

C-DI-GMP SIGNALTRANSDUKTION IN DER
REGULATION DER EXPRESSION DES
BIOFILMREGULATOR CSGD
IN *Escherichia coli*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

EINGEREICHT IM FACHBEREICH BIOLOGIE, CHEMIE, PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
SANDRA LINDENBERG

AUS BERLIN

2013

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen April 2009 und Juli 2013 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge
Institut für Biologie - Mikrobiologie
Freie Universität Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Kürsad Turgay
Institut für Mikrobiologie
Leibniz Universität Hannover

Tag der Disputation: 23.08.2013

Publikationen

Während dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E and Hengge R (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *Embo Journal* **32**(14):2001-14. doi: 10.1038/emboj.2013.120.

Tschowri N, Lindenberg S and Hengge R (2012). Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **85**(5):893–906. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08147.x.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Regine Hengge für die Möglichkeit bedanken, dieses spannende Thema in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Dazu haben sich mir durch ihre Anleitung oft neue Blickwinkel eröffnet, die auch für dieses komplexe Thema notwendig waren. Auch die Möglichkeit zur Teilnahme an Konferenzen waren eine tolle neue Erfahrung und dafür möchte ich ihr danken.

Bei Prof. Dr. Kürsad Turgay bedanke ich mich zum einen für die Begutachtung dieser Arbeit. Zum anderen bedanke ich mich auch für die vielen Anregungen und seine lockere Art, die auch ein Seminar häufig angenehmer machten.

Allen meinen Laborkollegen, die hier vielleicht auch nicht genannt sind, möchte ich mich generell für jegliche Hilfe bedanken, die ich bekommen habe und auch für die nette Zeit und Arbeitsumfeld, was einfach unbezahlbar ist. Und auch die vielen Gespräche und Diskussionen in der Teeküche brachten immer neue Perspektiven und werden mir bestimmt in Erinnerung bleiben. Ich danke Frau Wurm für ihre immer vorhandene Hilfsbereitschaft, besonders mit verwaltungstechnischen Aufgaben und ihre stetigen „Mitbringsel“ als Nervennahrung. Eberhard danke ich für seine fachliche Hilfe, wenn es um Proteinfragen ging und für seine immer währenden politischen oder geschichtlichen Anekdoten. Bei Alex bedanke ich mich vor allem für das morgendliche Animpfen und für das technische „Know-How“, auf das man sich verlassen konnte. Dazu waren ihre abenteuerlichen Reisen immer motivierend für mich. Bei Christine bedanke ich mich für ein stets offenes Ohr für die alltäglichen Probleme und Sorgen sowie bei Diego einfach nur, dass er in unser Labor gefunden hat. Mittlerweile weht auch ein frischer Wind in unserem Labor durch die „neue Generation“ mit Anja, Susi und Franzi. Besonders möchte ich mich aber bei Natalia als meiner direkten Laborpartnerin bedanken. Mit ihr konnte ich stets meine Frustrationen und Erfolge teilen und sie konnte mir immer gute Ratschläge erteilen. Auch werden unsere „Twilight“-Kinoausflüge unvergesslich bleiben. Und ich freue mich schon darauf, mit ihr wieder zusammen arbeiten zu dürfen.

Außerdem möchte ich noch meiner Familie und Freunden für jegliche Unterstützung und Verständnis danken. Und besonders meinem Freund Markus, der mir immer zur Seite stand und mir den Rücken frei gehalten hat, wenn ich mal wieder lange gearbeitet habe, möchte ich von ganzem Herzen danken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Regulation der bakteriellen Genexpression	5
1.1.1 Regulation über Transkriptionsfaktoren	8
1.1.2 Regulation durch MerR-Transkriptionsregulatoren	10
1.2 Die multizelluläre Lebensform im Biofilm	14
1.2.1 c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion	18
1.2.1.1 Die Synthese von c-di-GMP	20
1.2.1.2 Der Abbau von c-di-GMP	21
1.2.1.3 Degenerierte GGDEF- und EAL-Proteine	23
1.2.1.4 Effektoren der c-di-GMP Signaltransduktion	24
1.2.1.5 Spezifität des c-di-GMP Wirkmechanismus	27
1.2.2 Regulation der Curli- und Cellulose-Synthese	29
2 ZIELSETZUNG	33
3 MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Chemikalien und Materialien	35
3.2 Medien und Medienzusätze	36
3.2.1 Flüssig- und Festmedien	36

3.2.2	Medienzusätze	37
3.3	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	38
3.3.1	Bakterienstämme	38
3.3.2	Bakteriophagen	41
3.3.3	Plasmide	41
3.4	Mikrobiologische Techniken	44
3.4.1	Sterilisation	44
3.4.2	Kultivierung	44
3.4.3	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	44
3.4.4	Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten . .	44
3.4.5	Herstellung eines P1-Lysats	44
3.4.6	Transformation	45
3.4.7	P1-Transduktion	45
3.4.8	Motilitätsassay	45
3.5	Molekularbiologische Techniken	46
3.5.1	Isolation von Plasmid-DNA	46
3.5.2	TSS-Transformation	46
3.5.3	Isolation von genomischer DNA	46
3.5.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	46
3.5.5	Polymerasenkettenreaktion (PCR)	46
3.5.6	Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR	47
3.5.7	DNA-Primer	47
3.5.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	51
3.5.9	Agarosegelelektrophorese	51
3.5.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	52
3.5.11	Restriktionsverdau	52
3.5.12	Ligation	52
3.5.13	Herstellung elektrokompetenter Zellen	52
3.5.14	Elektroporation	52
3.5.15	Sequenzierungen	53
3.5.16	Herstellung chromosomaler <i>lacZ</i> -Reportergenfusionen	53

3.5.17	Herstellung chromosomaler Knockout-Mutationen durch Ein-Schritt-Inaktivierung	53
3.5.18	Herstellung chromosomaler Punktmutationen durch Zwei-Schritt-Mutagenese	54
3.5.19	Herstellung chromosomaler 3xFLAG-Tag-Epitope	54
3.5.20	Entfernung chromosomaler Resistenzkassetten	55
3.6	Biochemische Methoden	55
3.6.1	Proteinextraktion aus bakteriellen Zellkulturen	55
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.6.3	Coomassie-Färbung	56
3.6.4	Immunoblotanalyse (Western Blot)	56
3.6.5	Überexpression und Aufreinigung von Proteinen	57
3.6.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	59
3.6.7	Trypsin-In-Gel-Verdau	59
3.6.8	Chemischer Crosslink von Proteinen	60
3.6.9	Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA oder „Bandshift“)	60
3.6.10	<i>In vitro</i> Protein-Protein-Interaktionsstudien durch Co-Elution	61
3.6.11	Bakterieller Two-Hybrid Assay	61
3.6.12	Nachweis der Diguanylatzyklase-Aktivität	63
3.6.13	Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität	63
3.6.14	UV-crosslinking von Proteinen mit Nukleotiden	64
3.6.15	β -Galaktosidase-Aktivitätstests	64
3.7	Datenbanken und bioinformatische Analysen	65
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Zwei GGDEF/EAL-Module regulieren die Curli-Expression	67
4.1.1	Das YegE/YhjH-Modul reguliert über das YdaM/YciR-Modul die Curli-Expression	68
4.1.2	Das YdaM/YciR-Modul reguliert lokal die <i>csgD</i> -Transkription	72
4.1.3	Das YegE/YhjH-Modul reguliert posttranslational das YdaM/YciR-Modul	75

4.2	Bildet das YdaM/YciR-Modul einen ternären Komplex mit MlrA?	77
4.2.1	YciR bildet einen Komplex mit YdaM und MlrA	77
4.2.2	Die Komplexbildung von YdaM/YciR/MlrA erfolgt über multiple Domänenkontakte	80
4.3	Die Rolle von MlrA in der Curli-Expression	84
4.3.1	MlrA wird auf posttranslationaler Ebene reguliert	84
4.3.2	MlrA ist kein c-di-GMP Effektor	86
4.4	Charakterisierung und Funktion von YdaM	91
4.4.1	Die aktive Diguanylatzyklase bildet Dimere und Tetramere	91
4.4.2	Die Diguanylatzyklase-Aktivität von YdaM wird nicht durch c-di-GMP reguliert	94
4.4.3	YciR reguliert die Enzymaktivität von YdaM	97
4.4.4	YdaM-generiertes c-di-GMP ist nicht essentiell für die Curli-Expression	99
4.5	Charakterisierung und Funktion von YciR	101
4.5.1	YciR ist eine aktive 3'-Phosphodiesterase	102
4.5.2	Besitzt YciR Diguanylatzyklase-Aktivität?	105
4.5.3	Besitzt YciR eine 5'-Phosphodiesterase-Aktivität?	107
4.5.4	YciR wirkt als Inhibitor auf YdaM und MlrA	110
4.5.5	Die EAL-Domäne von YciR ist der Effektor für YegE-generiertes c-di-GMP	112
5	DISKUSSION	117
5.1	YciR ist das Verbindungsglied der global und lokal c-di-GMP-kontrollierten Curli-Expression	117
5.2	Ein dynamischer Komplex aus YdaM/YciR/MlrA reguliert die <i>csgD</i> -Transkription	120
5.3	YdaM aktiviert MlrA unabhängig von seinem Enzymprodukt	125
5.4	YciR ist der zentrale Schalter in der c-di-GMP abhängigen Curli-Expression .	128
5.5	Das Gesamtkonzept der c-di-GMP-abhängigen Curli-Expression	133
	LITERATURVERZEICHNIS	135

Abbildungsverzeichnis

1.1	Regulation durch MerR-Transkriptionsaktivatoren.	12
1.2	Struktur des an Kupfer gebundenen CueR-Dimers.	13
1.3	Stadien der Biofilmbildung.	17
1.4	Aufbau und Funktionsweise von c-di-GMP.	19
1.5	Das minimale c-di-GMP-Kontrollmodul.	24
1.6	Regulation der Motilität und Curli-Expression.	32
4.1	Integration vom YdaM/YciR- und YegE/YhjH-Modul in der Curli-Expression.	71
4.2	C-di-GMP Signaltransduktion in der Curli-Expression in Abhängigkeit von YdaM, YciR und MlrA.	73
4.3	YdaM beeinflusst nicht die Motilität von <i>E. coli</i>	74
4.4	Das YegE/YhjH-Modul reguliert nicht die Expression von YdaM und YciR.	76
4.5	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien von MlrA, YciR und YdaM.	79
4.6	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien zur Analyse der Domänen-Interaktionen von MlrA, YciR und YdaM.	83
4.7	Die Expression von MlrA wird nicht durch YdaM und YciR beeinflusst.	85
4.8	Bindung von MlrA an den <i>csgD</i> -Promotor unter Einfluss von YciR und YdaM.	85
4.9	Studien zur Bindung von c-di-GMP an MlrA.	88
4.10	Bedeutung der RxxD-Motive von MlrA für die Curli-Expression.	90
4.11	Diguanylatzyklase-Aktivität von YdaM und seinen Derivaten.	92
4.12	YdaM dimerisiert über die GGDEF-Domäne.	93
4.13	Einfluss des YegE/YhjH-Moduls auf die Curli-Expression in Abhängigkeit von YdaM und seinen konservativen Motiven.	95
4.14	Die Enzymaktivität von YdaM zeigt keine Produktfeedbackinhibition.	97
4.15	Einfluss von MlrA auf die Enzymaktivität von YdaM.	98
4.16	YciR inhibiert die c-di-GMP Synthese von YdaM.	99

4.17 YdaM-generiertes c-di-GMP ist nicht essentiell für die Curli-Expression. . . .	101
4.18 C-di-GMP-Bindung und Phosphodiesteraseaktivität von YciR und seinen Derivaten.	104
4.19 Studien zur Diguanylatzyklase-Aktivität von YciR.	106
4.20 Phosphodiesteraseaktivitäten von YciR in Abhängigkeit von GTP und c-di-GMP.	109
4.21 YciR inhibiert über seine GGDEF- und EAL-Domäne die Curli-Expression. . .	111
4.22 Die EAL-Domäne von YciR wird durch das YegE/YhjH-Modul reguliert. . . .	113
4.23 C-di-GMP verhindert eine Hemmung der YdaM-Enzymaktivität durch YciR.	114
5.1 Schema zur c-di-GMP-abhängigen Regulation der Curli-Expression.	134

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquelle	35
3.2	In dieser Arbeit verwendete Medienzusätze und ihre Konzentrationen.	37
3.3	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.	38
3.4	In dieser Arbeit verwendete Plasmide.	41
3.5	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.	47

Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A-site	active site (aktives Zentrum)
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basepaare
BTH	Bacterial Two-Hybrid
Cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
c-di-GMP	cyclisches di-Guanosin Monophosphat
cfu	colony forming units (Koloniebildende Einheiten)
Cm	Chloramphenicol
CTD	Carboxy-terminale Domäne
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
dest.	destilliert
DGC	Diguanylatzyklase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	1,4,-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
His DO	His dropout amino acid supplement
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
I-site	inhibitory site (inhibitorisches Zentrum)
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani Medium
m	milli

M	Molar
M9	Minimalmedium 9
MCS	multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n.d.	nicht definiert
NTD	Amino-terminale Domäne
N-terminal	Amino-terminal
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x [nm]
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PVDF	Polyvinylidenflourid
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
spec. β-gal.act.	spezifische β-Galaktosidase Aktivität
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Tn	Transposon
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Transformation Storage Solution
ÜN	über Nacht
UTR	untranslated region (nichttranslatierte Region von mRNAs)
V	Volt
WT (ggf. wt)	Wildtyp (wildtype)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wahl eines motilen oder sessilen Lebensstils erfolgt in gram-negativen Bakterien wie *E. coli* in Abhängigkeit des sekundären Botenstoffs c-di-GMP. Synthetisiert wird c-di-GMP durch Diguanylatzyklasen (DGC) und der Abbau erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDE). Erhöhte c-di-GMP Mengen in der Zelle stimuliert die Biofilmbildung, während niedrige Konzentrationen die Motilität fördern. Biofilme von *E. coli* benötigen u.a. die Synthese adhäsiver Curli-Fimbrien (bzw. Fasern) wie auch Cellulose.

Die Synthese der Curli-Fimbrien sowie der Cellulose-Matrix ist unter der Kontrolle des zentralen Biofilmregulators CsgD. Die Expression von CsgD erfolgt σ^S -abhängig mit Eintritt in die stationäre Wachstumsphase und unterliegt einer komplexen Regulation. Dabei ist die Transkription von *csgD* abhängig von zwei c-di-GMP-Kontrollmodulen, YegE/YhjH und YdaM/YciR. C-di-GMP, kontrolliert durch YegE (DGC) und YhjH (PDE), wirkt global und beeinflusst neben der *csgD*-Transkription auch die Motilität. Die aktive DGC YdaM und die aktive PDE YciR regulieren zusammen mit dem MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktor MlrA, der am *csgD*-Promotor bindet, hochspezifisch die *csgD*-Transkription.

Durch diese Arbeit wird deutlich, dass YdaM, YciR und MlrA Protein-Protein-Interaktionen über Multi-Domänenkontakte eingehen und vermutlich lokal in einem Proteinkomplex die *csgD*-Transkription regulieren. Innerhalb dieses Komplexes wirkt YdaM als direkter Aktivator von MlrA, während YciR als direkter Inhibitor von YdaM und MlrA eine vorzeitige Aktivierung von *csgD* verhindert.

Weiterhin zeigen *in vitro* und *in vivo* Analysen, dass YciR als konserviertes EAL-Protein eine neue Kategorie eines c-di-GMP-Effektors darstellt, das durch Wahrnehmung des zellulären c-di-GMP-Spiegels (generiert zunächst durch YegE, später auch durch YdaM) in seinen inhibitorischen Funktionen antagonisiert wird. YciR agiert somit als Verbindungsglied zweier seriell geschalteten c-di-GMP-Module (YegE/YhjH und YdaM/YciR). Dazu wird deutlich, dass die PDE-Aktivität von YciR zum Abbau von zellulärem c-di-GMP eine Schalterfunktion für die Aktivierung der *csgD*-Transkription darstellt. Dadurch nimmt

YciR die Rolle eines „Trigger“-Enzyms ein, das in Abhängigkeit seines Substrats die Genexpression reguliert.

Insgesamt zeigt diese Arbeit somit einen neuartigen Mechanismus innerhalb der c-di-GMP Signaltransduktion auf, bei dem das globale c-di-GMP-Signal, lokal verarbeitet und zu einer spezifischen, fein-regulierten Genexpression führt. Dabei wird zum ersten Mal das Prinzip des „Trigger“-Enzyms in Verbindung mit der c-di-GMP Signalverarbeitung gebracht und es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus eine wichtige Rolle bei lokalen Funktionsweisen von Signalmolekülen spielt.

SUMMARY

In gram-negative bacteria like *E. coli* the transition from a motile to a sessile 'lifestyle' is controlled by the second messenger c-di-GMP which is synthesized by diguanylate cyclases (DGC) and degraded by phosphodiesterases (PDE). In general, elevated levels of c-di-GMP in the cell favor bacterial biofilm formation whereas low concentrations stimulate motility. In *E. coli* biofilms, curli fimbriae and cellulose represent key adhesive and structural elements.

The synthesis of curli fibres and cellulose matrix is under the control of the central biofilm regulator CsgD. The expression of CsgD is σ^S -dependent and arises with entry into stationary growth phase underlying a complex regulation mechanism. Thereby, two c-di-GMP control modules, YegE/YhjH and YdaM/YciR, regulate *csgD* transcription. C-di-GMP controlled by YegE (DGC) and YhjH (PDE) acts globally in the cell and affects motility in addition to *csgD*. In cooperation with the MerR-like transcription factor MlrA, which binds to the *csgD* promoter, the active DGC YdaM and the PDE YciR regulate *csgD* transcription in a highly specific manner.

This work provides evidence, that the proteins of YdaM, YciR and MlrA interact with each other via multiple domain contacts and probably regulate transcription of *csgD* as a local protein complex. Within this complex YdaM acts as a direct activator of MlrA, whereas YciR inhibits YdaM and MlrA to prevent an early curli induction.

