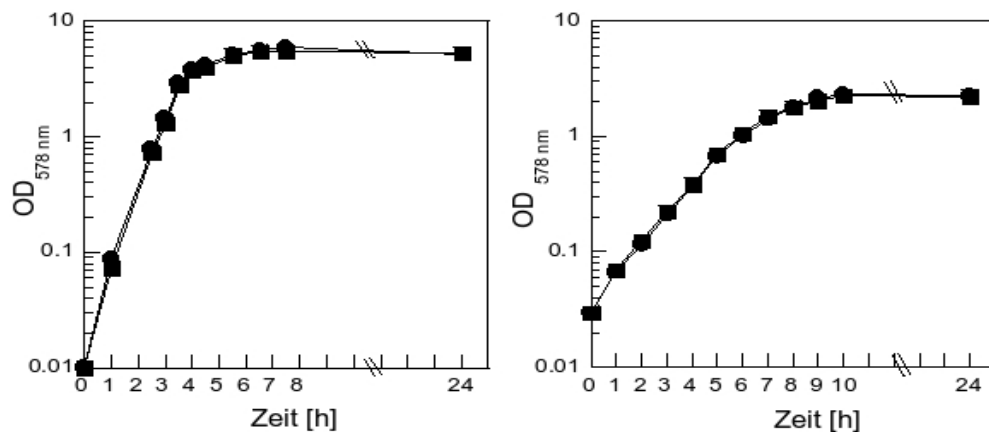


# 3 Ergebnisse

## 3.1 Globale Transkriptionsanalyse des $\sigma^S$ -Regulons

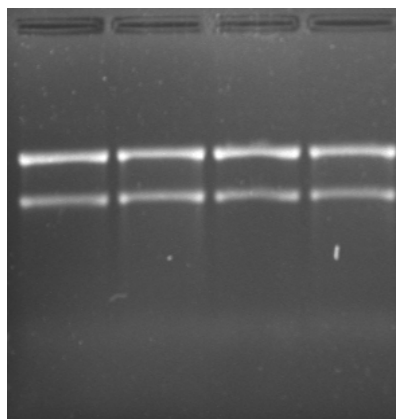
### 3.1.1 Vorversuche zur DNA Microarrayanalyse

Die DNA Microarrayanalyse ist eine geeignete Methode, um Genexpression im globalen Maßstab zu untersuchen (Brown et al., 1999). Zur Bestimmung der Targetgene von Regulatoren der Transkription, wie z.B. alternative Sigmafaktoren, Responseregulatoren etc. ist es das Mittel der Wahl. Das Verfahren ist zeitaufwendig und kostspielig und mußte im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert werden. Aus diesen Gründen wurden zuerst Vorversuche durchgeführt, die zeigen konnten, daß a) das experimentelle System geeignet ist, die Fragestellung zu beantworten und b) alle Schritte des Experiments mit der erforderlichen Qualität ausgeführt werden können. Um für die vorliegende Arbeit zu gewährleisten, daß die Ergebnisse der globalen Transkriptionsanalyse des  $\sigma^S$  Netzwerkes nicht durch Wachstumseffekte beeinflusst werden, wurde zuerst das Wachstum des Wildtyps und der isogenen *rpoS* Mutante unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Wildtyp und *rpoS* Mutante unterschieden sich nicht im Wachstum in LB Vollmedium oder M9 Minimalmedium (Abbildung 9). Differentielle Genexpression in der globalen Transkriptionsanalyse konnte somit direkt mit der Wirkung von  $\sigma^S$  verknüpft werden und war nicht die unspezifische Folge unterschiedlichen Wachstums von Wildtyp und Mutante.



**Abbildung 9:** Wachstum des Wildtyps MC4100 (Kreise) und der isogenen *rpoS* Mutante RH90 (Quadrate) in LB Vollmedium (links) und M9 Minimalmedium mit 0,4% Glycerin (rechts) bei 37° C.

Bevor eine RNA-Präparation für die Microarray-Analyse eingesetzt wurde, erfolgte eine Qualitätskontrolle mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese. Bei einer guten RNA-Präparation sieht man die distinkten Banden der 16S und der 23S rRNA, aber keine weiteren Banden oder Verschmierungen im hochmolekularen Bereich (was für DNA-Kontamination sprechen würde) oder im niedermolekularen Bereich (ein Hinweis auf Degradation). Idealerweise ist die Bande der 23S rRNA auf dem Gel etwa doppelt so intensiv wie die der 16S rRNA, da die 23S rRNA etwa doppelt so groß ist (und damit die doppelte Menge Ethidiumbromid bindet) wie die 16S rRNA und beide rRNA-Species in der Zelle in äquimolaren Mengen vorkommen. Die Abbildung 10 zeigt das Gel einer typischen RNA-Präparation, welche die Kriterien erfüllte, um für die Microarray-Analyse eingesetzt zu werden.

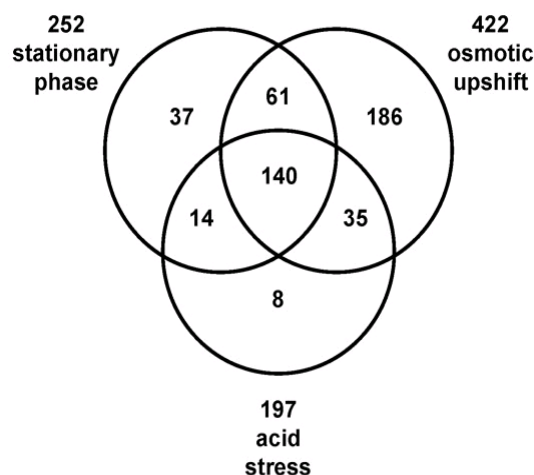


**Abbildung 10:** Denaturierendes Agarosegel mit RNA-Proben (jeweils 1µg pro Spur), Ethidiumbromidfärbung. In den beiden linken (Wildtyp) und beiden rechten Spuren (*rpoS* Mutante) sind jeweils identische Proben aufgetragen.

### 3.1.2 Circa 10% aller Gene in *E. coli* sind $\sigma^S$ -abhängig

Zur Aufklärung des  $\sigma^S$ -Regulons wurden DNA Microarrayanalysen mit dem Wildtypstamm MC4100 und der isogenen *rpoS* Mutante RH90 unter drei verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt, welche  $\sigma^S$ -Aktivität induzieren.

- Übergang in die stationäre Phase (OD 4)  
Wachstum in LB Medium bis  $OD_{578nm} = 4,0$
- Osmotischer Streß (NaCl)  
Wachstum in M9 Medium mit 0,3% Glycerin bis  $OD_{578nm} = 0,3$ . Osmotischer Streß durch Zugabe von 300 mM NaCl (Endkonzentration) für 20 min.
- Säurestreß (pH 5)  
Wachstum in LB Medium bis  $OD_{578nm} = 0,4$ . Säurestreß (pH 5) durch Zugabe von 170 mM MES (Endkonzentration) für 40 min.



**Abbildung 11:** Die Anzahl  $\sigma^S$ -kontrollierter Gene in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen dargestellt im Venn-Diagramm. Die Gruppe von 140 Genen welche  $\sigma^S$ -abhängig unter allen drei Bedingungen sind, werden als 'Kerngene' der generellen Streßantwort bezeichnet.

Nach der Zellernte wurde die Gesamtzell-RNA präpariert, in cDNA revers transkribiert und wie im Methodenteil und bei (Weber et al., 2005) beschrieben, in der Microarrayanalyse eingesetzt. Insgesamt konnten 481 Gene identifiziert werden, die mindestens zweifach höheres Expressionsniveau im Wildtyp als in der *rpoS* Mutante zeigten (Abbildung 11). Von den insgesamt 481  $\sigma^S$ -regulierten Genen, das sind ca. 10% des *E. coli* Genomes, zeigte aber nur eine Gruppe von 140 Genen  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter allen getesteten Bedingungen. Diese Gene stellen den invarianten Teil der generellen Streßantwort dar und werden im weiteren als 'Kerngene' bezeichnet. Weitere 341 Gene verteilten sich auf Untergruppen, die nur unter einer oder zwei Bedingungen  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigten. Weiterhin wurden 95 Gene

identifiziert, die in der *rpoS* Mutante ein zweifach höheres Expressionsniveau als im Wildtyp zeigten, d.h. diese Gene werden von  $\sigma^S$  negativ reguliert. Die negative Kontrolle von *ompF* (Protein der äußeren Membran) und den Genen der Succinatdehydrogenase *sdhCDAB* durch  $\sigma^S$  wurde bereits zuvor beobachtet (Liu et al., 2001b; Xu et al., 1995b). Da die Transkriptmenge von *ompF* von der sRNA MicF negativ reguliert wird (Mizuno et al., 1984; Andersen et al., 1989), liegt die Vermutung nahe, daß die Expression von MicF selbst unter positiver  $\sigma^S$ -Kontrolle steht. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, daß die Expression von *micF* durch globale Streßfaktoren gesteuert wird (Delihias et al., 2001). Für die überwiegende Mehrzahl der negativ regulierten Gene liegen aber die relativen Expressionslevel nur knapp über der Signifikanzgrenze und keines dieser Gene ist unter allen drei Wachstumsbedingungen durch  $\sigma^S$  negativ kontrolliert (siehe die vollständige Liste aller durch  $\sigma^S$  regulierten Gene im Anhang). Diese Gene werden vermutlich von  $\sigma^{70}$  abhängigen Promotoren aktiviert, welche auf die erhöhte Verfügbarkeit von  $\sigma^{70}$  reagieren, wenn in der *rpoS* Mutante die Konkurrenz zwischen  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^S$  um das RNA Polymerase Kernenzym entfällt. Die 341 positiv von  $\sigma^S$  regulierten Gene welche nicht zur Kerngruppe gehören, verteilen sich auf Untergruppen die nur unter einer oder zwei Streßbedingungen  $\sigma^S$ -Abhängigkeit zeigen. Diese Gene benötigen wahrscheinlich zusätzliche streßspezifische und  $\sigma^S$ -unabhängige Faktoren für ihre Expression. So existiert z.B. eine Gruppe von 98 Genen, die nur beim Übergang in die stationäre Phase und bei osmotischen Streß unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen, und von diesen sind wiederum 37 Gene ausschließlich unter den Bedingungen der stationären Phase  $\sigma^S$ -abhängig (Abbildung 11). Dies zeigt, daß im  $\sigma^S$ -Netzwerk komplexe Subregulation stattfindet und nicht alle  $\sigma^S$ -abhängigen Gene nur einfach der  $\sigma^S$ -Aktivität folgen. Außerdem wird damit auch deutlich, daß die generelle Streßantwort mit weiteren regulatorischen Netzwerken verknüpft ist. Insgesamt ist festzustellen, daß mit 481 positiv kontrollierten Genen das  $\sigma^S$ -Regulon weitaus größer und die Regulation innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes komplexer ist als bisher angenommen.

### 3.1.3 Die 140 Kerngene der generellen Streßantwort

Eine Gruppe von 140 Genen (Kerngene) zeigte  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter allen drei getesteten Wachstumsbedingungen (OD 4, NaCl und pH 5) (Tabelle 1). Insgesamt betrachtet, fallen in diese Gruppe auch die Gene mit den höchsten relativen Expressionslevel ('Ratio') und somit der am stärksten ausgeprägten  $\sigma^S$ -Abhängigkeit von allen  $\sigma^S$ -kontrollierten Genen. Die Expression dieser Gene folgt wahrscheinlich direkt dem zellulären  $\sigma^S$ -Spiegel und ist unabhängig von weiteren Faktoren. Sie stellen damit den invarianten Teil der generellen Streßantwort dar, welcher unabhängig von der konkreten Streßbedingungen operiert. Es ist anzunehmen, daß insbesondere diese Gene verantwortlich sind für den Phänotyp der unspezifischen, multiplen und vorsorglichen Streßresistenz. Die Kerngene bilden damit eine geeignete Grundlage für künftige Untersuchungen und dem Verständnis der generellen Streßantwort in *E. coli*.

**Tabelle 1:** Die 140 Kerngene der generellen Streßantwort und ihre relativen mRNA Level unter drei verschiedenen  $\sigma^S$ -Aktivität induzierenden Wachstumsbedingungen.

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $rpoS^+/rpoS$ )		
		OD 4	NaCl	pH 5
<i>adhP</i>	b1478 alcohol dehydrogenase, 1-propanol preferring, Zn enzyme and NAD-binding	5,38	9,19	3,43
<i>aidB</i>	b4187 isovaleryl CoA dehydrogenase	4,11	2,08	3,47
<i>amyA</i>	b1927 cytoplasmic alpha-amylase	12,21	11,02	10,57
<i>artM</i>	b0861 arginine transporter subunit -!- membrane component of ABC superfamily	2,20	2,79	2,61
<i>artP</i>	b0864 arginine transporter subunit -!- ATP-binding component of ABC superfamily	3,50	4,56	4,71
<i>bfr</i>	b3336 bacterioferritin, iron storage and detoxification protein	8,84	3,28	4,72
<i>blc</i>	b4149 outer membrane lipoprotein (lipocalin)	4,77	8,99	8,10
<i>bolA</i>	b0435 regulator of penicillin binding proteins and beta lactamase transcription (morphogene)	4,74	8,47	4,77
<i>cbpA</i>	b1000 curved DNA-binding protein, DnaJ homologue that functions as a co-chaperone of DnaK	4,97	4,16	2,05
<i>chaB</i>	b1217 predicted cation regulator	3,36	5,54	3,38
<i>csiR</i>	b2664 DNA-binding transcriptional dual regulator	4,84	10,09	4,30
<i>dkgA</i>	b3012 2,5-diketo-D-gluconate reductase A, NADP-binding	4,37	6,33	2,37
<i>dps</i>	b0812 Fe-binding and storage protein	8,92	24,19	4,32
<i>elaB</i>	b2266 conserved protein	8,11	17,82	11,80
<i>erfK</i>	b1990 conserved protein with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain	2,24	4,55	2,18
<i>eutH</i>	b2452 predicted inner membrane protein	3,11	3,06	2,59
<i>fbaB</i>	b2097 fructose-bisphosphate aldolase class I	8,00	9,61	9,33
<i>fic</i>	b3361 stationary-phase protein, cell division	12,94	17,76	10,82
<i>gabD</i>	b2661 succinate-semialdehyde dehydrogenase I, NADP-dependent	4,81	4,08	2,89
<i>gabP</i>	b2663 gamma-aminobutyrate transporter	4,06	4,70	2,83
<i>gadA</i>	b3517 glutamate decarboxylase A, PLP-dependent	32,38	5,80	2,33
<i>gadB</i>	b1493 glutamate decarboxylase B, PLP-dependent	16,44	3,96	2,22
<i>gadC</i>	b1492 predicted glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter	10,28	3,48	2,22
<i>gadW</i>	b3515 DNA-binding transcriptional activator	6,12	5,98	3,09
<i>gadX</i>	b3516 DNA-binding transcriptional dual regulator	6,09	7,45	3,14
<i>hchA</i>	b1967 Hsp31 molecular chaperone	6,02	15,64	4,89
<i>hdhA</i>	b1619 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, NAD-dependent	2,71	6,97	2,43
<i>hinT</i>	b1103 purine nucleoside phosphoramidase	2,68	2,99	2,10
<i>hycF</i>	b2720 formate hydrogenlyase complex iron-sulfur protein	10,67	24,06	9,11

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>rpoS</i> <sup>+</sup> / <i>rpoS</i> )			
		OD 4	NaCl	pH 5	
<i>hycI</i>	b2717	protease involved in processing C-terminal end of HycE	4,00	4,16	2,79
<i>katE</i>	b1732	hydroperoxidase HP(III) (catalase)	11,14	9,00	7,37
<i>ldcC</i>	b0186	lysine decarboxylase 2, constitutive	3,76	3,72	3,88
<i>mscL</i>	b3291	mechanosensitive channel	2,94	2,31	2,59
<i>msyB</i>	b1051	predicted protein	17,37	8,60	8,89
<i>narU</i>	b1469	nitrate/nitrite transporter	2,75	3,62	2,07
<i>narY</i>	b1467	nitrate reductase 2 (NRZ), beta subunit	5,24	5,70	4,57
<i>osmB</i>	b1283	lipoprotein	3,34	2,36	2,34
<i>osmC</i>	b1482	osmotically inducible, stress-inducible membrane protein	4,93	6,19	3,51
<i>osmY</i>	b4376	periplasmic protein	50,66	68,76	19,08
<i>otsA</i>	b1896	trehalose-6-phosphate synthase	10,27	52,44	13,79
<i>otsB</i>	b1897	trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic	5,56	38,22	9,09
<i>pdhR</i>	b0113	DNA-binding transcriptional dual regulator	5,01	3,42	2,86
<i>phnB</i>	b4107	conserved protein	4,81	5,37	3,38
<i>potF</i>	b0854	putrescine transporter subunit -/- periplasmic-binding component of ABC superfamily	2,76	4,25	2,24
<i>poxB</i>	b0871	pyruvate dehydrogenase (pyruvate oxidase), thiamin-dependent, FAD-binding	17,67	45,89	29,60
<i>psiF</i>	b0384	conserved protein	9,48	10,53	7,42
<i>qor</i>	b4051	quinone oxidoreductase, NADPH-dependent, Zn binding	2,39	2,73	2,64
<i>rssA</i>	b1234	conserved protein	2,50	3,19	2,26
<i>rssB</i>	b1235	response regulator of $\sigma^S$	4,68	7,19	4,08
<i>sra</i>	b1480	30S ribosomal subunit protein S22	5,20	6,07	4,60
<i>stfQ</i>	b1547	Qin prophage; predicted side tail fibre assembly protein	2,25	4,71	2,35
<i>talA</i>	b2464	transaldolase A	6,79	13,08	13,83
<i>tam</i>	b1519	trans-aconitate methyltransferase	2,76	8,68	3,53
<i>tktB</i>	b2465	transketolase 2, thiamin-binding	14,08	35,87	10,76
<i>treA</i>	b1197	periplasmic trehalase	7,98	12,71	2,50
<i>treF</i>	b3519	cytoplasmic trehalase	2,07	9,25	5,20
<i>ugpB</i>	b3453	glycerol-3-phosphate transporter subunit -/- periplasmic-binding component of ABC superfamily	3,29	5,55	3,29
<i>ugpC</i>	b3450	glycerol-3-phosphate transporter subunit -/- ATP-binding component of ABC superfamily	2,39	2,50	2,44
<i>ugpQ</i>	b3449	glycerophosphodiester phosphodiesterase, cytosolic	2,30	3,69	2,01
<i>wrbA</i>	b1004	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	9,38	6,83	14,77
<i>yaiA</i>	b0389	predicted protein	3,92	4,72	2,41

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $rpoS^+/rpoS^-$ )			
		OD 4	NaCl	pH 5	
<i>yajO</i>	b0419	predicted oxidoreductase, NAD(P)-binding	2,21	6,76	3,42
<i>ybaS</i>	b0485	predicted glutaminase	14,05	9,46	2,70
<i>ybaY</i>	b0453	predicted outer membrane lipoprotein	6,15	8,67	6,09
<i>ybdK</i>	b0581	gamma-glutamyl:cysteine ligase	8,78	14,70	12,71
<i>ybeL</i>	b0643	conserved protein	2,42	9,80	4,27
<i>ybgA</i>	b0707	conserved protein	6,53	16,97	13,24
<i>ybgS</i>	b0753	conserved protein	8,43	38,08	16,12
<i>ybhE</i>	b0767	6-phosphogluconolactonase	2,66	5,57	2,38
<i>ybiO</i>	b0808	predicted mechanosensitive channel	8,49	4,51	2,02
<i>ybiP</i>	b0815	predicted hydrolase, inner membrane	7,73	5,89	2,43
<i>ybjP</i>	b0865	predicted lipoprotein	3,66	6,53	6,24
<i>ycaC</i>	b0897	predicted hydrolase	13,34	5,92	5,88
<i>yccJ</i>	b1003	predicted protein	10,42	17,09	16,33
<i>yceK</i>	b1050	predicted lipoprotein	14,93	14,50	10,14
<i>ycgB</i>	b1188	conserved protein	10,36	35,43	11,19
<i>ycgZ</i>	b1164	predicted protein	5,11	5,53	4,00
<i>yciF</i>	b1258	conserved protein	2,98	20,43	2,04
<i>yciG</i>	b1259	predicted protein	18,16	84,92	19,19
<i>yciR</i>	b1285	modulator of RNase II stability with EAL, GGDEF, PAS domains	6,78	3,83	6,94
<i>ydaM</i>	b1341	predicted diguanylate cyclase, GGDEF domain signalling protein	6,74	9,54	3,15
<i>ydcS</i>	b1440	predicted spermidine/putrescine transporter subunit -/- periplasmic-binding component of ABC superfamily	21,66	4,83	4,36
<i>ydgA</i>	b1614	conserved protein	2,99	5,89	2,63
<i>ydHJ</i>	b1644	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	2,21	4,29	2,22
<i>yeaG</i>	b1783	conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	19,44	26,61	21,48
<i>yeaH</i>	b1784	conserved protein	11,89	14,66	14,73
<i>yeaY</i>	b1806	predicted lipoprotein	2,43	3,21	4,06
<i>yebF</i>	b1847	predicted protein	4,04	2,79	2,17
<i>yebS</i>	b1833	conserved inner membrane protein	2,08	2,50	2,48
<i>yeeP</i>	b1999	CP4-44 prophage; predicted GTP-binding protein (pseudogene)	2,80	4,87	3,08
<i>yegP</i>	b2080	predicted protein	17,85	17,67	7,86
<i>yegS</i>	b2086	conserved protein	8,87	6,52	13,93
<i>yfcF</i>	b2301	glutathione S-transferase	2,55	2,44	2,40
<i>yfiL</i>	b2602	predicted protein	3,22	3,63	3,75
<i>ygaF</i>	b2660	predicted enzyme	5,28	6,57	5,18

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>rpoS</i> <sup>+</sup> / <i>rpoS</i> )		
		OD 4	NaCl	pH 5
<i>ygaM</i>	b2672 predicted protein	9,39	14,13	13,02
<i>ygaT</i>	b2659 predicted protein	6,90	7,82	3,68
<i>ygaU</i>	b2665 predicted protein	7,54	11,75	8,51
<i>ygbA</i>	b2732 predicted protein	2,67	2,80	2,08
<i>ygfS</i>	b2886 predicted oxidoreductase, 4Fe-4S ferredoxin-type subunit	3,06	5,92	3,66
<i>yggE</i>	b2922 conserved protein	3,35	2,57	2,52
<i>yghA</i>	b3003 predicted glutathionylspermidine synthase, with NAD(P)-binding domain	4,55	26,14	6,54
<i>ygiW</i>	b3024 conserved protein	2,86	2,67	2,16
<i>ygiG</i>	b3073 putrescine:2-oxoglutaric acid aminotransferase, PLP-dependent	8,93	16,90	7,45
<i>yhbO</i>	b3153 predicted intracellular protease	4,94	23,00	12,10
<i>yhfG</i>	b3362 predicted protein	6,03	8,40	5,95
<i>yhfW</i>	b3380 predicted mutase	4,00	6,67	4,46
<i>yhhA</i>	b3448 conserved protein	4,05	8,31	3,28
<i>yhhT</i>	b3474 predicted inner membrane protein	2,30	3,89	2,92
<i>yhiO</i>	b3494 predicted universal stress (ethanol tolerance) protein B	4,52	5,91	3,61
<i>yhjD</i>	b3522 conserved inner membrane protein	4,11	5,93	7,24
<i>yhjG</i>	b3524 predicted outer membrane biogenesis protein	3,89	7,11	4,58
<i>yiaG</i>	b3555 predicted transcriptional regulator	8,40	9,20	4,08
<i>yjbJ</i>	b4045 predicted stress response protein	21,96	20,09	7,60
<i>yjcS</i>	b4083 predicted alkyl sulfatase	10,73	10,38	4,71
<i>yjdC</i>	b4135 predicted transcriptional regulator	2,49	2,34	2,46
<i>yjdI</i>	b4126 conserved protein	8,41	9,78	7,15
<i>yjdJ</i>	b4127 predicted acyltransferase with acyl-CoA N-acyltransferase domain	6,34	9,34	6,96
<i>yjeB</i>	b4178 DNA-binding transcriptional repressor	2,22	2,49	2,08
<i>yjgB</i>	b4269 predicted alcohol dehydrogenase, Zn-dependent and NAD(P)-binding	6,98	10,80	7,40
<i>yjgG</i>	b4247 Unknown CDS	3,62	3,87	2,22
<i>yjgH</i>	b4248 predicted mRNA endoribonuclease	6,04	4,70	3,06
<i>yjgR</i>	b4263 predicted ATPase	2,70	2,94	2,74
<i>yjhT</i>	b4310 conserved protein	3,05	7,04	3,05
<i>ymgA</i>	b1165 predicted protein	4,98	5,87	4,63
<i>yncB</i>	b1449 predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding	2,08	9,30	2,70
<i>yncG</i>	b1454 predicted enzyme	3,42	13,77	3,64
<i>ynhG</i>	b1678 conserved protein	5,46	8,64	6,71

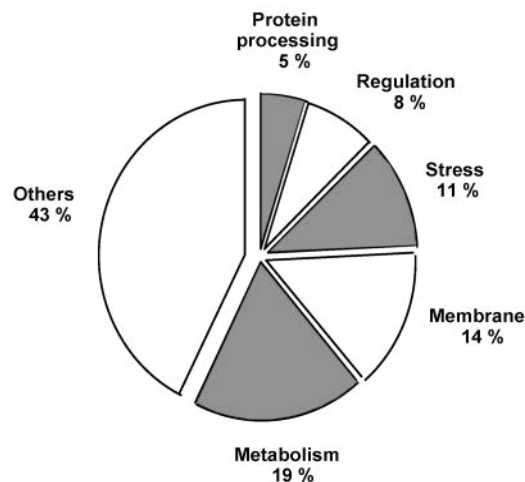


Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $rpoS^+/rpoS$ )			
		OD 4	NaCl	pH 5	
<i>ynjF</i>	b1758	predicted phosphatidyl transferase, inner membrane protein	2,95	2,87	2,69
<i>yodC</i>	b1957	predicted protein	5,46	3,02	2,15
<i>yodD</i>	b1953	predicted protein	8,49	18,20	15,16
<i>yohF</i>	b2137	predicted oxidoreductase with NAD(P)-binding domain	3,97	11,26	5,21
<i>yphA</i>	b2543	predicted inner membrane protein	2,35	3,38	2,53
<i>yqaE</i>	b2666	predicted membrane protein	2,42	4,78	3,16
<i>yqjC</i>	b3097	conserved protein	6,77	14,06	5,17
<i>yqjD</i>	b3098	conserved protein	4,88	4,75	4,59
<i>yqjE</i>	b3099	conserved inner membrane protein	5,26	5,36	4,65
<i>yqjG</i>	b3102	predicted S-transferase	4,77	9,03	5,65
<i>yqjK</i>	b3100	conserved protein	3,43	5,60	3,80
<i>ysgA</i>	b3830	predicted hydrolase	2,69	2,27	3,68

Ratio: relative mRNA Level  $rpoS^+/rpoS$ ; OD4: Übergang in die stationäre Phase in LB Medium; NaCl: hyperosmotischer Streß in Minimalmedium; pH5: Säurestreß in LB Medium. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus drei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar.

