserviert, wie in *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* und anderen (Romling et al., 1998a). Trotzdem kann das Expressionsmuster von Curli deutlich zwischen und sogar innerhalb den Species variieren, wie Isolate von *E. coli* und *Salmonella* zeigen, bei denen Curliexpression aufgrund von Mutationen in der Promotorregion von *csgD* verändert ist (La_Ragione et al., 1999; Romling et al., 2003; Uhlich et al., 2001; Uhlich et al., 2002). Die Expression von Curli wird durch viele verschiedene Umwelteinflüsse kontrolliert: Nährstofflimitation und Übergang in die stationäre Phase, microaerophile Wachstumsbedingungen, verminderte Temperatur, 4% Ethanol und reduzierte Osmolarität des Wachstumsmediums stimulieren die *csgD* Transkription und Curliexpression (Gerstel et al., 2001; Romling et al., 1998a; Romling et al., 2003; Zogaj et al., 2001; Olsen et al., 1993b; Prigent-Combaret et al., 2001). Die gesamte intergenische Region stromaufwärts vom *csgD*-Promotor kontrolliert die Transkription von *csgD*, wie transkriptionelle *csgD*-Fusionen mit unterschiedlich langen stromaufwärts gelegenen DNA-Bereichen zeigten (Gerstel et al., 2003b). Die *csgD* Region ist das Ziel von mehreren DNA-bindenden Proteinen, wobei jedes einzelne auch an mehreren Stellen binden kann. Für OmpR (Responseregulator) (Prigent-Combaret et al., 2001; Gerstel et al., 2003b), IHF (Histon-ähnliches Protein) (Gerstel et al., 2003b), H-NS (Histon-ähnliches Protein) (Gerstel et al., 2003b), CpxR (Responseregulator) (Jubelin et al., 2005), nicht aber für MlrA (MerR-ähnlicher Regulator) wurde bisher Bindung *in vitro* gezeigt. Die Transkription von *csgD* steht außerdem unter Kontrolle von σ^S , dem Sigmafaktor der generellen Streßantwort. Dabei aktiviert σ^S die Transkription sowohl direkt am *csgD* Promotor als auch indirekt über die Aktivierung von MlrA. Beide, σ^S (Olsen et al., 1993b) und MlrA (Brown et al., 2001) sind essentiell für die CsgD-Expression, aber verschiedene Isolate von *S. typhimurium* und enterohaemorrhagischen *E. coli* zeigten, daß die Insertion einer einzigen Base in der Promotorregion die Temperatur- und σ^S -unabhängige und damit semikonstitutive Transkription von *csgD* bewirkt (Bian et al., 2000; Sakellaris et al., 2000). Nach (Barnhart et al., 2006) wird die Curliexpression auch durch N-Acetylglucosaminphosphat moduliert. Insgesamt ist die Regulation der *csgD*-Transkription (für eine ausführliche Darstellung siehe Gerstel et al., 2003) und damit der Curli-Expression sehr komplex (Abbildung 7) und aufgrund der genetischen Variabilität in der Promotorregion sind Ergebnisse zur Regulation der *csgD* Transkription nur bedingt für verschiedene Stämme zu verallgemeinern.