Additionally, *in vitro* and *in vivo* analysis show that the conservative EAL domain protein YciR represents a new category of a c-di-GMP effector, which is antagonized in its inhibitory role by sensing the cellular c-di-GMP level (generated first by YegE and later on by YdaM). Thus, YciR acts as a connector or mediator of two serial arranged c-di-GMP modules (YegE/YhjH and YdaM/YciR). By degrading the cellular c-di-GMP the PDE activity of YciR presents the turning point for activation of *csgD* transcription. Consequently, YciR takes on a role as a 'trigger' enzyme, which regulates gene expression in dependance on its substrate.

Altogether, this work shows for the first time a mechanism of c-di-GMP signal transduction, where a global c-di-GMP signal is locally integrated and processed resulting

SUMMARY

in a specific and hypersensitive gene expression. With this study the principle of a trigger enzyme has been introduced into the c-di-GMP signalling field which has probably great importance in local second messengers functions.

1 EINLEITUNG

1.1 Regulation der bakteriellen Genexpression

Die Anpassungsfähigkeit von Bakterien an diverse Umweltbedingungen erfordert die Detektion von Veränderungen in ihrer Umwelt und eine entsprechend schnelle Adaption des Metabolismus durch Veränderung der Genexpression.

Bakterien nehmen über membrangebundene und intrazelluläre Sensoren sowie durch deren Transportsysteme ihre Umgebungsbedingungen wahr. Diese Sensoren sind mit komplexen Signaltransduktionswegen und regulatorischen Netzwerken verbunden. Dadurch können Signale von außen in die Zelle geleitet werden und es kann durch eine fein aufeinander abgestimmte Genexpression eine Anpassung von Stoffwechsel, zellulärer Differenzierung und Verhaltensweisen an veränderte Bedingungen erfolgen.

Die Wahrnehmung von intra- und extrazellulären Signalen und Weiterleitung an Effektoren ist der Prozess der Signaltransduktion. Der Signalinput erfolgt meist durch Bindung von Liganden resultierend in einer Konformationsänderung im Protein, das durch Modifizierung (wie Phosphorylierung, Methylierung oder Dimerisierung) eine Transduktion des Signals bewirkt. Signaltransduktionssysteme können bspw. Zwei-Komponenten-Systeme (Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren), Chemotaxis-Rezeptoren, Adenylat- oder Diguanylatzyklen bzw. Phosphodiesterasen sein [Galperin, 2004, 2005].

Der Output kann schließlich durch Veränderung der enzymatischen Aktivität oder durch Veränderung der Genexpression erfolgen. Dabei können ganze Netzwerke angeschaltet werden, wobei hier eine Integration von Signalen auf vielen Ebenen stattfinden kann, das eine hochspezifische Anpassung des Expressionsmusters als Reaktion auf unterschiedlichste Veränderungen in der Umgebung gewährleistet.

Die Regulation der Genexpression kann über transkriptionale Initiation, translationale und post-translationale Mechanismen auf Ebene der Synthese oder Stabilität erfolgen.

Die zentrale Komponente für die Transkriptionsinitiation ist die RNA-Polymerase (RNAP), die über die Assoziation mit einem Sigmafaktor ein Holoenzym bildet. Dabei ist der Sigmafaktor für die spezifische Promotorerkennung, zur Positionierung der RNAP am Promotor und zum Entwinden der DNA in der Nähe des Transkriptionsstartpunkt verantwortlich [Browning & Busby, 2004].

Generell gewährleisten Sigmafaktoren die Anpassung der Genexpression an Stresssituationen und spezifische Umweltbedingungen. *E. coli* exprimiert insgesamt sieben solcher Sigmafaktoren, den vegetativen Sigmafaktor σ^{70} und sechs weitere alternative Sigmafaktoren: σ^S (RpoS) als Masterregulator der generellen Stressantwort, den flagellaren Sigmafaktor σ^{28} (FliA oder σ^F), den Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} , σ^E als Sigmafaktor für Stresssignale der Zellhülle, σ^N für Stickstoffstress und als letztes σ^{FecI} für den Eisentransport [zusammengefasst in Helmann, 2011].

Neben dem vegetativen Sigmafaktor σ^{70} ist σ^S von besonderer Wichtigkeit, da nachweislich etwa 500 Gene in *E. coli* (das entspricht ca. 10 % des Genoms) unter der direkten oder indirekten Kontrolle von σ^S stehen. Davon sind etwa 140 Gene vermutlich direkt durch die Akkumulation von σ^S betroffen, während die restlichen Gene unter zusätzlicher Regulation stehen [Weber *et al.*, 2005]. Außerdem hatte sich gezeigt, dass σ^S zu dem vegetativen Sigmafaktor σ^{70} nahe verwandt ist, weshalb durch beide auch ähnliche Promotoren erkannt werden [Hengge, 2011b; Typas *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2005].

Die generelle Stressantwort durch σ^S wird mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wie auch durch diverse Stresssignale wie Nährstoffmangel, hohe Zelldichte, niedrige und hohe Temperaturen, hohe Osmolarität, saurer pH, oder UV-Strahlung und Kohlenstoffmangel induziert.

Das beruht auf der Wahrnehmung und Transduktion dieser Stresssignale, die einen Einfluss auf die Expression von *rpoS* auf transkriptionaler, translationaler Ebene sowie der Proteolyse von σ^S ausüben [zusammengefasst in: Hengge, 2009b, 2011b]. Dabei spielt die Proteolyse von RpoS eine besonders wichtige Rolle für eine schnelle Anreicherung in der Zelle, um somit auch eine schnelle Anpassung der Genexpression zu bewirken [Hengge, 2011b].

Die σ^S -exprimierten Genprodukte beeinflussen schließlich den Stoffwechsel, die Zellform, Motilität, Virulenz und die Biofilmbildung. Dazu werden als Präventivmaßnahme auch

multiple Resistenzen („cross-protection“) entwickelt [zusammengefasst in: Hengge, 2011b].

Ein wichtiges σ^S -Netzwerk ist das der Curli-Expression und Cellulose-Synthese, die wichtig für die Biofilmbildung in bspw. *E. coli* und *Salmonella* sind [Hengge, 2011a; Römling, 2005]. Dies soll im späteren Verlauf näher beschrieben werden (siehe Kapitel 1.2).

Neben den Sigmafaktoren spielt auch die Verpackung der DNA durch „Supercoiling“, sowie durch Interaktion mit Proteinen und RNA eine Rolle für die Genexpression. In *E. coli* verändern Nukleoid-assoziierte Proteine wie Fis („factor for inversion stimulation“), IHF („integration host factor“), H-NS („histone-like nucleoid-structuring proteins“) und Dps („DNA-protein from starved cells“) die Struktur der DNA und folglich auch die Genexpression [Azam & Ishihama, 1999; McLeod & Johnson, 2001]. Generell binden diese Proteine meist unspezifisch oder schwach spezifisch an die DNA. Bei einigen Promotoren sind mehrere Nukleoid-assoziierte Proteine vorhanden und beeinflussen so in Abhängigkeit zu ihrer Bindungsstelle die Transkription über Aktivierung oder Repression [Browning & Busby, 2004].

Eine weitere und immer bedeutender werdende Regulation der Genexpression ist die durch kleine RNA (sRNA). Diese können die Stabilität der mRNA oder Zugänglichkeit für Ribosomen beeinflussen. Genauso können sRNA die Aktivität von Proteinen regulieren [Chambers & Sauer, 2013; Gottesman & Storz, 2011; Storz *et al.*, 2011].

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die auch als Regulatoren der Genexpression gelten, sind die sog. „Trigger“(Schalter)-Enzyme [Commichau & Stülke, 2008]. Diese Art von Proteinen sind bifunktionale Enzyme, die in Abhängigkeit ihrer Enzymaktivität die Genexpression durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder Protein-DNA/RNA-Interaktion regulieren. Dabei wurden vier Klassen beschrieben: i) Enzyme, die über eine DNA-Bindedomäne in Abwesenheit des Substrats als Repressor agieren; ii) Aconitasen, die Eisen-wahrnehmende Elemente in Abwesenheit von Eisen binden, um Gene für die Eisen-Homöostase zu regulieren; iii) Zuckerpermeasen des Phosphotransferasesystems, die die Aktivität von Transkriptionsregulatoren durch Phosphorylierung (bei Abwesenheit des Substrats) kontrollieren; iv) Enzyme, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch inhibitorische Protein-Protein-Interaktion regulieren [Commichau & Stülke, 2008] Ein Beispiel wäre das Protein PutA in *E. coli*, das in Abwesenheit seines Substrates Prolin in einem oxidierten Zustand vorliegt und dadurch

an die DNA als Repressor bindet, das die Transkription der *put*-Gene verhindert. Mit Anwesenheit von Prolin liegt PutA in einem reduzierten Zustand vor und lokalisiert sich assoziiert an der Membran, so dass der *put*-Promotor frei wird zur Transkription [Ostrovsky de Spicer & Maloy, 1993].

Im Folgenden soll der wichtigste Regulationsmechanismus der Genexpression in Bakterien besprochen werden, der durch Transkriptionsfaktoren erfolgt.

1.1.1 Regulation über Transkriptionsfaktoren

E. coli kodiert mehr als 300 Transkriptionsfaktoren, die als Repressoren oder Aktivatoren agieren [Browning & Busby, 2004; Madan Babu & Teichmann, 2003; Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000; Seshasayee *et al.*, 2011]. Diese können als globale Regulatoren viele Gene kontrollieren (wie z.B. CRP [Fic *et al.*, 2009; Gosset *et al.*, 2004]) oder sehr spezifisch für nur ein oder zwei Gene sein [Browning & Busby, 2004]. Generell besitzen Transkriptionsfaktoren zumeist ein DNA-bindendes Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) und haben dazu noch eine sensorische Domäne [Seshasayee *et al.*, 2011].

Transkriptionsfaktoren selbst unterliegen oft einer Regulation ihrer Aktivität durch: i) kleine Liganden (z.B. Lac-Repressor wird inaktiviert durch Allolactose [Lewis, 2013]), ii) durch kovalente Modifikation (z.B. durch Phosphorylierung einer Receiver-Domäne wie bei NarL [Bijlsma & Groisman, 2003; Stock *et al.*, 2000]), iii) die Konzentration des Transkriptionsfaktors (z.B. SoxS [Dempfle, 1996]), iv) die Regulation des Transkriptionsfaktors durch Protein-Protein-Interaktion [Browning & Busby, 2004; Lee *et al.*, 2012].

Transkriptionsaktivatoren erhöhen die Affinität des Promotors für die RNA-Polymerase (RNAP). Die Aktivierung kann über einen einzelnen Faktor erfolgen und wird dann als simple Aktivierung betitelt. Diese kann über drei Klassen erfolgen [zusammengefasst in Browning & Busby, 2004; Lee *et al.*, 2012]. Bei der Klasse I Aktivierung bindet der Transkriptionsfaktor stromaufwärts der -35-Region und rekrutiert die RNAP. Bei der Klasse II überlappt die Bindung mit der -35-Region, so dass hier eine Interaktion mit dem Sigmafaktor oder anderen Domänen des RNAP-Holoenzym resultiert. Die Klasse III erfolgt über die Konformationsänderung der Zielpromotor-DNA, um eine Bindung der RNAP zu stimulieren. Dazu binden die Faktoren sehr nahe an die Promotorregion. Das kommt bspw.

bei MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren vor, die später noch genauer erläutert werden (siehe Kapitel 1.1.2).

Die Transkriptionsregulation kann auch über simple Repression erfolgen, der die Transkriptionsinitiation des Zielpromotors herabsetzt. Auch hier werden drei Mechanismen beschrieben [zusammengefasst in Browning & Busby, 2004; Lee *et al.*, 2012]. Der erste Mechanismus erfolgt über eine sterische Hinderung der RNAP durch Bindung des Repressors in oder nahe der Kernpromotorelemente. Ein zweiter Mechanismus verhindert nicht die Bindung der RNAP, aber interferiert (bspw. über Bildung einer DNA-Schleife durch vielfache Bindung von Repressormolekülen an distalen Regionen) mit der Transkriptionsinitiation (z.B. *gal*-Promotor [Weickert & Adhya, 1993]). Ein weiterer Mechanismus erfolgt über die Anti-Aktivierung, bei der der Repressor den Aktivator durch Protein-Protein-Interaktion inaktiv hält (z.B. CytR interagiert mit CRP und verhindert so eine Aktivierung [Shin *et al.*, 2001]).

Da viele Promotoren durch mehr als einen Transkriptionsfaktor reguliert sind, kann auch ein vielfältigerer Signalinput stattfinden. Generell zeigte sich, dass bei Regulation durch mehrere Transkriptionsfaktoren ein Zusammenspiel von globalen und spezifischen Regulatoren vorhanden ist [Browning & Busby, 2004]. Ein Beispiel wäre hier der *lac*-Promotor, der durch den globalen Regulator CRP über das globale Signal des Glucosemangels und durch den spezifischen Lac-Repressor über das spezifische Metabolit Allolactose reguliert wird [Wilson *et al.*, 2007].

Etwas komplizierter ist die Regulation durch mehrere Transkriptionsfaktoren, wobei hier vier Mechanismen beschrieben werden: i) Repositionierung eines Aktivators, bei der ein sekundärer Aktivator den primären (schlecht positionierten) Aktivator neu positioniert (z.B. Repositionierung von MalT durch CRP am *malK*-Promotor [Richet *et al.*, 1991]) oder bei der der sekundäre Aktivator die DNA biegt, so dass der primäre Aktivator Kontakt mit der RNAP herstellen kann; ii) unabhängige Aktivator-RNA-Polymerase-Kontakte, bei der zwei Aktivatoren unabhängig voneinander Kontakt mit der RNAP eingehen (d.h. hier sind unterschiedliche Aktivierungsklassen sowie verschiedene Signale miteinander kombiniert); iii) kooperative Aktivatorenbindung, bei der ein Aktivator nur in Abhängigkeit von einem weiteren Aktivator an den Promotor bindet; iv) Anti-Repression durch einen Aktivator, bei der ein sekundärer Aktivator mit reprimierenden Nukleoid-Proteinen interferiert, um eine

Aktivierung durch den primären Aktivator zu fördern [zusammengefasst in Browning & Busby, 2004; Lee *et al.*, 2012].

Bedeutend für diese Arbeit sind die MerR-ähnlichen Faktoren, die im Folgenden näher besprochen werden sollen.

1.1.2 Regulation durch MerR-Transkriptionsregulatoren

MerR-ähnliche Proteine sind zytoplasmatische Transkriptionsregulatoren, die Umgebungsstimuli wie oxidativen Stress, Hardmetalle oder Antibiotika wahrnehmen und einen Schutzmechanismus aktivieren. Dabei kommen sie nur in Eubakterien und nicht in Archaeen oder Eukaryoten vor [Brown *et al.*, 2003].

Benannt ist diese Proteinfamilie nach dem Transkriptionsfaktor MerR aus *Pseudomonas aeruginosa* [Brown *et al.*, 1983; Stanisich *et al.*, 1977]. Typischerweise bestehen diese Proteine aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH), gefolgt von einer Dimerisierungshelix zur Ausbildung einer antiparallelen „coiled-coil“-Struktur im Dimer, und einer C-terminalen Effektor-Domäne zur Bindung von Liganden [Changela *et al.*, 2003]. Die N-terminale Domäne sowie die Dimerisierungshelix sind charakteristisch für diese Proteinfamilie, während die C-terminale Domäne sehr variabel sein kann [Brown *et al.*, 2003]. Generell binden MerR-Regulatoren als Klasse III-Aktivatoren in der verlängerten Spacer-Region eines suboptimalen Promotors (optimal sind 17 bp). Die Bindung des Apo-MerR-Regulators hat selbst keine Aktivierung zufolge und kann sogar reprimierend sein. Die Transkriptionsaktivierung erfolgt erst mit Bindung eines Liganden, der eine Konformationsänderung im Protein und damit auch topologische Veränderungen der DNA bewirkt, so dass die Bindung der RNAP mit den Promotorelementen stimuliert wird (Abb. 1.1) [Brown *et al.*, 2003; Browning & Busby, 2004]. D.h. MerR-Transkriptionsfaktoren sind generell an die DNA gebunden, das eine schnelle Reaktion auf einen Liganden ermöglicht [Brown *et al.*, 2003; Hobman, 2007]. Dabei können unterschiedliche Affinitäten für die Promotorbindung je nach Apo- oder Liganden-gebundene Holo-Form vorliegen [Andoy *et al.*, 2009].

Eine Untergruppe sind die Metall-sensorischen MerR-Regulatoren, die direkt Metall-Ionen binden. In Bakterien sind diese Transkriptionsfaktoren wichtig, um die Expression von Genen zur Metall-Ionen-Homöostasis und für Efflux-Systeme zu regulieren. Dabei wird

der intrazelluläre Spiegel für die jeweiligen Metalle reguliert, um toxische Reaktionen zu vermeiden [Hobman, 2007].

Für die Familienbezeichnung verantwortlich ist das Protein MerR, das charakteristisch für diese Untergruppe ist [zusammengefasst in Brown *et al.*, 2003]. Es bindet Quecksilber-Ionen (Hg^{2+}), wodurch die Transkription des *mer*-Operons reguliert ist, dessen Genprodukte für die Resistenz von Quecksilber notwendig sind [Lund & Brown, 1989]. Dabei ist dieser Regulator hypersensitiv für Hg^{2+} und kann die Resistenzgene aktivieren, bevor annähernd eine Zelltoxizität erreicht wird [Ralston & O'Halloran, 1990]. Dabei aktiviert MerR die Expression von einem periplasmatischen Quecksilber-Chaperon (MerP), einem inneren Membranprotein (MerT oder MerP) als Kanal sowie von einer zytoplasmatischen Quecksilber-Reduktase (MerA), die Quecksilber-Ionen zu einem weniger toxischen Produkt reduziert. Neben den Genen der Detoxifizierung reguliert MerR auch seine eigene Expression [Brown *et al.*, 2003; Hobman *et al.*, 2005]. Die *mer*-Promotorregion ist gekennzeichnet durch einen ungewöhnlich langen Spacer zwischen der -35- und -10-Region (19 bp im Vgl. zu optimalen 17 bp). Das Apo-MerR bindet als Dimer innerhalb dieser Spacer-Region und rekrutiert den σ^{70} -RNAP-Komplex zum Promotor, aber reprimiert gleichzeitig die Transkription durch eine Biegung der DNA (Abb. 1.1). Sobald drei essentielle Cystein-Reste (Cys82, Cys117, Cys126) innerhalb des MerR Dimers in einer trigonalen Anordnung durch Hg^{2+} koordiniert werden, erfolgt durch das Hg-MerR-Dimer eine allosterische Unterwindung der DNA, so dass die -35- und -10-Region repositioniert wird und durch das RNAP-Holoenzym für die Transkriptionsinitiation gebunden werden kann [Ansari *et al.*, 1992, 1995; Helmann *et al.*, 1990].