### 3.1.4 Funktionelle Charakterisierung der $\sigma^S$ -abhängigen Gene

Die Kerngene der generellen Streßantwort wurden in funktionelle Gruppen auf der Grundlage von GenProtEC (Serres et al., 2004) und MultiFun (Serres et al., 2000) eingeteilt (Abbildung 12). Demnach wirken  $\sigma^S$ -abhängige Gene direkt gegen Streßfaktoren (11%), haben eine regulatorische Funktion (8%) und sind an verschiedenen Stoffwechselreaktionen (19%) und an Membranprozessen (14%) beteiligt. Ein großer Teil (43%) der  $\sigma^S$ -abhängigen Gene ist nur einer putativen oder gar keiner Funktion zugeordnet. Offensichtlich gibt es für  $\sigma^S$ -abhängige Gene ein weites Spektrum an Funktionen, die bisher nicht im Kontext von 'Streßantwort' betrachtet wurden. Ein Beispiel dafür sind die relativ vielen Gene des zentralen Energiestoffwechsel (siehe den folgenden Abschnitt), die membranständigen Faktoren welche z.T. alternative Nährstoffe in die Zelle schaffen, sowie die vielen Gene mit unbekannter Funktion und sehr starker  $\sigma^S$ -Abhängigkeit. Der signifikante Anteil von  $\sigma^S$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren, deutet auf eine komplexe Regulation innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes hin, die weiterer Untersuchungen bedarf. Zum ersten mal wurde auch gezeigt, daß GGDEF/EAL Gene, hier *ydaM* und *yciR*, Teil des  $\sigma^S$ -Netzwerkes sind und damit das bakterielle Signalmolekül c-di-GMP auch eine Funktion im Rahmen der generellen Streßantwort übernimmt.



**Abbildung 12:** Funktionelle Verteilung der 140 Kerngene. Die Einteilung in die verschiedenen Kategorien erfolgte nach einem vereinfachten Schema von (Serres et al., 2000; Serres et al., 2004).

### 3.1.5 $\sigma^S$ kontrolliert Gene des zentralen Energiestoffwechsels

Verschiedene Gene des zentralen Energiestoffwechsels zeigten  $\sigma^S$ -Abhängigkeit unter mindestens einer Wachstumsbedingung (Tabelle 2). In einzelnen Fällen werden alternative Stoffwechselwege entsprechend von  $\sigma^S$  antagonistisch beeinflusst. So stehen sowohl *poxB* (Pyruvatoxidase) und *pdhR* (Repressor der Expression der Pyruvatdehydrogenase) unter positiver  $\sigma^S$ -Kontrolle. Während *frdA* (Fumaratreduktase) unter positiver Kontrolle von  $\sigma^S$  steht, werden *sdhCDAB* (Succinatdehydrogenase) negativ kontrolliert. Auch die Isoenzyme des Pentosephosphatzyklus *tktA* und *tktB*, beides Transketolasen, werden von  $\sigma^S$  gegenläufig reguliert. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß  $\sigma^S$  die Zelle auf eine Umstellung vom aeroben Stoffwechsel zum anaeroben/fermentativen Stoffwechsel vorbereitet. Der Einfluß von  $\sigma^S$  auf Vorgänge im zentralen Energiestoffwechsel ist ein Aspekt der generellen Stressantwort, der bisher unterschätzt wurde.

**Tabelle 2:**  $\sigma^S$ -abhängige Kerngene mit Funktionen im zentralen Energiestoffwechsel.

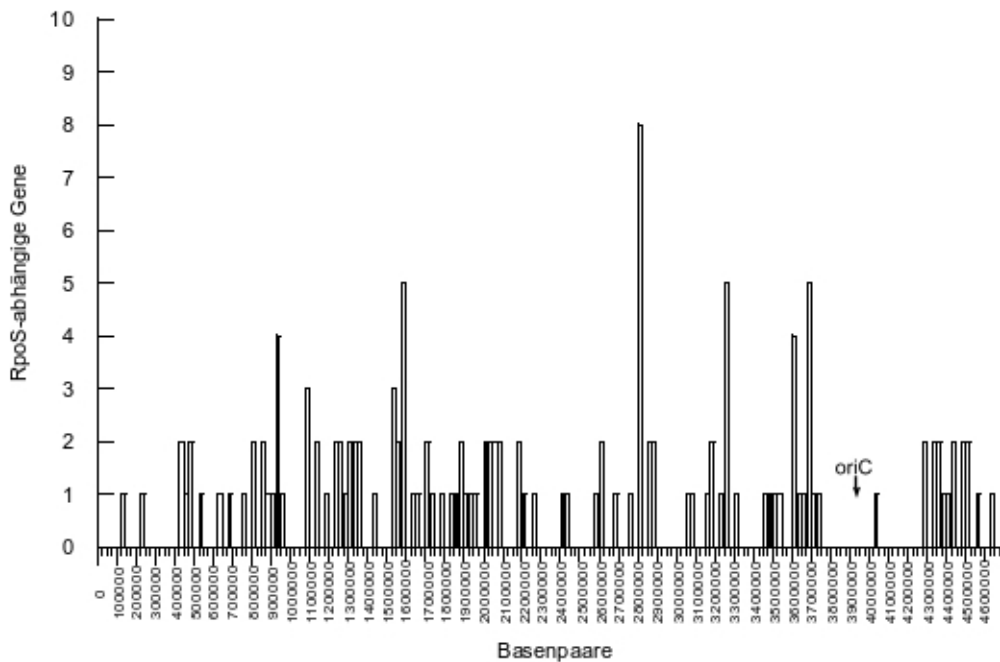
Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>rpoS</i> <sup>+</sup> / <i>rpoS</i> )			
		OD 4	NaCl	pH 5	
1. Glykolyse					
<i>pfkB</i>	b1723	6-phosphofruktokinase II	2,07	2,49	1,71
<i>fbaB</i>	b2097	fructose-bisphosphate aldolase class I	8,00	9,61	9,33
<i>gapC_2</i>	b1416	split gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C	0,78	2,17	1,46
<i>gapC_1</i>	b1417	split gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C	1,51	2,45	1,82
<i>pykA</i>	b1854	pyruvate kinase II, glucose-stimulated	0,89	2,56	0,83
<i>pdhR</i>	b0113	transcriptional repressor for pyruvate dehydrogenase complex	5,01	3,42	2,86

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $rpoS^+/rpoS$ )		
		OD 4	NaCl	pH 5
<i>poxB</i> b0871	pyruvate dehydrogenase/oxidase: FAD- and thiamin PPI-binding	17,67	45,89	29,60
2. Fermentation				
<i>fhlA</i> b2731	transcriptional activator for induction of formate hydrogen-lyase	2,75	4,54	1,85
<i>hycI</i> b2717	protease involved in processing C-terminal end of HycE	4,00	4,16	2,79
<i>hycF</i> b2720	hydrogenase 3, putative quinone oxidoreductase, Fe-S related	10,67	24,06	9,11
<i>adhP</i> b1478	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	5,38	9,19	3,43
3. Anaerobe Atmung/Elektronentransfer				
<i>narI</i> b1227	nitrate reductase 1, cytochrome b(NR), gamma subunit	2,72	2,23	1,32
<i>narY</i> b1467	nitrate reductase 2, beta subunit	5,24	5,70	4,57
<i>narU</i> b1469	nitrate extrusion protein	2,75	3,62	2,07
<i>frdA</i> b4154	fumarate reductase, anaerobic, catalytic and NAD/flavoprotein subunit	1,03	3,00	1,15
<i>sdhC</i> b0721	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit, cytochrome b556 with SdhD	0,62	0,46	0,45
<i>sdhD</i> b0722	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit, cytochrome b556 with SdhC	0,57	0,77	0,42
<i>sdhA</i> b0723	succinate dehydrogenase, catalytic and NAD/flavoprotein subunit	0,61	0,59	0,45
<i>sdhB</i> b0724	succinate dehydrogenase, Fe-S protein	0,65	0,64	0,49
<i>appC</i> b0978	cytochrome oxidase bd-II, subunit I	3,29	1,69	0,89
<i>cybC</i> b4236	cytochrome b(562)	1,76	2,03	1,21
<i>napH</i> b2204	ferredoxin-type protein, electron transfer	0,94	2,07	0,83
<i>menD</i> b2264	bifunctional: 2-oxoglutarate decarboxylase; SHCHC synthase	1,38	2,29	1,69
<i>qor</i> b4051	quinone oxidoreductase, NADPH-dependent	2,39	2,73	2,64
4. Pentosephosphat-Zyklus				
<i>talA</i> b2464	transaldolase A	6,79	13,08	13,83
<i>tktB</i> b2465	transketolase 2	14,08	35,87	10,76
<i>tktA</i> b2935	transketolase 1	0,55	0,35	0,49

Ratio: relative mRNA Level  $rpoS^+/rpoS$ ; OD4: Übergang in die stationäre Phase in LB Medium; NaCl: hyperosmotischer Streß in Minimalmedium; pH5: Säurestreß in LB Medium. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus drei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar.

### 3.1.6 $\sigma^S$ -abhängige Gene sind über das gesamte Genom verteilt

Von den 140 Kerngenen der generellen Streßantwort wurden die Koordinaten auf dem *E. coli* Chromosom aus der Genbank-Datei NC\_00913.ppt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) extrahiert und das Genom in Segmente zu 25000 Basenpaaren unterteilt. Durch Auftragung der Anzahl  $\sigma^S$ -abhängiger Gene in den Segmenten ergab sich ein Bild der Verteilung  $\sigma^S$ -abhängiger Gene über das Chromosom (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Verteilung der 140 Kerngene auf dem Chromosom von *E. coli*. Das Chromosom wurde in Segmente zu 25000 Basenpaaren eingeteilt und der Replikationsstartpunkt *oriC* markiert. Die Anzahl der  $\sigma^S$ -abhängigen Gene in den Segmenten wird durch Balken angezeigt.

Demnach sind  $\sigma^S$ -abhängige Gene über das gesamte Genom verteilt und nicht auf bestimmte Regionen beschränkt. Daraus läßt sich ableiten, daß die Gene des  $\sigma^S$ -Regulons keine Einheit auf einer genomischen Insel (GEI [Hacker et al., 2004]) bilden, die als ganzes durch horizontalen Gentransfer zwischen Stämmen und Species übertragen werden kann. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, daß  $\sigma^S$  z.B in *P. aeruginosa* ganz andere Gene als in *E. coli* reguliert (Schuster et al., 2004). In einigen Bereichen des Genoms ist dennoch eine Häufung von  $\sigma^S$ -abhängigen Genen zu beobachten. Bei ca. 79,3 Minuten des *E. coli* Chromosoms befindet sich ein Cluster der ca. 91 kb und 29  $\sigma^S$ -abhängige Gene umfaßt, von denen einige eine besondere Rolle bei der Säureresistenz haben (siehe hierzu Kapitel 1.4) und alle auf einer sogenannten 'fitness island for acid adaptation' (Hommais et al., 2004) lokalisiert sind. Ein weiterer Cluster von ca. 13 kb bei etwa 60,2 Minuten umfaßt das *csiD-ygaF-gabDTP* Operon (Metzner et al., 2004) sowie die Gene *ygaU*, *yqaE*, *yqaM* und *nrdE*. Weitere solcher Regionen beinhalten *dps* und *poxB* (unter 27  $\sigma^S$ -abhängigen Genen in einem Bereich von ca. 89 kb bei etwa 18,9 Minuten) oder *sodC*, *cfa*, *ihfA* und *katE* (unter 34  $\sigma^S$ -

abhängigen Genen in einem Bereich von ca. 12 kb bei etwa 38,4 Minuten). In einer Region von ca. 540 kb und annähernd symmetrisch um den Replikationsstartpunkt *oriC* herum befindet sich eine Zone die, mit der Ausnahme von *ysgG*, keine  $\sigma^S$ -abhängigen Gene aufweist.

### 3.1.7 Das -10 Erkennungsmotiv von $\sigma^S$ ist in den Promotorregionen der 140 Kerngene konserviert

Auf der Suche nach konservierten Sequenzmotiven wurden von den 140 Kerngenen jeweils die 200 Nukleotide stromaufwärts vom Startcodon gelegene Sequenz extrahiert und dann alle Sequenzen mit den Programmen MEME und Bioprosector (siehe Material und Methoden) untersucht. Diese Programme finden konservierte Sequenzmotive in Sätzen von nicht-alignierten Sequenzen. Beide Algorithmen fanden 'TCTATACTTAA' als konserviertes DNA-Sequenzmotiv (Abbildung 14). Dieses Sequenzmotiv stellt eine erweiterte Version der -10 Binderegion für  $\sigma^S$  dar, wie sie bereits vorher theoretisch vorhergesagt und experimentell bestätigt wurde (Espinosa-Urgel et al., 1996a; Becker et al., 2001; Lee et al., 2001). Für die Gene *dps*, *poxB*, *osmC* und *otsB* existierten bereits publizierte Daten zu deren experimentell ermittelten Promotoren (für eine Zusammenstellung experimentell verifizierter  $\sigma^S$ -abhängiger Promotoren siehe z.B. Espinosa-Urgel et al., 1996a und Becker et al., 2001). Die genauen Positionen der von MEME und BioProspector für diese Gene gefundenen Motive stimmten exakt mit den publizierten Daten überein, was die Plausibilität dieser Ergebnisse zusätzlich unterstreicht.

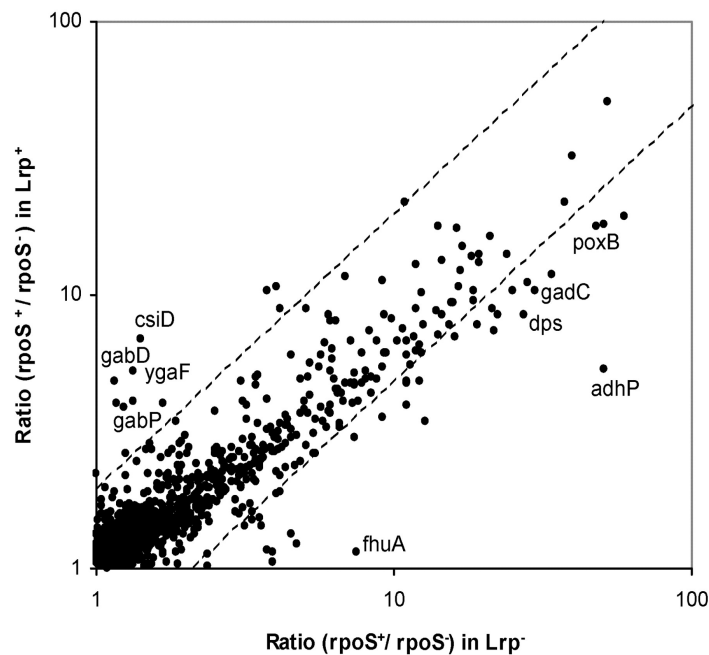
Blk1	A	C	G	T	Con	Deg
1	0.17	0.08	<b>0.34</b>	<b>0.41</b>	T	K
2	0.00	<b>1.00</b>	0.00	0.00	C	C
3	0.00	0.05	0.00	<b>0.95</b>	T	T
4	<b>1.00</b>	0.00	0.00	0.00	A	A
5	0.09	<b>0.44</b>	0.00	<b>0.47</b>	T	Y
6	<b>0.59</b>	0.06	<b>0.34</b>	0.00	A	R
7	0.06	<b>0.73</b>	0.17	0.03	C	C
8	0.00	0.00	0.00	<b>1.00</b>	T	T
9	0.09	0.06	0.03	<b>0.81</b>	T	T
10	<b>0.64</b>	0.00	0.17	0.19	A	A
11	<b>0.50</b>	0.20	0.09	0.20	A	A



**Abbildung 14:** Ein konserviertes Sequenzmotiv in der 200 Basenpaare stromaufwärts (relativ zum Startcodon) gelegenen Region der Kerngene entspricht der -10 Region von  $\sigma^S$ -abhängigen Promotoren. Die relativen Häufigkeiten der Nukleotide, wie von Bioprosector gefunden, sind in der Tabelle angegeben. Sowohl die Konsensussequenz (Con) als auch der degenerierte Konsensus (Deg), welcher zusätzlich das zweithäufigste Nukleotid berücksichtigt, sind angezeigt. Die Konsensussequenz ist auch als Sequenzlogo (Vacic et al., 2006) dargestellt.

### 3.1.8 Das Histon-ähnliche Protein Lrp moduliert das $\sigma^S$ -Regulon

Lrp ist ein Faktor, der die Selektivität eines Promotors für  $\sigma^{70}$  oder  $\sigma^S$  beeinflussen kann. Dies wurde für *osmY* (Colland et al., 2000), *osmC* (Bouvier et al., 1998) und *aidB* (Landini et al., 1996) gezeigt. Um zu prüfen, ob Lrp globale Effekte auf die Sigma-Selektivität von  $\sigma^S$ -abhängigen Promotoren hat, wurden die relativen Expressionslevel von Wildtyp und *rpoS* Mutante noch einmal bestimmt, aber diesmal im Lrp-negativen Hintergrund, d.h. MC4100 *lrp*<sup>-</sup> versus MC4100 *lrp*<sup>-</sup> *rpoS*<sup>-</sup>. Die Experimente wurden wieder beim Übergang in die stationäre Phase durchgeführt (LB, OD 4,0), denn viele  $\sigma^S$ -abhängige Gene sind unter diesen Bedingungen durch Lrp reprimiert (Tani et al., 2002). Es konnten noch viele weitere Gene gefunden werden, deren  $\sigma^S$ -Abhängigkeit durch Lrp moduliert wird (Abbildung 15, Tabelle 3). So verlieren z.B. die Gene des *csiD-ygaF-gabDTP* Operons in Abwesenheit von Lrp fast vollständig ihre  $\sigma^S$ -Abhängigkeit. Dies stimmt mit vorherigen Untersuchungen zur Rolle von Lrp bei der Kontrolle des *csiD*-Promotors überein (Marschall et al., 1998; Germer et al., 2001). Andere Gene zeigen deutlich erhöhte  $\sigma^S$ -Abhängigkeit in der *lrp* Mutante, wie z.B. *dps*, *poxB* und andere, welche schon zuvor als Lrp-reprimiert in der stationären Phase beschrieben wurden (Tani et al., 2002). Insgesamt sind also deutlich mehr Gene durch  $\sigma^S$  und Lrp koreguliert, als bisher beschrieben.



**Abbildung 15:** Gene mit veränderter  $\sigma^S$ -Abhängigkeit in Abhängigkeit vom globalen Regulator Lrp. Die relativen Expressionslevel (Microarrayanalyse) *rpoS*<sup>+</sup> versus *rpoS*<sup>-</sup> aus Experimenten im Wildtyp und in der *lrp* Mutante sind im Scatterplot gegeneinander aufgetragen. Gene mit mindestens zweifacher Abweichung in der  $\sigma^S$ -Abhängigkeit befinden sich außerhalb der diagonalen Linien.

**Tabelle 3:** Gene mit veränderter  $\sigma^S$ -Abhängigkeit in der *lrp* Mutante.

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>rpoS</i> <sup>+</sup> / <i>rpoS</i> )			
		<i>lrp</i> <sup>-</sup>	<i>lrp</i> <sup>+</sup>	<i>lrp</i> <sup>-</sup> / <i>lrp</i> <sup>+</sup>	
1. Erhöhte $\sigma^S$ -Abhängigkeit in <i>lrp</i> <sup>-</sup>					
<i>adhP</i>	b1478	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	50,69	5,38	9,42
<i>yncG</i>	b1454	putative glutathione S-transferase with thioredoxin-like and glutathione S-transferases, C-terminal domain	12,85	3,42	3,76
<i>yodD</i>	b1953	unknown CDS	27,37	8,49	3,22
<i>yeaG</i>	b1783	conserved protein, nucleotide triphosphate hydrolase domain	59,38	19,44	3,06
<i>ycdF</i>	b1005	unknown CDS	21,89	7,40	2,96
<i>gadC</i>	b1492	putative glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter (APC family)	29,72	10,28	2,89
<i>yeaH</i>	b1784	conserved hypothetical protein	34,10	11,89	2,87
<i>yciG</i>	b1259	conserved hypothetical protein	50,85	18,16	2,80
<i>yohF</i>	b2137	putative oxidoreductase with NAD(P)-binding domains	11,11	3,97	2,80
<i>poxB</i>	b0871	pyruvate dehydrogenase/oxidase: FAD- and thiamin PPi-binding	48,05	17,67	2,72
<i>ybgS</i>	b0753	conserved protein	22,26	8,43	2,64
<i>nrdE</i>	b2675	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, alpha subunit	9,16	3,56	2,57
<i>cfa</i>	b1661	cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase (unsaturated-phospholipid methyltransferase)	12,29	4,84	2,54
<i>katE</i>	b1732	catalase; hydroperoxidase HPiI (III), $\sigma^S$ -dependent	28,14	11,14	2,53
<i>ydcT</i>	b1441	putative sperimidine/putrescine transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	19,22	7,71	2,49
<i>yojI</i>	b2211	putative transport proteins (ABC superfamily, membrane (N-terminal), atp_bind (C-terminal))	7,43	3,02	2,47
<i>otsA</i>	b1896	trehalose-6-phosphate synthase	25,17	10,27	2,45
<i>dps</i>	b0812	stress response DNA-binding protein with ferritin-like domain	21,58	8,92	2,42
<i>sufS</i>	b1680	selenocysteine lyase, PLP-dependent	11,04	4,76	2,32
<i>yjgB</i>	b4269	putative alcohol dehydrogenase with NAD(P)-binding and GroES domains	16,11	6,98	2,31
<i>phnB</i>	b4107	conserved protein with glyoxalase and dihydroxybiphenyl dioxygenase domain	11,06	4,81	2,30
<i>ynfD</i>	b1586	conserved hypothetical protein	5,42	2,62	2,07
<i>yphG</i>	b2549	putative transposase with tetratricopeptide repeats (TPR) domain	5,46	2,64	2,07
<i>otsB</i>	b1897	trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic	11,32	5,56	2,04
<i>gadW</i>	b3515	DNA-binding transcriptional activator	12,39	6,12	2,03

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $rpoS^+/rpoS^-$ )			
		$lrp^-$	$lrp^+$	$lrp^-/lrp^+$	
<i>yhjY</i>	b3548 putative lipase	6,57	3,27	2,01	
<i>mlrA</i>	b2127 transcriptional regulator of curli and extracellular matrix synthesis (MerR family)	14,18	7,08	2,01	
<i>yeaY</i>	b1806 putative membrane protein	4,87	2,43	2,01	
2. Verminderte $\sigma^S$ -Abhängigkeit in $lrp^-$					
<i>csiD</i>	b2659 conserved protein with clavamate synthase-like domain	1,41	6,90	0,20	
<i>gabD</i>	b2661 succinate-semialdehyde dehydrogenase I, NADP-dependent	1,16	4,81	0,24	
<i>ygaF</i>	b2660 putative enzyme	1,34	5,28	0,25	
<i>gabT</i>	b2662 4-aminobutyrate aminotransferase, PLP-dependent	0,60	2,09	0,29	
<i>hycI</i>	b2717 protease involved in processing C-terminal end of HycE	1,18	4,00	0,29	
<i>yghF</i>	b2970 putative protein exporter (General Secretory Pathway)	1,23	3,89	0,32	
<i>gabP</i>	b2663 gamma-aminobutyrate transport protein, $\sigma^S$ -dependent (APC family)	1,33	4,06	0,33	
<i>yjcS</i>	b4083 putative coenzyme with 2 metallo-hydrolase/oxidoreductase domains	4,04	10,73	0,38	
<i>yebF</i>	b1847 conserved hypothetical protein	1,67	4,04	0,42	
<i>yahG</i>	b0321 conserved protein	1,01	2,20	0,46	
<i>ygiG</i>	b3073 putrescine:2-oxoglutaric acid aminotransferase, PLP-dependent	4,16	8,93	0,47	
<i>dppB</i>	b3543 dipeptide transport protein 1 (ABC superfamily, membrane)	1,26	2,62	0,48	
<i>yjbJ</i>	b4045 unknown CDS with YmbJ domain	10,87	21,96	0,49	

Ratio: relative mRNA Level  $rpoS^+/rpoS^-$  gemessen bei OD4 in LB Medium. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus drei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar. Die  $\sigma^S$ -Abhängigkeiten (als Ratios) im Wildtyp ( $lrp^+$ ) und der  $lrp$  Mutante ( $lrp^-$ ) sowie deren relativen Unterschiede ( $lrp^-/lrp^+$ ) sind angegeben.



## 3.2 Die Rolle von cyclischem di-GMP im $\sigma^S$ -Netzwerk

### 3.2.1 $\sigma^S$ kontrolliert die Expression von GGDEF/EAL-Genen

C-di-GMP ist ein bakterielles Signalmolekül welches von Diguanylatcyclasen synthetisiert und von Phosphodiesterasen degradiert wird. Diguanylatcyclasen sind durch eine GGDEF- und Phosphodiesterasen durch eine EAL-Domäne charakterisiert. Die Ergebnisse der globalen Transkriptionsanalyse zum  $\sigma^S$ -Regulon zeigten, daß mehrere GGDEF/EAL-Gene unter der Kontrolle von  $\sigma^S$  stehen. Von den insgesamt 28 GGDEF/EAL Proteine codierenden Genen in *E. coli* MC4100 sind sieben  $\sigma^S$ -abhängig unter mindestens einer Bedingung (Tabelle 4). Für *ydaM*, *yciR*, *yddV* und *yedQ* konnte die  $\sigma^S$ -Abhängigkeit durch Analyse von entsprechenden *lacZ*-Reporterfusionen verifiziert werden (Diplomarbeit von Christina Pesavento). Mit diesem Ergebnis erscheinen GGDEF/EAL-Gene und c-di-GMP zum ersten mal im Kontext der generellen Streßantwort.