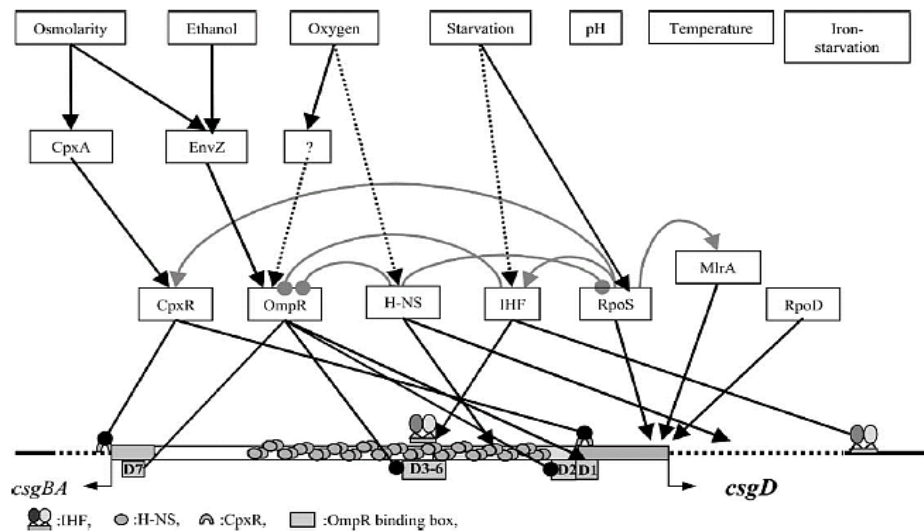


Abbildung 7: Regulatorisches Netzwerk der Faktoren, welche die *csgD* Transkription beeinflussen. Proteine, welche in der *csgD* Promotorregion binden, sind mit ihren Bindestellen dargestellt. Die Effekte untereinander sowie auf die *csgD* Promotoraktivität sind wie folgt angedeutet: spitze Pfeile stehen für Aktivierung, runde Pfeile für Reprimierung und Linien für einen unbekannten Effekt. Außerdem sind die Signaltransduktionswege von bekannten Umweltsignalen sowie hypothetische Verbindungen dargestellt (gepunktete Pfeile) (nach Gerstel et al., 2003).

1.4 Die Glutamat-abhängige Säurestressantwort

1.4.1 Säureresistenz in *E. coli*

Sowohl aquatische Habitate als auch der Darm von Säugetieren können von *E. coli* besiedelt werden. Auf dem Weg in den Darm muß *E. coli* das saure Milieu des Magens mit pH-Werten zwischen 1,5 und 2,5 passieren. Ohne entsprechende Abwehrmechanismen können Bakterien nicht in der extrem sauren Umgebung des Magens überleben, weshalb dem Magen eine wichtige Funktion bei der unspezifischen Immunabwehr zukommt. *E. coli* ist in der Lage bei pH 2 für mehrere Stunden zu überleben (Gorden et al., 1993; Small et al., 1994), Zeit genug um die Magenbarriere zu überwinden und in den Darm zu gelangen. Untersuchungen unter Laborbedingungen haben ergeben, daß die Säureresistenz von *E. coli* von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums abhängt. Kulturen, die in einem Medium wachsen, welches reich an Aminosäuren ist, überleben Säurestress deutlich besser als Kulturen, die in einem Minimalmedium ohne Aminosäuren kultiviert wurden (Small et al., 1994; Lin et al., 1995; Lin et al., 1996). Aufgrund dieser Beobachtung wurden drei verschiedene Säureresistenzsysteme in *E. coli* postuliert, deren Funktionsweise und Regulation noch nicht vollständig verstanden ist. Das erste System (AR I) verleiht *E. coli* Säureresistenz in der stationären Phase, ist abhängig von σ^S und Crp und wird durch Glucose reprimiert (Castanie-Cornet et al., 1999). Das zweite System (AR II) vermittelt Säureresistenz in der

Gegenwart von Glutamat im Medium und AR III ist abhängig von Arginin (Lin et al., 1995). Das bedeutendste und am besten untersuchte System in *E. coli* ist die Glutamat-abhängige Säureresistenz. Das System beruht auf der Pyridoxalphosphat-abhängigen Decarboxylierung von Glutamat zu Gammaaminobuttersäure (GABA) durch die Enzyme GadA und GadB. Bei dieser Reaktion wird ein Proton aus dem Cytosol umgesetzt, was zur Erhöhung des pH-Wertes führt. GABA wird durch das Antiporter-System GadC gegen Glutamat aus dem Medium ausgetauscht (Smith et al., 1992; De_Biase et al., 1999; Hersh et al., 1996). Die Aktivität der Glutamat-Decarboxylase wird durch Chloridionen und niedrigen pH stimuliert und auf diese Weise sind der Säurestimulus und die Enzymaktivität direkt über biochemische Parameter miteinander verknüpft (Capitani et al., 2003; Gut et al., 2006). Obwohl das Gad-System in *E. coli* sehr effizient vor Säurestress schützt, ist es in der nahverwandten Gattung *Salmonella* nicht konserviert. Stattdessen sind hier Arginindecarboxylasen die Haupteffektoren der Säureresistenz. Allerdings ist dieses System weniger effizient als das Gad-System und *Salmonella* ist unter vergleichbaren Wachstumsbedingungen auch nicht so säureresistent wie *E. coli* (Audia et al., 2001).