Generell konnte beschrieben werden, dass MerR-Regulatoren, die divalente Metalle wahrnehmen, ein essentielles Cystein in der MerR-äquivalenten Cys82-Position in einer Gelenk-Region besitzen, während MerR-Regulatoren, die monovalente Metalle binden, ein Serin-Rest an dieser Position kodieren. Die Bindung des Metall-Ions in dieser Gelenkregion der C-terminalen Domäne ist verantwortlich für die Konformationsänderung des Proteins und somit wichtig für die Rearrangierung der Promotorregion [Changela *et al.*, 2003; Checa *et al.*, 2007; Hobman *et al.*, 2005].

E. coli hat insgesamt fünf solcher MerR-ähnlichen Regulatoren: SoxR, CueR, ZntR, YcgE und MlrA [Brown *et al.*, 2003].

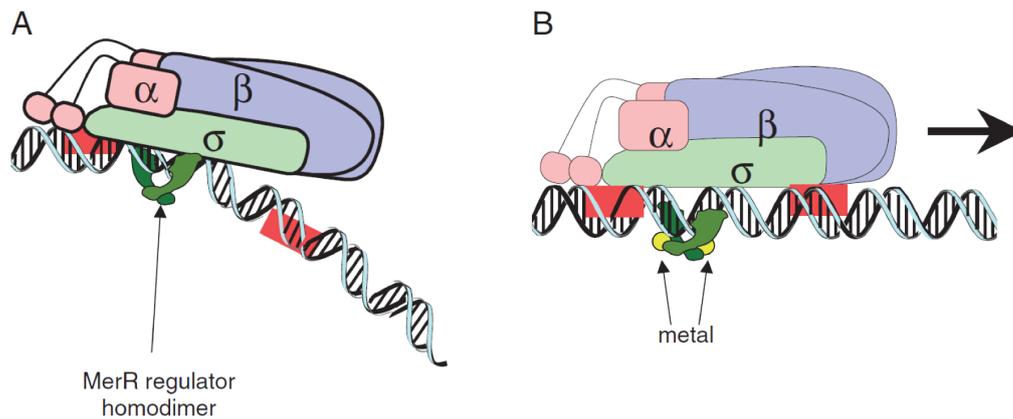


Abb. 1.1: Regulation durch MerR-Transkriptionsaktivatoren. A. Der MerR-Transkriptionsfaktor bindet als Homodimer innerhalb einer verlängerten Spacer-Region zwischen der -35 und -10-Promotorregion, und rekrutiert das RNAP-Holoenzym. Durch die Bindung des Apo-MerR-Regulators erfolgt eine leichte Biegung der DNA, so dass der Kontakt mit der RNAP verhindert wird. B. Durch Bindung des entsprechenden Metall-Ions an den Transkriptionsfaktor erfolgt eine topologische Änderung der DNA durch eine Konformationsänderung im Holo-MerR Protein und ermöglicht den Kontakt der RNAP zur Promotorregion für die Transkriptionsinitiation. [aus Hobman, 2007]

Der SoxR-Regulator ist Teil des SoxR/SoxS-Regulons für oxidativen Stress [Dempfle, 1996; Pomposiello & Dempfle, 2001]. SoxR aktiviert die Expression von SoxS, der wiederum die Expression von weiteren Genen des Regulons aktiviert und zur Stressbewältigung führt. Dabei hat der *soxS*-Promotor einen suboptimalen, aber essentiellen Spacer (19 bp) [Hidalgo *et al.*, 1998]. SoxR bildet ein Dimer, wobei jedes Monomer ein [2Fe-2S]-Cluster beinhaltet, das in Anwesenheit von Superoxid oder Nitritoxid zu $[\text{Fe}^{3+}\text{-Fe}^{3+}]$ oxidiert wird und Konformationsänderungen verursacht, die in der Transkriptionsaktivierung von SoxS resultieren. Die Bindung von Fe an Apo-SoxR erfolgt hier durch Cysteine im Motiv $\text{Cx}_2\text{Cx}_5\text{C}$ und ähnelt der effektorischen Position von MerR [Pomposiello & Dempfle, 2001].

CueR und ZntR sind auch Metall-bindende Regulatoren und dem MerR-Protein am ähnlichsten. ZntR bindet dabei Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , das in der Expressionsaktivierung der Efflux-ATPase ZntA resultiert [Brocklehurst *et al.*, 1999]. Auch hier ist der Promotor mit einer 20 bp langen Spacer-Region suboptimal und wird durch das ZntR-Homodimer gebunden. Dabei hat ZntR fünf Cysteinreste, von denen drei in der Position homolog zu den an der Hg^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäuren von MerR (Cys82, Cys117 und Cys126) sind. Insgesamt binden zwei Zink-Ionen (bzw. Cadmium oder Blei) an jeweils ein Monomer und verursachen im ZntR-Dimer eine Konformationsänderung und topologische Änderung der DNA, die zur Aktivierung der Transkription führt [Changela *et al.*, 2003].

CueR aktiviert die Expression einer Kupfer/Silber/Gold-Efflux ATPase (CopA) und einer

Kupferoxidase (CueO) [Outten *et al.*, 2000]. Die Röntgenkristallstruktur konnte für CueR bereits beschrieben werden und zeigt die typische Konformation eines MerR-Regulators (Abb. 1.2) [Changela *et al.*, 2003]. Dabei besteht die Dimerisierungsdomäne hier aus einer langen α -Helix mit zehn Windungen, die durch antiparallele Zusammenlagerung mit dem zweiten Monomer eine „coiled-coil“ Struktur bildet. Das Metall-Ion wird durch zwei konservierte Cysteinreste in der C-terminalen Domäne gebunden. CueR ist hochsensitiv für Kupfer-Ionen und reagiert bereits im Zeptomolarbereich, d.h. auf weniger als 1 Atom pro Zelle [Changela *et al.*, 2003].

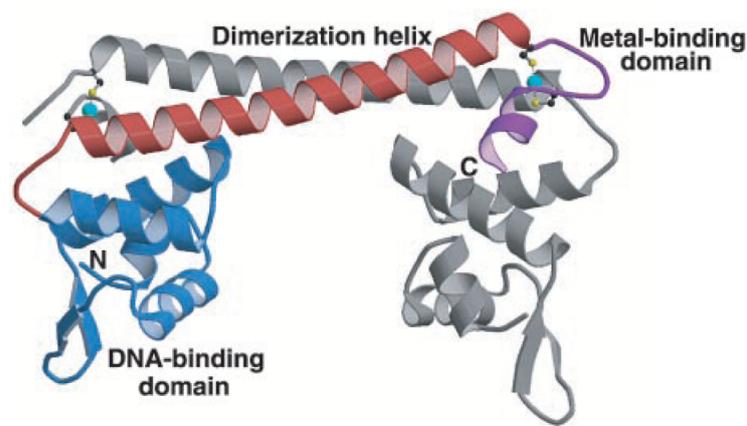


Abb. 1.2: Struktur des an Kupfer gebundenen CueR-Dimers. Ein Monomer ist farblich dargestellt mit der DNA-Bindedomäne in blau, der Dimerisierungshelix in rot und der C-terminalen Metall-bindenden Domäne in violett. Das zweite Monomer ist in grau dargestellt. Die Bindung der Kupfer-Ionen (hellblaue Kugeln) an die Cysteinreste Cys112 und Cys120 ist hervorgehoben. [aus Changela *et al.*, 2003]

Zwei weitere und sehr ähnliche MerR-ähnliche Regulatoren in *E. coli* sind YcgF (BluR) und MlrA. Beide Proteine sind zu 49 % identisch und vielmehr hat es sogar den Anschein, dass YcgE aus einer Genduplikation von MlrA entstanden ist [Tschowri *et al.*, 2012]. Dabei agiert YcgE als Repressor in der Promotorregion von Genen, die kleine Proteine kodieren (YcgZ, YmgABC), die unter Blaulicht und niedrigen Temperaturbedingungen die Curli-Synthese hemmen und die Kolansäuresynthese stimulieren. Die Bindestelle von YcgE ist dabei überlappend mit der Spacer- und -35-Region. YcgE bindet keine Liganden, sondern wird durch Protein-Protein-Interaktion antagonisiert. Das erfolgt über seine N-terminale DNA-Bindedomäne, die durch Interaktion mit dem Protein YcgF in seiner DNA-Bindung gehindert wird [Tschowri *et al.*, 2009]. Der Mechanismus der Anti-Repression ist hier somit anders als es für MerR-ähnliche Regulatoren üblich ist.

MlrA ist ein essentieller Aktivator für die Curli-Synthese in *E. coli* wie auch *Salmonella*

[Brown *et al.*, 2001]. Man konnte dabei bereits die Bindestelle für MlrA am Promotor von *csgD* nachweisen [Ogasawara *et al.*, 2010b; Pesavento, 2011], dessen Genprodukt für die Curli- und Cellulose-Synthese notwendig ist und somit die Biofilmbildung reguliert (siehe Kapitel 1.2.2) [Brombacher *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2001; Römling *et al.*, 2000]. Die Bindestelle von MlrA liegt dabei etwa 80 bp stromaufwärts vor der -35- und -10-Region [Ogasawara *et al.*, 2010b; Pesavento, 2011] und ist damit untypisch für MerR-Regulatoren, die meist in der Spacer-Region binden. Jedoch weist auch der *csgD*-Promotor eine Spacer-Region von 15 bp auf [Hammar *et al.*, 1995]. Ein möglicher Regulationsmechanismus über MlrA soll durch diese Arbeit genauer untersucht werden.

1.2 Die multizelluläre Lebensform im Biofilm

Bakterien leben häufig in ihrem natürlichen Lebensraum in Gemeinschaften von einer oder mehrerer Spezies, die eine organisierte Struktur ausbilden und mit einer Matrix umschlossen sind. Generell wird diese Lebensform auch als Biofilm bezeichnet [Beloin *et al.*, 2008; Costerton *et al.*, 1999; Dunne, 2002].

Bei der Biofilmbildung produzieren die Zellen eine extrazelluläre polymerische Matrix (EPS), die nicht nur zum Schutz vor Austrocknung von Bedeutung ist, sondern auch eine Diffusionsbarriere von und nach außen darstellt, so dass unerwünschte Agenzien nicht in den Biofilm gelangen und Nährstoffe sich im Biofilm anreichern [Beloin *et al.*, 2008]. Dadurch sind die Zellen im Biofilm resistent gegen Antibiotika, Biozide sowie gegen Bakteriophagen und der immunologischen Abwehr des Wirtes [Anderson & O'Toole, 2008; Dunne, 2002; Flemming & Wingender, 2010]. Eine weitere wichtige Funktion der Matrix-Exopolysaccharide ist die strukturgebende Architektur, aber auch für Zell-Zell-Kontakte spielen sie eine Rolle [Flemming & Wingender, 2010]. Sie besteht grundlegend aus Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren, Lipiden und Wasser [Beloin *et al.*, 2008; Flemming & Wingender, 2010]. Wasser macht generell den größten Teil der Matrix aus, weshalb in den meisten Biofilmen das Trockengewicht der Zellen geringer als 10% ist [Flemming & Wingender, 2010].

Polysaccharide wie Cellulose, Poly- β -1,6-N-Acetyl-Glucosamin (PGA) und Kolansäure sind die wichtigsten sekretierten Polysaccharide [Beloin *et al.*, 2008]. Cellulose ist wichtig für die Festigung des Biofilms [Beloin *et al.*, 2008]. Die Synthese von Cellulose wurde zuerst

in *G. xylinus* beschrieben und ist homolog in *E. coli* und *S. typhimurium* abhängig von der Expression zweier Operone, *bcsQABZC* und *bcsEFG* [Römling, 2002; Ross *et al.*, 1991]. Dabei kodiert das *bcsQABZ* Operon die strukturellen Gene der Cellulose Biosynthese mit BcsA und BcsB als Cellulose-Synthase-Komplex und BcsZ als Endo-1,4- β -Glucanase (Cellulase) [Römling, 2002; Zogaj *et al.*, 2001]. BcsA ist ein cytoplasmatisches Membranprotein und wird als katalytische Untereinheit über die Bindung des kleinen Botenstoffs c-di-GMP allosterisch reguliert [Amikam & Galperin, 2006]. Die Funktion von BcsEFG ist noch nicht geklärt, wobei BcsE scheinbar eine Protease und BcsG eine Endoglucanase darstellt [Solano *et al.*, 2002].

PGA als weiteres Polysaccharid dient der Zell-Zell-Adhäsion und dem Anheften an eine Oberfläche, wodurch diese den Biofilm stabilisiert [Beloin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004]. Die Synthese und Sekretion von PGA ist abhängig von der Expression des *pgaABCD*-Operons, das eine Zellhüllen-übergreifende Pga-Maschinerie kodiert. Dabei sind PgaA und PgaB in bzw. an der Außenmembran lokalisiert und für den Export von PGA notwendig, während PgaC und PgaD in der Innenmembran für die PGA-Synthese mit gleichzeitiger Sekretion benötigt werden, die in Abhängigkeit von dem kleinen Botenstoff c-di-GMP erfolgt [Itoh *et al.*, 2008; Steiner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2004]. Kolansäure ist ein negativ geladenes Polysaccharidpolymer, das unter bestimmten Bedingungen zur Kapselbildung um die Bakterienzelle dient und bei der Biofilmbildung für die Entwicklung des reifen Biofilm eine wichtige Rolle spielt [Beloin *et al.*, 2008].

Weiterhin sind für den Biofilm adhäsive Strukturen wie z.B. die Curli-Fimbrien von großer Bedeutung [Beloin *et al.*, 2008]. Curli sind vielmehr dünne aggregative Fasern und eine charakteristische Struktur bei der Ausbildung von Biofilmen in Enterobakterien wie *E. coli* und *Salmonella* [Barnhart & Chapman, 2006; Kikuchi *et al.*, 2005; Römling, 2005]. Sie dienen der Anheftung an abiotische Oberflächen und der Zell-Zell-Interaktion [Barnhart & Chapman, 2006; Beloin *et al.*, 2008] sowie der Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix von eukaryotischen Zellen wie z.B. Fibronectin [Olsen *et al.*, 1989]. Innerhalb des reifen Biofilms von *E. coli* sind Curli-Fimbrien vorwiegend in der äußeren Biofilmschicht zu finden und bilden ein käfigartiges Netz um die Zellen [Serra *et al.*, 2013]. Die Curli-Synthese erfolgt durch die Expression zwei divergenter Operone, *csgBAC* und *csgDEFG* [Hammar *et al.*, 1995]. Dabei kodiert *csgBAC* die strukturellen Komponenten der Curli-Fimbrien mit dem Nukleator-Protein CsgB, der Curli-Hauptkomponente CsgA, die

außerhalb der Zelle selbst assembliert [Hammar *et al.*, 1996] und dem uncharakterisierten Protein CsgC. Das *csgDEFG*-Operon kodiert hingegen für die Curli-Export-Maschinerie bestehend aus CsgE, CsgF und CsgG [Chapman *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2006] sowie für den transkriptionalen Aktivator CsgD, der zu der Familie der NarL/FixJ-Proteine gehört und ein LuxR-ähnliches Helix-Turn-Helix Bindemotiv besitzt [Volz, 1993]. CsgD wird auch als Masterregulator der Biofilmbildung betitelt, da er neben der Curli-Synthese auch indirekt für die Cellulose-Synthese verantwortlich ist (siehe auch Kapitel 1.2.2) [Brombacher *et al.*, 2003; Hengge, 2011a; Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Römling *et al.*, 2000]. Die Regulation von der CsgD-Expression sehr komplex, so dass viele Signale bei der Biofilmbildung mitwirken (siehe auch Kapitel 1.2.2). CsgD wird während der Biofilmentwicklung bistabil exprimiert und sogar im reifen Biofilm einer Makrokolonie konnte beobachtet werden, dass CsgD heterogen in verschiedenen Zellen exprimiert wurde [Grantcharova *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2013]. Da in dieser Arbeit die Expression von CsgD eine wichtige Rolle spielt, sollen grundlegende Regulationsmechanismen später beschrieben werden (siehe Kapitel 1.2.2).

Ein Biofilm, der in Abhängigkeit von Curli-Fimbrien und Cellulosematrix ausgebildet wird, ist z.B. der sogenannte „rdr“-Morphotyp in *E. coli* und *S. typhimurium*. Dieser Phänotyp ist eine charakteristische Koloniemorphologie auf Agarplatten mit flachen Kolonien, rau-trockener Oberfläche, vernetzten Strukturen und wellenartiger Begrenzung [Römling, 2005].

Generell gliedert sich die Bildung eines Biofilms in verschiedene Schritte, die jeweils eine Anpassung der Genexpression infolge der Umweltbedingungen erfordert [Dunne, 2002; Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Prüß *et al.*, 2006; Schembri *et al.*, 2003]. Als erster Schritt erfolgt ein reversibles Anheften der Bakterienzellen durch Flagellen zur abiotischen Oberfläche, das durch die Umweltbedingungen wie pH und der Ionenkraft des Mediums oder der Temperatur beeinflusst wird [Pratt & Kolter, 1998; Wood *et al.*, 2006]. Als zweiter Schritt folgt die irreversible Adhäsion durch die Expression und Sekretion adhäsiver Strukturen wie den TypI Fimbrien, Curli Fimbrien und konjugativen Pili. Dadurch können Mikrokolonien ausgebildet werden. Schließlich erfolgt die Reifung des Biofilms durch Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsion und weiteres dreidimensionales Wachstum zu Makrokolonien [Beloin *et al.*, 2008; Dunne, 2002; Reisner *et al.*, 2003]. Die Lösung von Zellen aus dem Biofilm zurück zum planktonischen Lebensstil nennt man Dispersion (Abb. 1.3).