**Tabelle 4:**  $\sigma^S$ -abhängige GGDEF/EAL-Gene.

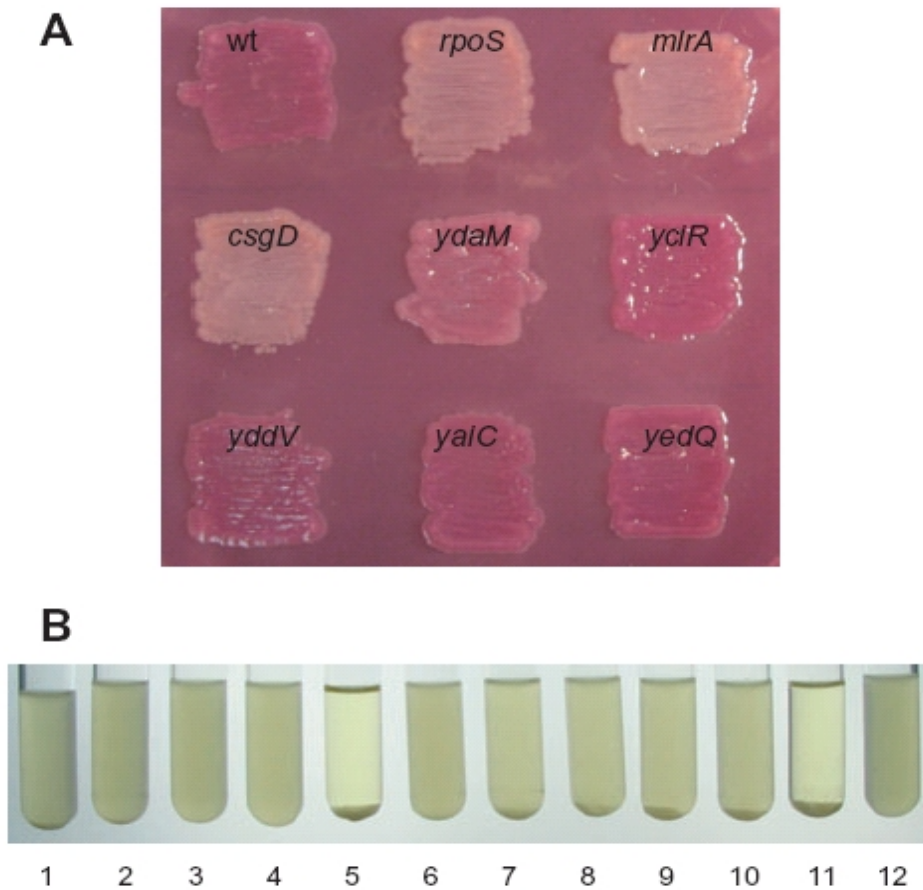
Genname	b-Nummer	GGDEF	EAL	Ratio ( <i>rpoS</i> <sup>+</sup> vs. <i>rpoS</i> <sup>-</sup> )		
				OD 4	NaCl	pH 5
<i>ycgG</i>	b1168		x	1,36	2,46	1,55
<i>yciR</i>	b1285	x	x	6,78	3,83	6,94
<i>ydaM</i>	b1341	x		6,74	9,54	3,15
<i>yddV</i>	b1490	x		2,01	3,33	1,39
<i>ydiV</i>	b1707		x	n.d.	1,04	3,47
<i>yeaI</i>	b1785	x		1,23	2,80	1,17
<i>yedQ</i>	b1956	x		2,42	3,64	1,88

Ratio: relative mRNA Level *rpoS*<sup>+</sup>/*rpoS*<sup>-</sup>; OD4: Übergang in die stationäre Phase in LB Medium; NaCl: hyperosmotischer Streß in Minimalmedium; pH5: Säurestreß in LB Medium. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus drei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar. Für *ydiV* war bei OD 4 kein Signal detektierbar (n.d.), d.h. unter diesen Bedingungen wird das Gen nicht exprimiert.

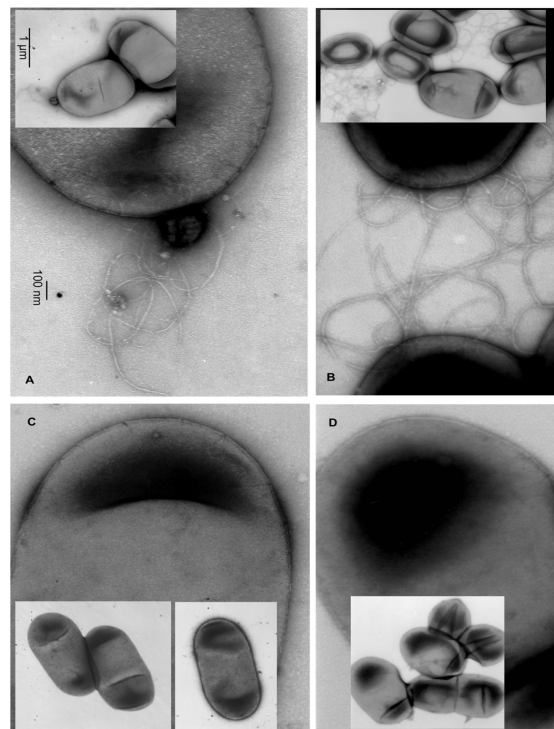
### 3.2.2 *YdaM* und *YciR* kontrollieren die Expression von Curli

Die GGDEF/EAL-Gene *ydaM* und *yciR* gehören zu den Kerngenen der generellen Streßantwort und zeigten darüber hinaus intermediäre bis hohe relative Expressionslevel bei OD 4,0 in LB Medium (Tabelle 4). Insbesondere diese beiden Gene wurden deshalb genauer untersucht, um ihre Funktion im  $\sigma^S$ -Netzwerk zu bestimmen. Aus der Literatur war bekannt, daß GGDEF- und EAL-Gene mit der Bildung von Biofilmen und extrazellulärer Matrix assoziiert sind (Jenal et al., 2006). Regulation der Cellulosesynthase in *G. xylinus* (Ross et al., 1989) war der erste publizierte Phänotyp von c-di-GMP überhaupt und auch in der zu *E. coli*

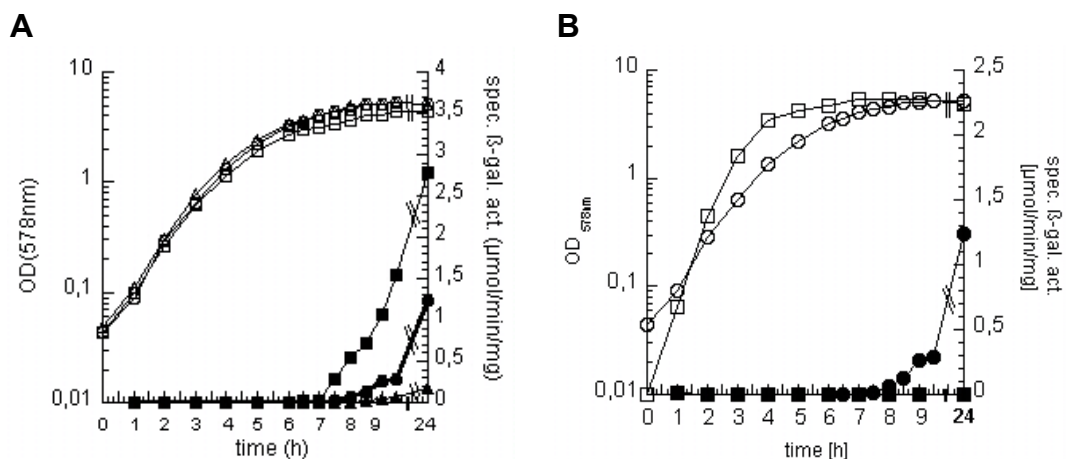
nah verwandten Species *S. typhimurium* kontrolliert ein GGDEF-Gen die Cellulosesynthese (Zogaj et al., 2001). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte *E. coli* Stamm MC4100 produziert keine Cellulose (Zogaj et al., 2001), und damit entfiel die Cellulosesynthese als möglicher Phänotyp für *ydaM* und *yciR*. Für *E. coli* war schon seit langem bekannt, daß Curli Fimbrien eine Biofilmkomponente sind und  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden (Olsen et al., 1993b). In *S. typhimurium* sind Curli (aggregative Fimbrien) an der Ausprägung der 'rdar' und 'bdar' Phänotypen beteiligt, die durch ihre Färbung und Kolonienmorphologie auf Kongorotplatten charakterisiert sind (Kongorotfärbung ist ein unspezifischer Nachweis für Curli und Cellulose). Erste Hinweise auf die Funktion von *ydaM* und *yciR* in *E. coli* konnten mittels phänotypischer Analysen erbracht werden (Abbildung 16; Die Abbildung zeigt kumulativ Ergebnisse von Harald Weber und Christina Pesavento. Die ursprünglichen Kongorot- bzw. Sedimentationsanalysen zu *ydaM*, *yciR*, *yddV*, *mlrA* und *flu* sind die Arbeit von Harald Weber). Auf Kongorotplatten deutete die schwächere Färbung der *ydaM* Mutante auf verminderte und die verstärkte Färbung der *yciR* Mutante auf erhöhte Curliexpression. Da Curli auch Autoaggregation vermitteln (Vidal et al., 1998), wurde auch das Sedimentationsverhalten von *ydaM/yciR* untersucht. Wenn Übernachtskulturen bei 28°C inkubiert wurden, dann zeigte der Wildtyp MC4100 geringe Sedimentation. Im Gegensatz dazu sedimentierte die *ydaM* Mutante gar nicht und die *yciR* Mutante fast vollständig, so daß der Überstand der Kultur annähernd klar war. Kongorot- und Sedimentationsassay lieferten damit einen deutlichen Hinweis, daß *ydaM* und *yciR* (aber nicht *yddV*, *yaiC* und *yedQ*) die Expression einer extrazellulären Matrixkomponente kontrollieren. Die Sedimentationsanalyse mit weiteren Mutantenstämme gab Hinweise darauf, daß es sich bei dieser Komponente um Curli handelt. *MlrA* ist ein essentieller Regulator der Curliexpression und die *mlrA yciR* Doppelmutante zeigte keine Sedimentation im Kontrast zur drastischen Sedimentation des *yciR* Einzelmutante. Auch *Ag43 (flu)* kann Autoaggregation vermitteln (Henderson et al., 1997), doch eine *flu yciR* Doppelmutante zeigte wesentlich stärkere Sedimentation als die *flu* Einzelmutante und damit ist der *yciR* Effekt unabhängig von *Ag43*. Mittels Elektronenmikroskopie wurden *ydaM/yciR* auf das Vorhandensein von extrazellulären filamentösen 2 nm-Strukturen untersucht, welche den von (Olsen et al., 1989) beschriebenen Curli entsprechen. Im Gegensatz zum Wildtypstamm zeigte die *ydaM* Mutante keine filamentösen Oberflächenstrukturen, wohingegen diese in der *yciR* Mutante verstärkt auftraten (Abbildung 17). Schließlich wurde die Expression der Curlistrurgene untersucht. Bei Wachstum bei 28° C in LB Medium war relativ zum Wildtyp die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *csgB::lacZ* Fusion in der *ydaM* Mutante deutlich vermindert und die der *yciR* Mutante stark erhöht. Wie erwartet, zeigte *csgB::lacZ* nur bei Wachstum bei 28° C aber nicht bei 37° C Aktivität (Abbildung 18; gemeinsames Experiment von Harald Weber und Christina Pesavento). Die Summe aller phänotypischen Analysen (Kongorotfärbung, Sedimentation, Elektronenmikroskopie, *lacZ*-Reporterfusionen) konnten klar zeigen, daß die  $\sigma^S$ -abhängigen GGDEF/EAL Gene *ydaM* und *yciR* die Expression von Curli in *E. coli* kontrollieren.



**Abbildung 16:** Phänotypische Analyse verschiedener  $\sigma^S$ -abhängiger GGDEF/EAL-Gene. (A) Der Wildtyp MC4100 (wt), Regulatormutanten (*rpoS*, *mlrA*, *csgD*) sowie Mutanten von  $\sigma^S$ -abhängigen GGDEF/EAL-Genen (*ydaM*, *yciR*, *yddV*, *yaiC*, *yedQ*) wurden auf Kongorotplatten ausgestrichen und bei 28° C übernacht bebrütet. (B) Sedimentationsassay vom Wildtyp, GGDEF/EAL Mutanten und verschiedenen Kontrollstämmen: 1, Wildtyp (MC4100); 2, *rpoS*; 3, *mlrA*; 4, *csgD*; 5, *yciR*; 6, *ydaM*; 7, *yddV*; 8, *yedQ*; 9, *yaiC*; 10, *flu*; 11, *flu yciR*; 12, *mlrA yciR*). Die Kulturen wurden übernacht in LB Medium bei 28° C im Roller inkubiert.



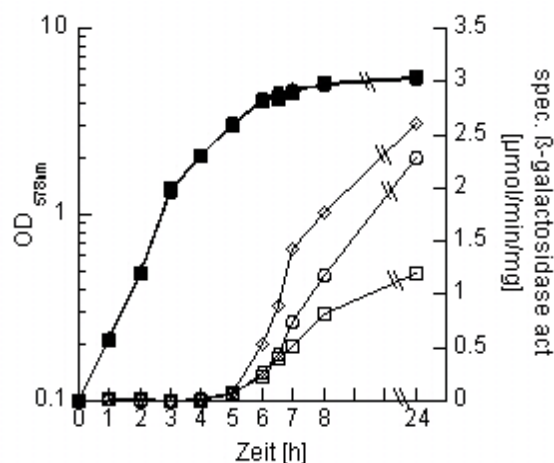
**Abbildung 17:** Elektronmikroskopische Aufnahmen von ganzen Zellen und Curli Fimbrien (vergrößerte Ausschnitte). Vom Wildtyp MC4100 (A) und den isogenen *ydaM* (B), *rpoS* (C), *yciR* (D) Mutanten wurden LB Kulturen bei 28° C bis  $OD_{578nm} = 4,0$  inkubiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie präpariert (Präparationen und Aufnahmen wurden von Gilbert Tischendorf angefertigt).



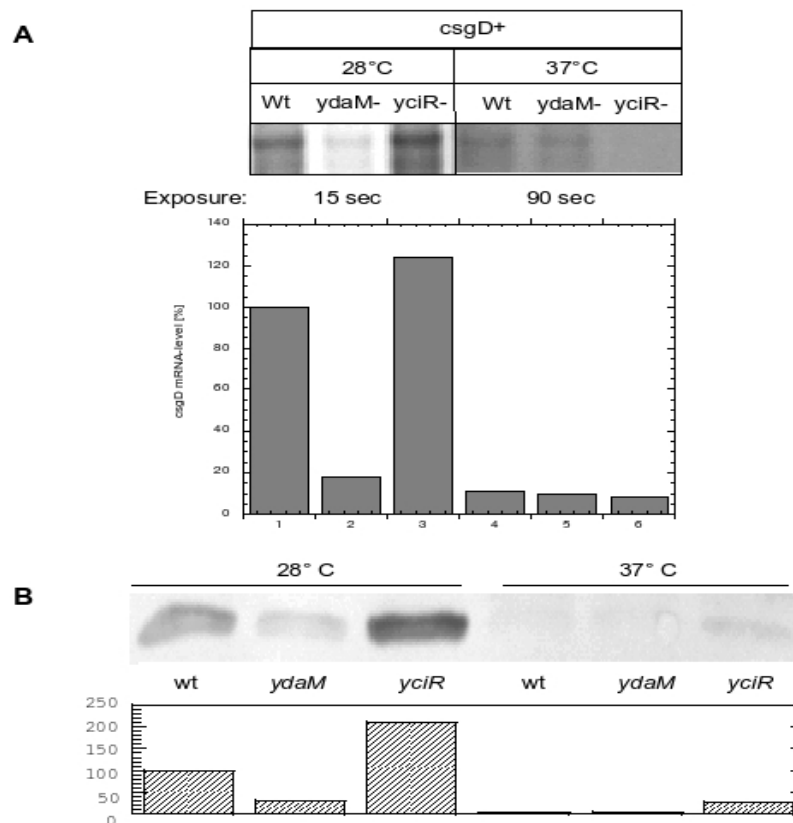
**Abbildung 18:** Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität der *csgB::lacZ* Fusion. (A) Wachstum (offene Symbole) und β-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) im Wildtyp MC4100 (Kreise), der *ydaM* (Dreiecke) und der *yciR* (Quadrate) Mutante bei Wachstum in LB bei 28° C. (B) Wachstum und β-Galaktosidase-Aktivität des Wildtyps bei 28° C (Kreise) und 37° C (Quadrate).

### 3.2.3 YdaM und YciR kontrollieren die Expression von CsgD, dem zentralen Regulator der Curlisynthese

Nachdem der Einfluß von YdaM und YciR auf die Curlisynthese nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, auf welcher Stufe der Regulationskaskade der Curliexpression diese beiden Faktoren wirken. Die Expression der Curli-Strukturgene im Operon *csgBAC* steht unter der direkten Kontrolle des Transkriptionsfaktors CsgD (Hammar et al., 1995). Die Expression von CsgD selbst wird durch viele verschiedene Regulatoren (OmpR, CpxR, IHF, H-NS, MlrA) beeinflusst, für die (mit Ausnahme von MlrA) Bindung in der stromaufwärts gelegenen Region des *csgD* Promotors gezeigt wurde (Gerstel et al., 2003b). Die Expression von *csgD* erschien damit ein plausibles Ziel für eine durch YdaM und YciR vermittelte Regulation der Curliexpression. Northernanalysen konnten zeigen, daß die Transkriptmengen von *csgD* beim Wachstum bei 28° C und Übergang in die stationäre Phase in der *ydaM* Mutante deutlich reduziert und in der *yciR* Mutante deutlich erhöht waren (Abbildung 20). Dieses Resultat bestätigte sich in der Immunoblotanalyse, in der die *ydaM* Mutante deutlich verminderte und die *yciR* Mutante deutlich erhöhte CsgD Proteinlevel zeigten (Abbildung 20). Auch die Aktivität einer translationalen *csgD::lacZ* Fusion (die Fusion umfasste 756 Nukleotide stromaufwärts vom *csgD* Startcodon und 549 Nukleotide codierenden Bereich) war in der *ydaM* Mutante erhöht und in der *yciR* Mutante vermindert (Abbildung 19). In Übereinstimmung mit der Temperaturkontrolle der Curliexpression, war sowohl in der Northern- als auch in der Immunoblotanalyse die Expression von *csgD* bei 37° C drastisch verringert und nicht mehr durch *ydaM* oder *yciR* beeinflusst (Abbildung 20). Insgesamt zeigten die Immunoblot-, Northern und Genreporteranalysen, daß *ydaM* und *yciR* die Expression von CsgD, dem zentralen Regulator der Curlisynthese, kontrollieren.



**Abbildung 19:** Die *csgD* Expression wird von *ydaM* und *yciR* reguliert. Dargestellt sind Wachstum (geschlossene Symbole) und Aktivität der *csgD*(-754, +549):*lacZ* Fusion (offene Symbole) im Wildtyp (Kreise), der *ydaM* (Quadrate) und der *yciR* Mutante (Rauten).



**Abbildung 20:** Der Einfluß von *ydaM*, *ycaR* und der Temperatur auf die Expression von *csgD* beim Übergang in die stationäre Phase (OD=4,0). (A) Die RNA aus dem Wildtypstamm MC4100, der *ydaM* und der *ycaR* Mutante wurde im Northernblot gegen eine nichtradioaktive *csgD* Sonde hybridisiert. Die Proben aus den Kulturen, die bei 28° C und jene die bei 37° C gewachsen waren, wurden auf verschiedenen Blots detektiert. Für eine standardisierte Quantifizierung wurden die Proben aus der 28° C Kultur als Referenz auf allen Blots mitaufgetragen. Diese Analyse wurde von Alexandra Possling durchgeführt. (B) Quantifizierter Westernblot mit Antikörper gegen CsgD. Stämme und Proben entsprechen denen der Northernanalyse.

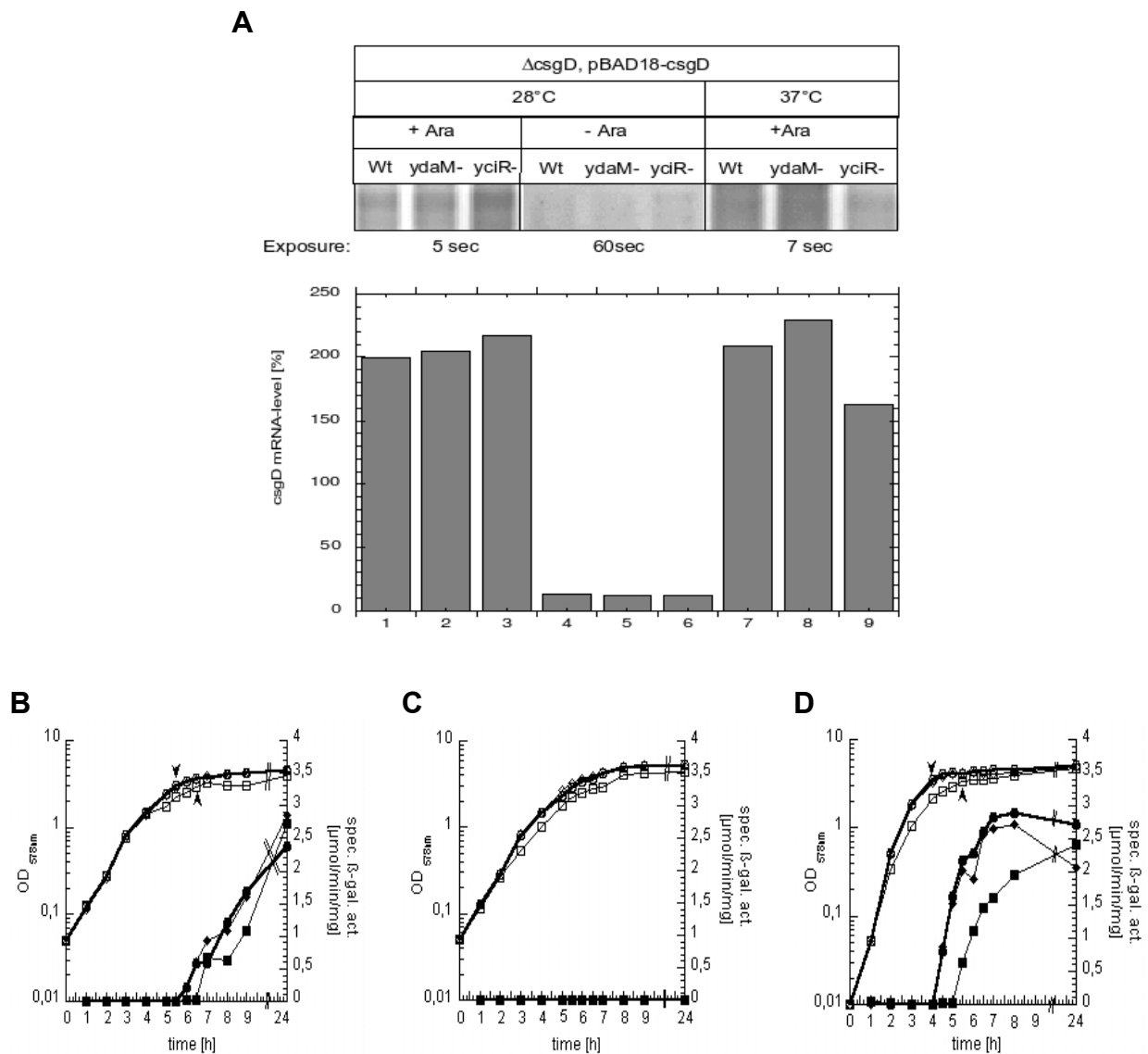
### 3.2.4 YdaM und YcaR kontrollieren die *csgD* Expression auf der Ebene der Transkriptionsinitiation

Nach den Ergebnissen des vorhergehenden Abschnittes kontrollieren *ydaM* und *ycaR* die Transkriptmenge von *csgD*, aber hierfür könnte theoretisch auch ein posttranskriptioneller Mechanismus verantwortlich sein, wie zum z.B. Kontrolle der mRNA-Stabilität. Um zu testen, ob die Effekte auf das *csgD* Transkript auf der Ebene der Transkriptioninitiation oder auf einer nachfolgenden Ebene wirken, wurde die natürliche transkriptionelle Kontrolle der *csgD* Expression durch die ektopische und Arabinose-induzierbare Kontrolle des  $p_{BAD}$  Promotors ersetzt. Vom Plasmid pAP5 wurde die *csgD* mRNA (149 Nukleotide nichttranslatierte 5'-Sequenz + die gesamte codierende Sequenz) exprimiert und zwar entkoppelt von den regulatorischen Einflüssen auf die Transkriptionsinitiation im Wildtyp. Die Expression

erfolgte in der chromosomalen *csgD* Mutante und den *csgD ydaM* und *csgD yciR* Doppelmutanten. Dabei wurde die *csgD* Expression zum einen direkt durch den Nachweis der mRNA in der Northernanalyse bestimmt und zum anderen indirekt durch die Aktivität einer chromosomalen *csgB::lacZ* Fusion gemessen. Tatsächlich konnten unter diesen Bedingungen keine Effekte von *ydaM* oder *yciR* mehr auf die Expression von *csgD* gemessen werden (Abbildung 21). Weder *csgD* Transkriptmenge im Northernblot noch die Aktivität der *csgB::lacZ* Fusion zeigten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *ydaM* bzw. der *yciR* Mutante. Dabei war die *csgD* bzw. indirekt auch die *csgB* Expression durch Arabinose stark induziert, sowohl bei 28° C als auch bei 37° C Wachstumstemperatur. Analysen zur Halbwertszeit der *csgD* mRNA ergaben, daß diese in der *ydaM* Mutante sogar leicht erhöht war (unveröffentlichte Daten von Alexandra Possling). Insgesamt ergibt sich aus diesen Daten, daß YdaM und YciR in antagonistischer Weise die Expression von *csgD* auf der Ebene der Transkriptionsinitiation kontrollieren, wobei YdaM stimulierend YciR inhibierend wirkt.