1.4.2 Die Regulation der Glutamat-abhängigen Säureresistenz

Die Glutamat-abhängige Säureresistenz unterliegt einer komplizierten Regulation. In deren Zentrum steht GadE, ein Transkriptionsregulator aus der LuxR-Familie. GadE bindet an ein Sequenzmotiv von 20 Basenpaaren, die sogenannte GAD-Box, 63 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte von *gadA* und *gadBC* liegend. Sowohl die GAD-Box als auch GadE sind essentiell für die Expression von *gadA* und *gadBC* und damit für die Glutamat-abhängige Säureresistenz (Ma et al., 2003b; Castanie-Cornet et al., 2001). Weitere 10 Regulatoren sind Komponenten von zwei verschiedenen Signalwegen, welche beide auf den zentralen Regulator GadE hin konvergieren. Diese Signalwege werden durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen aktiviert. So kann die Expression von *gadA/BC* z.B. in saurem Minimalmedium (pH 5,5) in der Logphase oder auch pH-unabhängig in der stationären Phase in Komplexmedium induziert werden. Im ersten Fall verläuft der Signalweg über den Responseregulator EvgA und den Transkriptionsaktivator YdeO. Überexpression von EvgA und YdeO verleihen *E. coli* Säureresistenz und Microarrayanalysen zeigten, daß EvgA die Säurestressantwort indirekt über die Aktivierung der Transkription von *ydeO* stimuliert, so daß sich letztlich eine Signalkaskade EvgA -> YdeO -> GadE -> Säureresistenz ergibt (Masuda et al., 2003; Ma et al., 2004). Unter Wildtypbedingungen, also ohne Überexpression, kann EvgA auch direkt die Transkription von *gadE* aktivieren. Das System ist autoreguliert, indem GadE die eigene Transkription aktiviert und die von *ydeO* reprimiert, wodurch dieser Regelkreis geschlossen wird (Ma et al., 2004). Obwohl EvgA und YdeO die Säureresistenz in Minimalmedium bei pH 5,5 kontrollieren, spielen sie keine Rolle bei der Aktivierung des Gad-Systems in der stationären Phase in LB Medium (Abbildung 8).

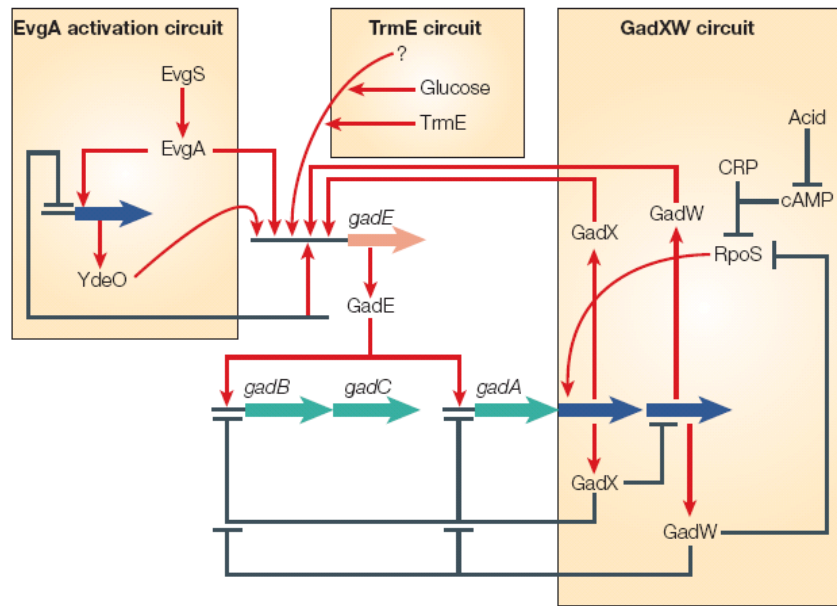


Abbildung 8: Aktivierende und akzessorische Regelkreise welche die Glutamat-abhängige Säureresistenz kontrollieren. Große Pfeile repräsentieren Gene, regulatorische Gene sind blau. Kleine rote Pfeile zeigen positive Kontrolle an, schwarze Linien stehen für negative Kontrolle (nach Foster et al., 2004).