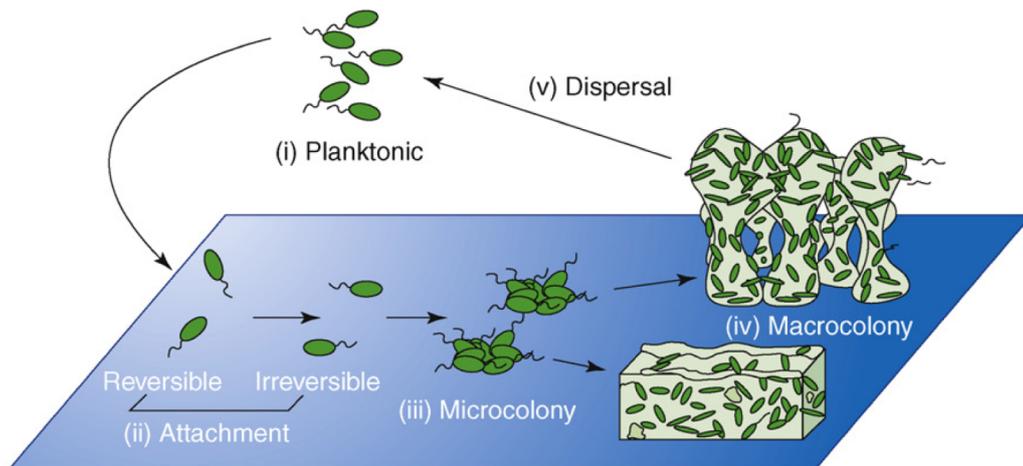


Abb. 1.3: Stadien der Biofilmbildung. (i) Planktonische Zellen („Planctonic“) sind einzellig und motil, (ii) über ihre Flagellen können sie sich durch Interaktion mit einer Oberfläche an diese anheften („Attachment“) und durch Expression von adhäsiven Strukturen eine irreversible Anheftung bewirken, das zur Ausbildung einer Mikrokolonie („Microcolony“) führt (iii); (iv) die Reifung des Biofilms und dreidimensionales Wachstum führt zur Ausbildung einer Makrokolonie („Macrocolony“); (v) durch Dispersion („Dispersal“) können sich einzelne Zellen aus dem Biofilm lösen und wieder dem planktonischen Zyklus nachgehen. [aus Monds & O’Toole, 2009]

Generell spielt die Oberflächenbeschaffung eine Rolle bei der Adhäsion, so dass raue oder hydrophobe Oberflächen wie Teflon oder Plastik bevorzugter besiedelt werden als hydrophile Oberflächen wie Glas und Metall [Donlan, 2002]. Zusätzlich sind die Adsorption und Desorption von Nährstoffen auf der Oberfläche von Bedeutung [Beloin *et al.*, 2008; Dunne, 2002].

Der Umstand, dass die Zellen im Biofilm so geschützt sind, ist ein komplizierter Sachverhalt in der Medizin, da sie häufig die Ursache chronischer Erkrankungen sind (z.B. Cystische Fibrose) und die Behandlung durch Resistenzen erschwert wird [Donlan & Costerton, 2002]. Auch in der Handhabung von medizinischen Geräten wie z.B. in Kathetern ist die Biofilmbesiedlung von Bakterien ein Problem [Anderson & O’Toole, 2008; Donlan, 2008]. Daher ist das Verständnis eines Biofilms in seiner Regulation und Struktur notwendig, um Strategien zur Bekämpfung zu entwickeln.

Es wurde bereits für diverse Spezies nachgewiesen, dass die Biofilmbildung in Abhängigkeit von dem sekundären Botenstoff c-di-GMP reguliert wird [Cotter & Stibitz, 2007; Jenal & Malone, 2006; Povolotsky & Hengge, 2012; Simm *et al.*, 2004; Tischler & Camilli, 2004]. Die Signaltransduktion durch dieses Molekül ist somit eine wichtige Grundlage für den Lebensstil und soll daher zunächst besprochen werden.

1.2.1 c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion

Für viele Bakterien wie *E. coli*, die häufig natürlicherweise im Biofilm leben, wird die Entscheidung zur Wahl des motilen oder sessilen Lebensstils durch das kleine Signalmolekül c-di-GMP vermittelt [Povolotsky & Hengge, 2012].

Zyklisches di-GMP (Bis-(3'-5')-cyclo-di-Guanosinmonophosphat; kurz: c-di-GMP) ist ein sekundärer Botenstoff, der ubiquitär bei Bakterien vorkommt. Die erste Beschreibung des Moleküls erfolgte 1987 bei der Entdeckung, dass c-di-GMP als allosterischer Aktivator einer Komponente des Cellulosesynthase-Komplexes in *Gluconactebacter xylinus* (früher: *Acetobacter xylinum*) wirkt [Ross *et al.*, 1987, 1991].

Erst nach fast weiteren 20 Jahren wurde festgestellt, dass c-di-GMP verschiedene zelluläre Funktionen wie Zell-Zell-Kontakte, Biofilmbildung, Motilität, Zelldifferenzierung und Virulenz in Bakterien reguliert und dadurch die Rolle eines globalen Regulator zukommt (Abb. 1.4) [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Povolotsky & Hengge, 2012; Sondermann *et al.*, 2012; Tamayo *et al.*, 2007].

Schließlich konnten durch genomische Studien konservierte GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen-Proteine mit der Synthese und dem Abbau von c-di-GMP in Verbindung gebracht werden (Abb. 1.4). Synthetisiert wird c-di-GMP durch Diguanylatzyklasen (DGC) über eine enzymatisch aktive, konservierte GGDEF-Domäne (siehe Kapitel 1.2.1.1) [Ausmees *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 1987; Ryjenkov *et al.*, 2005]. Abgebaut wird das Molekül durch Phosphodiesterasen (PDE) über eine enzymatisch aktive, konservierte EAL-Domäne oder HD-GYP-Domäne (siehe Kapitel 1.2.1.2) [Christen *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 1987; Ryjenkov *et al.*, 2006; Tamayo *et al.*, 2005].

Mittlerweile ist auch durch Überexpression und Deletion von GGDEF- und EAL-Proteinen bekannt, dass hohe c-di-GMP-Konzentrationen in der Zelle Biofilm und Sessilität und niedrige c-di-GMP-Konzentrationen Motilität und Virulenz stimulieren [Cotter & Stibitz, 2007; Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Kulasakara *et al.*, 2006; Pesavento *et al.*, 2008; Simm *et al.*, 2004; Sommerfeldt *et al.*, 2009; Tamayo *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2006].

Erst einmal synthetisiert, umfasst die c-di-GMP-Konzentration einer Zelle vermutlich einen Bereich von Nano- bis niedrigen Micromolarbereich und ist etwa 100-fach geringer als die geschätzte GTP-Konzentration [Buckstein *et al.*, 2008; Hengge, 2009a; Jenal, 2004]. Das bedeutet, dass c-di-GMP bereits in geringer Konzentration wirken muss und die Synthese

und der Abbau stark reguliert sein müssen (Abb. 1.5) [Hengge, 2009a].

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass GGDEF- und EAL-Domänen-Proteine zwei der größten Protein-Superfamilien im Bakterienreich umfassen und Homologe nur bei Eubakterien und nicht bei Archaeen oder Eukaryoten vorkommen [Galperin *et al.*, 2001]. Insgesamt besitzen die meisten Bakterien mehrere GGDEF- und EAL-Domänen-Proteine, dessen Anzahl und Verteilung sehr variabel ist [Galperin, 2004, 2005; Seshasayee *et al.*, 2010].

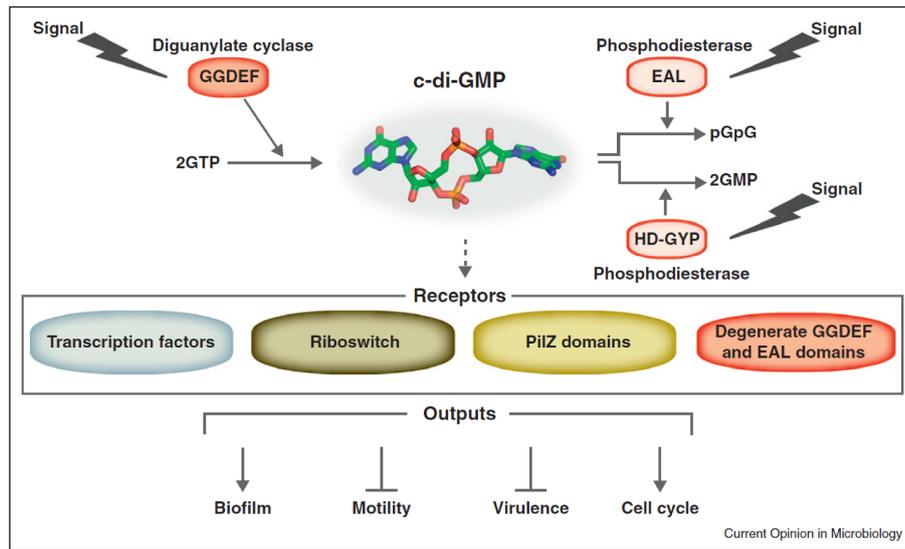


Abb. 1.4: Aufbau und Funktionsweise von c-di-GMP. Der bakterielle sekundäre Botenstoff c-di-GMP wird von GGDEF-Domänen-Proteinen mit Diguanylatzyklase-Aktivität aus zwei Molekülen GTP synthetisiert. Abgebaut wird c-di-GMP durch eine Phosphodiesterase-Aktivität von EAL- oder HD-GYP-Domänen-Proteinen. Als c-di-GMP-Receptoren dienen Proteine mit degenerierten GGDEF- oder EAL-Domänen, PilZ-Domänen, Transkriptionsfaktoren sowie RNA-Riboswitches. Durch c-di-GMP wird die Biofilmbildung, Motilität, Virulenz und Zellzyklus reguliert. [aus Sondermann *et al.*, 2012]

In *E. coli* als Beispiel eines gram-negativen Bakteriums wurden 29 Proteine mit GGDEF-/EAL-Domänen identifiziert. Davon sind 19 GGDEF- und 17 EAL-Domänen-Proteine und dazu kodiert es 7 Proteine, die aus beiden Domänen zusammengesetzt sind [Hengge, 2011a]. Im Vergleich dazu zeigt *V. cholerae* (gram-negativ) überaus hohe Variabilität mit 31 GGDEF-, 22 EAL-, 9 HD-GYP- und 10 GGDEF/EAL-Proteinen während *Bacillus subtilis* als gram-positives Bakterium nur vier GGDEF- und drei EAL-Proteine exprimiert. In manchen Bakterienspezies findet man auch keine GGDEF-, EAL- oder HD-GYP-Proteine, wie z.B. bei *Helicobacter pylori* oder den *Chlamydiales* [Jenal & Malone, 2006; Römling *et al.*, 2005].

In der Bakterienzelle kommen GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen in löslichen Proteinen im Cytoplasma oder in transmembranen Proteinen vor. Sie enthalten oftmals

sensorische Domänen, die vermutlich durch Signale die DGC- und PDE-Aktivität regulieren (siehe auch Kapitel 1.2.1.5) [Hengge, 2011a]. Es gibt auch Hinweise, dass die Regulation von c-di-GMP in Abhängigkeit von Quorum Sensing stehen kann [Camilli & Bassler, 2006].

Insgesamt verhilft scheinbar c-di-GMP einer Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen, da vor allem die Bakterien mit GGDEF-, EAL-, HD-GYP-Proteinen vielfältige Umweltnischen besiedeln können [Tamayo *et al.*, 2007]. Mittlerweile ist bekannt, dass c-di-GMP nicht nur eine Rolle bei Motilität und Biofilmbildung spielt, sondern auch bei der Zelldifferenzierung und Zellzyklusentwicklung, wie sie bspw. bei *Caulobacter crescentus* vorkommt, wichtig ist. Dabei reguliert c-di-GMP die asymmetrische Teilung von einer motilen Schwärmerzelle zu einer sessilen Stämmchenzelle [Duerig *et al.*, 2009].

Weiterhin hat c-di-GMP auch eine wichtige Rolle bei der Virulenz von Bakterien, da die Wahl der sessilen oder motilen Lebensform oft verbunden mit ihrer Virulenz ist. Dabei stimuliert ein niedriger c-di-GMP Spiegel in der Zelle neben der Motilität auch die Expression von Virulenzfaktoren, während die Biofilmbildung im Wirt oftmals zu chronischen Krankheiten führt [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Tamayo *et al.*, 2007].

1.2.1.1 Die Synthese von c-di-GMP

Die Synthese von c-di-GMP erfolgt durch eine Diguanylatzyklase-Aktivität von Proteinen mit GGDEF-Domänen. Der Name der GGDEF-Domäne basiert auf das hoch konservierte GG(D/E)EF-Motiv (Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe) im aktiven Zentrum („active site“ oder kurz: „A-site“), dessen enzymatische Aktivität durch Mutation jeglicher Aminosäuren dieses Motivs verloren ging [Ryjenkov *et al.*, 2005; Simm *et al.*, 2004]. Mittlerweile ist bekannt, dass es weitere Aminosäuren gibt, die N-terminal zum GGDEF-Motiv lokalisiert sind und eine Funktion in der GTP-Bindung und c-di-GMP-Katalyse haben [Chan *et al.*, 2004; Schirmer & Jenal, 2009].

Generell erfolgt die Katalyse von c-di-GMP durch Kondensation von zwei GTP-Molekülen, die an beide GGDEF-Domänen eines Homodimers binden und zu c-di-GMP zirkularisiert werden.

Ein gut beschriebenes Beispiel einer Diguanylatzyklase ist der Response Regulator PleD aus *C. crescentus*, dessen Röntgenkristallstruktur bereits beschrieben wurde [Chan *et al.*, 2004; Schirmer & Jenal, 2009; Wassmann *et al.*, 2007]. Dabei hat die

hochkonservierte GGDEF-Domäne die Struktur einer β -Haarnadel und ist ähnlich der einer Klasse III-Nucleotidylzyklase (z.B. Adenylatzyklase) bzw. TypI-DNA-Polymerase [Pei & Grishin, 2001; Schirmer & Jenal, 2009]. Diese Strukturanalyse zeigte auch, dass zwei Magnesium-Ionen gebunden sind, die für die Katalyse notwendig sind [Chan *et al.*, 2004]. Für PleD konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Dimerisierung der GGDEF-Domänen abhängig von der Phosphorylierung und Dimerisierung der Receiver(REC)-Domäne am N-Terminus ist [Paul *et al.*, 2007]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die REC-GGDEF-Proteine WspR in *Pseudomonas aeruginosa* und Rrp1 in *Borrelia burgdorferi* beobachtet, weshalb vermutet wird, dass dies ein genereller Mechanismus für die REC-Domänen ist [Schirmer & Jenal, 2009]. Daher wurde auch postuliert, dass die Dimerisierung von GGDEF-Domänen ein Aktivierungsmechanismus durch eine sensorische Domäne sein könnte [Schirmer & Jenal, 2009].

Ein weiterer Regulationsmechanismus für Diguanylatzyklasen konnte in der nicht-kompetitiven Produktinhibition durch c-di-GMP für die Proteine PleD und DgcA beispielhaft beschrieben werden [Chan *et al.*, 2004; Christen *et al.*, 2006]. Dieser Prozess gibt dem Enzym eine Syntheseobergrenze vor und verhindert, das unnötig Substrat verbraucht und eine unnützige Überproduktion von c-di-GMP erfolgt. Dabei bindet c-di-GMP an ein inhibitorisches Zentrum („inhibitory site“ oder kurz „I-site“) bestehend aus einem RxxD-Motiv (Arg-x-x-Asp), das fünf Aminosäuren N-terminal vom GGDEF-Motiv entfernt ist, und inaktiviert so über eine Konformationsänderung die A-site [Chan *et al.*, 2004; Christen *et al.*, 2006; Schirmer & Jenal, 2009]. Die Kristallstruktur hatte weiterhin zeigen können, dass dimerisches c-di-GMP im Komplex mit PleD wie WspR diese inaktiviert hat [Chan *et al.*, 2004; De *et al.*, 2008; Wassmann *et al.*, 2007].

Da jedoch nicht alle DGC eine I-site besitzen, gibt es vermutlich auch andere Mechanismen zur Regulation der DGC-Aktivität, wie zum Beispiel über N-terminale Domänen (siehe Kapitel 1.2.1.5) [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006].

1.2.1.2 Der Abbau von c-di-GMP

Der Abbau von c-di-GMP erfolgt entweder durch die Phosphodiesterase-Aktivität von Proteinen mit EAL- oder HD-GYP-Domänen [Dow *et al.*, 2006; Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Schirmer & Jenal, 2009].

Die weit verbreiteten EAL-Proteine spalten dabei c-di-GMP hydrolytisch in 5'-Phosphoguanilyl-(3'-5')-Guanosin (kurz: pGpG) [Christen *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2005], während die selteneren HD-GYP-Proteine (mit einem konservierten HHExxDGxxGYP-Motiv) den Abbau in zwei GMP-Moleküle katalysieren [Dow *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006a]. Da *E. coli* keine HD-GYP-Domänen-Proteine kodiert und in dieser Arbeit nur EAL-Proteine von Bedeutung sind, soll im Folgenden allein die Gruppe der EAL-Proteine beschrieben werden.

Erstmals wurde die EAL-Domäne auch in *G. xylinus* beschrieben [Tal *et al.*, 1998] und der Name basiert auf dem konservierten EAL-Motiv (Glu-Ala-Leu), das auch als EVL-Motiv vorkommt. Mittlerweile hat man in der gesamten EAL-Domäne verteilt weitere Aminosäuren identifiziert, die für die Katalyse notwendig sind [Rao *et al.*, 2008].

Strukturanalysen konnten am Beispiel von YkuI aus *Bacillus subtilis* oder BlrP1 aus *Klebsiella pneumoniae* zeigen, dass die EAL-Domäne eine konservierte Region aus α -Helices und β -Faltblättern (im sog. „TIM barrel fold“) besitzt. Diese bindet zwei Metall-Ionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), die für die effektive Reaktion bei den meisten EAL-Proteinen essentiell gebraucht werden [Barends *et al.*, 2009; Minasov *et al.*, 2009; Schirmer & Jenal, 2009], während Calcium- und Zink-Ionen inhibitorisch wirken [Schmidt *et al.*, 2005; Tamayo *et al.*, 2005].

Generell sind EAL-Domänen als Monomer aktiv und können wie GGDEF-Domänen N-terminale Sensor-Domänen zur Regulation der PDE-Aktivität besitzen [Schirmer & Jenal, 2009]. Allerdings wurde für das degenerierte, zusammengesetzte GGDEF-EAL-Protein FimX aus *Pseudomonas aeruginosa* auch allein für seine EAL-Domäne eine Dimerstruktur beobachtet [Robert-Paganin *et al.*, 2012].