### 3.2.5 YdaM und YciR kontrollieren spezifisch die Curliexpression und sind keine globalen Regulatoren

Es war denkbar, daß YdaM und YciR nicht nur die Curligene kontrollieren, sondern darüber hinaus noch die Expression weiterer Gene regulieren. Um dies zu überprüfen, wurden globale Transkriptionsanalysen (Microarrayanalysen) durchgeführt, bei denen der Wildtypstamm MC4100 mit der isogenen *ydaM* bzw. *yciR* Mutante verglichen wurde. Die Versuche wurden unter den gleichen Wachstumsbedingungen durchgeführt, bei der auch Curliexpression stimuliert wird (LB Medium; 28° C; OD 4,0). Wie zu erwarten, zeigten die Curligene in der *ydaM* Mutante verminderte und in der *yciR* Mutante erhöhte Expression (Tabelle 5), wobei für *yciR* die relativen Expressionsraten von *csgD*, *csgE* und *csgF* knapp unterhalb der Signifikanzgrenze für differentielle Expression lagen. Auch *ymdA*, welches vermutlich mit *csgBAC* eine Transkriptionseinheit bildet, zeigte das gleiche Regulationsmuster. Nur drei weitere Gene, *ymfE*, *rpsN* und *hdeB* zeigten differentielle Regulation durch YdaM an, allerdings ist bei den beiden letzteren der Einfluß von YdaM nur sehr gering. Keines dieser drei Gene ist mit einer regulatorischen Funktion annotiert oder steht mit der Curli-synthese in Zusammenhang. Insgesamt konnten diese Analysen bestätigen, daß YdaM und YciR spezifische Regulatoren der Curliexpression sind und keine globale Wirkung auf die Genexpression haben. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß diese Ergebnisse bei einer speziellen Wachstumsbedingung erzielt wurden und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß YdaM und YciR unter anderen Bedingungen (z.B. in der späten stationären Phase, oder bei Wachstum als Biofilm auf Festmedium) weitere Effekte bewirken. Das Fehlen von weiteren durch YdaM und YciR kontrollierten Regulatoren ist auch ein starker Hinweis darauf, daß diese beiden Faktoren ihre Wirkung direkt und nicht indirekt auf die Expression am *csgD* Promotor ausüben, möglicherweise vermittelt durch einen Transkriptionsfaktor mit c-di-GMP bindenden Eigenschaften.



**Abbildung 21:** Der Einfluß von *ydaM* und *yciR* auf die ektopische Expression von *csgD*. Codierender Bereich und 149 Nukleotide nichttranslatierte 5'-Region der *csgD* mRNA wurden unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren p<sub>BAD</sub> Promotors vom Plasmid pAP5 exprimiert. Die Induktion erfolgte mit 0,05% Arabinose (Endkonzentration) bei OD = 3,0 und bei 28° C oder 37° C Wachstumstemperatur. (A) Mit Northernanalyse wurde die *csgD* mRNA bei OD 4,0 im Wildtypstamm MC4100, sowie in der *ydaM* und *yciR* Mutante bestimmt. Die Proben unterschiedlicher Wachstumsbedingungen (28° C, +Arabinose; 28° C, -Arabinose; 37° C, +Arabinose) wurden auf verschiedenen Blots detektiert. Auf jedem Blot waren die identischen Proben aus (28° C, +Arabinose) aufgetragen, um eine standardisierte Quantifizierung zu ermöglichen. Diese Analyse wurde von Alexandra Possling durchgeführt. (B) Wachstum (offene Symbole) und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) der *csgB::lacZ* Fusion im Wildtyp (Kreise), der *ydaM* (Rauten) und *yciR* (Quadrate) Mutante wurden unter den entsprechenden Bedingungen wie für die Northernanalyse bestimmt: 28° C, +Arabinose; (C) 28° C, -Arabinose; (D) 37° C, +Arabinose. Pfeile in (B) und (D) zeigen den Zeitpunkt der Arabinose-Induktion an. Die *yciR* Mutante zeigte in Gegenwart des *csgD* Expressionsvektors leicht vermindertes Wachstum.



**Tabelle 5:** YdaM- und YciR-abhängige Gene und deren relativen Expressionslevel (Ratio), bestimmt durch globale Transkriptionsanalyse (Microarrayanalyse).

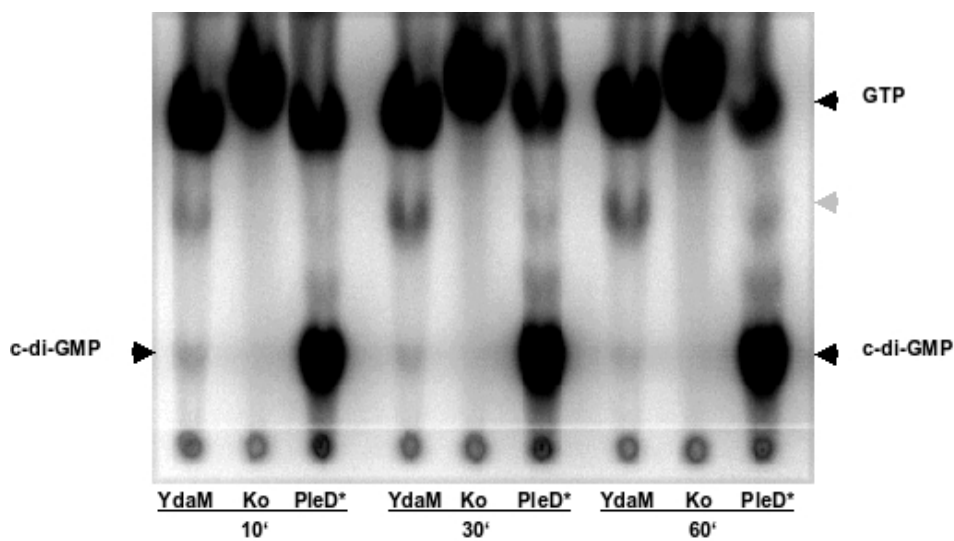
Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio	
		wt <i>vs.</i> <i>ydaM</i>	wt <i>vs.</i> <i>yciR</i>
<i>csgG</i>	b1037 curli production assembly/transport component, 2nd curli operon	3,22	0,47
<i>csgF</i>	b1038 curli production assembly/transport component, 2nd curli operon	4,40	-
<i>csgE</i>	b1039 curli production assembly/transport component, 2nd curli operon	4,12	-
<i>csgD</i>	b1040 transcriptional activator for curli fiber formation, fibronectin binding, and hydroxymethyltransferase synthesis (LuxR/UhpA family)	4,05	-
<i>csgB</i>	b1041 minor curlin subunit precursor, nucleator for assembly of adhesive surface organelles	14,51	0,20
<i>csgA</i>	b1042 curlin major subunit, coiled surface structures, cryptic	29,39	0,21
<i>csgC</i>	b1043 putative curli production protein	10,04	0,19
<i>ymdA</i>	b1044 conserved hypothetical protein	4,76	0,34
<i>ymfE</i>	b1138 e14 prophage	7,47	-
<i>rpsN</i>	b3307 30S ribosomal subunit protein S14	2,24	-
<i>hdeB</i>	b3509 acid-resistance protein	2,22	-

Ratio: relative mRNA Level. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus zwei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar. Bei nichtdifferentieller Regulation wurden die Werte durch '-' ersetzt.

### 3.2.6 YdaM ist eine Diguanylatcyclase (DGC)

YdaM ist ein GGDEF-Protein und es ist deshalb naheliegend, daß seine Wirkung auf die Expression von *csgD* durch c-di-GMP vermittelt wird. Bei YdaM ist die Sequenz 'GGEEF' anstatt 'GGDEF' codiert, aber dieser Aminosäureaustausch 'D -> E' ist kompatibel mit DGC-Aktivität (Jenal et al., 2006). GGDEF-Domänen zeigen nicht grundsätzlich DGC-Aktivität und können stattdessen eine regulatorische Funktion haben (Christen et al., 2005). Aus diesem Grund wurde gereinigtes YdaM *in vitro* auf seine DGC-Aktivität hin untersucht. Als Positivkontrolle diente PleD\*, eine durch Mutagenese (A214T; H234P; N120T; Y357N) der Receiverdomäne konstitutiv aktivierte Diguanylatcyclase aus *C. crescentus* (Paul et al., 2004). In einem DGC-Assay nach (Paul et al., 2004) konnte die Bildung von c-di-GMP aus GTP durch YdaM gezeigt werden (Abbildung 22). Dabei akkumuliert c-di-GMP nach zehn Minuten Inkubation in geringen Mengen und nimmt dann nicht mehr zu. Hierfür könnte die autoinhibitorische Wirkung des Reaktionsproduktes c-di-GMP auf die DGC-Aktivität von YdaM verantwortlich sein. Analog zu PleD existiert in YdaM eine I-site (RXXD, fünf Aminosäuren vor dem GGDEF Motiv), welche allosterisch die autoinhibitorische Wirkung von c-di-GMP auf die DGC vermittelt (Chan et al., 2004; Christen et al., 2006). Im Gegensatz

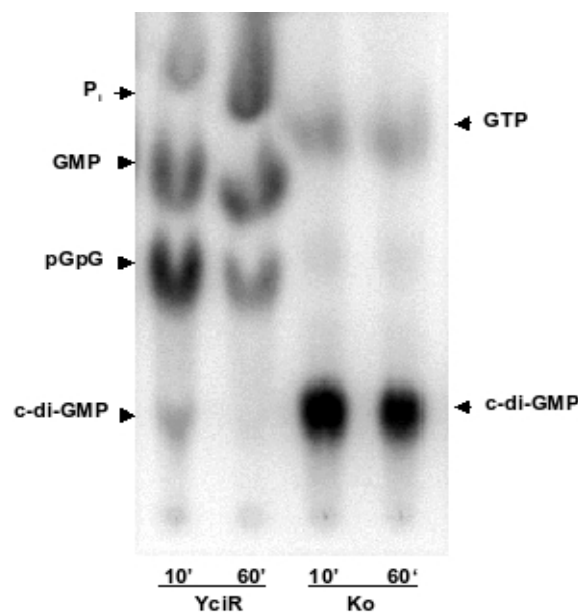
zu PleD ist YdaM kein Response-Regulator, der durch Mutation der Receiver-Domäne konstitutiv aktiviert werden kann (Aldridge et al., 2003; Klose et al., 1993). Stattdessen besitzt YdaM eine PAS-Domäne (Taylor et al., 1999), deren Signal unbekannt ist und für die auch keine Mutationen bekannt sind, welche die Output-Domäne konstitutiv aktivieren. Insgesamt sind also Produktinhibition durch c-di-GMP, fehlende Stimulierung der Sensordomäne sowie suboptimale Pufferbedingungen als mögliche Ursachen für die relativ geringe DGC-Aktivität von YdaM *in vitro* zu nennen. In einem genetischen Ansatz konnte die DGC-Aktivität von YdaM verifiziert werden (Diplomarbeit von Christina Pesavento; Weber et al., 2006). Dazu wurde in der GGDEF-Domäne von YdaM die Sequenz des katalytischen Zentrums von 'GGDEF' zu 'GGAAF' mutiert, was nicht mehr mit DGC-Aktivität vereinbar ist (Jenal et al., 2006). Von einem Plasmid exprimiert konnte das mutierte YdaM im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nicht die chromosomale *ydaM* Deletion komplementieren, wenn die Aktivität der *csgB::lacZ* Fusion als Reportersystem gemessen wurde. Die Ergebnisse aus der *in vitro* Analyse und dem genetischen Ansatz zusammen identifizierten YdaM als eine Diguanylatcyclase.



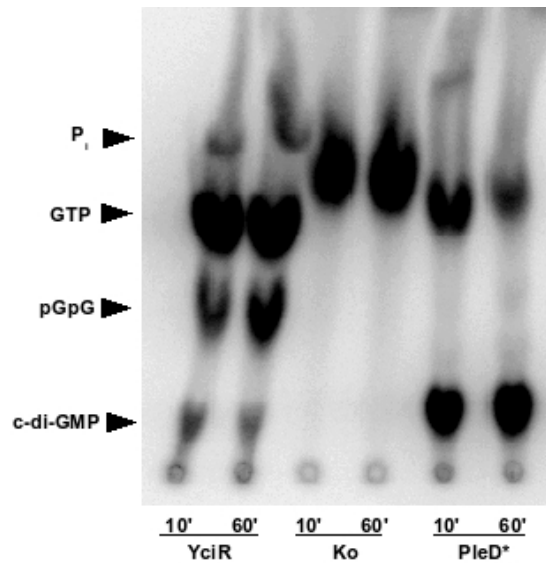
**Abbildung 22:** Nachweis der Diguanylatcyclase-Aktivität von YdaM. Ansätze mit gereinigtem YdaM, sowie der Positivkontrolle PleD\* und der Negativkontrolle ohne Protein (Ko) wurden mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-GTP inkubiert (siehe Abschnitt 2.6.2 im Kapitel Material und Methoden). Nach 10, 30 und 60 Minuten wurden Proben entnommen, mit Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Phosphoimaging visualisiert. Der graue Pfeil zeigt auf ein Signal, welches möglicherweise auf pppGpG, das Produkt einer unvollständigen Reaktion, beruht.

### 3.2.7 YciR ist eine Phosphodiesterase und eine Diguanylatcyclase

YciR besitzt sowohl eine GGDEF- als auch eine EAL-Domäne. Aufgrund seiner zur DGC YdaM antagonistischen Wirkung auf die Curli-Expression wurde vermutet, daß YciR eine Phosphodiesterase (PDE) ist. Ein *in vitro* Assay mit gereinigtem YciR und radioaktivem c-di-GMP (synthetisiert aus [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-GTP mit PleD\*, siehe Material und Methoden) ergab, daß YciR das cyclische Dinukleotid schnell und quantitativ umsetzt (Abbildung 23). Dabei konnten das primäre Abbauprodukt der PDE-A-Aktivität pGpG sowie GMP und Phosphat als Folgeprodukte der PDE-B-Aktivität detektiert werden. YciR besitzt auch eine GGDEF-Domäne mit der optimalen Sequenz 'GGDEF' und wurde deshalb auf DGC-Aktivität getestet (Abbildung 24). Tatsächlich konnte ein deutliches c-di-GMP Signal detektiert werden, aber gleichzeitig waren auch die Produkte pGpG, GMP und  $P_i$  nachweisbar. Offensichtlich hat YciR DGC-Aktivität, wobei das von YciR synthetisierte c-di-GMP durch die eigene PDE-Aktivität wieder abgebaut wird. Welche Rolle die DGC-Aktivität von YciR *in vivo* spielt sollte durch phänotypische Analysen mit Varianten von YciR (mutiert in der GGDEF- und/oder EAL-Domäne) untersucht werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist YciR die erste bifunktionelle Diguanylatcyclase/Phosphodiesterase, die bisher beschrieben wurde.



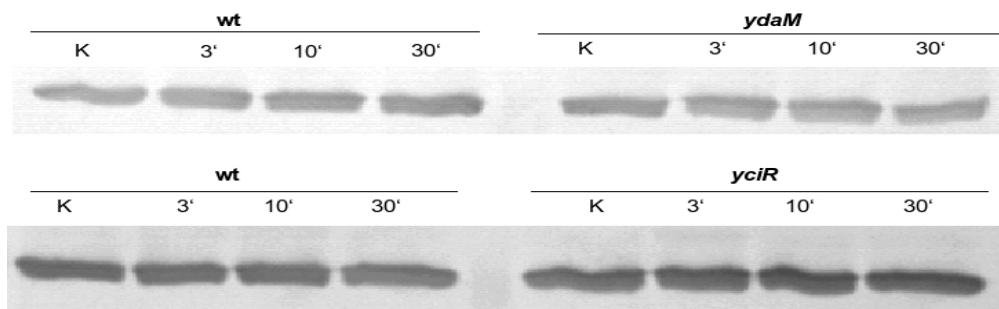
**Abbildung 23:** Nachweis der Phosphodiesteraseaktivität von YciR. Gereinigtes YciR sowie eine Kontrolle ohne Protein (Ko) wurden 10 bzw. 60 Minuten mit [ $^{32}$ P]-c-di-GMP inkubiert (siehe Abschnitt 2.6.3 im Kapitel Material und Methoden). Die Proben wurden anschließend mit Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Phosphoimaging visualisiert. Die Zuordnung von Signalen zu entsprechenden Reaktionsprodukten erfolgte nach (Tamayo et al., 2005).



**Abbildung 24:** Nachweis der Diguanylatcyclaseaktivität von YciR. Gereinigtes YciR, PleD\* sowie eine Kontrolle ohne Protein (Ko) wurden 10 bzw. 60 Minuten mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$  inkubiert (siehe Abschnitt 2.6.2 im Kapitel Material und Methoden). Die Proben wurden anschließend mit Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Phosphoimaging visualisiert. Die Zuordnung von Signalen zu entsprechenden Reaktionsprodukten erfolgte nach (Tamayo et al., 2005).

### 3.2.8 YdaM und YciR haben keinen Einfluß auf die Stabilität von CsgD

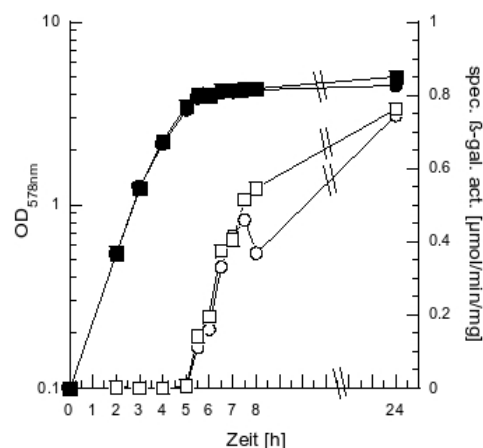
YdaM und YciR kontrollieren die Curli-Expression auf der Ebene der Transkriptionsregulation von *csgD* und es ist naheliegend, daß diese Effekte von c-di-GMP vermittelt werden. Aufgrund der Ergebnisse zur ektoptischen Expression von CsgD (Abschnitt 3.2.4) waren keine Effekte von YdaM/YciR auf die Curliexpression zu erwarten, die der *csgD* Transkription nachgeschaltet sind. Um explizit zu überprüfen, daß YdaM/YciR sich nicht auf die CsgD Proteininstabilität auswirken, wurde CsgD ektoptisch von einem Arabinose-induzierbaren Promotor auf dem Plasmid pAP5 exprimiert und nach Stoppen der Proteinsynthese mit Spectinomycin die Proteinlevel von CsgD im Westernblot bestimmt (Abbildung 25). Die ektoptische Expression von CsgD erfolgte, um die Effekte von YdaM/YciR auf die Transkription zu eliminieren und die CsgD Anfangsmenge in allen Stammhintergründen zu vereinheitlichen. Nachdem die Proteinbiosynthese 30 min gestoppt war, konnte kein signifikanter Abbau von CsgD und keine Effekte von YdaM oder YciR auf die Stabilität von CsgD beobachtet werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die ektoptische Expression und die damit verbundene starke Akkumulation von CsgD zur Sättigung der CsgD Proteolyse führte und Effekte von YdaM/YciR dadurch maskiert waren. Um dies zu klären, sollte die CsgD Stabilität noch einmal bei Wildtypniveau bestimmt werden.



**Abbildung 25:** Stabilität von CsgD in Abhängigkeit von *ydaM* und *yciR*. In einer chromosomalen *csgD* Mutante wurde plasmidcodiertes CsgD von einem *rpoS*-unabhängigen und Arabinose-induzierbaren Promotor exprimiert. Die Induktion erfolgte bei OD 3,5 mit 0,05% Arabinose für 20 min. Nach dem Stop der Proteinbiosynthese mit Spectinomycin wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und mittels Immunoblot analysiert.

### 3.2.9 Die Transkription von *csgB* erfolgt $\sigma^S$ -unabhängig

$E\sigma^S$  bindet direkt am *csgD* Promotor, wie durch Footprint-Analysen gezeigt wurde (Robbe-Saule et al., 2006). Um zu prüfen, ob auch *csgB* direkt  $\sigma^S$ -abhängig transkribiert wird, wurde die Aktivität einer *csgB::lacZ* Fusion bei ektopischer Expression von CsgD in einer chromosomalen *csgD* Mutante untersucht (Abbildung 26). Das unter der Kontrolle von  $p_{BAD}$  exprimierte CsgD unterlag damit nicht mehr der Regulation durch  $\sigma^S$ . In diesem System zeigten sich im Wildtyp und in der  $\sigma^S$ -Mutante keine Unterschiede bezüglich der *csgB* Expression. Daraus folgt, daß die Transkription am *csgB* Promotor unabhängig von  $\sigma^S$  initiiert wird, aber sehr wahrscheinlich  $\sigma^{70}$ -vermittelt ist, während der Effekt von  $\sigma^S$  indirekt ist (über die Transkription von *csgD* und den diesem vorgeschalteten Genen *mlrA*, *ydaM* und *yciR*)



**Abbildung 26:** Die Transkription von *csgB* erfolgt  $\sigma^S$ -unabhängig. Die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (offene Symbole) von chromosomalen *csgD* Mutanten mit chromosomaler *csgB::lacZ* Fusion wurde entlang des Wachstumskurve (geschlossene Symbole) bei 28° C in LB bestimmt. Es wurde der Wildtyp (Kreise) mit der *rpoS* Mutante (Quadrate) verglichen. CsgD wurde  $\sigma^S$ -unabhängig von  $p_{BAD}$  exprimiert. Die Induktion von CsgD erfolgte bei OD = 3,0 mit 0,05% Arabinose.

### 3.3 Untersuchungen zu MlrA, einem Regulator der Curli-expression

#### 3.3.1 MlrA ist kein globaler Regulator

MlrA ist ein essentieller und  $\sigma^S$ -abhängiger Regulator der Curliexpression und ein positiver Regulator der *csgD* Transkription (Brown et al., 2001). Dieser Transkriptionsfaktor wird aufgrund seines N-terminalen Helix-turn-Helix Motivs der MerR Familie der DNA-bindenden Proteine zugeordnet. Da die direkte Bindung von MlrA am *csgD* Promotor bisher nicht gezeigt wurde, bestand die Möglichkeit, daß MlrA die Expression eines Aktivators der *csgD* Transkription kontrolliert. Es war auch denkbar, daß MlrA im Kontext der generellen Stressantwort die Expression weiterer  $\sigma^S$ -abhängiger Gene reguliert und mit diesen ein regulatorisches Modul im  $\sigma^S$ -Netzwerk darstellt. Um zu testen, ob MlrA die Expression weiterer Gene kontrolliert, wurden Microarrayanalysen durchgeführt. Es wurde der Wildtypstamm MC4100 mit der isogenen *mlrA* Mutante beim Eintritt in die stationäre Phase (LB; OD = 4,0) verglichen. Bei Wachstum bei 28° C, aber nicht bei 37° C (Daten nicht gezeigt), zeigten die Curligene starke Abhängigkeit von MlrA, aber mit der Ausnahme von *ymfE* (auch deutlich YdaM-abhängig, siehe Tabelle 5) konnten darüber hinaus keine weiteren von MlrA kontrollierten Gene identifiziert werden (Tabelle 6). Aus diesem Grund ist es auch naheliegend, daß MlrA die Curliexpression direkt, und nicht indirekt über einen zwischengeschalteten Regulator, am *csgD* Promotor aktiviert. Interessanterweise teilt MlrA diese Eigenschaft mit YdaM und YciR (Abschnitt 3.2.5) und möglicherweise ist MlrA das gesuchte Protein, welches die Effekte von c-di-GMP auf die Expression von *csgD* vermittelt.

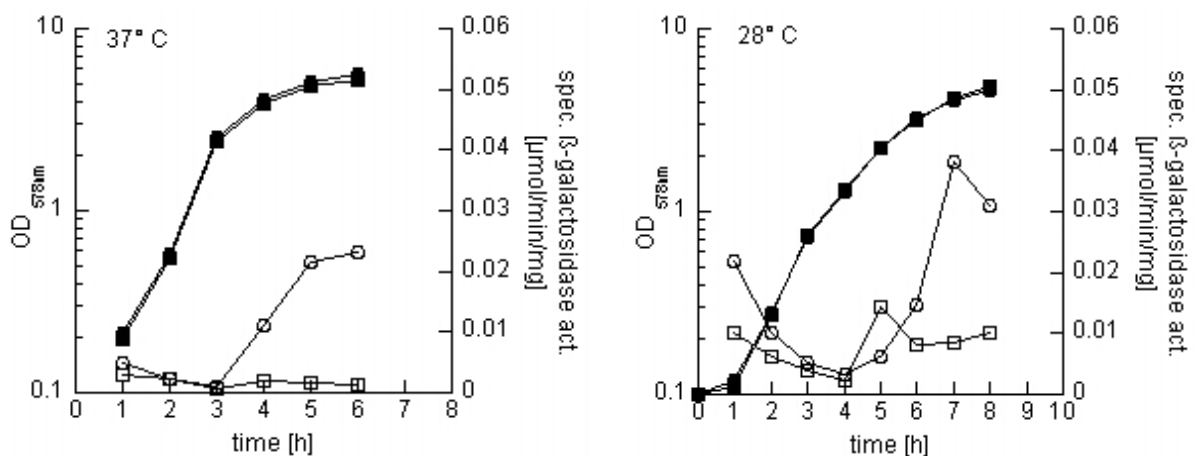
**Tabelle 6:** MlrA-abhängige Gene, identifiziert durch globale Transkriptionsanalyse.

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>mlrA</i> <sup>+</sup> / <i>mlrA</i> <sup>-</sup> )
<i>csgF</i> b1038	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon	12,86
<i>csgE</i> b1039	curli production assembly/transport component, 2nd curli operon	13,59
<i>csgD</i> b1040	transcriptional activator for curli fiber formation, fibronectin binding, and hydroxymethyltransferase synthesis (LuxR/UhpA family)	13,08
<i>csgB</i> b1041	minor curlin subunit precursor, nucleator for assembly of adhesive surface organelles	91,80
<i>csgA</i> b1042	curlin major subunit, coiled surface structures, cryptic	117,56
<i>csgC</i> b1043	putative curli production protein	16,58
<i>ymdA</i> b1044	conserved hypothetical protein	4,71
<i>ymfE</i> b1138	e14 prophage	19,92

Ratio: relative mRNA Level *mlrA*<sup>+</sup>/*mlrA*<sup>-</sup>. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus zwei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar. Die Experimente wurden mit LB Kulturen, OD 4,0 bei 28° C Wachstumstemperatur durchgeführt.