Dieser Regelkreis wird von σ^S und den beiden Transkriptionsfaktoren GadX und GadW kontrolliert. Bisherige Modelle gingen davon aus, daß GadX und GadW gemeinsam mit GadE die Expression *gadA/gadBC* durch Bindung an die GAD-Boxen auf Transkriptionsebene aktivieren (Ma et al., 2002; Shin et al., 2001; Tramonti et al., 2003). Unveröffentlichte Daten deuten allerdings darauf hin, daß GadX und GadW die Transkription von *gadE* stimulieren und somit indirekt die Expression der gad-Decarboxylasen induzieren (Foster et al., 2004). GadX und GadW binden aber auch direkt an die GAD-Box Sequenzen der Promotoren von *gadA/BC* und scheinen so die Transkription dieser Gene zu reprimieren (Ma et al., 2002; Tramonti et al., 2002). Diese duale Rolle von GadX/W erklärt möglicherweise widersprüchliche Berichte, welche GadX/W unter bestimmten Bedingungen als Aktivatoren und unter anderen Bedingungen als Repressoren der Glutamat-Decarboxylasen sehen (Shin et al., 2001). GadW wurde zusätzlich auch als Repressor der σ^S Synthese beschrieben (Ma et al., 2003), wobei hierzu widersprüchliche Daten existieren (Untersuchungen von Johanna Heuveling). Der GadX/W Regelkreis schließt sich, indem GadX die Transkription von *gadW* reprimiert. Dieser Effekt tritt am deutlichsten in der exponentiellen Phase in Komplexmedium auf, wenn GadX und GadW sich scheinbar gegenseitig kontrollieren. Eine *gadX* Mutante zeigt aufgrund der Überproduktion von GadW (welche zur Aktivierung der Transkription von *gadE* führt) trotzdem erhöhte Expression von *gadA/BC* bei pH 8 in der exponentiellen Phase (Ma et al., 2002). Das Gleichgewicht der Kräfte in diesem Signalsystem wird durch cAMP-CRP

beeinflusst, das die Synthese von σ^S inhibiert (Lange et al., 1994b). Wachstum unter sauren Bedingungen vermindert die cAMP Konzentration in der Zelle (Ma et al., 2003). Verminderte cAMP Konzentrationen stimulieren eine regulatorische Kaskade welche die σ^S Expression erhöht, was zu erhöhter Synthese von GadX führt. Die Zunahme von GadX wiederum stimuliert die Transkription von *gadE* und der Decarboxylasegene und reguliert die GadW Expression herunter (Ma et al., 2003). Auf diese Weise läßt sich teilweise die Säureinduktion des Systems erklären. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, daß die *gadA/BC* Transkription auf drei verschiedene Weisen aktiviert werden kann: Expression der Aktivatoren GadE und GadX, sowie Veränderung der Aktivität von GadW. Es wurde vorgeschlagen, daß GadX, GadW und CRP unterschiedliche chemische Signale in der Zelle wahrnehmen und das Verhältnis dieser Signale zueinander das Gleichgewicht des Regelkreises balanciert (Foster et al., 2004). Globale Transkriptionsanalysen zeigten, daß insgesamt 28 Gene durch Säurestress (pH 5 in Minimalmedium) aktiviert werden (Tucker et al., 2002), wovon 11 Gene unter der Kontrolle von GadX stehen (Tucker et al., 2003). Gemeinsam mit den Ergebnissen von (Masuda et al., 2003), welche Microarrayanalysen nach Überproduktion von EvgA und YdeO durchführten, konnte ein Gencluster bei etwa 78° auf dem *E. coli* Chromosom identifiziert werden, welcher mit dem Phänotyp der Säureresistenz assoziiert ist. Auf diesem Cluster befinden sich die Gene *gadA*, *gadX*, *gadW*, *gadE* sowie *hdeABD* (Gajiwala et al., 2000), von denen nicht eines in der nahverwandten Gattung *Salmonella* vorkommt. Diese Genregion wurde auch als 'fitness island of acid adaptation' bezeichnet (Hommais et al., 2004).

In der neueren Literatur wurden zwei weitere Regulatoren der Glutamat-abhängigen Säureresistenz eingeführt: TrmE und GadY. Deletion von TrmE, ursprünglich als ein tRNA-modifizierender Faktor beschrieben, führt zu 10fach verminderter *gadE* Expression und verhindert die Synthese von GadA und GadBC, wenn die Zellen in LB mit Glukose wachsen (Gong et al., 2004). GadY ist eine kleine nichtcodierende RNA welche σ^S -abhängig in der stationären Phase stark induziert wird. Das *gadY* Gen überlappt mit dem 3'-Ende von *gadX* und es wurde gezeigt, daß diese Überlappungsregion nötig ist für eine GadY-abhängige Akkumulation von *gadX* mRNA. Es wird angenommen, daß die GadY sRNA das *gadX* Transkript vor Abbau schützt, indem sie mit dem nichttranslatierten 3'-Ende der GadX mRNA basenpaart und somit als positiver Faktor auf die Expression von *gadA/BC* wirkt (Opdyke et al., 2004).