Eine Besonderheit sind noch zusammengesetzte GGDEF-EAL-Proteine, die entweder DGC- oder PDE-Aktivität haben. Meist ist hier eine Domäne degeneriert und reguliert allosterisch die Aktivität der anderen Domäne [Hengge, 2011a; Pesavento & Hengge, 2010]. Dies wurde bspw. für das Protein PdeA (CC3396) von *Caulobacter crescentus* beschrieben, wo über die degenerierte GGDEF-Domäne GTP gebunden wird und so die EAL-Domäne durch Erhöhung der Substrataffinität für c-di-GMP aktiviert wird [Christen *et al.*, 2005]. Außerdem konnten für konservierte, zusammengesetzte Proteine auch bifunktionale *in vitro*-Aktivitäten beschrieben werden, wie bspw. BphG1 aus *Rhodobacter sphaeroides* oder Lpl0329 aus *Legionella pneumophila* [Levet-Paulo *et al.*, 2011; Tarutina *et al.*, 2006].

1.2.1.3 Degenerierte GGDEF- und EAL-Proteine

Neben den konservierten GGDEF- und EAL-Proteinen besitzt *E. coli* vier degenerierte GGDEF- und EAL-Proteine: YcgF, YdiV, YhdA und YeaI [Hengge, 2011a; Povolotsky & Hengge, 2012].

YcgF (BluF) ist ein degeneriertes EAL-Protein mit einer N-terminalen BLUF-Domäne, das sich vermutlich aus einem konservierten EAL-Domänen-Protein evolutiv entwickelte und die Fähigkeit c-di-GMP zu binden oder umzusetzen verlor [Tschowri *et al.*, 2009, 2012]. Durch blaues Licht wirkt YcgF als Anti-Repressor des Transkriptionsfaktors YcgE (BluR), wodurch Gene kleiner Proteine exprimiert werden und so die Curli-Expression inhibiert und die Produktion von Kolansäure aktiviert wird [Tschowri *et al.*, 2009].

YhdA (CsrD) ist ein für beide Domänen degeneriertes GGDEF-EAL-Protein, das RNA bindet und so den Abbau der kleinen RNAs CsrB und CsrC stimuliert. Dadurch wird das RNA-bindende Protein CsrA frei und stabilisiert die mRNA des flagellaren Masterregulator FlhDC. Neben Motilität beeinflusst CsrA außerdem die Glykogen-Genexpression sowie indirekt die PGA-Produktion und hat somit Auswirkungen auf den Kohlenstoff-Stoffwechsel und Biofilmbildung [Babitzke & Romeo, 2007; Povolotsky & Hengge, 2012; Suzuki *et al.*, 2006].

YdiV als degeneriertes EAL-Protein wird auch als Anti-FlhDC-Faktor beschrieben [Wada *et al.*, 2012]. In *Salmonella* wie auch *E. coli* konnte gezeigt werden, dass YdiV über Protein-Protein-Interaktion mit FlhDC dieses der Proteolyse zuführt, was in der Inhibition der flagellaren Genkaskade resultiert [Takaya *et al.*, 2012; Wada *et al.*, 2011, 2012].

YeaI ist ein GGDEF-Protein mit einer degenerierten A-site (mit einem EGEVF-Motiv) und einer intakten I-site. Bisher ist seine Funktion unbekannt, jedoch wird postuliert, dass es als aktive Diguanylatzyklase die Motilität reduziert [Sanchez-Torres *et al.*, 2011].

Keines dieser genannten Proteine konnte bisher als mögliches c-di-GMP-Effektorprotein beschrieben werden, jedoch sind degenerierte GGDEF- und EAL-Proteinen potentielle Zielproteine für die Signaltransduktion, sofern sie nicht die Fähigkeit c-di-GMP zu binden verloren haben. Mögliche Effektormechanismen sollen jedoch im Folgenden beschrieben werden.

1.2.1.4 Effektoren der c-di-GMP Signaltransduktion

Eine minimale, funktionale c-di-GMP Kontrollereinheit besteht aus einer Diguanylatzyklase (DGC) und einer Phosphodiesterase (PDE), die antagonistisch c-di-GMP kontrollieren, und einer Effektor Komponente, die als Sensor von c-di-GMP dieses bindet und schließlich eine Transduktion des Signales bewirkt (Abb. 1.5). Das kann über Regulation der Transkription, Translation oder auf Ebene der Proteinaktivität erfolgen [Hengge, 2009a].

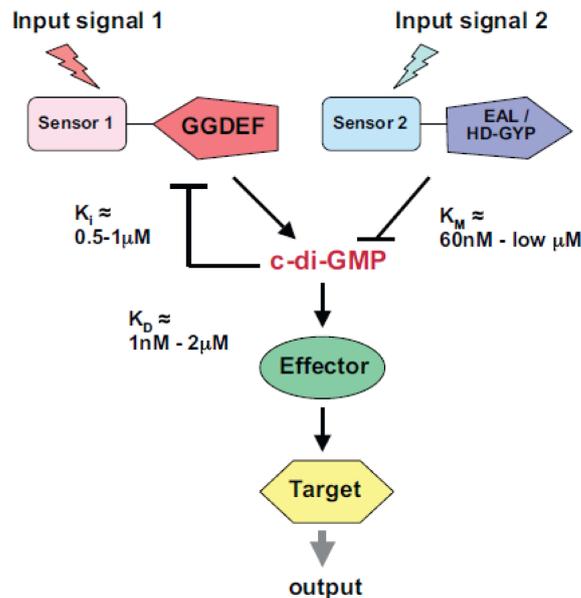


Abb. 1.5: Das minimale c-di-GMP-Kontrollmodul. Eine einfache, funktionale Kontrollereinheit für c-di-GMP besteht zum einen aus einer DGC und einer PDE, die ein Signal über ihre sensorischen Domänen wahrnehmen („Input signal“) und in Abhängigkeit davon die Konzentration von c-di-GMP über Synthese und Abbau regulieren. Die Synthese von c-di-GMP kann zusätzlich über nicht-kompetitive Produktinhibition kontrolliert sein. Zum anderen gehört zu der Einheit auch ein Effektormolekül („Effector“), das entstandenes c-di-GMP bindet und in Abhängigkeit davon eine Zielstruktur („Target“) reguliert und so eine Reaktion („output“) hervorruft. Die unterschiedlichen c-di-GMP-Wirkungsbereiche sind über die Konstanten K_i , K_M und K_D dargestellt. [aus Povolotsky & Hengge, 2012]

Generell gibt es verschiedene Effektormechanismen für die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion [Boyd & O’Toole, 2012; Römling *et al.*, 2013; Sondermann *et al.*, 2012].

Eine Gruppe stellen die degenerierten GGDEF-/EAL-Proteine dar, wie sie zuvor schon beschrieben worden sind (siehe Kapitel 1.2.1.3). Hier können Proteine über eine degenerierte EAL-Domäne oder über die I-site (RxxD-Motiv) einer degenerierten GGDEF-Domäne c-di-GMP binden [Jenal & Malone, 2006].

Ein Beispiel aus *P. aeruginosa* ist das Protein FimX, das für die Motilität durch „Twitching“ notwendig ist. Es besitzt eine degenerierte GGDEF- und EAL-Domäne und bindet c-di-GMP über letztere [Huang *et al.*, 2003; Kazmierczak *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011;

Robert-Paganin *et al.*, 2012].

Ein weiteres Beispiel aus *P. fluorescens* wäre das Protein LapD, das eine degenerierte GGDEF- und EAL-Domäne besitzt und über die EAL-Domäne c-di-GMP bindet [Newell *et al.*, 2009]. Durch eine Signaltransduktion von innen nach außen kann LapD in Abhängigkeit von c-di-GMP Einfluss auf das Zelloberflächenadhäsion LapA nehmen und somit die Biofilmbildung beeinflussen [Newell *et al.*, 2009, 2011].

PopA aus *C. crescentus* wiederum ist ein degeneriertes GGDEF-Protein mit einer degenerierten A-site und einer konservierten I-site. PopA reguliert den Zellzyklus in Abhängigkeit von seiner Bindung zu c-di-GMP (über die I-site) und seiner dadurch regulierten Lokalisierung in der Zelle [Abel *et al.*, 2011; Duerig *et al.*, 2009].

Eine weitere Gruppe der c-di-GMP-Effektoren sind Proteine mit einer sog. PilZ-Domäne, bei denen die Bindung von c-di-GMP über konservierte Aminosäurereste RxxxR und D/NxSxxG erfolgt [Benach *et al.*, 2007]. Sie wurden als erste Effektorgruppe entdeckt und zeigen auch eine ähnliche phylogenetische Verbreitung wie GGDEF- und EAL-Proteine und kann einzeln oder tandemartig mit anderen Domänen (wie REC, GGDEF, EAL etc.) im Protein vorkommen [Amikam & Galperin, 2006; Mills *et al.*, 2011; Ryjenkov *et al.*, 2006].

Benannt wurde diese Domäne nach dem PilZ-Protein von *P. aeruginosa* und sie ist homolog zur C-terminalen Domäne der α -Untereinheit BcsA der Cellulose-Synthase von *G. xylinus* [Amikam & Galperin, 2006]. Es stellte sich heraus, dass diese Domäne generell durch die Bindung von c-di-GMP allosterisch reguliert ist und bspw. bei BcsA dadurch die Cellulose-Synthese aktiviert [Benach *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 1987; Ryjenkov *et al.*, 2006]. Der Erkennungsmechanismus konnte für BcsA in *G. xylinum* vor kurzem gezeigt werden [Fujiwara *et al.*, 2013].

Mittlerweile sind auch eine Reihe von Proteinen mit PilZ-Domänen beschrieben worden [Benach *et al.*, 2007; Christen *et al.*, 2007; Merighi *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007; Russell *et al.*, 2013; Wilksch *et al.*, 2011]. Bspw. regulieren in *Caulobacter crescentus* die beiden PilZ-Domänen-Proteine DgrA und DgrB, in Abhängigkeit von c-di-GMP die Motilität [Christen *et al.*, 2007]. In *V. cholerae* beeinflussen die PilZ-Proteine PlzC und PlzD in Abhängigkeit von c-di-GMP die Biofilmbildung, Motilität und Virulenz [Benach *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007]. Weiterhin besitzt das Protein Alg44 in *P. aeruginosa* eine PilZ-Domäne, das essentiell in der c-di-GMP regulierten Alginat-Biosynthese beteiligt ist [Merighi *et al.*, 2007].

In *E. coli* gibt es neben BcsA außerdem nur noch YcgR als PilZ-Domänen-Protein [Hengge, 2011a]. Das YcgR-Protein ist bereits auch sehr gut beschrieben und es ist bekannt, dass es durch die Bindung von c-di-GMP direkt über die Flagellenmotorproteine die Motilität reguliert und sogar als molekulare Bremse agiert [Boehm *et al.*, 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010; Ryjenkov *et al.*, 2006].

Da nicht alle Bakterien, die c-di-GMP in der Signaltransduktion benutzen, auch PilZ-Domänen-Proteine kodieren, wurden natürlich weitere Bindemotive für c-di-GMP gesucht [Tamayo *et al.*, 2007]. Mittlerweile konnten weitere Effektorengruppen beschrieben werden.

Dabei stieß man auf Transkriptionsregulatoren, die in Abhängigkeit von einer c-di-GMP-Bindung die Expression von Genen regulieren. Zunächst wurde das Protein FleQ in *P. aeruginosa* entdeckt, das durch die Bindung zu c-di-GMP vom Repressor zum Aktivator für die *pel*-Gene wird und so die Synthese von Pel-Polysacchariden für die Pellikelbildung (ein spezieller Biofilm) induziert [Baraquet *et al.*, 2012; Hickman & Harwood, 2008]. Das Bindemotiv ist hier kein PilZ-Motiv und ist noch nicht bekannt [Hickman & Harwood, 2008].

Dazu konnte nachgewiesen werden, dass ein Genprodukt dieser kodierten *pel*-Gene, und zwar das Protein PelD, über ein RxxD Motiv c-di-GMP bindet und diese Bindung für die Produktion der Pel-Exopolysaccharide notwendig ist [Lee *et al.*, 2007]. Daher könnte neben den PilZ-Domänen die Bindung über das RxxD-Motiv möglicherweise ein genereller Mechanismus zur Bindung von c-di-GMP sein.

Erst kürzlich wurde noch ein weiterer Effektormechanismus über c-di-GMP Riboswitches beschrieben, für die sogar bereits zwei unterschiedliche Klassen bekannt sind [zusammengefasst in Hengge, 2010; Ryan *et al.*, 2012]. Der Klasse I Mechanismus (c-di-GMP-I) wurde durch bioinformatische Daten entdeckt. Und in *Vibrio cholera* konnte gezeigt werden, dass ein Riboswitch über eine „GEMM“-RNA-Domäne in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) einiger mRNAs (von bspw. kodierten GGDEF- und EAL-Proteinen) erfolgt, bei der durch eine komplexe sekundäre und tertiäre Struktur („Aptamer“) c-di-GMP über Basenpaarung und Wechselwirkungen gebunden wird und so die Expression reguliert [Kulshina *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Sudarsan *et al.*, 2008].

Der Klasse II Mechanismus (c-di-GMP-II) konnte für *Clostridium difficile* beschrieben

werden, bei der c-di-GMP an einem Riboswitch einer „Pseudoknoten“-Struktur bindet und so die Aktivität eines selbst-spleißendes Ribozyms reguliert [Lee *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011].

Neben diesen genannten Mechanismen werden fortlaufend auch weitere Effektoren beschrieben, die hier nicht zuzuordnen sind. Das wäre z.B. die c-di-GMP bindende PNPase, die Bedeutung für die RNA-Prozessierung hat [Tuckerman *et al.*, 2011]. Außerdem wurde kürzlich noch ein neuer Mechanismus in *E. coli* beschrieben, bei dem zwei Proteine, PgaC und PgaD, c-di-GMP binden und dadurch einen stabilen, heterodimeren Komplex bilden, der in der Membran eine Sekretionsmaschinerie für Poly- β -1,6-N-Acetyl-Glucosamin (PGA, eine Komponente der Biofilmbildung) bildet. Dabei wurde ein Arginin (R222) in PgaC und ein NKLR-Motiv in PgaD als Bindemotiv für c-di-GMP beschrieben [Steiner *et al.*, 2012].

Da die Signaltransduktion für c-di-GMP ein ubiquitärer Mechanismus für Bakterien ist und nicht in Eukaryoten vorkommt, ist es interessant, dass selbst in eukaryotischen Makrophagenzellen bereits ein Rezeptor für c-di-GMP entdeckt werden konnte [Burdette *et al.*, 2011].

Generell ist es daher denkbar, dass es noch einige unentdeckte Effektor-Mechanismen gibt, die es noch aufzudecken gilt.

1.2.1.5 Spezifität des c-di-GMP Wirkmechanismus

Da so viele GGDEF- und EAL-Proteine in Organismen wie *E. coli* vorkommen und diese auf unterschiedliche Signale hin die Konzentration von c-di-GMP regulieren, ist es fraglich, wie eine spezifische Wirkung durch c-di-GMP erfolgen kann. Daher muss durch Regulationsmechanismen eine Spezifität gewährleistet sein.

Von den 29 GGDEF/EAL-Proteinen in *E. coli* besitzen 27 Proteine eine oder mehrere N-terminale Domänen, die als Sensor agieren können [Hengge, 2011a]. Diese sensorischen Domänen können bspw. MASE1, MASE2, PAS, GAF, BLUF, REC, HAMP oder sensorisches Globin sein, die durch spezifische Signale vermutlich die enzymatische Aktivität regulieren [Galperin, 2005; Hengge, 2011a; Povolotsky & Hengge, 2012]. MASE1 und MASE2 sind Transmembrandomänen, die auch in Histidinkinasen und Adenylatzyklen vorkommen, jedoch sind die durch sie wahrgenommenen Signale nicht ganz klar [Galperin, 2004; Hengge, 2011a]. Eine MASE1-Domäne ist bspw. in YegE zu finden. PAS-Domänen sind auch häufig

in Histidinsensorkinasen zu finden und können verschiedene Liganden binden wie bspw. Flavin, Adenin oder Häm und dadurch z.B. Licht oder Sauerstoff wahrnehmen [Taylor & Zhulin, 1999]. Diese Domäne finden wir bspw. in den Proteinen YdaM, YciR und YegE. Die GAF-Domäne ist bekannt für die Bindung kleiner Liganden wie kleine zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) oder verschiedene Chromophoren [Galperin, 2004; Ho *et al.*, 2000]. BLUF-Domänen dagegen sind Flavin-Adenin-Dinukleotid abhängige Blaulicht-Sensoren [Gomelsky & Klug, 2002].

Bisher sind jedoch nur wenige Regulationsmechanismen bekannt. Jedoch konnte bereits beobachtet werden, dass YcgF auf Licht reagiert [Tschowri *et al.*, 2009] und YddU (DosP) über die N-terminale PAS-Domäne Sauerstoff wahrnimmt [Delgado-Nixon *et al.*, 2000; Tuckerman *et al.*, 2009].

Wie zuvor beschrieben, können die GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen auch eine Receiver(REC)-Domäne eines Response-Regulators besitzen, die durch Phosphorylierung die Enzymaktivität regulieren (siehe Kapitel 1.2.1.1) [Paul *et al.*, 2007; Schirmer & Jenal, 2009]. Hier sei noch einmal das Beispiel von PleD erwähnt, das für die Differenzierung von einer Schwärmer- zur Stämmchenzelle in *C. crescentus* benötigt wird. Erst durch Phosphorylierung seiner REC-Domäne wird PleD zur lokal aktiven DGC am Flagellenpol [Paul *et al.*, 2004, 2007].