### 3.3.2 MlrA wird sowohl bei 37°C als auch bei 28°C exprimiert

Vorhergehende Analysen (Abschnitt 3.3.1) zeigten, daß die MlrA-abhängige Expression der Curli gene temperaturabhängig bei 28° und nicht bei 37° C Wachstumstemperatur stattfindet. Möglicherweise beruhte diese Beobachtung auf der temperaturabhängigen Expression von MlrA selbst. Die Aktivität einer translationalen *mlrA::lacZ* Fusion (das Fusionskonstrukt umfasste nur ca. 30 Codons der codierenden *mlrA* Sequenz und reflektiert damit sehr wahrscheinlich die *mlrA*-Transkription) zeigte aber keine nennenswerten Unterschiede bei den verschiedenen Wachstumstemperaturen (Abbildung 27). In beiden Fällen war die MlrA Expression klar  $\sigma^S$ -abhängig und Wachstumsphasen-kontrolliert, allerdings konnte bei 28° C im Gegensatz zu 37° C ein geringes  $\sigma^S$ -unabhängiges Basalniveau beobachtet werden.

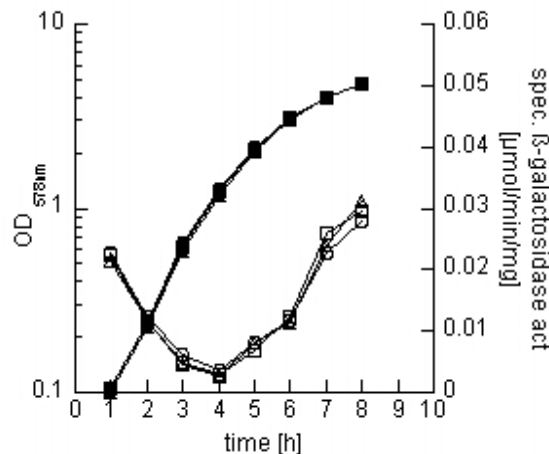


**Abbildung 27:**  $\sigma^S$ - und Temperatur-Abhängigkeit der *mlrA*-Expression. Die translationale *mlr::lacZ*-Fusion wurde im Wildtyp (Kreise) und in der *rpoS* Mutante (Quadrate) bei 37° C und bei 28° C Wachstumstemperatur gemessen (geschlossene Symbole: Wachstum; offene Symbole:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität).

### 3.3.3 MlrA Expression ist unabhängig von YdaM und YciR

Die Transkription von *csgD* steht gleichzeitig unter der Kontrolle der GGDEF/EAL Proteine YdaM und YciR sowie von MlrA (Brown et al., 2001) und weiteren DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren. Möglicherweise wirken YdaM und YciR indirekt auf die *csgD* Transkription, indem sie die MlrA Expression regulieren. Obwohl die globalen Transkriptionsanalysen zu *ydaM* und *yciR* (Abschnitt 3.2.5) keine Hinweise auf eine solche Regulation lieferten, sollte der Einfluß der beiden Faktoren auf die MlrA Expression in einem für MlrA spezifischen Ansatz explizit überprüft werden. Es konnte auch nicht ausgeschlossen werden, daß YdaM und YciR posttranskriptionell auf die MlrA Expression wirken und diese Effekte mit der translationalen *mlrA::lacZ* Fusion nachweisbar sind. Denkbar wären z.B. Effekte auf die Translationsinitiation oder Proteinstabilität von MlrA. Die Aktivität einer translationalen *mlrA::lacZ* Fusion (30 Codons von *mlrA*) zeigte sich unbeeinflusst durch *yciR* und *ydaM* (Abbildung 28). Gemeinsam mit den Ergebnissen aus

Abschnitt 3.2.5 läßt sich sagen, daß *ycaR* und *ydaM* nicht auf die Transkription von *MlrA* wirken. Das Experiment mit der relativ kurzen Fusion kann aber Effekte von *YdaM* und *YcaR* auf die Proteinstabilität von *MlrA* nicht ausschließen, was durch entsprechende Abbauexperimente überprüft werden soll (erste Versuche hierzu scheiterten an der schlechten Detektierbarkeit von *MlrA*).



**Abbildung 28:** Einfluß von *ydaM* und *ycaR* auf die Expression von *mlrA*. Eine translationale *mlrA::lacZ*-Fusion wurde bei 28° C Wachstumstemperatur im Wildtyp (Kreise), der *ydaM* (Quadrate) und der *ycaR* (Dreiecke) Mutante gemessen (geschlossene Symbole: Wachstum; offene Symbole:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität).

### 3.3.4 *MlrA* bindet an die DNA der *csgD* Promotorregion

Obwohl *MlrA* die Transkription von *csgD* aktiviert (Brown et al., 2001), wurde eine Bindung von *MlrA* am *csgD* Promotor (Abbildung 29) bisher nie gezeigt. Aufgrund der globalen Transkriptionsanalysen zu *MlrA* (Abschnitt 3.3.1) konnte ausgeschlossen werden, daß *MlrA* die *csgD* Transkription indirekt über die Zwischenschaltung eines weiteren Regulators aktiviert. Um die Bindung von *MlrA* an die Promotorregion von *csgD* zu untersuchen, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt. Dazu wurden PCR-Produkte generiert, welche verschiedene, sich überlappende Bereiche, der *csgD* Promotorregion repräsentierten. Diese wurden mit gereinigtem *MlrA* inkubiert und anschließend mit nicht-denaturierender PAGE untersucht. Es wurde gefunden, daß gereinigtes *MlrA* *in vitro* an DNA-Fragmente der *csgD* Promotorregion binden kann (Abbildung 30). Zwei verschiedene DNA-Fragmente (up, -699 bis -200; center, -389 bis +94; alle Koordinaten geben das Nukleotid relativ zum *csgD* Startcodon an) zeigten Bindung an *MlrA*. Es wurde vermutet, daß sich die *MlrA* Bindestelle im Überlappungsbereich der beiden DNA-Fragmente befindet. Es war aber auch möglich, daß zwei oder mehrere *MlrA* Bindestellen auf beiden Fragmenten existierten. In beiden Fällen mußte sich die Bindestelle aber stromaufwärts von -146 befinden, da ein entsprechendes DNA-Fragment (down, -146 bis +354) keine Bindung an *MlrA* zeigte.



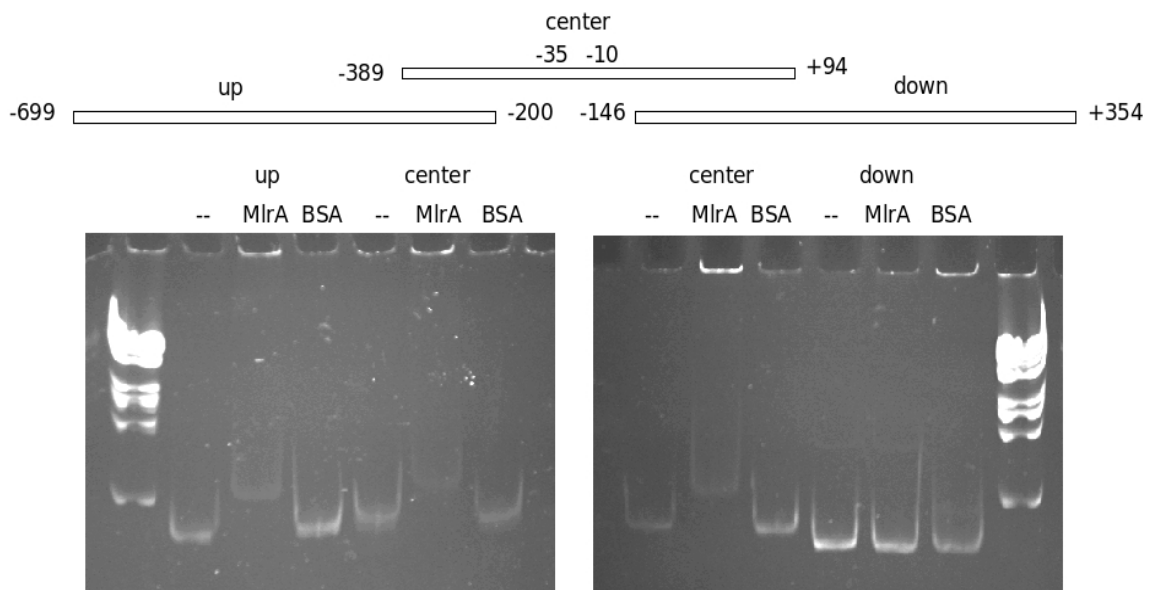
```

-360 aaggactacaccgaaatattttttatatgcattattagtaagttatcaccatttgtatga
                                     ┌─────────── MlrA ──────────┐
-300 ttttttaaattgtgcaataaaaaccaaattgtacaacttttctatcatttctaaacttaa
                                     (- 35)                       (- 10)
      ┌───────────────────────────┐
-240 taaaaccttaagggttaacattttaatataacgagttacatttagttacatgtttaacact
      └───────────────────────────┘
-180 tgatttaagatttgaatggctagattgaaatcagatgtaatccattagttttatatttt
      -35                               -10                               ▶
-120 acccatttagggctgatttattactacacacagcagtgcaacatctgtcagtacttctgg
-60  tgcttctatttttagaggcagctgtcaggtgtgcatcaataaaaaaagcggggtttcac

+1 ATG TTT AAT

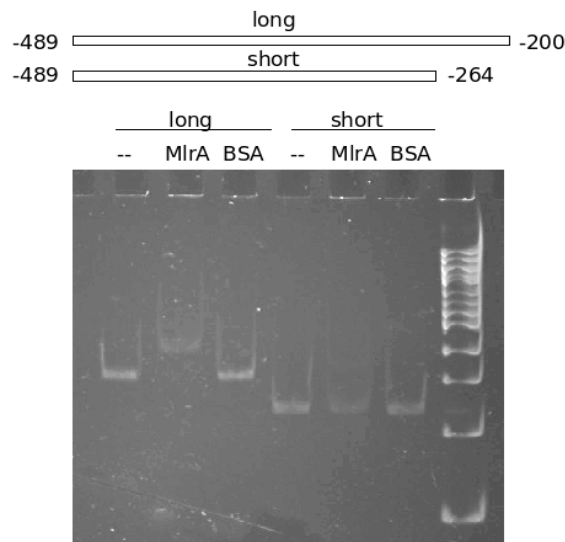
```

**Abbildung 29:** Die DNA-Sequenz stromaufwärts von *csgD*. Der Promotor (-35/-10, unterstrichen) und Transkriptionsstart (Pfeil), wie von (Hammar et al., 1995) bestimmt, ein putativ  $\sigma^S$ -abhängiger Promotor (fett, -35/-10 in Klammern), die Binderegion von MlrA (fetter Balken), das Palindrom (punktiert unterstrichen) und codierende Sequenz (Großbuchstaben) sind hervorgehoben.



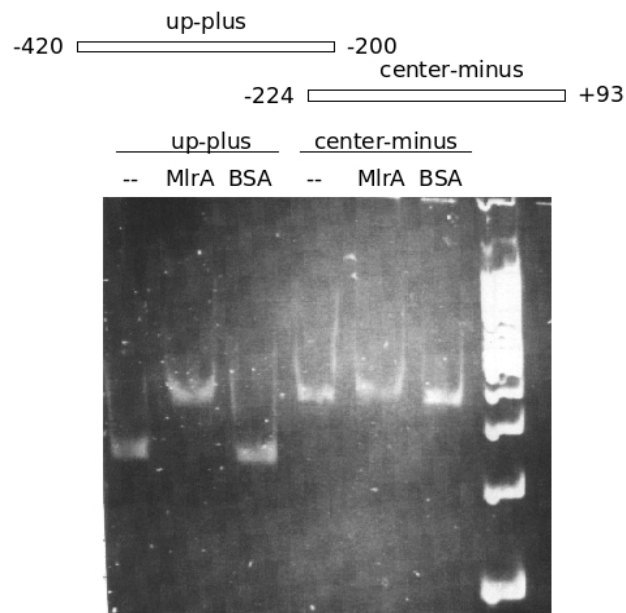
**Abbildung 30:** Gelretardationsexperimente mit gereinigtem MlrA und PCR-Produkten abgeleitet aus der Promotorregion von *csgD*. Die DNA-Fragmente 'up', 'center' und 'down' mit ihren Koordinaten relativ zum Startcodon von *csgD* sind schematisch dargestellt. Die Position des *csgD* Promotors (Hammar et al., 1995) ist auf dem „center“ Fragment angedeutet. Ansätze mit 500 ng MlrA, 1 µg BSA oder ohne Protein wurden mit 50 ng gereinigten PCR-Produkten inkubiert, mittels nichtdenaturierender PAGE getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (siehe auch Material und Methoden).

Um die Bindestelle von MlrA weiter einzugrenzen, wurden zwei DNA-Fragmente generiert, die unterschiedlich lange Bereiche der Überlappungsregion der 'up' und 'center' Fragmente abbildeten, ansonsten aber identisch waren. Der ursprüngliche Überlappungsbereich lag zwischen -389 und -200. Bei etwa Position -250 relativ zum *csgD* Startcodon befindet sich eine Sequenz, die sehr gut einem  $\sigma^S$  Promotor entspricht ( charakterisiert durch ein -35 Element 'TGTACA', eine 16 bp Spacerregion und -10 'CTAAACTTAA', siehe ). Außerdem befindet sich hier auch eine 9mer palindromische Sequenz 'TAAACTTAATAAAAACCTTAAGGTTA' (ein Mismatch, 7 bp Spacer). Es wurde spekuliert, daß die MlrA Bindestelle im Sequenzbereich um -250 herum liegt und deshalb wurde die Region zwischen -200 und -264 in der Bandshiftanalyse näher untersucht. In der Tat zeigte nur das lange (-489 bis -200), aber nicht das kurze (-489 bis -264) Fragment Bindung an MlrA (Abbildung 31). Aufgrund dieser Untersuchung konnte die MlrA Bindestelle auf den Bereich zwischen -264 und -200 relativ zum *csgD* Startcodon eingegrenzt werden.



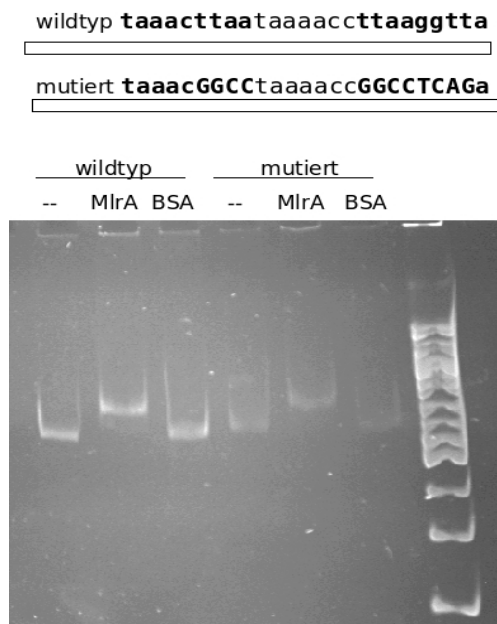
**Abbildung 31:** Gelretardationsexperiment mit gereinigtem MlrA und PCR-Produkten abgeleitet aus der DNA-Region von *csgD*. Die PCR-Produkte 'long' und 'short' mit ihren Koordinaten relativ zum Startcodon von *csgD* sind schematisch dargestellt. Für weitere Angaben siehe Abbildung 30.

In einem letzten Ansatz wurde die MlrA Bindestelle noch weiter eingegrenzt. Dazu wurden zwei DNA-Fragmente synthetisiert (-420 bis -200; -224 bis +93), die sich nur in einem kurzen Bereich der MlrA-Binderegion überlappten. In der Bandshiftanalyse zeigte nur das distal gelegene Fragment (-420, -200) Bindung an MlrA. Der Überlappungsbereich von -224 bis -200 schied damit als Bindestelle für MlrA aus. Aufgrund der Summe der Ergebnisse aller hier gezeigten Bandshiftanalysen konnte die Bindestelle von MlrA auf einen Bereich von 39 Basenpaaren zwischen Position -264 und -224 relativ zum *csgD* Startcodon eingegrenzt werden (Abbildung 29).



**Abbildung 32:** Gelretardationsexperiment mit zwei verschiedenen DNA-Fragmenten aus der *csgD* Region. Die Fragmente mit ihren Koordinaten relativ zum *csgD* Startcodon sind schematisch dargestellt. Für weitere Angaben siehe auch Abbildung 30.

### 3.3.5 Die palindromische Sequenz in der MlrA Binderegion ist nicht die Bindestelle von MlrA

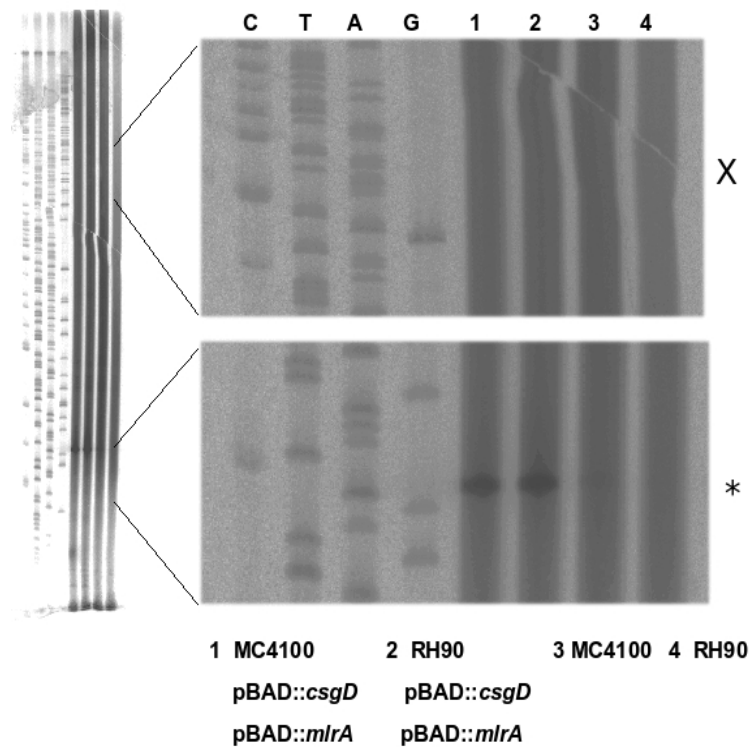


**Abbildung 33:** Gelretardationsanalyse zur putativen MlrA Bindestelle. Es wurde die Bindung an MlrA von verschiedenen PCR-Fragmenten der von *csgD* stromaufwärts gelegenen DNA-Region untersucht. Dabei wurde ein Wildtypfragment mit einem Fragment mit mutierter putativer MlrA Bindestelle verglichen. Die Sequenz der palindromischen (fett) putativen Bindestelle für MlrA im Wildtypfragment und im mutierten (Großbuchstaben) Fragment sind angegeben. Siehe auch Abbildung 30.

MlrA ist ein MerR-ähnlicher Transkriptionsfaktor und bindet deshalb möglicherweise als Homodimer an eine palindromische DNA-Sequenz (Brown et al., 2003). Im Bereich der MlrA-Binderegion (-264 bis -224) befindet sich die palindromische Sequenz 'TAAACTTAATAAAACCTTAAGGTTA' (ein Mismatch, 7 bp Spacer) und es wurde vermutet, daß es sich hierbei um die MlrA-Erkennungssequenz handelt (siehe auch Abbildung 29). Um diese Hypothese zu prüfen, wurden DNA-Fragmente der MlrA-Binderegion mit verschiedenen Basenaustauschen in der palindromischen Sequenz synthetisiert und mittels Bandshiftanalyse untersucht. Keines dieser Fragmente zeigte veränderte MlrA-Bindung im Vergleich zur Wildtypsequenz. Sogar ein DNA-Fragment, bei dem eine palindromische Halbseite komplett und die andere zur Hälfte mutiert war, zeigte unverändert Bindung an MlrA (Abbildung 33). Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die palindromische Sequenz in der MlrA-Binderegion nicht die MlrA-Targetsequenz ist. In der MlrA Binderegion befindet sich kein weiterer Sequenzabschnitt, der eine MlrA Bindesequenz vermuten ließe. Um die exakte MlrA Bindestelle zu identifizieren, sollten DNA-Footprintanalysen durchgeführt werden.

### 3.3.6 Untersuchungen zum Transkriptionsstart von *csgD*

In der MlrA-Binderegion befindet sich ein Sequenzbereich, der fast perfekt der Konsensussequenz eines  $\sigma^S$ -abhängigen Promotors entspricht (Abbildung 29). Dieser Abschnitt ist charakterisiert durch die Sequenz 'CTAAACTTAA', welche einer optimalen -10-Region für  $\sigma^S$  entspricht, und die Sequenz 'TGTACA' entspricht gut einer optimalen -35-Region (TTGACA). Die putativen -10 und -35-Elemente sind durch einen AT-reichen und 16 Nukleotide langen Spacerbereich getrennt, was auch für einen  $\sigma^S$ -abhängigen Promotor spricht (Typas et al., 2006). Es wurde vermutet, daß es sich hierbei um einen weiteren *csgD* Promotor handelt, neben dem bereits publizierten Promotor (Hammar et al., 1995; siehe Abbildung 29). Um dies zu überprüfen, wurde eine Primerextension Analyse zum *csgD* Promotor durchgeführt (Abbildung 34). Dazu wurden der Wildtyp MC4100 und die *rpoS* Mutante bei 28° C bis zu einer OD = 4,0 inkubiert. Die eine Hälfte der Kulturen exprimiert CsgD und MlrA von einem Multicopy-Plasmid, die andere Hälfte exprimiert nur chromosomal codiertes MlrA und CsgD. Die Primerextension Analyse konnte den zuvor publizierten *csgD* Promotor bestätigen. Der exakte Transkriptionsstart wurde bei A(149) bestimmt, also um eine Position abweichend von G(150), wie von (Hammar et al., 1995) angegeben (allgemein tritt A deutlich häufiger als G als Startnukleotid auf). Im Bereich des vorhergesagten  $\sigma^S$ -abhängigen Promotors konnte kein weiteres Transkript und damit kein zweiter Promotor nachgewiesen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß  $\sigma^S$  dennoch in diesem Bereich bindet und eine unorthodoxe Wirkung auf die Transkription von *csgD* ausübt.  $\sigma^S$  könnte z.B. eine Fernwirkung auf die Rekrutierung von RNA Polymerase haben, ähnlich wie es für CRP gezeigt wurde (Miroslavova et al., 2006). Ob der putative  $\sigma^S$  Bindebereich überhaupt *in vivo* Relevanz besitzt, soll mit *csgD* Reporterfusionen untersucht werden, bei denen dieser Bereich durch Mutation verändert wurde.



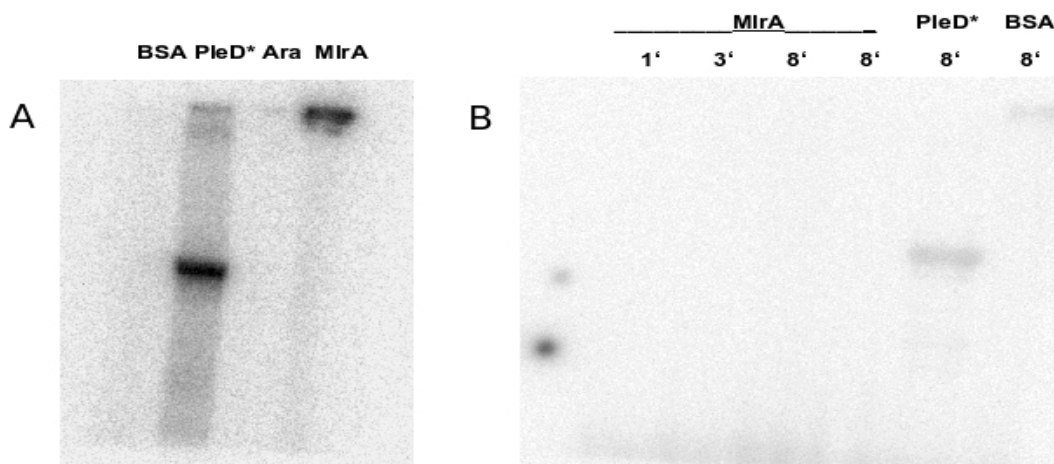
**Abbildung 34:** Bestimmung des Transkriptionsstartes (Primer Extension) von *csgD*. Im Wildtyp (Spur 1) und der *rpoS* Mutante (Spur 2) wurden *csgD* und *mlrA* von einem Multicopy-Plasmid exprimiert. Die Induktion erfolgte bei OD = 3,5 mit 0,05% Arabinose für 45 min. Zwei weitere Ansätze mit Wildtyp (Spur 3) und *rpoS* Mutante (Spur 4) wurde ohne ektopische Expression von *csgD* untersucht. Der Transkriptionsstart nach (Hammar et al., 1995) (Stern) sowie die putative  $\sigma^S$  Promotorregion (Kreuz) sind angezeigt. Alle Kulturen wuchsen bei 28° C in LB Medium, die Probennahme erfolgte bei OD 4,0.

### 3.3.7 Untersuchung der Bindung von c-di-GMP an MlrA

Die Transkription von *csgD* wird von der Diguanylatcyclase YdaM und der Phosphodiesterase YciR kontrolliert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit vermittelt c-di-GMP diese Kontrolle, aber über den genauen Mechanismus kann nur spekuliert werden. Möglicherweise spielt c-di-GMP in diesem Kontext die Rolle eines Induktors: ein kleines Molekül (wie zum Beispiel auch cAMP), welches die Aktivität eines DNA-bindenden Proteins moduliert. CpxR, OmpR, IHF und H-NS sind alle Faktoren, für die Bindung in der Promotor-Region von *csgD* beschrieben wurde (Gerstel et al., 2003). Auch MlrA bindet am *csgD* Promotor, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Von den Faktoren CpxR, OmpR, IHF und HNS war bekannt, daß sie als globale Regulatoren die Expression vieler Gene kontrollieren (Oshima et al., 2002; De\_Wulf et al., 2002; Arfin et al., 2000; Hommais et al., 2001). Sollte von YdaM/YciR kontrolliertes c-di-GMP seine Effekte über einen dieser Faktoren ausüben, so wären in der globalen Transkriptionsanalyse auch globale Effekte zu erwarten. Die Microarrayanalyse zeigte aber, daß YdaM und YciR nur die Expression der Curli Gene kontrollieren und keine weiteren Gene kontrollieren. Damit sind OmpR, CpxR, IHF und HNS

eher unwahrscheinliche Ziele von c-di-GMP. MlrA dagegen reguliert, ebenso wie YdaM und YciR, nur die Curli Gene, wie Ergebnisse der globalen Transkriptionanalyse zeigten. Außerdem ist es für MlrA durchaus wahrscheinlich, daß seine Aktivität durch ein kleines Molekül reguliert wird, wie es bei vielen anderen MerR-ähnlichen Regulatoren der Fall ist (Brown et al., 2003). Theoretisch ist MlrA damit ein idealer Kandidat, um die Wirkung von c-di-GMP auf die *csgD*-Transkription zu vermitteln. Um zu testen, ob MlrA ein c-di-GMP bindendes Protein ist, wurden verschiedene experimentellen Ansätze durchgeführt (UV-Crosslinking, Gleichgewichtsdialyse und Bandshiftassays). In keinem der Experimente ergab sich ein Hinweis auf die Bindung von c-di-GMP an MlrA. Möglicherweise sind methodische Probleme die Ursache für den fehlenden Nachweis, aber insgesamt liegt bei drei unabhängigen Versuchsansätzen mit negativem Ausgang der Schluß nahe, daß MlrA unter den gegebenen Bedingungen kein c-di-GMP-bindendes Protein ist.