Neben der Regulation der Aktivität von GGDEF- und EAL-Proteinen, gewährleisten spezifische Expressionsmuster für die einzelnen Proteine eine bestimmte zeitliche Abfolge der Expression in Abhängigkeit von spezifischen Signalen. Für die Gene in *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Großteil dieser Gene σ^S -abhängig exprimiert werden [Weber *et al.*, 2005]. Außerdem konnten Expressionsmuster der GGDEF-/EAL-Gene in Abhängigkeit von der Oberfläche (Flüssig- oder Festmedium), Wachstumsphase und Temperatur beobachtet werden [Sommerfeldt *et al.*, 2009]. Dabei wurde bspw. gezeigt, dass u.a. *yegE*, *ydaM* und *yciR* früh in der stationären Phase exprimiert werden, während *yaiC* erst später induziert wird. Hier zeigt sich der zeitliche Ablauf, bei dem YegE und YdaM zusammen mit YciR die Expression des Transkriptionsaktivators CsgD zunächst aktivieren, der wiederum für die Expression von YaiC notwendig ist [Hengge, 2011a; Sommerfeldt *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006].

Generell gilt jedoch, dass die Expression der GGDEF- und EAL-Gene einer temporalen

Regulation unterliegt, die wahrscheinlich durch eine räumliche Sequestrierung weiter spezifiziert wird. Das bedeutet, dass selbst gleichzeitig exprimierte GGDEF- und EAL-Proteine durch Komplexbildung sich räumlich von anderen Systemen abgrenzen und so keiner gegenseitigen Beeinflussung unterliegen. Das kann durch eine solche Mikrokompartimentierung erreicht werden, wo Effektorproteine/-moleküle mit DGC und/oder PDE zusammen lokalisiert sind und somit Entstehungs- und Wirkungsort von c-di-GMP vereint wäre. Dadurch wäre eine höhere Genauigkeit und Spezifität der Signalübertragung gegeben [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Kader *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006].

Solch eine Komplexbildung konnte bspw. bereits in *E. coli* bei der DGC YddV (DosC) und PDE YddU (DosP) zusammen mit der PNPase (Polynukleotid-Phosphorylase) beobachtet werden. Dabei bindet die PNPase c-di-GMP, wodurch seine Aktivität im Degradosom stimuliert wird [Tuckerman *et al.*, 2011]. Weiterhin konnte auch bereits ein Komplex aus DGC und PDE mit einem PilZ-Domänen beschrieben werden, der in *Xanthomonas campestris* die Motilität (jedoch unabhängig von c-di-GMP) reguliert [Ryan *et al.*, 2012].

1.2.2 Regulation der Curli- und Cellulose-Synthese

Der Übergang von einem motilen Lebensstil hin zu einem sessilen Lebensstil unterliegt der Kontrolle von c-di-GMP [Povolotsky & Hengge, 2012]. Vielmehr wurde durch die Arbeit von Pesavento *et al.* deutlich, dass die Curli-vermittelte Adhäsion, die für die Biofilmbildung eine wichtige Rolle spielt, invers mit der Motilität reguliert wird [Pesavento *et al.*, 2008]. Jedoch sind für die Biofilmbildung, wie zuvor beschrieben, Flagellen bedeutend, um zumindest eine initiale Anheftung zur Oberfläche zu bewirken. Dass Flagellen auch innerhalb eines Biofilms wichtig sind, zeigte nun die Arbeit von Serra *et al.*, wo Flagellen an den am Boden lokalisierten Zellen der Makrokolonie identifiziert wurden. Hier wurde auch vermutet, dass die Faltenbildung in einer Makrokolonie abhängig von der Flagellensynthese ist [Serra *et al.*, 2013].

Generell sind Flagellen proteinogene Filamente, die für die Fortbewegung von Bakterien, wie Schwimmen, Swarming und Twitching für das aktive Aufsuchen von bevorzugten Umweltbedingungen (Chemotaxis) verantwortlich sind. Die Expression von Flagellen und Curli-Fasern ist eng gekoppelt und wird daher im Folgenden kurz erläutert.

In *E. coli* Zellen werden Flagellen in der post-exponentiellen Wachstumsphase exprimiert, wodurch sie dadurch hochmotil werden [Amsler *et al.*, 1993]. Die Synthese dieser komplexen Organellen hängt von mehr als 50 Genprodukten ab, deren Expression einer Hierarchie unterliegt, die mit dem Zusammenbau des Flagellums gekoppelt ist. Die Gene werden in drei zeitlichen Klassen transkribiert: früh, mittel und spät. Diesen liegen Promotoren mit der zeitlichen Einteilung der Klasse 1-3 zugrunde. Mit einem Klasse 1 Promotor wird das komplex regulierte *flhDC*-Operon früh transkribiert. Es bildet sich ein heteromultimerer Komplex von FlhDC (FlhD₄C₂), der als Masterregulator die σ^{70} -abhängige Transkription von Klasse 2 Promotoren der mittleren und einigen späten Genen aktiviert [Chilcott & Hughes, 2000; Wang *et al.*, 2006].

Die mittleren Gene kodieren für Strukturproteine des Haken-Basalkörpers (BBH = basal body hook) sowie für den flagellaren Sigmafaktor FliA (σ^F oder σ^{28}), den Anti-Sigmafaktor FlgM und FliZ, das als DNA-bindendes Protein mit σ^S kompetitiert und so σ^S -abhängige Genexpression inhibiert [Pesavento & Hengge, 2012]. Solange der Haken-Basalkörper noch nicht fertig gestellt ist, inhibiert FlgM durch Bindung von FliA die Transkription von FliA-abhängigen Genen (Klasse 3). Durch vollständige Assemblierung des Haken-Basalkörpers wird dann FlgM sekretiert und dadurch die Inhibierung von FliA aufgehoben. Es können dann die späten Gene, die u.a. für das externe Filament und Chemotaxis-Proteine kodieren, transkribiert werden [zusammengefasst in: Chevance & Hughes, 2008; Chilcott & Hughes, 2000].

Außerdem werden als Klasse 3-Gene die Proteine YhjH und YcgR exprimiert, die für die Schaltung von der flagellaren zur Curli-Kaskade wichtig sind [Pesavento *et al.*, 2008]. YhjH ist eine Phosphodiesterase, die durch den Abbau von c-di-GMP verhindert, dass YcgR im Komplex mit c-di-GMP die flagellare Motorfunktion unterbindet (Abb. 1.6; siehe auch Kapitel 1.2.1) [Amikam & Galperin, 2006; Boehm *et al.*, 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010; Ryjenkov *et al.*, 2006].

Später in der post-exponentiellen Phase wird FlhDC wie auch FliA durch Proteolyse degradiert, wodurch auch die Expression von FliZ, YhjH und YcgR inhibiert ist [Pesavento *et al.*, 2008].

Währenddessen erhöht sich die σ^S -Konzentration in der Zelle und kann nicht mehr ausreichend durch FliZ gehemmt werden. Die Konkurrenz mit σ^{70} bzw. σ^F um die RNAP

wird so überwunden, wodurch die σ^S -abhängige Genexpression den Eintritt in die stationäre Phase bedeutet [Hengge, 2011b]. Dabei werden u.a. die Diguanylatzyklasen YegE und YedQ exprimiert, die durch die erhöhte Produktion von c-di-GMP die PDE-Aktivität von YhjH überwinden können, so dass die c-di-GMP-Konzentration in der Zelle ausreicht, um schließlich durch die Bindung an YcgR die flagellare Bewegung zu hemmen [Boehm *et al.*, 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010; Wolfe & Visick, 2008] Gleichzeitig wirkt der erhöhte zelluläre c-di-GMP-Spiegel über einen unbekanntes Effektor auf die Transkription von *csgD*, der die Curli-Synthese schließlich initiiert (Abb. 1.6) [Pesavento *et al.*, 2008].

Durch zusätzliche σ^S -abhängige Expression der DGC YdaM und des MerR-ähnlichen Transkriptionsaktivators MlrA wird die *csgD*-Transkription eingeleitet [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006]. MlrA und YdaM sind dabei essentiell für die Transkription und genomweite Studien haben auch gezeigt, dass YdaM zusammen mit seinem Antagonisten, der PDE YciR, hochspezifisch für die Regulation von *csgD* ist, das auf eine lokale Wirkungsweise hindeutete (Abb. 1.6) [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006]. Potentiell könnte hier MlrA hier eine Rolle spielen [Brown *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006].

In *E. coli* ist die Expression von *csgD* nicht nur durch c-di-GMP reguliert und findet normalerweise nur unter 30°C statt und unter bestimmten Bedingungen auch bei 37°C [Arnqvist *et al.*, 1992; Kikuchi *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006]. Dabei beeinflussen diverse Umweltbedingung wie Nährstoffmangel, Osmolarität und Sauerstoffgehalt über eine Vielfalt von weiteren Transkriptionsregulatoren die *csgD*-Transkription [Gerstel & Romling, 2001; Prigent-Combaret *et al.*, 2001]. Eine direkte Repression erfolgt am *csgD*-Promotor durch die Regulatoren CpxR und H-NS, während OmpR, IHF und RstA als direkte Aktivatoren agieren [Gerstel *et al.*, 2003; Jubelin *et al.*, 2005; Ogasawara *et al.*, 2010a; Prigent-Combaret *et al.*, 2001]. Dazu haben noch weitere Faktoren wie das Zweikomponenten-System RcsCDB Einfluss auf die *csgD*-Transkription [Ferrieres & Clarke, 2003; Vianney *et al.*, 2005].

Die Regulation von *csgD* ist jedoch nicht auf die Transkription beschränkt. Die mRNA von *csgD* besitzt eine lange 5'-untranslatierte Region (5'-UTR), an die die kleinen RNAs OmrA, OmrB, McaS, GcvB und RprA binden und die Translation reprimieren [Boehm & Vogel, 2012; Holmqvist *et al.*, 2010; Mika *et al.*, 2012]. Weiterhin wurde auch eine post-translationale Regulation von CsgD in *Salmonella* beschrieben, bei dem die Receiver-Domäne einer Phosphorylierung unterliegt und CsgD nur im unphosphorylierten Zustand an die

Promotoren der Zielgene bindet [Zakikhany *et al.*, 2010].

Mit der aktiven Form des CsgD-Proteins kann dann eine Expression der Curli-Gene erfolgen, wie sie zuvor beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.2). Das CsgD-Protein aktiviert neben den Genen für die Curli-Synthese auch die Transkription von *yaiC* (*adrA*; Abb. 1.6). *YaiC* ist auch eine Diguanylatzyklase und aktiviert über die Produktion von c-di-GMP die Cellulose-Synthese [Römling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001].

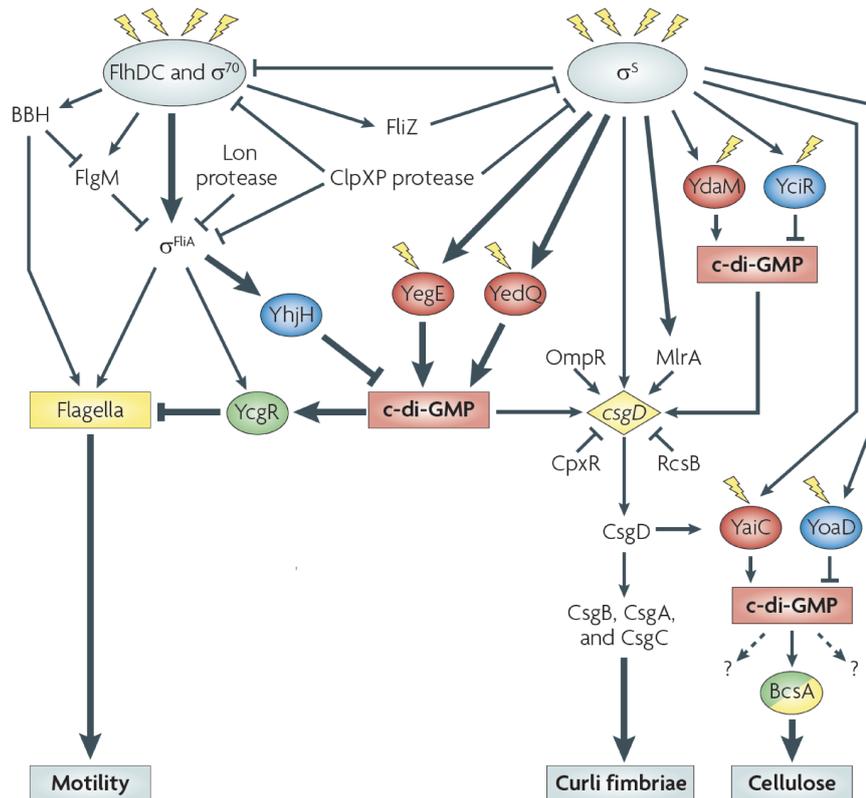


Abb. 1.6: Regulation der Motilität und Curli-Expression. Beim Übergang der post-exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase wird in *E. coli* die Curli-Expression bei gleichzeitiger Reduktion der Motilität stimuliert. Dabei findet eine gegenseitige Inhibition beider Kaskaden auf verschiedenen Ebenen statt. An der Spitze der Hierarchie erfolgt eine Sigmafaktorkompetition durch σ^5 , σ^{70} und FliA (σ^{FliA}) um die RNAP. Mit Expression der flagellaren Kaskade wird das Protein FliZ exprimiert und verhindert die σ^5 -abhängige Genexpression. Durch stetige Akkumulation von σ^5 und Abbau von FliA durch die ClpXP -Protease erfolgt die Expression der GGDEF-Proteine YegE , YedQ und YdaM , sowie des EAL-Proteins YciR . Dadurch verringert sich gleichzeitig die FliA -abhängige Expression der PDE YhjH . Die erhöhte Synthese von c-di-GMP durch YegE und YedQ resultiert in der Inhibition der Flagellenmotorfunktion über YcgR im Komplex mit c-di-GMP. Die σ^5 -abhängig expremierten Proteine MlrA , YdaM und YciR regulieren spezifisch die *csgD*-Transkription. CsgD aktiviert direkt die Curli-Expression (*csgBAC*) und indirekt die Cellulose-Synthese über die Transkription der DGC YaiC , dessen c-di-GMP-Synthese die Cellulose-Synthese über die Komplexuntereinheit BcsA allosterisch reguliert. (siehe auch Text) [verändert nach Hengge, 2009a]

Insgesamt ist deutlich, wie wichtig die Rolle von CsgD in der Biofilmbildung ist. Der Mechanismus der c-di-GMP abhängigen Regulation der *csgD*-Transkription soll Bestandteil dieser Arbeit sein.

2 ZIELSETZUNG

Durch vorhergehende Studien wurde festgestellt, dass die Curli-Expression in Abhängigkeit des sekundären Botenstoffs c-di-GMP exprimiert wird [Weber *et al.*, 2006]. C-di-GMP wird durch Diguanylatzyklasen (DGC) synthetisiert und durch Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut [Hengge, 2009a].

In *E. coli* sind zwei GGDEF/EAL-Module an der Regulation der Curli-Expression beteiligt, zum einen das globale YegE/YhjH-Modul und zum anderen das lokal postulierte YdaM/YciR-Modul [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006]. Diese Regulation findet auf der Ebene der Transkription von *csgD* statt, der für den Transkriptionsaktivator der strukturellen Curli-Gene (*csgBAC*) kodiert und auch eine wichtige Rolle für die Cellulose-Synthese spielt [Hengge, 2011a; Weber *et al.*, 2006].

Für die Transkriptionsinitiation von *csgD* sind die DGC YdaM sowie der MerR-ähnliche Transkriptionsaktivator MlrA essentiell [Brown *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006]. Daneben wirkt die PDE YciR antagonistisch zu YdaM und inhibiert die *csgD*-Transkription [Weber *et al.*, 2006]. YdaM und YciR wirken hochspezifisch für die Kontrolle der *csgD*-Transkription, weshalb sie als potentiell lokales c-di-GMP Kontrollmodul beschrieben wurden [Hengge, 2009a; Weber *et al.*, 2006], wofür auch weitere Hinweise in der vorherigen Studie sprachen [Lindenberg, 2008; Pesavento, 2011]. Hingegen beeinflusst YegE/YhjH-kontrolliertes c-di-GMP die Motilität wie auch Curli-Expression und wird daher als globales c-di-GMP-Modul angesehen [Pesavento *et al.*, 2008]. Einige Hinweise deuteten darauf hin, dass YciR als mögliches Effektorprotein für YegE/YhjH-kontrolliertes c-di-GMP agiert [Lindenberg, 2008]. Diesen Hinweisen sollte in dieser Arbeit weiter nachgegangen werden und möglicherweise in Verbindung mit einem Aminosäure-Motiv in YciR gebracht werden.

Die zentrale Frage in dieser Arbeit war der Wirkmechanismus eines möglichen Proteinkomplexes aus YdaM/YciR/MlrA, der lokal die Transkription von *csgD* reguliert. Dabei sollten zunächst die zuvor *in vivo* beobachteten Protein-Protein-Interaktionen

zwischen MlrA/YciR und YciR/YdaM [Lindenberg, 2008] *in vitro* verifiziert werden. Ferner sollten in detaillierten *in vivo* Studien die einzelnen Domänen-Kontakte näher untersucht und beschrieben werden, um ein Verständnis für eine solche Komplexbildung zu entwickeln.

Dabei war interessant zu analysieren, wie MlrA als Transkriptionsregulator aktiviert wird und ob er möglicherweise als c-di-GMP-bindendes Protein agiert.

Weitergehend sollte die Funktion von YdaM untersucht werden, inwieweit seine Konformation und Regulation der DGC-Aktivität eine Rolle für die Curli-Expression spielen.

Zusätzlich war natürlich die Rolle von YciR als Inhibitor der Curli-Expression zu klären, die bereits als unabhängig von seiner PDE-Aktivität beobachtet wurde [Lindenberg, 2008; Pesavento, 2011]. Mithilfe der Interaktionsstudien sollten hier mögliche Mechanismen als Grundlage der Inhibition identifiziert werden. Dazu sollte auch die Funktionsweise des Enzyms betrachtet werden, welche Rolle die GGDEF-Domäne von YciR einnimmt und wie YciR in seiner Inhibition gehemmt werden kann, um eine Curli-Expression zu ermöglichen.

Insgesamt sollte durch diese Arbeit ein Verständnis für den Mechanismus der c-di-GMP regulierten Curli-Expression entwickelt werden und geklärt werden, wie eine spezifische und fein-regulierte Expression von CsgD durch ein lokales c-di-GMP-Kontrollmodul innerhalb eines globalen Signaltransduktionsweges erfolgen kann.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Materialien

Standard-Chemikalien und Materialien wurden von den Herstellern AppliChem, Millipore, Merck, Carl Roth, Roche, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Medien und Medienzusätze stammen von der Firma Difco Laboratories. Radioaktiv markiertes [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP und c-di-[^{32}P]GMP wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH geliefert. Weitere Produkte und Geräte sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte mit Bezugsquelle

Produkt	Hersteller/Referenz
3-AT	Sigma
Acrylamid-Bisacrylamid	Carl Roth
Adenin-HCL	Sigma
Agarose	Biozym Scientific
Antibiotika (Amp, Cm, Kan, Tet)	Carl Roth, Sigma, Merck
Anti-Strep Antikörper	USBiological
Anti-His Antikörper	Biomol, Bethyl Laboratories
Anti-Mouse IgG-Alkalische Phosphatase Antikörper	Sigma
Anti-Rabbit IgG-Alkalische Phosphatase Antikörper	Sigma
APS	Carl Roth
BCIP	Carl Roth
Blotanlage	Bio-Rad
Blotmembran für Proteine (Roti-PVDF)	Carl Roth
Bromphenol Blau	Carl Roth
c-di-GMP	BIOLOG Life Science Institute
Chloroform	Carl Roth
CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blau R-250	AppliChem
DNA-Längenmarker: 100 bp extended	New England Biolabs
DNA-Polymerasen (Opti-Taq, Pfu)	Roboklon
dNTP-Stammlösungen	MP Biomedicals
DSS	Thermo Scientific
Elektroporationsapparatur	Bio-Rad
ELISA Reader (Model 550)	Bio-Rad

French Press (HTU - DIGI-F-Press)	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Geldokumentationsanlage	Biozym
Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Analytik Jena
His DO supplement	BD/Clontech
IPTG	Carl Roth
Lysozym	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
NanoDrop	Peqlab
NBT	AppliChem
Oligonukleotide	Metabion
ONPG	Carl Roth
PAGE-Apparatur	Bio-Rad
PCR-Thermocycler	MWG Biotech, Peqlab
PCR-Purification Kit	Analytik Jena, Qiagen
PhosphoImager (FLA-2000G)	Fujifilm
Photometer Ultrospec 1000	Amersham Biosciences Europe GmbH
Plasmid-Mini-Kit	Analytik Jena
Proteingrößenstandars	New England BioLabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
TCA	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Thiamin-HCL	Sigma
Whatman Gel-Blotting-Papier	Carl Roth
X-Gal	Carl Roth
Xylencyanol	Carl Roth
Zentrifugen	Sorvall Instruments, Eppendorf

3.2 Medien und Medienzusätze

3.2.1 Flüssig- und Festmedien

Als reiches Medium wurde Luria-Bertani Medium (LB) nach Silhavy und Kollegen verwendet [Silhavy *et al.*, 1984]. SOB- und SOC-Medien wurden für die Herstellung der Ein-Schritt-Inaktivierung (siehe Kapitel 3.5.17) und Zwei-Schritt-Mutagenese (siehe Kapitel 3.5.18) chromosomaler Gene sowie für das Bakterielle Two-Hybrid eingesetzt. Für die P1-Transduktion (siehe Kapitel 3.4.7) wurde außerdem Dyt-Medium verwendet.

SOB-Medium:	SOC-Medium:	DYT-Medium:
10g Trypton	9,8 ml SOB-Medium	8.0 g Trypton
2,5g Hefeextrakt	0,2 ml 20% Glucose	5.0 g Hefeextrakt
0,25g NaCl		2.5 g NaCl
ad 500 ml H ₂ O dest.		ad 500 ml H ₂ O dest.
autoklavieren		auf pH 7 einstellen
5ml 1 M MgCl ₂		autoklavieren
5ml 1 M MgSO ₄		

Feste Medien wurden durch Zugabe von 15 g Agar zu 1 L Medium und anschließender Autoklavierung hergestellt und ggf. mit Medienzusätzen versetzt. Motilitätsplatten (siehe Kapitel 3.4.8) enthielten 5 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl und 3 g Bacto-Agar pro Liter.

Die Zusammensetzung fester M9-Minimalmedien für das BTH-System wurde nach dem „Instruction Manual Kit“ von Agilent Technologies angefertigt mit 4-5 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) für das selektive Medium.

Für die Zwei-Schritt-Mutagenese (siehe Kapitel 3.5.18) wurden M9-Festmedien (0,75 % Bacto-Agar, 1x M9-Medium, 100 µM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 20 % Rhamnose (bzw. zur Kontrolle: Glucose) verwendet.

3.2.2 Medienzusätze

Die in Tab. 3.2 genannten Medienzusätze wurden in hochkonzentrierten Stammlösungen angesetzt (100 - 1000-fach).

Tab. 3.2: In dieser Arbeit verwendete Medienzusätze und ihre Konzentrationen.

Medienzusatz	Lösungsmittel	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml (Amp100)
CaCl ₂	H ₂ O	100 mM	100 µM
Chloramphenicol	70% Ethanol	25 mg/ml	15 oder 25 µg/ml
Glucose	H ₂ O	20%	0,4%
Rhamnose	H ₂ O	20%	0,4%
IPTG	H ₂ O	50 mM	50 oder 100 µM
Kanamycin	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml (Kan50)
MgSO ₄	H ₂ O	1 M	1 mM
Natriumcitrat	H ₂ O	1 M	20 mM
Tetrazyklin	70% Ethanol	10 oder 12,5 mg/ml	10 oder 12,5 µg/ml
X-Gal	DMF	10 mg/ml	30 µg/ml

3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

3.3.1 Bakterienstämme

Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz/Herkunft
ER2566	<i>E. coli</i> B F ⁻ λ ⁻ <i>fluA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT lacZ::T7 geneI gal sulA11</i> <i>Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1</i> (TetS) <i>endA1</i> [<i>dcm</i>]	New England Biolabs
W3110	<i>E. coli</i> K12 <i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)1</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 2006
W3110 <i>Δlac U169</i>	W3110 <i>Δ(argF-lacU)169 zaj-3053::Tn10</i> (auch: W3110 <i>Δlac::Tn10</i>)	Nichols <i>et al.</i> , 1998 Peters <i>et al.</i> , 2003
FI1202	W3110 <i>LacI^q lacL8 glnG::Tn5 202</i>	Fiedler & Weiss, 1995
GB1000	W3110 <i>Δlac(I-A)</i>	G. Klauck
GK1000	W3110 <i>Δlac(Z-A) lacI_q⁺</i>	G. Klauck
GK1100	W3110 <i>Δlac(Z-A) lacI_q⁺ [λRS45:csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.)]</i>	G. Klauck
GB350	W3110 <i>ΔlacU169 [λRS45:csgB(-190, +43)::lacZ (hybr.)]</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB355	GB350 <i>mlrA::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB356	GB350 <i>yciR::kan</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB357	GB350 <i>ydaM::cat</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB366	GB350 <i>yegE::kan</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB370	GB350 <i>yhjH::kan</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB386	GB350 <i>ΔyhjH ΔyegE</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB391	GB350 <i>ΔyhjH</i>	Pesavento <i>et al.</i> , 2008
GB394	GB350 <i>ΔyhjH ydaM::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB828	GB350 <i>yciR::kan ydaM::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB829	GB350 <i>ΔyhjH ΔyegE ydaM::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB835	GB350 <i>yegE::kan ydaM::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB836	GB350 <i>ΔyciR ΔydaM</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB837	GB350 <i>ΔyhjH ΔyegE ydaM::cat yciR::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB838	GB350 <i>yciR::kan yhjH::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB839	GB350 <i>yhjH::cat ΔyegE yciR::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013

3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

GB840	GB350 $\Delta yciR \Delta ydaM yhjH::cat$	Pesavento <i>et al.</i> , 2008 Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB841	GB350 $\Delta yhjH \Delta yegE \Delta ydaM \Delta yciR$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
GB841 <i>mlrA::kan</i>	GB350 $\Delta yhjH \Delta yegE \Delta ydaM \Delta yciR mlrA::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
NS125	W3110 $\Delta lacU169 [\lambda RS45:mlrA(-199, +91)::lacZ (hybr)]$	Pesavento <i>et al.</i> , 2008
NS159	GB350 $\Delta yegE yciR::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
NS188	NS125 <i>ydaM::cat</i>	Sommerfeldt-Impe, 2012
NS209	NS125 <i>yciR::kan</i>	Sommerfeldt-Impe, 2012
NS254	GB1000 $[\lambda RS45:yciR(-296, +64)::lacZ (hybr)]$	Sommerfeldt <i>et al.</i> , 2009
NS307	GB1000 $[\lambda RS45:ydaM(-307, +43)::lacZ (hybr)]$	Sommerfeldt-Impe, 2012
SL01	GB350 $\Delta yciR \Delta ydaM mlrA::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL20	NS254 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
SL21	NS254 <i>yegE::kan</i>	diese Arbeit
SL22	NS254 <i>yhjH::kan</i>	diese Arbeit
SL24	NS307 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
SL25	NS307 <i>yegE::kan</i>	diese Arbeit
SL26	NS307 <i>yhjH::kan</i>	diese Arbeit
SL35	MC4100 $\Delta mlrA ydaM::cat$	diese Arbeit
SL37	ER2566 <i>yciR::kan</i>	diese Arbeit
SL46	FI1202 <i>rpoS::Tn10</i>	diese Arbeit
SL49	GB350 <i>ydaM::kan::ccdB (pkD46)</i>	diese Arbeit
SL50	ER2566 <i>mlrA::kan</i>	diese Arbeit
SL51	ER2566 $\Delta yciR$	diese Arbeit
SL52	ER2566 $\Delta mlrA$	diese Arbeit
SL53	ER2566 <i>ydaM::cat</i>	diese Arbeit
SL54	ER2566 <i>yciR::kan ydaM::cat</i>	diese Arbeit
SL55	ER2566 <i>mlrA::kan ydaM::cat</i>	diese Arbeit
SL56	ER2566 $\Delta mlrA yciR::kan$	diese Arbeit
SL57	ER2566 $\Delta yciR mlrA::kan$	diese Arbeit
SL59	ER2566 $\Delta yciR \Delta ydaM$	diese Arbeit
SL60	ER2566 $\Delta mlrA \Delta ydaM$	diese Arbeit
SL62	ER2566 $\Delta yciR \Delta ydaM mlrA::kan$	diese Arbeit
SL63	ER2566 $\Delta mlrA \Delta ydaM yciR::kan$	diese Arbeit
SL64	GB350 <i>yciR::kan::ccdB</i>	diese Arbeit
SL65	GB350 <i>ydaM::ydaM^w</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013

3 MATERIAL UND METHODEN

SL66	GB350 <i>yciR::yciR^{wt}</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL67	GB350 <i>ydaM::ydaM^{A-}</i> (A ⁻ = E334A/E335A = GGAAF)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL68	GB350 <i>ydaM::ydaM^{I-}</i> (I ⁻ = R323G/D325G = GxxG)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL69	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF}</i> (D316A/E317A)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL70	GB350 <i>yciR::yciR^{AAL}</i> (E440A)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL71	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF&AAL}</i> (D316A/E317A & E440A)	diese Arbeit
SL72	GB350 <i>ydaM::ydaM^{wt} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL73	GB350 <i>ydaM::ydaM^{wt} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL74	GB350 <i>ydaM::ydaM^{A-} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL75	GB350 <i>ydaM::ydaM^{A-} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL76	GB350 <i>ydaM::ydaM^{I-} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL77	GB350 <i>ydaM::ydaM^{I-} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL78	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL79	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL80	GB350 <i>yciR::yciR^{wt} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL81	GB350 <i>yciR::yciR^{wt} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL82	GB350 <i>yciR::yciR^{AAL} yegE::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL83	GB350 <i>yciR::yciR^{AAL} yhjH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL84	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF&AAL} yegE::kan</i>	diese Arbeit
SL85	GB350 <i>yciR::yciR^{GGAAF&AAL} yhjH::kan</i>	diese Arbeit
SL89	GB350 <i>yciR::FLAG::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL90	GB350 <i>mlrA::FLAG::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL93	GB350 <i>mlrA::FLAG (Δkan)</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL94	GB350 <i>ΔyciR mlrA::FLAG (Δkan)</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL95	GB350 <i>ΔydaM mlrA::FLAG (Δkan)</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL106	GB350 <i>ydaM::ydaM^{wt} yciR::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL107	GB350 <i>ydaM::ydaM^{A-} yciR::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL109	GK1100 <i>ΔmlrA</i>	diese Arbeit
SL111	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yaiC::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL112	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR ycdT::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL113	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yddV::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL114	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR ydeH::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL115	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yeal::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL116	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yeaJ::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL117	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yeaP::kan</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL118	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yedQ::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL119	GB350 <i>ΔydaM ΔyciR yfiN::cat</i>	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013

SL120	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yliF::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL121	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yneF::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL122	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yddU::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL123	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yegE::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL124	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yfeA::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL125	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yfgF::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL126	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yhdA::cat$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL127	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yhjK::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL128	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR rtn::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL129	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yahA::cat$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL130	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR ycgF::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL131	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR ycgG::cat$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL132	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR ydiV::cat$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL133	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yjcC::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL134	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR ylaB::cat$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL135	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yliE::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
SL136	GB350 $\Delta ydaM \Delta yciR yoaD::kan$	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013

Außerdem wurde während dieser Arbeit der Reporterstamm des BacterioMatch[®] II Two-Hybrid Systems von Agilent für das bakterielle Two-Hybrid (BTH; siehe Kapitel 3.6.11) verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat von *E. coli* XL1-BLue MRF' und wird in Form kompetenter Zellen geliefert. Der relevante Genotyp ist wie folgt: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' lacI^q HIS2 aadA, KanR]$.

3.3.2 Bakteriophagen

In dieser Arbeit wurde der P1_{vir} Phage als transduzierender Bakteriophage aus der Laborsammlung eingesetzt.

3.3.3 Plasmide

Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pBT	BacterioMatch [®] II Two-Hybrid System Vektor, kodiert λ cI-Repressor, induzierbar mit <i>lac-UV5</i> Promotor, CmR	Agilent Technologies

3 MATERIAL UND METHODEN

pCP20	FLP-Helferplasmid zur Entfernung von AntibiotikaResistenzkassetten nach der Ein-Schritt-Inaktivierung; kodiert FLP-Rekombinase, Synthese von FLP ist temperaturinduzierbar, temperatursensitive Replikation, AmpR	Datsenko & Wanner, 2000
pETDuet	Überexpressionsvektor mit zwei „Multiple-Cloning-Sites“ zur Co-Expression von Proteinen mit einem N-terminalen His6-oder C-terminalen S-tag, AmpR	Merck (vorher: Novagen)
pKD45	Template-Plasmid für CcdB-Toxin-KanR-Kassette (AmpR, KanR)	Datsenko & Wanner
pKD46	Helferplasmid, kodiert λ Red Rekombinase, temperatursensitive Replikation, AmpR	Datsenko & Wanner, 2000
pQE60	Vektor zur Überexpression von Proteinen mit einem C-terminalen 6xHis-Tag, AmpR	Qiagen
pRH800	Vektor mit induzierbarer p_{tac} Promotor, AmpR	Lange & Hengge-Aronis, 1994
pSUB11	Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten FLAG-Tag::kan-Kassette; pir abhängiges $oriR\gamma$, AmpR, KanR	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pTRG	BacterioMatch II Two-Hybrid System Vektor; kodiert α NTD RNAP, induzierbarer lpp/lac -UV5 Promotor, TetR	Agilent Technologies
pBT::rpoS	pBT-Derivat, kodiert für λ cl-RpoS	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pHW4	pQE60::mlrA, kodiert für MlrA-His6 (Schnittstellen NcoI/BglII)	H. Weber
pHW16	pQE60::ydaM, kodiert für YdaM-His6	Weber <i>et al.</i> , 2006
pHW20	pQE60::yciR, kodiert für YciR-His6	Weber <i>et al.</i> , 2006
pTRG::rssB	pTRG-Derivat, kodiert für RNAP- α NTD-RssB	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pYciR	pRH800-Derivat kodierend für yciR	C. Pesavento
pYciR-AAL	pRH800-Derivat kodierend für das mutierte YciR-E440A (Austausch von Glutamat440 zu Alanin; EAL zu AAL)	C. Pesavento
pYdaM	pRH800-Derivat kodierend für ydaM	C. Barembruch
pSL01	pTRG::yciR, kodiert für RNAP- α NTD-YciR	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL02	pTRG::ydaM, kodiert für RNAP- α NTD-YdaM	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL03	pBT::yciR, kodiert für λ cl-YciR	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL04	pTRG::mlrA, kodiert für RNAP- α NTD-MlrA	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL05	pBT::ydaM, kodiert für λ cl-YdaM	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL06	pBT-yciR-NTD, kodiert NTD von YciR fusioniert an λ cl	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL07	pBT-yciR-GGDEF, kodiert YciR-GGDEF-Domäne fusioniert an λ cl	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL08	pBT-yciR-EAL, kodiert YciR-EAL-Domäne fusioniert an λ cl	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL09	pTRG-ydaM-NTD, kodiert YdaM-NTD fusioniert an RNAP- α NTD	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013

3.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

pSL10	pTRG- <i>ydaM</i> -GGDEF, kodiert YdaM-GGDEF-Domäne fusioniert an RNAP- α NTD	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL11	pTRG- <i>mlrA</i> -NTD, kodiert MlrA-NTD fusioniert an RNAP- α NTD	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL12	pTRG- <i>mlrA</i> -CTD, kodiert MlrA-CTD fusioniert an RNAP- α NTD	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL13	pYdaM-I ⁻ (= pRH800:: <i>ydaM</i> -I ⁻ ; R323G/D325G, Austausch von Arginin323 und Aspartat325 zu Glycin)	Lindenberg, 2008, Diplomarbeit
pSL14	pYdaM-A ⁻ ; pRH800:: <i>ydaM</i> -A ⁻ (E334A/E335A, Austausch von Glutamat334 und Glutamat335 zu Alanin)	Lindenberg, 2008, Diplomarbeit
pSL18	pETDuet::His6:: <i>ydaM</i> , kodiert für His6-YdaM	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL19	pETDuet::His6:: <i>ydaM</i> -A ⁻ , kodiert für His6-YdaM-A ⁻ (E334A/E335A)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL20	pETDuet::His6:: <i>ydaM</i> -I ⁻ , kodiert für His6-YdaM-I ⁻ (R323G/D325G)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL21	pETDuet:: <i>mlrA</i> ::S, kodiert für MlrA-S	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL22	pETDuet:: <i>ydaM</i> ::S, kodiert für YdaM-S	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL26	pRH800:: <i>yciR</i> - Δ EAL, kodiert für YciR mit deletierter EAL-Domäne	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL32	pRH800:: <i>yciR</i> - Δ NTD, kodiert für YciR mit deletierter NTD	diese Arbeit
pSL35	pETDuet::His6:: <i>yciR</i> , kodiert für His6-YciR	diese Arbeit
pSL36	pQE60:: <i>yciR</i> -AAL, kodiert für YciR-AAL-His6 (E440A)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL38	pETDuet::His6:: <i>mlrA</i> , kodiert für His6-MlrA	diese Arbeit
pSL39	pQE60:: <i>yciR</i> -GGAAF, kodiert für YciR-GGAAF-His6 (D316A/E317A)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL45	pBT:: <i>ydaM</i> -NTD, kodiert für NTD von YdaM fusioniert an λ CI	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL46	pBT:: <i>ydaM</i> -GGDEF, kodiert für GGDEF-Domäne von YdaM fusioniert an λ CI	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL51	pETDuet::His6:: <i>yhjH</i> , kodiert für His6-YhjH	diese Arbeit
pSL58	pETDuet::6His:: <i>ydaM</i> - Δ NTD), YdaM-GGDEF-Domäne mit N-terminalen 6xHis-Tag	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL65	pQE60:: <i>yciR</i> -G/R, YciR mutiert für R248A & AAAAF (Austausch von Arginin248, Glycin314, Glycin315, Aspartat316 und Glutamat317 zu Alanin)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL67	pQE60:: <i>yciR</i> -GGAAF/AAL, kodiert für YciR-GGAAF/AAL-His6 (DE316/7AA & E440A; Austausch Aspartat316, Glutamat317, Glutamat440 zu Alanin)	Lindenberg <i>et al.</i> , 2013
pSL68	pQE60:: <i>mlrA</i> , kodiert für MlrA-His6 (Schnittstellen NcoI/BamHI)	diese Arbeit
pSL79	pQE60:: <i>mlrA</i> -RD55/58AA, kodiert für MlrA-RD55/58AA-His6 (Austausch Arginin55 und Aspartat58 zu Alanin)	diese Arbeit

pSL80	pQE60:: <i>mlrA</i> -RD107/110AA, kodiert für MlrA-RD107/110AA-His6 (Austausch Arginin107 und Aspartat110 zu Alanin)	diese Arbeit
-------	---	--------------

3.4 Mikrobiologische Techniken

3.4.1 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden 20 min bei ein bar und 121°C feucht autoklaviert (*Ausnahme*: His DO Amino Acid Supplement 15 min). Glaswaren wurden 8 Stunden bei 180°C trocken sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen Milliporefilter (Porendurchmesser 0,22 oder 0,45 µm) sterilfiltriert.