### 3.3.7.1 UV-Crosslinking

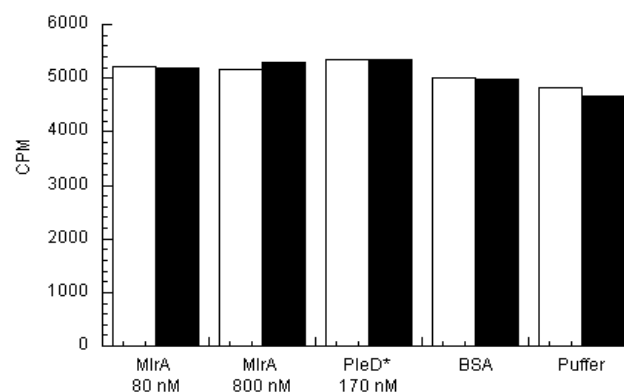


**Abbildung 35:** UV-Crosslinking. Gereinigtes MlrA, PleD\*, Ara (Pf-5 Fragment aus *Arabidopsis thaliana*, Negativkontrolle) und BSA wurden mit radioaktivem c-di-GMP inkubiert und für (A) 20 min oder (B) zwischen 1 min und 8 min mit UV<sub>365nm</sub>-Licht bestrahlt. Die Proben wurden anschließend mit SDS-PAGE getrennt und durch Phosphorimaging visualisiert.

Mittels UV-Crosslinking konnte die Bindung von c-di-GMP an PleD\* demonstriert werden (Christen et al., 2005). Mit der gleichen Methode sollte hier die Bindung von c-di-GMP an MlrA untersucht werden. Es konnte die Bindung von c-di-GMP an die Positivkontrolle PleD\* bestätigt, aber nicht für MlrA gezeigt werden (Abbildung 35). In der Probe mit MlrA war bei 20 minütiger Bestrahlung mit UV<sub>365nm</sub> die Bildung eines radioaktiven hochmolekularen Komplexes zu beobachten. Es wurde vermutet, daß die Einstrahldauer möglicherweise zu lange war und es dadurch zu einer Quervernetzung von vielen MlrA Molekülen inklusive c-di-GMP kam. Um dies zu überprüfen, wurde das Experiment mit verkürzten Einstrahldauern wiederholt. Auch hier konnte keine Bindung von c-di-GMP an MlrA beobachtet werden, obwohl die Positivkontrolle PleD\* auch unter diesen Bedingungen Bindung von c-di-GMP zeigte.

### 3.3.7.2 Gleichgewichtsdialyse

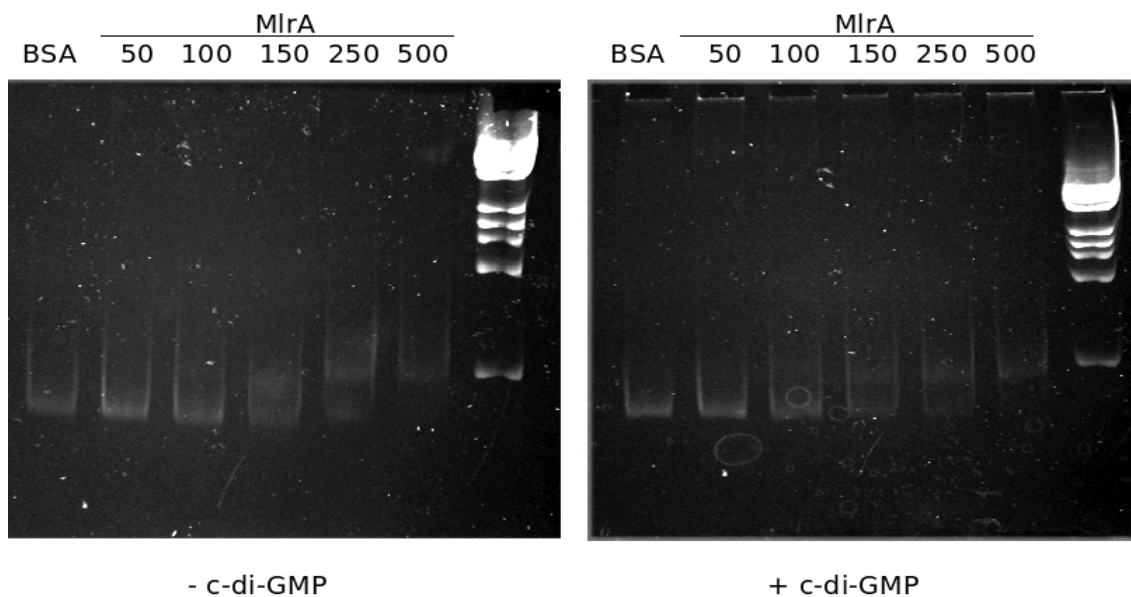
Mittels Gleichgewichtsdialyse konnte die Bindung von c-di-GMP an verschiedene PilZ-Proteine gezeigt werden (Ryjenkov et al., 2006). Der gleiche Ansatz wurde hier verfolgt, um die Bindung von c-di-GMP an MlrA zu untersuchen. Das Prinzip der Methode beruht auf der Ungleichverteilung von radioaktivem c-di-GMP zwischen zwei Dialysekompartmenten, wenn das eine Kompartiment mit c-di-GMP-bindendem Protein und das andere mit Puffer beschickt wird. Radioaktives c-di-GMP, aber nicht das Protein, kann frei zwischen den Kompartimenten wandern bis sich ein Gleichgewicht an freiem c-di-GMP zwischen den Kompartimenten ausgebildet hat. Falls das Protein nicht c-di-GMP bindet, dann befindet sich in beiden Kompartimenten die gleiche Absolutmenge an c-di-GMP. Handelt es sich aber um ein c-di-GMP-bindendes Protein, dann addiert sich im Proteinkompartiment die Menge an gebundenem c-di-GMP zur Menge an freiem c-di-GMP, welche als erhöhte Radioaktivität relativ zum Kompartiment ohne Protein nachgewiesen werden kann. Nach der Gleichgewichtsdialyse von 0,5 nM [ $^{32}$ P]-c-di-GMP (siehe Material und Methoden zur Herstellung von [ $^{32}$ P]-c-di-GMP) gegen Überschuß an MlrA wurde Gleichverteilung der Radioaktivität beobachtet (Abbildung 36), d.h. MlrA zeigte in diesem Assay keine signifikante Bindung von c-di-GMP. Allerdings konnte auch für die Positivkontrolle PleD\* keine Bindungsaktivität gezeigt werden, obwohl die Bindung von c-di-GMP durch PleD\* publiziert war und durch eigene Experimente (Abbildung 35) bestätigt werden konnte. Dies deutete darauf hin, daß die Versuchsbedingungen für die Gleichgewichtsdialyse nicht geeignet waren, um c-di-GMP-Bindung zu demonstrieren. Wahrscheinlich muß durch Variation des Dialysepuffers oder anderer Parameter der Assay zuerst optimiert werden.



**Abbildung 36:** Verteilung der Radioaktivität (CPM) nach der Gleichgewichtsdialyse von [ $^{32}$ P]-c-di-GMP gegen Ansätze mit gereinigtem MlrA, PleD\*, BSA und ohne Protein. 30  $\mu$ l Puffer mit ca. 0,5 nM [ $^{32}$ P]-c-di-GMP wurden übernacht gegen das gleiche Volumen von verschiedenen konzentrierten Proteinlösungen dialysiert. Anschließend wurde die Radioaktivität in den Dialysekompartmenten mit (weiße Balken) und ohne (schwarze Balken) Protein im Szintillator bestimmt.

### 3.3.7.3 Gelretardationsanalysen

Wie in vorhergehenden Gelretardationsexperimenten gezeigt, bindet MlrA an die DNA der stromaufwärts von *csgD* gelegenen DNA. Wenn MlrA und c-di-GMP sich wie ein typisches Aktivator-/Koaktivator-Paar verhielten, dann wäre erhöhte Affinität von MlrA zur *csgD* DNA in Gegenwart von c-di-GMP zu erwarten. Im Bandshift-Experiment sollte dann im Ansatz mit c-di-GMP im Vergleich zum Ansatz ohne c-di-GMP bei niedrigeren MlrA-Konzentrationen noch DNA-Bindung zu beobachten sein. Dies könnte dann als indirekter Nachweis der Bindung von c-di-GMP an MlrA betrachtet werden. Aufgrund dieser Überlegung wurden Bandshiftexperimente mit MlrA durchgeführt und dabei Ansätze mit und ohne c-di-GMP miteinander verglichen. Die Zugabe von c-di-GMP zeigte keinen Einfluß auf die Bindung von MlrA an die *csgD* DNA (Abbildung 37). Sowohl der Ansatz mit als auch der Ansatz ohne c-di-GMP zeigen die untere Grenze 100 ng MlrA für die Bindung an 50 ng DNA. Damit konnte auch mit der Bandshiftanalyse keine Bindung von c-di-GMP an MlrA gezeigt werden.



**Abbildung 37:** Gelretardationsanalyse mit MlrA und dem 'center' PCR-Fragment (siehe Abbildung 30), abgeleitet aus der stromaufwärts von *csgD* gelegenen DNA Region. Verschiedene Mengen MlrA (zwischen 50 und 500 ng) wurden mit 50 ng DNA und mit oder ohne 25  $\mu$ M c-di-GMP inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit nichtdenaturierender PAGE getrennt und mit Ethidumbromid gefärbt.



## 3.4 Die Säurestreßantwort ist ein regulatorisches Modul im $\sigma^S$ -Netzwerk

### 3.4.1 Säureresistenzgene bilden eine Untergruppe im $\sigma^S$ -Regulon

Bereits vor dieser Arbeit war bekannt, daß die Gene der Glutamat-abhängigen Säurestreßantwort *gadA* und *gadBC* unter  $\sigma^S$ -Kontrolle stehen (De\_Biase et al., 1999). Die Globalanalyse des  $\sigma^S$ -Regulons zeigte aber, daß weitere Säureresistenzgene (Tucker et al., 2002, Tucker et al., 2003)  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden (Tabelle 7).

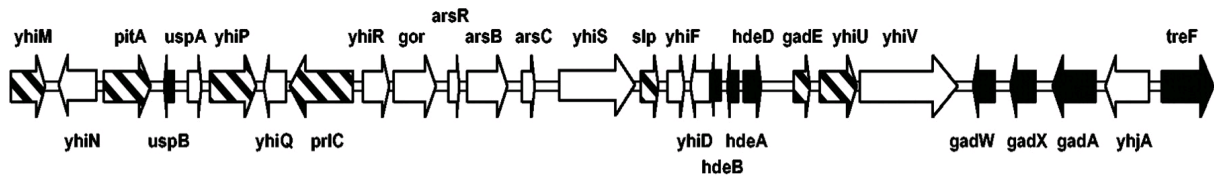
**Tabelle 7:**  $\sigma^S$ -Abhängigkeit von Säureresistenzgenen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio			
		OD 4	NaCl	pH 5	
<i>gadA</i>	b3517	Glutamate decarboxylase A, isozyme, PLP dependent	32,38	5,80	2,33
<i>gadB</i>	b1493	Glutamate decarboxylase, PLP dependent, isozyme <i>bea</i>	16,44	3,96	2,22
<i>gadC</i>	b1492	Putative glutamate gamma-aminobutyric acid antiporter (APC family)	10,28	3,48	2,22
<i>hdeA</i>	b3510	Conserved protein with protein HNS-dependent expression	11,26	9,16	1,65
<i>hdeB</i>	b3509	Conserved hypothetical protein	6,61	4,46	1,28
<i>hdeD</i>	b3511	Putative membrane protein	2,52	2,07	1,27
<i>slp</i>	b3506	Outer membrane protein, induced after carbon starvation	3,68	2,79	1,08
<i>ybaS</i>	b0485	predicted glutaminase	14,05	9,46	2,70
<i>yhiM</i>	b3491	conserved inner membrane protein	7,76	2,50	2,37
<i>gadE</i>	b3512	Transcriptional regulator for <i>gadABC</i> operon, activates glutamate decarboxylase-dependent acidresistance	13,06	8,68	1,14
<i>gadW</i>	b3515	Transcriptional regulator for GadX (regulatory protein), glutamic acid decarboxylase (GadA, -B), and glutamate transport protein (GadC)	6,12	5,98	3,09
<i>gadX</i>	b3516	Transcriptional regulator for glutamic acid decarboxylase and transporter ( <i>gadA</i> , <i>gadBC</i> )	6,09	7,45	3,14

Ratio: relative mRNA Level *rpoS*<sup>+</sup>/*rpoS*<sup>-</sup>; OD4: Übergang in die stationäre Phase in LB Medium; NaCl: hyperosmotischer Streß in Minimalmedium; pH5: Säurestreß in LB Medium. Alle Ratios stellen die Durchschnittswerte aus drei biologisch unabhängigen Microarrayanalysen dar. Siehe auch Abschnitt 3.1.2.

Diese Gene befinden sich überwiegend auf einem chromosomalen Bereich, der auch als 'fitness island of acid adaptation' (Hommals et al., 2004) bezeichnet wird (Abbildung 38). In dieser Region liegt auch *gadE*, welches den zentralen Regulator der Säurestreßantwort codiert (Ma et al., 2003b). Mit der vorliegenden Arbeit wurde auch zum ersten mal experimentell gezeigt, daß *gadE* ein  $\sigma^S$ -abhängiges Gen ist. Es stellte sich die Frage, ob die Säurestreßgene alle unter direkter Kontrolle von  $\sigma^S$  stehen, oder in einer regulatorischen Kaskade organisiert sind, welche insbesondere von den Transkriptionsfaktoren GadX und

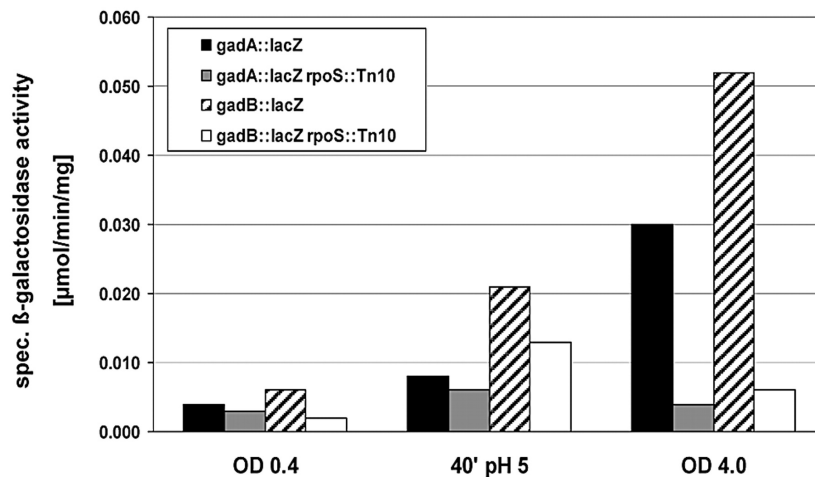
GadE gesteuert wird. Von GadX war bereits bekannt, daß es  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert wird und die Säurestressgene kontrolliert (Tramonti et al., 2002; Tucker et al., 2003). Für GadE war gezeigt, daß es der essentielle Regulator der Glutamat-abhängigen Säurestressantwort ist (Ma et al., 2003b). Wie ist der regulatorische Zusammenhang zwischen  $\sigma^S$ , GadX und GadE? Bilden diese drei Faktoren ein Subnetzwerk zur Kontrolle des Säurestressmoduls innerhalb der generellen Stressantwort? Wenn ja, wie sieht die Architektur dieses Subnetzwerkes aus?



**Abbildung 38:** Cluster auf dem *E. coli* Chromosom mit  $\sigma^S$ -abhängigen Säureresistenzgenen ('fitness island of acid adaptation'). Schwarze Pfeile stehen für Kerngene der generellen Stressantwort ( $\sigma^S$ -abhängig unter allen drei Bedingungen), gestreifte Pfeile für Gene die nur unter einer oder zwei Bedingungen  $\sigma^S$ -abhängig sind.

### 3.4.2 Expression und $\sigma^S$ -Abhängigkeit von *gadA/B* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

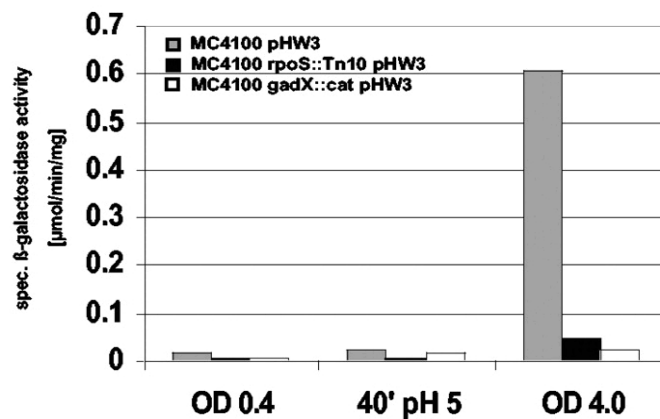
Die Ergebnisse der Microarrayanalyse zeigten, daß die Gene der Glutamatdecarboxylasen *gadA/B* nach 40 min Säurestress in der Logphase deutlich geringer  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert werden, als beim Übergang in die stationäre Phase (Tabelle 7). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die Expression von *gadA* und *gadB* spezifisch mit entsprechenden translationalen *lacZ*-Reporterfusionen bestimmt (Abbildung 39). Das Ergebnis der Microarrayanalyse bestätigte sich: Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *gadA/B*-Fusionen sind bei Säurestress in der Logphase deutlich weniger abhängig von  $\sigma^S$  als beim Übergang in die stationäre Phase. Dies wurde beobachtet bei gleichzeitig deutlichem Anstieg der Absolutaktivitäten nach Säurestress relativ zur ungestresten Kontrolle, wobei die Aktivität der *gadB* Fusion die der *gadA* Fusion deutlich überstieg. Unter Säurestressbedingungen in der Logphase ist die Expression von *gadA/B* also verstärkt von  $\sigma^{70}$ -abhängiger Transkription getrieben und weniger  $\sigma^S$ -abhängig. Dies kann als Effekt der spezifischen,  $\sigma^S$ -unabhängigen Säurestressantwort interpretiert werden. Wahrscheinlich erfolgt unter diesen Bedingungen die Aktivierung der Säurestressgene über eine Signalkaskade an der EvgAS und YdeO beteiligt sind. Dieser Signalweg operiert unabhängig von  $\sigma^S$  und kontrolliert ebenso die Säurestressgene (Masuda et al., 2003). Interessanterweise übersteigen die Absolutaktivitäten der *gadA/B* Fusionen in der stationären Phase die der säuregestresten Kulturen. Offensichtlich reicht ein moderater pH von 5 (relativ zu pH 2 im Magen) nicht aus, um die maximale Expression des Systems zu stimulieren. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, daß die Gene der Glutamat-abhängigen Säurestressantwort einer komplexen Regulation unterliegen, an der sowohl  $\sigma^S$ -abhängige als auch  $\sigma^S$ -unabhängige Mechanismen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen beteiligt sind.



**Abbildung 39:** Expression und  $\sigma^S$ -Abhängigkeit von *gadA* und *gadB* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Wildtypstämme JK86 (*gadA::lacZ*) (schwarz) und JK87 (*gadB::lacZ*) (gestreift) sowie deren isogenen *rpoS* Mutanten (grau und weiß) wurden in LB Medium in der Logphase (OD 0.4), nach 40 min Säurestress (40' pH 5) und beim Übergang in die stationäre Phase (OD 4.0) bestimmt.

### 3.4.3 GadE, der zentrale Regulator der Glutamat-abhängigen Säureresistenz, wird $\sigma^S$ - und GadX-abhängig exprimiert

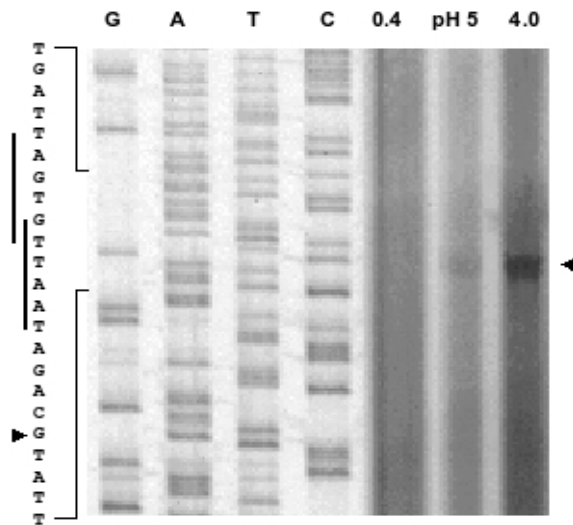
Nach den Ergebnissen der globalen Transkriptionsanalyse wird *gadE*, welches den zentralen Regulator der Glutamat-abhängigen Säurestressantwort codiert (Ma et al., 2003b), beim Übergang in die stationäre Phase deutlich  $\sigma^S$ -abhängig exprimiert (Tabelle 7). Aus der Literatur war bekannt, daß GadX unter Kontrolle von  $\sigma^S$  steht und die Expression der Säurestressgene aktiviert (Tramonti et al., 2002; Tucker et al., 2003). Aus diesen Daten ergab sich die Hypothese, daß eine Signalkaskade  $\sigma^S \rightarrow$  GadX  $\rightarrow$  GadE existiert, die womöglich das Rückgrat eines regulatorischen Moduls im  $\sigma^S$ -Netzwerk darstellt. Zur Überprüfung des Resultats der Microarrayanalyse, daß *gadE* ein  $\sigma^S$ -abhängiges Gen ist und um zu testen ob *gadE* in Abhängigkeit von GadX exprimiert wird, wurde die Aktivität einer transkriptionellen *gadE::lacZ*-Fusion in Abhängigkeit von  $\sigma^S$  und GadX untersucht (Abbildung 40). Weil das Konstrukt mit der *lacZ* Fusion in der chromosomalen Attachmentsite nur sehr schwache Signale lieferte, wurde die Fusion vom Plasmid gemessen. Beim Übergang in die stationäre Phase war ein starker Anstieg der *gadE::lacZ*-Aktivität zu beobachten und gleichzeitig war diese in den *rpoS* und *gadX* Mutanten drastisch vermindert. Damit wurde bestätigt, daß sowohl  $\sigma^S$  als auch GadX beim Übergang in die stationäre Phase die Expression *gadE* kontrollieren.



**Abbildung 40:** Expression,  $\sigma^S$ - und GadX-Abhängigkeit von *gadE* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen: Logphase (OD 0.4), 40 min Säurestreß in der Logphase (40' pH 5) und Übergang in die stationäre Phase (OD 4.0). Es wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität einer plasmidcodierten transkriptionellen *gadE::lacZ* Fusion (pHW3) im Wildtyp (grau), der *rpoS* (schwarz) und der *gadX* (weiß) Mutante gemessen.

### 3.4.4 Bestimmung des Transkriptionsstartes von *gadE*

Zum Nachweis des Transkriptionsstartes von *gadE* wurde eine Primerextension-Analyse mit RNA-Proben aus der logarithmischen Wachstumsphase, nach 40 min Säurestreß und beim Übergang in die stationäre Phase durchgeführt. Für die Probe aus der stationären Phase, aber nicht für die Probe aus der logarithmischen Phase und nach Säurestreß konnte ein Signal detektiert werden. Demnach befindet sich der Transkriptionsstart von *gadE* bei -121 Nukleotiden stromaufwärts vom *gadE*-Startcodon (Abbildung 41:). Die entsprechende -10 Region zeigt nur geringe Ähnlichkeit mit dem Konsensusmotiv 'TATAAT'. Der Transkriptionsstart von *gadE* wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestimmt. Dabei wurden von (Hommais et al., 2004) zwei Transkriptionsstartpunkte bei -92 und -125 gefunden, (Ma et al., 2004) bestimmten den Transkriptionsstart bei Nukleotid -21. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den distalen Transkriptionsstart von *gadE* bei -125 wie von (Hommais et al., 2004) gezeigt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeitsgruppen beruhen wahrscheinlich auf den verschiedenen experimentellen Bedingungen. Während in der vorliegenden Arbeit der Transkriptionsstart von *gadE* beim Übergang in die stationäre Phase in LB Medium untersucht wurde, untersuchten die beiden anderen Arbeitsgruppen M9 Minimalmediumkulturen in der Logphase, wobei (Hommais et al., 2004) aber mit einer *hms* Mutante gearbeitet haben. H-NS ist ein starker Repressor der  $\sigma^S$ -Aktivität und aus diesem Grund ist der von (Hommais et al., 2004) bei -125 gefundene Transkriptionsstartpunkt wahrscheinlich  $\sigma^S$ -kontrolliert und steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die anderen Transkriptionsstartpunkte (-92, -21) deuten möglicherweise auf alternative,  $\sigma^S$ -unabhängige Promotoren.



**Abbildung 41:** Bestimmung des Transkriptionsstartes (Primer Extension) von *gadE*. Die RNA wurde aus MC4100 mit plasmidcodierter *gadE::lacZ* Fusion präpariert. Folgende Wachstumsphasen wurden untersucht: Logphase (OD 0,4), 40 min Säurestress in der Logphase (pH 5) und Übergang in die stationäre Phase (OD 4,0). Das reverse Transkript und der Transkriptionsstart sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die putativen -10 Regionen sind durch vertikale Striche seitlich von der Gensequenz markiert.

### 3.4.5 Das System der Säureresistenzgene als regulatorisches Modul beim Übergang in die stationäre Phase

Die Regulatoren der Säureresistenz, GadX und GadE, sind  $\sigma^S$ -abhängige Gene. Gemeinsam mit  $\sigma^S$  bilden sie eine regulatorische Kaskade, welche die Expression der Gene der Glutamat-abhängigen Säureresistenz sowie weiterer Säureresistenzgene aktiviert (Tabelle 7). Diese regulatorische Triade stellte aber auch potentiell das Rückgrat eines umfassenderen Säurestressmoduls innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes dar. Es war durchaus denkbar, daß GadX und GadE im Kontext der generellen Stressantwort weitere Gene regulierten, welche unter den bis dato untersuchten Säurestressbedingungen nicht als GadX/GadE-abhängig in Erscheinung getreten waren. Es stellten sich die Fragen, a) ob weitere Gene  $\sigma^S$ -, GadX- und GadE-abhängig exprimiert werden und b) ob regulatorische Submodule existieren, d.h. Gruppen von Genen die nur GadX-abhängig, aber nicht GadE-abhängig bzw. GadX- und GadE-abhängig sind. Um das Säurestressmodul im  $\sigma^S$ -Netzwerk genauer zu definieren, wurden verschiedene globale Transkriptionsanalysen zum Einfluß der Regulatoren GadX und GadE beim Übergang in die stationäre Phase (LB Medium; OD 4,0) durchgeführt:

- MC4100 vs. MC4100 *gadX*<sup>-</sup>  
findet GadX-abhängige Gene
- MC4100 vs. MC4100 *gadE*<sup>-</sup>  
findet GadE-abhängige Gene

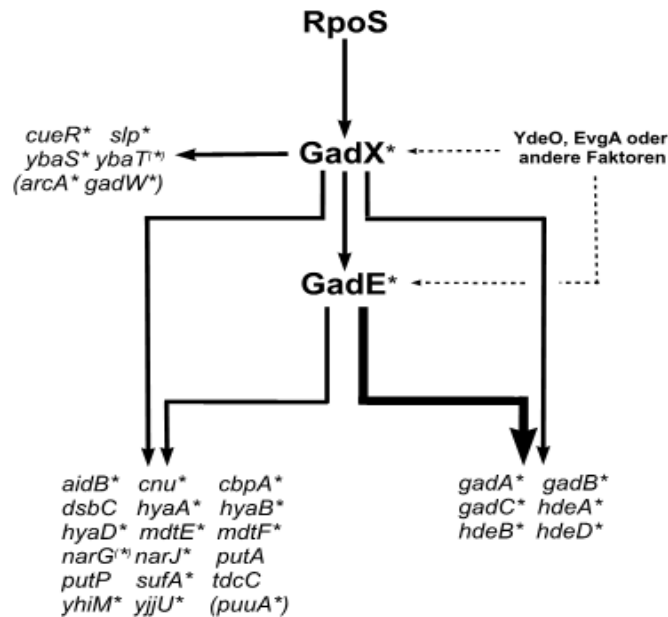
- MC4100 *gadX*<sup>-</sup> vs. MC4100 *gadX*<sup>-</sup> *gadE*<sup>-</sup>  
findet Gene, die auch im *gadX*<sup>-</sup> Hintergrund noch GadE-abhängig sind
- MC4100 *gadE*<sup>-</sup> vs. MC4100 *gadE*<sup>-</sup> *gadX*<sup>-</sup>  
findet Gene, die auch im *gadE*<sup>-</sup> Hintergrund noch GadX-abhängig sind

Insgesamt wurden 31 Gene identifiziert, die beim Übergang in die stationäre Phase in LB Medium GadX- und/oder GadE-abhängig exprimiert werden (Tabelle 8). Durch Kombination der Resultate aller Telexperimente konnten GadX/GadE-abhängigen Genen die Position im regulatorischen Säurestress-Modul zugewiesen werden. Folgende Gruppen von Genen sind unterscheidbar (Abbildung 42, Tabelle 8):

1. Gene, die GadX und GadE in gleichem Ausmaß benötigen: *aidB*, *cnu*, *cbpA*, *dsbC*, *hyaA*, *hyaB*, *hyaD*, *mdtE*, *mdtF*, *narG*, *narJ*, *putA*, *putP*, *sufA*, *tdcC*, *yhiM* und *yjjU*. Fällt bei diesen Genen einer der beiden Regulatoren weg, dann ist der andere nicht mehr ausreichend, um differentielle Regulation zu erzeugen. Diese Gene haben moderate und ähnliche hohe Ratios sowohl unter der Bedingung *gadX*<sup>+</sup>/*gadX*<sup>-</sup> wie auch unter *gadE*<sup>+</sup>/*gadE*<sup>-</sup> und stellen die größte Gruppe dar. Die Gene *hyaA* und *hyaB* sind auch im *gadE*<sup>-</sup>-Hintergrund noch schwach GadX-abhängig, was darauf hindeutet, daß bei diesen Genen der Einfluß von GadX gegenüber GadE überwiegt. Vorläufig werden dieser Gruppe auch *arcA* und *gadW* zugeordnet, die beide nur im *gadE*<sup>+</sup>, aber nicht im *gadE*<sup>-</sup> Hintergrund GadX-abhängig sind, was zunächst widersprüchlich erscheint und durch weitere Experimente geklärt werden muß.
2. Gene, die ebenfalls von GadE- und GadX reguliert werden, wobei der Einfluß von GadE sehr stark überwiegt (d.h. *gadE*<sup>+</sup>/*gadE*<sup>-</sup> Ratios >> *gadX*<sup>+</sup>/*gadX*<sup>-</sup> Ratios). Diese Regulation zeigen nur *gadA*, *gadB*, *gadC*, *hdeA*, *hdeB* und *hdeD* (*gadA* und *gadB* sind aufgrund fast identischer Nukleotidsequenz in der Microarrayanalyse nicht unterscheidbar und in Tabelle 8 durch die gleichen Meßwerte repräsentiert). Bei diesen Genen ist der Einfluß von GadE so stark, daß er selbst im *gadX*<sup>-</sup> Hintergrund deutlich (alle Ratios > 10, außer bei *hdeD*) erhalten bleibt. Gleichzeitig zeigen die Gene dieser Gruppe keine differentielle Regulation im *gadE*<sup>-</sup> Hintergrund, was dafür spricht, daß GadX keine direkte, sondern eine akzessorische Wirkung (Aktivierung der *gadE*-Expression, Stimulierung der GadE-Aktivität) bei der Aktivierung dieser Gene hat. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, daß Überexpression von GadX nicht den *gadE*<sup>-</sup> Phänotyp komplementieren kann und das GadE und GadX simultan in der *gadA* Promotorregion binden können (Ma et al., 2003b). Die GadX-unabhängige Wirkung von GadE deutet auf einen weiteren Mechanismus, der die *gadE* Expression beim Übergang in die stationäre Phase aktiviert. Möglicherweise handelt es sich dabei um EvgA und YdeO, welche als Aktivatoren von *gadE* beschrieben wurden (Ma et al., 2004). Es wäre auch denkbar, daß GadE teilweise GadX-unab-

hängig und durch  $\sigma^S$  alleine aktiviert wird, aber die Ergebnisse zur Expression von *gadE* (Abbildung 40) deuten darauf hin, daß eine  $\sigma^S$ -unabhängige Aktivierung von *gadE* beim Übergang in die stationäre Phase existiert.

3. Gene, die ausschließlich GadX- aber nicht GadE-abhängig exprimiert werden: *cueR*, *slp*, *ybaS* und *ybaT*. Das Gen *ybaS* wird ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet, da es stark GadX- aber nur schwach GadE-abhängig exprimiert wird und wahrscheinlich mit dem nur GadX-abhängigen *ybaT* ein Operon bildet.



**Abbildung 42:** Regulatorisches Modell des Säurestressmoduls im  $\sigma^S$ -Netzwerk (Gene mit '\*'), bzw. der GadX- und/oder GadE-abhängigen Gene (alle Gene) beim Übergang in die stationäre Phase in LB Medium. Pfeile zeigen positive Kontrolle durch den übergeordneten Regulator an. GadX und GadE werden möglicherweise auch  $\sigma^S$ -unabhängig durch YdeO, EvgA oder andere Faktoren aktiviert (gestrichelte Pfeile). Zwei verschiedene Gruppen von Genen stehen unter GadE-Kontrolle. Die Gene *aidB* etc. sind strikt GadX-abhängig, d.h. sie zeigen im *gadX*-Hintergrund keine *gadE*-Abhängigkeit. Die Gene *gadA* etc. sind deutlich GadX-abhängig, werden aber auf niedrigem Niveau GadX-unabhängig exprimiert (Tabelle 8). Beide Gruppen werden wahrscheinlich durch GadX im Sinne einer Feedforward-Schleife reguliert, d.h. diese Gene stehen sowohl unter direkter als auch indirekter (via GadE) Kontrolle durch GadX. Alle Gene der *gadA*-Gruppe zeigen überdurchschnittlich hohe GadE-Abhängigkeit auf (durch den fetten Pfeil angedeutet, Tabelle 8). Eine Gruppe von Genen (*cueR* etc.) ist nur GadX- aber nicht GadE-abhängig. Das Gen *ybaT* ist schwach GadE-, aber stark GadX-abhängig (Tabelle 8). Da es wahrscheinlich mit dem nur GadX-abhängigen Gen *ybaS* eine Transkriptionseinheit bildet, wurde es den nur GadX-abhängigen Genen zugeordnet. Gene mit '\*' gekennzeichnet sind  $\sigma^S$ -abhängig. Die Gene *narG* und *ybaT* zeigen Ratios für  $\sigma^S$ -Abhängigkeit knapp unterhalb der Signifikanzgrenze. Da sie mit Genen ein Operon bilden, welche  $\sigma^S$ -abhängig sind (*narJ* bzw. *ybaS*) werden sie auch den  $\sigma^S$ -abhängigen Genen zugeordnet ('\*' in Klammern). Die Gene *arcA*, *gadW* und *puuA* sind aufgrund widersprüchlicher Daten (Tabelle 8) vorerst nicht eindeutig einer Gruppe zuzuordnen und deshalb in Klammern gesetzt..

Die unterschiedliche Regulation der drei Gruppen könnte mit den GAD-Boxen vor den Promotoren der entsprechenden Gene in Zusammenhang stehen. Die GAD-Box ist eine 20 Basenpaare lange DNA-Konsensussequenz, die Bindestelle für GadX und GadE und wurde als aktivierende Komponente der *gadA/BC* Expression gefunden (Castanie-Cornet et al., 2001; Shin et al., 2001; Ma et al., 2003b). Die Anzahl und Affinität zu den Regulatoren GadX und GadE der vor einem Gen befindlichen GAD-Boxen, würden sein spezifisches Regulationsmuster definieren. So könnten sich beispielsweise vor den Genen der Gruppe 1 (*aidB* etc.) zwei unterschiedliche GAD-Boxen befinden, eine die spezifisch von GadX und eine andere die spezifisch von GadE erkannt wird. Nur die Bindung von GadX und GadE an ihre entsprechenden Boxen, aber nicht die Bindung eines einzelnen Faktors, würde die Expression des Zielgenes aktivieren. Vor den Genen der Gruppe 2 (*gadA* etc.) könnte sich eine essentielle GAD-Box befinden, welche die Aktivierung spezifisch durch GadE vermittelt, deren Wirkung aber durch eine weitere GadX-bindende Box verstärkt würde. Vor den Genen der Gruppe 3 (*cueR* etc.) würde sich eine GAD-Box befinden, die nur von GadX aber nicht von GadE genutzt werden kann. Tatsächlich befindet sich vor allen Genen der Gruppe 2 (*gadA* etc.), *yhiM* (Gruppe 1) sowie vor *ybaS* und *slp* (beide Gruppe 3) eine GAD-Box (Tucker et al., 2003). Auch vor *narG*, aber vor keinen weiteren Genen, konnte eine GAD-Box identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Bei Genen ohne offensichtliche GAD-Box könnte diese stark degeneriert sein, was auch die insgesamt schwächeren relativen Expressionsraten dieser Gene in der Microarrayanalyse relativ zu denen mit konservierten GAD-Boxen erklären würde.

Von allen 31 GadX/GadE-abhängigen Genen sind 27 Gene  $\sigma^S$ -abhängig (unter Einbeziehung von *gadA*, *narG* und *ybaT* [siehe die Erläuterungen in Abbildung 42, Tabelle 8]). Die Transkriptionsfaktoren GadX und GadE bilden zusammen eine regulatorische Binnenstruktur aus, unter deren Kontrolle die Expression von 26  $\sigma^S$ -abhängigen Genen steht. GadX und GadE, gemeinsam mit diesen 26 Genen, bilden ein regulatorisches Modul, das Säurestressmodul, im  $\sigma^S$ -Netzwerk (Abbildung 42). Vier weitere Gene (*dsbC*, *putA*, *putP*, *tdcC*) sind deutlich GadX/GadE-, aber nicht  $\sigma^S$ -abhängig .

**Tabelle 8:** Gene unter GadX- und/oder GadE-Kontrolle in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund.

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio				
		wt vs. <i>gadX</i>	<i>gadE</i> vs. <i>gadEX</i>	wt vs. <i>gadE</i>	<i>gadX</i> vs. <i>gadXE</i>	wt vs. <i>rpoS</i>
<i>aidB</i> b4187	isovaleryl CoA dehydrogenase	3,15	-	8,72	-	4,00
<i>arcA</i> b4401	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with ArcB or CpxA	2,99	-	-	-	3,01
<i>cbpA</i> b1000	curved DNA-binding protein, DnaJ homologue that functions as a co-chaperone of DnaK	2,76	-	6,91	-	3,77
<i>cnu</i> b1625	predicted regulator	4,60	-	3,75	-	3,56
<i>cueR</i> b0487	DNA-binding transcriptional activator	3,20	2,94	-	-	2,50

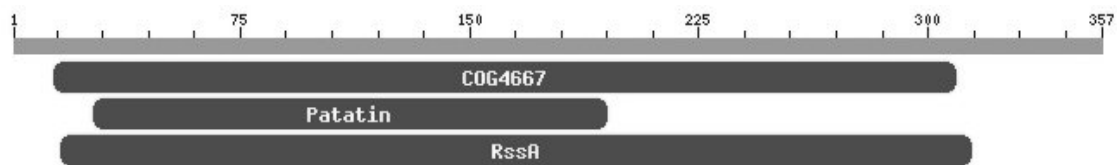


Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio					
		wt	<i>gadE</i>	wt	<i>gadX</i>	wt	
		vs. <i>gadX</i>	vs. <i>gadEX</i>	vs. <i>gadE</i>	vs. <i>gadXE</i>	vs. <i>rpoS</i>	
<i>dsbC</i>	b2893	protein disulfide isomerase II	3,10	-	4,58	-	-
<i>gadA/B</i> <sup>§</sup>	b1493	glutamate decarboxylase B, PLP-dependent	20,88	-	373,51	12,38	27,68
<i>gadC</i>	b1492	predicted glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter	20,11	-	305,83	11,82	20,94
<i>gadE</i>	b3512	DNA-binding transcriptional activator	18,33	-	[143,06]	[14,94]	14,50
<i>gadW</i>	b3515	DNA-binding transcriptional activator	3,55	-	-	-	7,97
<i>hdeA</i>	b3510	stress response protein acid-resistance protein	14,61	-	189,80	24,88	5,24
<i>hdeB</i>	b3509	acid-resistance protein	18,20	-	254,43	36,59	5,79
<i>hdeD</i>	b3511	acid-resistance membrane protein	9,39	-	54,65	5,16	7,90
<i>hyaA</i>	b0972	hydrogenase 1, small subunit	3,97	2,38	3,69	-	4,83
<i>hyaB</i>	b0973	hydrogenase 1, large subunit	2,31	2,24	3,37	-	2,38
<i>hyaD</i>	b0975	protein involved in processing of HyaA and HyaB proteins	2,25	-	3,49	-	3,34
<i>mdtE</i>	b3513	multidrug resistance efflux transporter	8,99	-	6,77	-	8,88
<i>mdtF</i>	b3514	multidrug transporter, $\sigma^S$ -dependent	5,59	-	3,56	-	4,00
<i>narG</i>	b1224	nitrate reductase 1, alpha subunit	3,56	-	3,77	-	-
<i>narJ</i>	b1226	molybdenum-cofactor-assembly chaperone subunit (delta subunit) of nitrate reductase 1	4,26	-	4,27	-	2,69
<i>putA</i>	b1014	fused DNA-binding transcriptional regulator -!- proline dehydrogenase -!- pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	23,37	-	7,82	-	-
<i>putP</i>	b1015	proline:sodium symporter	3,42	-	3,36	-	-
<i>puuA</i>	b1297	gamma-Glu-putrescine synthase	-	-	2,89	2,28	2,74
<i>slp</i>	b3506	outer membrane lipoprotein	45,71	40,50	-	-	10,83
<i>sufA</i>	b1684	Fe-S cluster assembly protein	2,33	-	3,24	-	26,19
<i>tdcC</i>	b3116	L-threonine/L-serine transporter	6,80	-	9,95	-	-
<i>ybaS</i>	b0485	predicted glutaminase	32,03	36,54	2,84	-	27,32
<i>ybaT</i>	b0486	predicted transporter	2,64	2,24	-	-	-
<i>yhiM</i>	b3491	conserved inner membrane protein	8,00	-	38,89	-	11,83
<i>yjjU</i>	b4377	predicted esterase	2,67	-	6,13	-	2,65

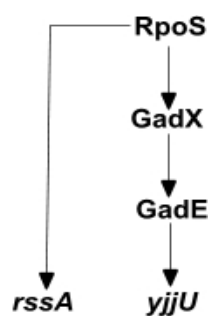
Ratio: relative mRNA Level. wt: Wildtyp. GadX-abhängige Gene (wt vs. *gadX*); GadX-abhängige, GadE-unabhängige Gene (*gadE* vs. *gadEX*); GadE-unabhängige Gene (wt vs. *gadE*); GadE-abhängige, GadX-unabhängige Gene (*gadX* vs. *gadXE*). Zusätzlich ist die RpoS-Abhängigkeit aller Gene angegeben (wt vs. *rpoS*). Die RpoS-Abhängigkeit wurde noch einmal mit dem gleichem Typ Microarrays wie für die *gadX/gadE*-Experimente bestimmt, um gleiche experimentelle Bedingungen für alle Experimente zu garantieren. Aus diesem Grund unterscheiden sich die hier angegebenen Ratiowerte für RpoS-Abhängigkeit von denen, die bei der globalen Transkriptionsanalyse zum RpoS-Regulon (siehe Abschnitt 1.1.2 „Circa 10% aller Gene in *E. coli* sind  $\sigma^S$ -abhängig“) ermittelt wurden. Die Werte für *gadB* stehen stellvertretend für *gadA* und *gadB*, da diese aufgrund fast identischer Nukleotidsequenz in der Microarrayanalyse nicht unterscheidbar sind. Relative Expressionslevel (Ratio) kleiner als 2,0 (nicht reguliert) wurden zur besseren Übersicht durch „-“ ersetzt. Alle Ratios sind Durchschnittswerte von zwei unabhängigen Microarrayanalysen. Alle Experimente wurden mit LB Kulturen bei OD = 4,0 durchgeführt. <sup>§</sup> Die Gene *gadA* und *gadB* können aufgrund fast identischer Nukleotidsequenz in der Microarrayanalyse nicht unterschieden werden.

### 3.4.6 YjjU ist eine RpoS-, GadX- und GadE-abhängige Patatin-ähnliche Phospholipase

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, ist die Expression von *yjjU* sowohl GadX- als auch GadE-abhängig. Darüber hinaus ist *yjjU* auch ein schwach  $\sigma^S$ -abhängiges Gen (nur bei OD 4, siehe die Liste im Anhang 1). YjjU ist vermutlich eine Phosphoesterase vom Patatintyp und hat Ähnlichkeit zu RssA. YjjU und RssA sind die beiden einzigen Patatin-ähnlichen Phospholipasen im Genom von *E. coli* K12. RssA ist ein stark  $\sigma^S$ -abhängiges Gen (siehe ) und eine Phospholipase mit hoher Substratspezifität für Phosphatidylglycerin (Dissertation von Maya Marquardt). Die Expression von Phospholipasen scheint damit ein weiteres Merkmal der generellen Streßantwort zu sein (Abbildung 44), allerdings bleibt deren biologische Bedeutung in *E. coli* K12 weiterhin unklar. Phospholipasen kontrollieren Signaltransduktionswege in eukaryontischen Zellen, möglicherweise spielen diese Enzyme eine ähnliche Rolle in *E. coli* (siehe dazu die Dissertation von Maya Marquardt).



**Abbildung 43:** Konservierte Domänen in YjjU. YjjU aligniert mit dem Konsensus der Domänen von vorhergesagten Esterasen der Superfamilie der alpha/beta-Hydrolasen (COG4667, von Patatin-ähnlichen Phospholipasen, sowie von RssA. Die Alignments beruhen auf der NCBI-BLAST-Analyse (blastp) von YjjU und der damit verknüpften Suche nach konservierten Domänen.



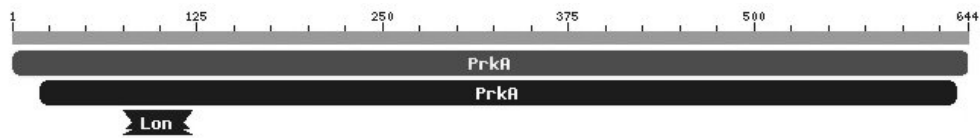
**Abbildung 44:** Phosphoesterasen vom Patatintyp im  $\sigma^S$ -Netzwerk. *RssA* steht unter direkter Kontrolle von  $\sigma^S$ , *yjjU* steht am Ende der regulatorischen Kaskade im  $\sigma^S$ -kontrollierten Modul der Säureresistenzgene.

### 3.5 Untersuchungen zu $\sigma^S$ -abhängigen Regulatoren

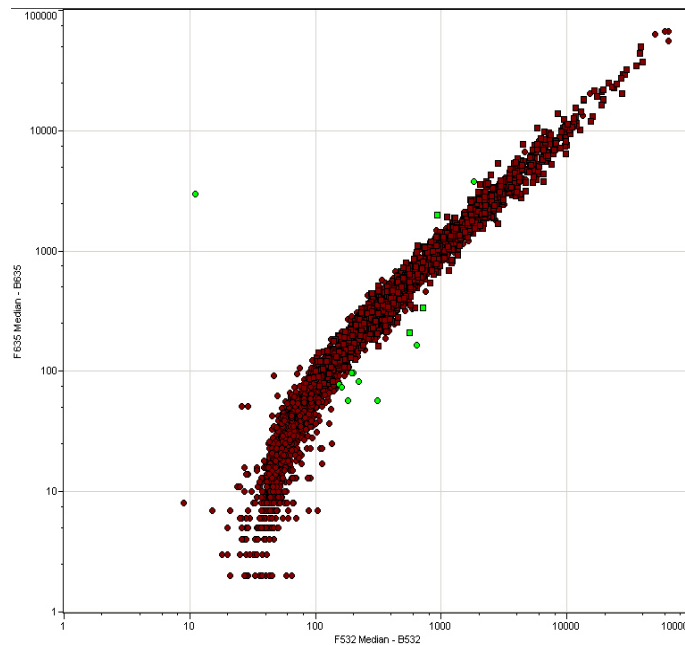
Unter den Genen aus der Microarrayanalyse zum  $\sigma^S$ -Regulon befanden sich u.a. drei Faktoren mit putativer regulatorischer Funktion: *yeaG*, *yjgH* und *yiaG*. Alle drei Gene sind Kerngene der generellen Streßantwort und zeigen hohe relative Expressionslevel in den Globalanalysen (Tabelle 1). Diese Gene stehen möglicherweise jeweils an der Spitze eines regulatorischen Moduls innerhalb des  $\sigma^S$ -Netzwerkes. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Mutantenstämme hergestellt und dann in der Microarrayanalyse mit dem Wildtyp MC4100 verglichen, um so die durch diese Regulatoren kontrollierten Gene zu identifizieren. Alle Untersuchungen wurden mit LB Kulturen beim Übergang in die stationäre Phase ( $OD_{578} = 4.0$ ) durchgeführt. Keiner der Mutantenstämme zeigte Wachstumseffekte oder morphologische Auffälligkeiten. Die Experimente wurden jeweils nur einmal durchgeführt und bedürfen einer Wiederholung zur Bestätigung der Ergebnisse. Erfahrungsgemäß können die Ergebnisse von Microarrayergebnissen großen Schwankungen unterliegen und solange keine Wiederholungsexperimente vorliegen, sollten die unten stehenden Ergebnisse nur mit Vorbehalt betrachtet werden. Aus diesem Grund werden in den nachfolgenden Abschnitten auch keine differentiell regulierten Gene weiter diskutiert. Für alle getesteten putativen Regulatoren galt, daß die Bedingungen unter denen ihre Genprodukte aktiv sind, nicht bekannt waren. Um unabhängig vom Stimulus die Targets ihrer Regulation zu identifizieren, könnten auch Globalanalysen mit Überexpressionskonstrukten dieser Gene durchgeführt werden. Dabei müßte aber das Risiko einkalkuliert werden, viele falsch positiv regulierte Gene zu identifizieren, da Überexpression von Regulatoren leicht zu pleiotropen Effekten führt.

#### 3.5.1 YeaG, eine putative Serin Proteinkinase

Das Gen *yeaG* codiert für eine putative Serinkinase (Abbildung 45). Proteinkinasen können auch in Bakterien regulatorische Funktionen auch auf Ebene der Genexpression zeigen, wie z.B. die Sensorkinasen von Zweikomponentensystemen. Insgesamt 12 Gene zeigten veränderte Genexpression in der Microarrayanalyse (Abbildung 46, Tabelle 9) von *yeaG*. Da die Effekte einer Proteinkinase nicht zwangsläufig auf der Transkriptionsebene liegen, wurden auch vergleichende Proteomanalysen mit der *yeaG* Mutante und dem Wildtyp unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie bei der Microarrayanalyse durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Die Proteomdaten ergaben keine weiteren Hinweise auf Gene deren Expression von YeaG kontrolliert wird, oder auf Proteine die durch YeaG phosphoryliert werden.



**Abbildung 45:** Konservierte Domänen in YeaG. Das Protein aligniert mit der Domäne von putativen Serin Proteinkinasen (PrkA). Ein kurzer Abschnitt aligniert mit der Domäne der Lon Protease (Lon). Die Alignments beruhen auf der NCBI-BLAST-Analyse (blastp) von YjjU und der damit verknüpften Suche nach konservierten Domänen.



**Abbildung 46:** Scatterplot der Microarrayanalyse von *yeaG*. Auf der x-Achse sind die Medianintensitäten von Genen der *yeaG* Mutante, auf der y-Achse die des Wildtyps aufgetragen. Braune Punkte stehen für Gene, die keiner differentiellen Regulation unterliegen, grüne Punkte zeigen differentiell regulierte Gene an (siehe hierzu Material und Methoden).

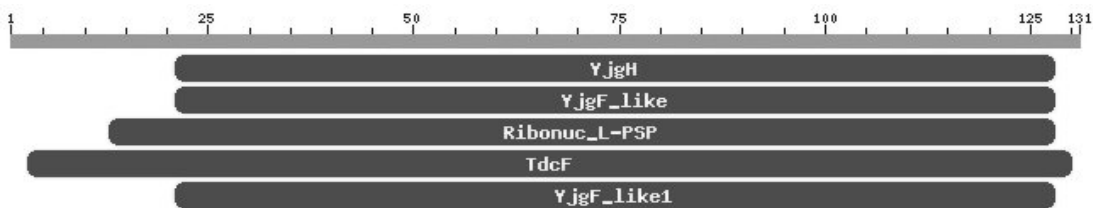
**Tabelle 9:** YeaG-abhängige Gene

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>yeaG</i> <sup>+</sup> / <i>yeaG</i> <sup>-</sup> )
<i>yeaG</i> b1783	orf, hypothetical protein; yeaG	[217,82]
<i>ybaY</i> b0453	glycoprotein/polysaccharide metabolism; ybaY	2,11
<i>cysG</i> b3368	uroporphyrinogen III methylase; sirohaeme biosynthesis; cysG	2,08
<i>ybfB</i> b0702	orf, hypothetical protein; ybfB	0,19
<i>ftsL</i> b0083	cell division protein; ingrowth of wall at septum; ftsL	0,26
<i>rnk</i> b0610	regulator of nucleoside diphosphate kinase; rnk	0,32
<i>yjiH</i> b4330	orf, hypothetical protein; yjiH	0,37
<i>goaG</i> b1302	4-aminobutyrate aminotransferase; goaG	0,46
<i>yjiG</i> b4329	orf, hypothetical protein; yjiG	0,47
<i>hybA</i> b2996	hydrogenase-2 small subunit; hybA	0,48
<i>hyaB</i> b0973	hydrogenase-1 large subunit; hyaB	0,49
<i>lplA</i> b4386	lipoate-protein ligase A; lplA	0,49

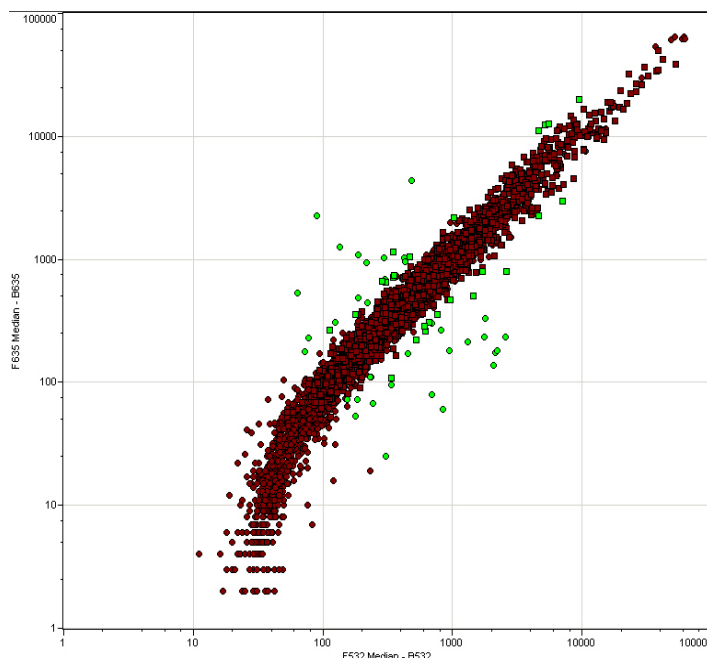
Ratio: relative mRNA Level *yeaG*<sup>+</sup>/*yeaG*<sup>-</sup>, gemessen von LB Kulturen bei OD = 4,0.

### 3.5.2 YjgH, eine putative mRNA Endoribonuclease

Das Gen *yjgH* codiert für eine putative mRNA Endoribonuclease vom Typ L-PSP (Abbildung 47). Eventuell werden von YjgH beim Übergang in die stationäre Phase bestimmte mRNAs abgebaut und dies sollte in der Microarrayanalyse Effekte zeigen. Insgesamt 61 Gene zeigten veränderte Genexpression in der *yjgH* Mutante (Abbildung 48, Tabelle 10). Da sich die Effekte von YjgH möglicherweise erst auf Translationsebene auswirken, wurde auch die *yjgH* Mutante mittels Proteomanalyse untersucht, aber es konnten auch hier keine differentiell exprimierten Proteine identifiziert werden.



**Abbildung 47:** Konservierte Domänen in YjgH. Ein Bereich von ca. 110 Aminosäuren aligniert zu 98% mit der Domäne von Endoribonucleasen vom Typ L-PSP. Die Domänen YjgH und YjgF\_like gehören zu einer großen Familie von Proteinen ohne definierte Funktion in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten. Die Domäne TdcF steht für putative Translationsinhibitoren. Die Alignments beruhen auf der NCBI-BLAST-Analyse (blastp) von YjgH und der damit verknüpften Suche nach konservierten Domänen.



**Abbildung 48:** Scatterplot der Microarrayanalyse von *yjgH*. Auf der x-Achse sind die Medianintensitäten von Genen der *yjgH* Mutante, auf der y-Achse die des Wildtyps aufgetragen. Braune Punkte stehen für Gene, die keiner differentiellen Regulation unterliegen, grüne Punkte zeigen differentiell regulierte Gene an (siehe hierzu Material und Methoden).

Tabelle 10: YjgH-abhängige Gene

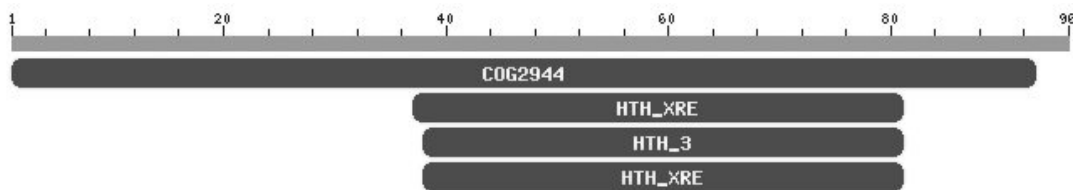
Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio (yjgH <sup>+</sup> /yjgH)
<i>putA</i> b1014	proline dehydrogenase, P5C dehydrogenase; putA	25,74
<i>yjgH</i> b4248	orf, hypothetical protein; yjgH	[9,43]
<i>flu</i> b2000	outer membrane fluffing protein, similar to adhesin; flu	8,98
<i>b2001</i> b2001	orf, hypothetical protein; b2001	8,36
<i>putP</i> b1015	major sodium/proline symporter; putP	5,90
<i>yjiH</i> b4330	orf, hypothetical protein; yjiH	4,33
<i>rpiR</i> b4089	transcriptional repressor of rpiB expression; rpiR	3,46
<i>yjcX</i> b4088	putative LACI-type transcriptional regulator; yjcX	3,30
<i>b2352</i> b2352	putative ligase; b2352	3,03
<i>fkpA</i> b3347	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase); fkpA	2,62
<i>yhdU</i> b3263	orf, hypothetical protein; yhdU	2,53
<i>asnA</i> b3744	asparagine synthetase A; asnA	2,49
<i>yjiG</i> b4329	orf, hypothetical protein; yjiG	2,45
<i>rseA</i> b2572	sigma-E factor, negative regulatory protein; rseA	2,42
<i>rpoE</i> b2573	RNA polymerase, sigma-E factor; heat shock and oxidative stress; rpoE	2,39
<i>lysA</i> b2838	diaminopimelate decarboxylase; lysA	2,36
<i>ygiM</i> b3055	orf, hypothetical protein; ygiM	2,33
<i>b2351</i> b2351	putative glycan biosynthesis enzyme; b2351	2,31
<i>mopB</i> b4142	GroES, 10 Kd chaperone binds to Hsp60 in pres. Mg-ATP, suppressing its ATPase activity; mopB	2,26
<i>yeiC</i> b2166	putative kinase; yeiC	2,25
<i>ansB</i> b2957	periplasmic L-asparaginase II; ansB	2,24
<i>htrA</i> b0161	periplasmic serine protease Do; heat shock protein HtrA; htrA	2,14
<i>yciD</i> b1256	putative outer membrane protein; yciD	2,11
<i>smpA</i> b2617	small membrane protein A; smpA	2,10
<i>b2595</i> b2595	orf, hypothetical protein; b2595	2,10
<i>cutC</i> b1874	copper homeostasis protein; cutC	2,07
<i>rplI</i> b4203	50S ribosomal subunit protein L9; rplI	2,03
<i>tdcD</i> b3115	putative kinase; tdcD	2,03
<i>ydbS</i> b1393	putative enzyme; ydbS	0,07
<i>b1394</i> b1394	putative enzyme; b1394	0,07
<i>ynbF</i> b1389	orf, hypothetical protein; ynbF	0,08
<i>b1391</i> b1391	orf, hypothetical protein; b1391	0,08
<i>ydbU</i> b1395	putative enzyme; ydbU	0,09
<i>ydbP</i> b1390	orf, hypothetical protein; ydbP	0,09
<i>goaG</i> b1302	4-aminobutyrate aminotransferase; goaG	0,12
<i>ydbO</i> b1388	orf, hypothetical protein; ydbO	0,13
<i>aldH</i> b1300	aldehyde dehydrogenase, prefers NADP over NAD; aldH	0,17
<i>b1392</i> b1392	putative oxidoreductase; b1392	0,19
<i>ordL</i> b1301	probable oxidoreductase; ordL	0,19
<i>b1396</i> b1396	orf, hypothetical protein; b1396	0,28
<i>ybfB</i> b0702	orf, hypothetical protein; ybfB	0,29
<i>b1297</i> b1297	putative glutamine synthetase (EC 6.3.1.2); b1297	0,31
<i>ydjS</i> b1744	orf, hypothetical protein; ydjS	0,32
<i>ycjJ</i> b1296	putative amino acid/amine transport protein; ycjJ	0,33
<i>b1397</i> b1397	putative acyltransferase; b1397	0,33
<i>b1747</i> b1747	orf, hypothetical protein; b1747	0,34
<i>b1398</i> b1398	orf, hypothetical protein; b1398	0,38
<i>flgJ</i> b1081	flagellar biosynthesis; flgJ	0,41
<i>cstC</i> b1748	acetylornithine delta-aminotransferase; cstC	0,42
<i>glcD</i> b2979	glycolate oxidase subunit D; glcD	0,43
<i>narU</i> b1469	nitrite extrusion protein 2; narU	0,43
<i>ycjC</i> b1299	orf, hypothetical protein; ycjC	0,44
<i>potG</i> b0855	ATP-binding component of putrescine transport system; potG	0,46
<i>b1745</i> b1745	orf, hypothetical protein; b1745	0,46

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $yjgH^+ / yjgH$ )
<i>ybhP</i> b0790	orf, hypothetical protein; ybhP	0,47
<i>fadA</i> b3845	thiolase I; 3-ketoacyl-CoA thiolase; acetyl-CoA transferase; fadA	0,47
<i>yjcG</i> b4067	putative transport protein; yjcG	0,49
<i>b1485</i> b1485	putative transport protein; b1485	0,49
<i>yjfQ</i> b2633	orf, hypothetical protein; yjfQ	0,49
<i>yehV</i> b2127	putative transcriptional regulator; yehV	0,49
<i>glcF</i> b2978	glycolate oxidase iron-sulfur subunit; glcF	0,49

Ratio: relative mRNA Level  $yjgH^+ / yjgH$ , gemessen von LB Kulturen bei OD = 4,0.

### 3.5.3 YiaG, ein putativer Transkriptionsregulator

Aufgrund eines Helix-turn-Helix Motivs (Abbildung 49) codiert *yiaG* für einen putativen Transkriptionsfaktor und ist aus diesem Grund ein ideales Target für die Microarrayanalyse. Insgesamt 122 Gene zeigten veränderte Genexpression in der *yiaG* Mutante (Tabelle 11, Abbildung 50), aber überwiegend nur knapp über der Signifikanzgrenze.



**Abbildung 49:** Konservierte Domänen (NCBI Blast). Ein Bereich von etwa 45 Aminosäuren (siehe Skala) aligniert zu ca. 80% mit konservierten Helix-turn-Helix Motiven (HTH\_XRE, HTH\_3). COG2944 steht für putative Transkriptionsregulatoren und aligniert mit ca. 90%. Die Alignments beruhen auf der NCBI-BLAST-Analyse (blastp) von YjyU und der damit verknüpften Suche nach konservierten Domänen.

**Tabelle 11:** YiaG-abhängige Gene

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( $yiaG^+ / yiaG$ )
<i>yeeR</i> b2001	CP4-44 prophage; putative membrane protein	12,19
<i>yiaG</i> b3555	putative transcriptional regulator with DNA-binding domain	11,26
<i>flu</i> b2000	CP4-44 prophage; phase-variable outer membrane-associated fluffing protein with pectin lyase-like domain	6,06
<i>eutJ</i> b2454	putative ethanolamine utilization protein	5,46
<i>yagF</i> b0269	CP4-6 prophage; putative dehydratase	5,15
<i>cysH</i> b2762	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) reductase	3,99
<i>parE</i> b3030	DNA topoisomerase IV, subunit B	3,44
<i>ybbN</i> b0492	putative protein prenyltransferase domain	3,41
<i>cysC</i> b2750	adenosine 5'-phosphosulfate kinase	3,35
<i>nohA</i> b1548	Qin prophage; packaging protein NU1	3,25
<i>yegD</i> b2069	putative heat shock protein (Hsp70 family), actin-like ATPase domain	3,16

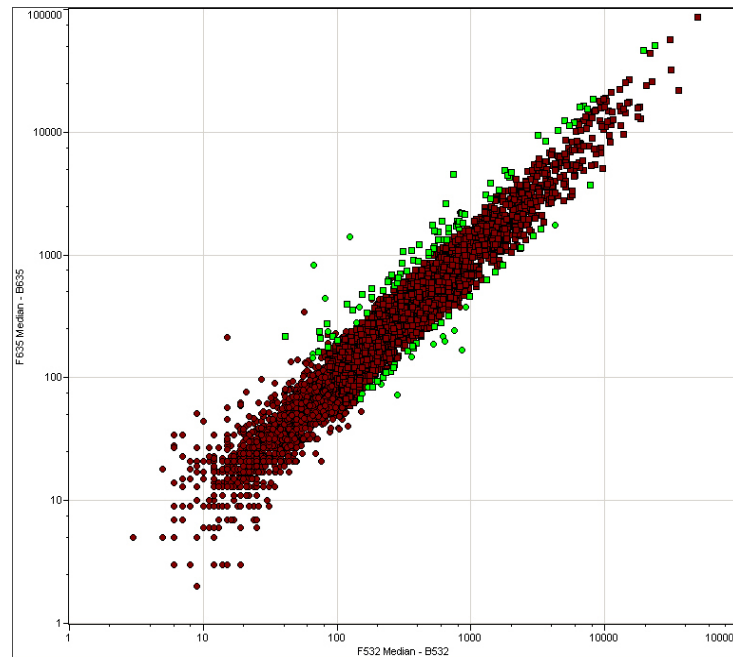
Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>yiaG</i> <sup>+</sup> / <i>yiaG</i> )
<i>ybiA</i>	b0798 conserved protein	3,08
<i>ftnA</i>	b1905 cytoplasmic ferritin (iron storage protein)	3,07
<i>osmC</i>	b1482 resistance protein, osmotically inducible	3,01
<i>nrdB</i>	b2235 ribonucleoside-diphosphate reductase 1, beta subunit	2,97
<i>ompW</i>	b1256 outer membrane protein W; colicin S4 receptor; putative transport protein	2,95
<i>ansB</i>	b2957 periplasmic L-asparaginase II	2,93
<i>cysJ</i>	b2764 sulfite reductase, alpha subunit (flavoprotein)	2,92
<i>fliY</i>	b1920 cysteine transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	2,79
<i>citX</i>	b0614 apo-citrate lyase phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase	2,79
<i>lysA</i>	b2838 diaminopimelate decarboxylase, PLP-binding	2,79
<i>yeeD</i>	b2012 conserved hypothetical protein with SirA-like domain	2,79
<i>cysU</i>	b2424 thiosulfate transport protein (ABC superfamily, membrane)	2,77
<i>arcC</i>	b0521 putative carbamate kinase-like protein	2,75
<i>manX</i>	b1817 PTS family enzyme IIA (N-terminal); enzyme IIB (C-terminal), mannose-specific	2,73
<i>rfaF</i>	b3620 ADP-heptose; LPS heptosyltransferase II	2,69
<i>ydiO</i>	b1695 putative acyl-CoA dehydrogenase (flavoprotein)	2,69
<i>ybbV</i>	b0510 unknown CDS	2,60
<i>ybaY</i>	b0453 glycoprotein/polysaccharide metabolism	2,60
<i>murF</i>	b0086 D-alanine:D-alanine-adding enzyme	2,59
<i>fre</i>	b3844 flavin reductase, FAD = preferred substrate	2,56
<i>yafV</i>	b0219 putative NAD(P)-binding amidase-type enzyme with nitrilase/N-carbamoyl-D-aminoacid amidohydrolase	2,53
<i>yneB</i>	b1517 putative aldolase with ribulose-phosphate binding barrel	2,48
<i>ygaE</i>	b2664 putative transcriptional repressor with DNA-binding Winged helix domain (GntR family)	2,47
<i>wrbA</i>	b1004 flavodoxin-like protein, trp repressor-binding protein	2,47
<i>cysN</i>	b2751 ATP-sulfurylase, subunit 1 (ATP:sulfate adenylyltransferase)	2,43
<i>ycjL</i>	b1298 putative protein with Class I glutamine amidotransferase function domain	2,40
<i>rbsB</i>	b3751 D-ribose transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	2,40
<i>ydgA</i>	b1614 conserved protein	2,39
<i>yeeX</i>	b2007 conserved protein	2,39
<i>glnH</i>	b0811 high-affinity glutamine transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	2,38
<i>cydB</i>	b0734 cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit II	2,37
<i>pspE</i>	b1308 thiosulfate:cyanide sulfurtransferase (rhodanese), phage shock protein	2,37
<i>ribB</i>	b3041 3,4 dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase	2,35
<i>citT</i>	b0612 citrate:succinate antiporter (DASS family)	2,34
<i>sodB</i>	b1656 superoxide dismutase, iron	2,34
<i>ygaF</i>	b2660 putative enzyme	2,34
<i>ilvI</i>	b0077 acetolactate synthase III, valine-sensitive, large subunit	2,33
<i>ykgK</i>	b0294 putative transcriptional regulator	2,32
<i>nhaR</i>	b0020 transcriptional activator of cation transport (LysR family)	2,31
<i>yjbQ</i>	b4056 cell division protein	2,31
<i>yqhD</i>	b3011 putative alcohol dehydrogenase with dehydroquinone synthase-like domain	2,30
<i>csiE</i>	b2535 stationary phase-inducible protein with PTS-regulatory domain	2,27
<i>treC</i>	b4239 trehalose-6-P hydrolase, alternative inducer of maltose system, cytoplasmic	2,26
<i>gabP</i>	b2663 gamma-aminobutyrate transport protein, $\sigma^S$ -dependent (APC family)	2,25
<i>ybiK</i>	b0828 L-asparaginase	2,25
<i>ptsI</i>	b2416 PTS family enzyme I and Hpr components, PEP-protein phosphotransferase	2,24
<i>gmhB</i>	b0200 D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	2,23
<i>serC</i>	b0907 3-phosphoserine/phosphohydroxythreonine aminotransferase	2,21
<i>dnaE</i>	b0184 DNA polymerase III, alpha subunit	2,21
<i>ygdP</i>	b2830 nucleotide hydrolase, acts on adenosine(5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Nudix family)	2,20
<i>srIA</i>	b2702 PTS family enzyme IIC, glucitol/sorbitol-specific	2,19
<i>ydjN</i>	b1729 putative transport protein	2,19
<i>ycjK</i>	b1297 putative glutamine synthetase with N-terminal domain and glutamine synthase/guanidino kinase catalytic domain	2,18
<i>ccmF</i>	b2196 periplasmic heme lyase subunit with CcmH, transfers heme from CcmE to apocytochrome c, cytochrome c-type biogenesis	2,17



Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>yiaG</i> <sup>+</sup> / <i>yiaG</i> )
<i>ftnB</i>	b1902 putative ferritin-like protein	2,15
<i>tnaA</i>	b3708 tryptophan deaminase, PLP-dependent	2,15
<i>aphA</i>	b4055 non-specific acid phosphatase/phosphotransferase, class B	2,14
<i>yajQ</i>	b0426 conserved protein	2,12
<i>thrC</i>	b0004 threonine synthase	2,12
<i>yjdK</i>	b4128 unknown CDS	2,12
<i>cysD</i>	b2752 ATP-sulfurylase, subunit 2 (ATP:sulfate adenylyltransferase)	2,08
<i>yliA</i>	b0829 putative oligopeptide transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	2,08
<i>yneA</i>	b1516 putative sugar transport protein with periplasmic binding protein domain (ABC superfamily, peri_bind)	2,07
<i>yqjD</i>	b3098 conserved hypothetical protein	2,07
<i>malG</i>	b4032 maltose transport protein (ABC superfamily, membrane)	2,07
<i>coaE</i>	b0103 dephospho-CoA kinase	2,05
<i>astC</i>	b1748 succinylornithine transaminase, also has acetylnitine transaminase activity, PLP-dependent	2,04
<i>b1408</i>	b1408 putative enzyme	2,04
<i>pntB</i>	b1602 pyridine nucleotide transhydrogenase (proton pump), beta subunit	2,04
<i>atpD</i>	b3732 membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit	2,03
<i>pstS</i>	b3728 high-affinity phosphate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	2,01
<i>ompC</i>	b2215 outer membrane pore protein 1b (Ib;c)	2,00
<i>hrsA</i>	b0731 PTS family enzyme IIA (N-terminal); enzyme IIB (middle); enzyme IIC (C-terminal), induction of ompC	2,00
<i>gnsB</i>	b1550 Qin prophage; suppressor of cold/temperature-sensitive mutants, affects levels of unsaturated fatty acids, similar to GnsA	0,20
<i>bfd</i>	b3337 regulatory or redox component complexing with Bfr, in iron storage and mobility	0,26
<i>ivbL</i>	b3672 ilvB operon leader peptide	0,31
<i>yciF</i>	b1258 conserved protein	0,32
<i>ynaE</i>	b1375 Rac prophage	0,35
<i>yeaQ</i>	b1795 conserved hypothetical protein	0,36
<i>rpsJ</i>	b3321 30S ribosomal subunit protein S10	0,41
<i>yeeI</i>	b1976 conserved hypothetical protein	0,41
<i>sgaU</i>	b4197 L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase	0,41
<i>trpC</i>	b1262 bifunctional: indole-3-glycerolphosphate synthetase (N-terminal); N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase (C-terminal)	0,42
<i>ftsX</i>	b3462 integral membrane cell division protein	0,45
<i>paaB</i>	b1389 putative subunit of multicomponent oxygenase, phenylacetic acid degradation	0,45
<i>rseC</i>	b2570 regulator of sigma E (sigma 24) factor	0,45
<i>yhhN</i>	b3468 conserved hypothetical protein	0,46
<i>rhlB</i>	b3780 putative ATP-dependent helicase with nucleoside triP hydrolase domain	0,46
<i>yefG</i>	b2034 unknown CDS	0,47
<i>sfa</i>	b0991 suppresses fabA and ts growth mutation	0,47
<i>rplQ</i>	b3294 50S ribosomal subunit protein L17	0,47
<i>ypdC</i>	b2382 putative transcriptional regulator with homeodomain-like DNA binding domain (AraC/XylS family)	0,47
<i>ansA</i>	b1767 cytoplasmic L-asparaginase I	0,47
<i>sdaA</i>	b1814 L-serine deaminase I	0,47
<i>phoH</i>	b1020 PhoB-dependent, ATP-binding pho regulon component	0,48
<i>rpsG</i>	b3341 30S ribosomal subunit protein S7, initiates assembly	0,48
<i>ynaK</i>	b1365 Rac prophage	0,48
<i>b2350</i>	b2350 CPS-53 (KpLE1) prophage; putative integral membrane protein	0,48
<i>yicE</i>	b3654 putative purine/xanthine transport protein (NCS2 family)	0,48
<i>ygiZ</i>	b3027 conserved hypothetical protein	0,48
<i>yhdV</i>	b3267 unknown CDS	0,48
<i>ugpA</i>	b3452 sn-glycerol 3-phosphate transport protein (ABC superfamily, membrane)	0,48
<i>ymgA</i>	b1165 unknown CDS	0,49
<i>rpsP</i>	b2609 30S ribosomal subunit protein S16	0,49
<i>yccA</i>	b0970 putative transport protein (TEGT family)	0,49

Genname/ b-Nummer	Genprodukt	Ratio ( <i>yiaG</i> <sup>+</sup> / <i>yiaG</i> <sup>-</sup> )	
<i>yecM</i>	b1875	protein with structural homology to metal-binding isomerases and oxygenases	0,49
<i>glgS</i>	b3049	glycogen biosynthesis, <i>rpoS</i> -dependent	0,49
<i>ilvB</i>	b3671	acetolactate synthase I, large subunit, valine-sensitive	0,49
<i>moaC</i>	b0783	molybdenum cofactor biosynthesis protein C	0,49
<i>ybdJ</i>	b0580	conserved hypothetical protein	0,49

Ratio: relative mRNA Level *yiaG*<sup>+</sup>/*yiaG*<sup>-</sup>, gemessen von LB Kulturen bei OD = 4,0.



**Abbildung 50:** Scatterplot der Microarrayanalyse von *yiaG*. Auf der x-Achse sind die Medianintensitäten von Genen der *yiaG* Mutante, auf der y-Achse die des Wildtyps aufgetragen. Braune Punkte stehen für Gene, die keiner differentiellen Regulation unterliegen, grüne Punkte zeigen differenziell regulierte Gene an (siehe hierzu Material und Methoden).