3.4.2 Kultivierung

Flüssigkulturen wurden in Glasgefäßen bei 28°C oder 37°C aerob im Reagenzglasroller oder im Schüttelwasserbad bei 300 rpm zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffzufuhr angezogen. Dafür wurden die Kulturgefäße zu höchstens 20% befüllt. Die Kultivierung von Bakterienstämmen auf Festmedien erfolgte ebenfalls bei 28°C oder 37°C im Brutschrank.

3.4.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm mit einem Photometer bestimmt. Als Referenz diente das unverbrauchte Wachstumsmedium. Ab einer OD₅₇₈ von über 0,5 wurde die zu messende Kultur entsprechend verdünnt, um die Linearität des Verhältnisses von Bakterienkonzentration zur OD₅₇₈ zu gewährleisten.

3.4.4 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten

Die Aufbewahrung von Bakterienstämmen über längere Zeit erfolgte in 7% DMSO bei -80°C. Hierbei wurden Übernachtskulturen in LB mit DMSO versetzt und tiefgefroren. Bakterien auf Festmedien wurden über einen Zeitraum von max. einer Woche bei 4°C aufbewahrt. Phagenlysate wurden in Glasröhrchen ebenfalls bei 4°C aufbewahrt.

3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats

Zur Herstellung eines P1-Lysats wurde eine Übernachtskultur (5 ml) des Spender-Bakterienstammes angezogen und 1:100 verdünnt (50 µl in 5 ml LB) und bei 37°C bis zu einer leichten Trübung

($OD_{578} = 0,3$) wachsen gelassen. Anschließend wurde ein Tropfen 1 M $CaCl_2$ und ein bis zwei Tropfen eines Wildtyp- $P1_{vir}$ -Lysats hinzugefügt und für die Lyse der Bakterienzellen bei $37^\circ C$ für ca. 3-8 Stunden inkubiert. Bei Verminderung der Trübung und Sichtbarwerden von Zelltrümmern wurden 5-10 Tropfen Chloroform zur Abtötung der restlichen lebenden Zellen hinzugefügt und für 10 min bei $37^\circ C$ inkubiert. Schließlich wurde das Lysat 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein steriles Glasröhrchen überführt. Für die Aufbewahrung bei $4^\circ C$ wurden weitere 2-3 Tropfen Chloroform hinzugegeben.

3.4.6 Transformation

Unter Transformation versteht man die Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Die Übertragung von gereinigten Plasmiden in die gewünschten Rezipientenstämme erfolgte mit Hilfe der TSS-Transformation (siehe Kapitel 3.5.2) Diese wies eine geringere Transformationseffizienz auf, war aber schneller durchzuführen. Für eine Transformation von ligierten Plasmiden oder (schwer transformierbaren) gereinigten Plasmiden, wurde die Elektroporation (siehe Kapitel 3.5.14) genutzt, die eine sehr hohe Transformationseffizienz aufwies.

3.4.7 P1-Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man die Übertragung von DNA einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle durch Bakteriophagen. Die Stammkonstruktion mittels P1-Transduktion erfolgte nach Standardvorschriften [Miller, 1972, 1992].

Hierzu wurde ein bereits hergestelltes P1-Lysat vom Spenderbakterium verwendet, um eine Infizierung und somit Transduktion der Spender-DNA in eine Empfängerkultur durchgeführt. Dabei wurde eine 5 ml Übernachtskultur des Empfängerstammes bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert sowie mit 12,5 μl 1 M Calciumchlorid versetzt. Anschließend wurden zu je 200 oder 500 μl Zellen 2 Tropfen des Phagenlysats hinzugegeben. Die Kultur wurde 5-10 min bei Raumtemperatur und anschließend nach Zugabe von 0,5 ml DYT-Medium im Roller für 20 min bei $37^\circ C$ inkubiert. Schließlich wurden die Zellen nach Zugabe von einem Tropfen 1 M Natriumcitrat auf LB-Agar-Platten, die das jeweils notwendige Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausplattiert.

3.4.8 Motilitätsassay

Um das Schwimmverhalten von Bakterienstämmen in einem sog. Motilitätsassay zu testen, wurden 4 μl einer auf $OD_{578} = 4$ eingestellten Übernachtskultur in den Schwimagar (0,5 % Bacto-Trypton, 0,5 % NaCl, 0,3 % Agar; siehe auch Kapitel 3.2.1) pipettiert. Anschließen wurden die Platten bei $28^\circ C$ oder $37^\circ C$ für 5-8 Stunden inkubiert.

3.5 Molekularbiologische Techniken

3.5.1 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Isolation erfolgte aus 5 bis 10 ml Übernachtskultur mittels des InnuPrep Plasmid Mini Kits von Analytik Jena.

3.5.2 TSS-Transformation

Die Transformation von gereinigten Plasmiden wurde nach Chung *et al.* durchgeführt [Chung *et al.*, 1989]. Dabei wurden 2 ml LB mit dem Rezipientenstamm angeimpft und ca. 2 h bei 37°C bis zu einer leichten Trübung inkubiert ($OD_{578} = 0,3-0,4$; logarithmische Wachstumsphase). Anschließend wurden 200 μ l Zellen mit 200 μ l 2x TSS (LB-Medium, 20 % (w/v) PEG-6000, 100 mM $MgSO_4$, 10 % DMSO (v/v)) und 1-2 μ l Plasmid-DNA für ca. 30-60 min auf Eis stehen gelassen. Schließlich wurde der Ansatz für ca. 30-60 min bei 37°C im Roller inkubiert und auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3.5.3 Isolation von genomischer DNA

Für die Präparation chromosomaler DNA wurde 1 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (14.000 rpm) und das Pellet anschließend in 1 ml 0,85 %-ige NaCl-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension des Pellets in 500 μ l sterilem dH_2O . Anschließend wurde die Probe 10 min in heißem Wasser gekocht und nach 1-minütiger Zentrifugation auf Eis gestellt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt. Alternativ wurde das DNA-Extraction Kit von Analytik Jena verwendet.

3.5.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA erfolgte i.d.R. über die Nanodrop-Methode. DNA absorbiert Licht der Wellenlänge 260 nm, Proteine bei 280 nm. Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurde von folgender Beziehung ausgegangen: Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml Lösung. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis der OD_{260}/OD_{280} bestimmt werden, welches bei reiner DNA bei 1,8 bis 2,0 liegt.

3.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht sowohl die Vervielfältigung geringster Mengen von DNA als auch das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an Genfragmente. Die Reaktion wurde in dieser Arbeit nach den allgemeinen Vorgaben von Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.*, 1989] mit der Pfu- und

Optitaq-Polymerase durchgeführt. Ein üblicher PCR-Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl: 1 Einheit DNA-Polymerase, 1x Polymerasepuffer (nach Angaben des Herstellers), 1 mM dNTPs, 2,5 mM MgSO₄, 1 µM Primer I, 1 µM Primer II, chromosomale oder Plasmid-DNA als Template und bidestilliertes Wasser.

3.5.6 Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR

Zielgerichtete Mutationen im *mlrA*- und *yjiR*-Gen wurden mittels der Zwei-Schritt-PCR unter Verwendung von vier Primern generiert [Higuchi, 1990]. Dabei stellen zwei Primer, die stromaufwärts und stromabwärts an den äußeren Enden des Ziel-Templates binden, „externe“ Primer dar. Zwei weitere, „intern“ komplementäre Primer tragen die gewünschte Mutation und lesen jeweils stromaufwärts und stromabwärts. Mit der ersten PCR kombiniert man ein Primerpaar aus „extern“ und „intern“ zur Herstellung von zwei partiell überlappenden PCR-Fragmenten. Nach Elution dieser Fragmente aus einem Agarosegel, wurden sie im Verhältnis 1:1 als Template für die zweite PCR mit dem „externen“ Primerpaar eingesetzt. Das Produkt der zweiten PCR enthielt die gewünschte Mutation und wurde nach einer Gelaufreinigung mit entsprechenden Enzymen verdaut und in den vorgesehenen Vektor kloniert.

3.5.7 DNA-Primer

Für die PCR konnten teilweise bereits hergestellte Primer verwendet werden, andernfalls wurden diese bei Metabion in Auftrag gegeben (3.5).

Tab. 3.5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

I. Primer für Klonierungen in den pBT-Vektor

<i>rpoS</i> -EcoRI (E. Klauck)	5'-CGGAATTCAGTCAGAATACGCTGAAAGTTCATG-3'
<i>rpoS</i> -XhoI (E. Klauck)	5'-GATCCTCGAGTTACTCGCGAACAGCGCTTCGATATTCAGC-3'
<i>ydaM</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGATTACGCACAACCTCAATACCCTG-3'
<i>ydaM</i> -XhoI	5'-GCTACTCGAGTTATGCCGCCAGCACGCG-3'
<i>ydaM</i> -NTD-XhoI	5'-GCTACTCGAGGATGGCGAGATGCTGCATTTGGCCTGGTTC-3'
<i>ydaM</i> -GGDEF-EcoRI	5'-GTACGAATTCATGCCGATTGAAATTTATGGCGACAAG-3'
<i>yjiR</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGAAAACCGTTAGGGAGTCCACAACG-3'
<i>yjiR</i> -XhoI	5'-GCTACTCGAGTTATGCGCGCTTCAGATAGCG-3'
<i>yjiR</i> -NTD-XhoI	5'-GCTACTCGAGGTGATCGATTAAATCCTGCATTGCGTTACG-3'
<i>yjiR</i> -GGDEF-EcoRI	5'-GTACGAATTCGCCGAATAACCGTGATTTTTTCGAAGCGGC-3'
<i>yjiR</i> -GGDEF-XhoI	5'-GCTACTCGAGCCAGGTGATTTTCGGTTGATAGTGAATAAC-3'

3 MATERIAL UND METHODEN

<i>yciR</i> -EAL-EcoRI	5'-GTACGAATTCCCGTCACGCCGACACAGCAATGTACACAGCG-3'
<i>yegE</i> -GGDEF-EcoRI	5'-GTACGAATTCCTCACGCAAAATGCTGCGCCAG-3'
<i>yegE</i> -GGDEF-XhoI	5'-GCTACTCGAGATCAAGCGACATCGCCGC-3'
<i>yaiC</i> -pBT-EcoRI-for (O. Sarenko)	5'-GCCGAATTCCTGGCGGAACATAAACGCAGG-3'
<i>yaiC</i> -pBT-BglIII-rev (O. Sarenko)	5'-GCCAGATCTTCAGGCCGCCACTTCGGTGC-3'

II. Primer für Klonierungen in den pTRG-Vektor

<i>rssB</i> -EcoRI (E. Klauck)	5'-GCCAATTCAGACGCAGCCATTGGTCGGAAAACAG-3'
<i>rssB</i> -XhoI (E. Klauck)	5'-GATCCTCGAGTTATTCTGCAGACAACATCAAGCGCAGTCG-3'
<i>ydaM</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCAGATGATTACGCACAACCTCAATACCCTG-3'
<i>ydaM</i> -XhoI	5'-GCTACTCGAGTTATGCCGCCAGCACGCGg-3'
<i>ydaM</i> -NTD-XhoI	5'-GCTACTCGAGGATGGCGAGATGCTGCATTTGGCCTGGTTC-3'
<i>ydaM</i> -GGDEF-EcoRI	5'-GTACGAATTCAGCCGATTGAAATTTATGGCGACAAGCTC-3'
<i>mlrA</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCAGATGGCGCTTTACACAATTGGTG-3'
<i>mlrA</i> -XhoI	5'-GCTACTCGAGTTAAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGGCC-3'
<i>mlrA</i> -NTD-XhoI	5'-GCTACTCGAGCCACGTTTCGCAGGCTATGTAGATTGCC-3'
<i>mlrA</i> -CTD-EcoRI	5'-GTACGAATTCAGCTGCGAACGTGGATCAAAGAGCGCGG-3'
<i>yciR</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCAGATGAAAACCGTTAGGGAGTCCACAACG-3'
<i>yciR</i> -XhoI	5'-GCTACTCGAGTTATGCGCGCTTCAGATAGCG-3'
<i>yeaP</i> -d-452(EcoRI) (G. Klauck)	5'-CACAATGAATTCAAAAAGAGGCACTGGTTGAACAG-3'
<i>yeaP</i> -u-1038(XhoI) (G. Klauck)	5'-TGTGAACTCGAGTCAGGAATGTAGCGCTGG-3'

III. Primer für Klonierungen in den pRH800-Vektor

<i>yciR</i> -EcoRI (Pesavento, 2011)	5'-GCCAATTCGCTGTAAACCGGAGGATATGC-3'
<i>yciR</i> -HindIII (Pesavento, 2011)	5'-CGTGACAAGCTTTTATGCGCGCTTCAGATAGCG-3'
<i>yciR</i> -ΔNTD-EcoRI	5'-GCCAATTCGCTGTAAACCGGAGGATATGCATCATGCGCAATAACCGT GTATTTTTTCG-3'
<i>yciR</i> -ΔEAL-HindIII	5'-GCTAAGCTTTTACCAGGTGATTTTCGG-3'

IV. Primer für Klonierungen in den pCAB18-Vektor

<i>yaiC</i> -EcoRI (Tschowri, 2012)	5'-CGGAATTCCTAAGGAGGTTCTGAATGTTCCCAAAAATA-3'
--	--

<i>yaiC</i> -HindIII (Tschowri, 2012)	5'-CGTAAGCTTTCAGGCCGCCACTTCGGTG-3'
<i>yhjH</i> -EcoRI (Tschowri, 2012)	5'-CGGAATTC AAGGAGGACTGAGATGATAAGGCAGG-3'
<i>yhjH</i> -HindIII (Tschowri, 2012)	5'-GCAGAAGCTTCTGGTTGATAGTCGGTTTGAGTC-3'

V. Primer für Klonierungen in den pQE60-Vektor

<i>ydaM</i> -NcoI (Weber <i>et al.</i> , 2006)	5'-TTCATGCCATGGCGTGGCTTTTTTGGCGATCGGATAGC-3'
<i>ydaM</i> -BglII (Weber <i>et al.</i> , 2006)	5'-ATTAGATCTTGCCGCCAGCACGCGGTTGCGTCCATC-3'
<i>yciR</i> -NcoI (Weber <i>et al.</i> , 2006)	5'-CATGCCATGGAAACCGTTAGGGAGTCCACAACG-3'
<i>yciR</i> -BamHI (Weber <i>et al.</i> , 2006)	5'-CGCGGATCCTGCGCGCTTCAGATAGCGTTTATACC-3'
<i>mlrA</i> -NcoI (Weber, 2007)	5'-TTCATGCCATGGCGCTTTACACAATTGGTGAAG-3'
<i>mlrA</i> -BglII (Weber, 2007)	5'-AATGGAAGATCTAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGG-3'
<i>mlrA</i> -NcoI	5'-CATGCCATGGCGCTTTACACAATTGG-3'
<i>mlrA</i> -BamHI	5'-CGCGGATCCAATGCCGAGTGGGAAAATATC-3'

VI. Primer für Klonierungen in den pETDuet-Vektor mit N-terminalen 6xHis-Tag

<i>ydaM</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGATTACGCACAACCTCAATACCCTG-3'
<i>ydaM</i> -HindIII	5'-GGCCAAGCTTTTATGCCGCCAGCACGCGGTTGC-3'
<i>ydaM</i> - Δ NTD-EcoRI	5'-GTACGAATTCATGCCGATTGAAATTTATGGCGACAAGC-3'
<i>mlrA</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGGCGCTTTACACAATTGGTG-3'
<i>mlrA</i> -HindIII	5'-GCTAAGCTTTTAAATGCCGAGTGGG-3'
<i>yciR</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGAAAACCGTTAGGGAGTCCACAACG-3'
<i>yciR</i> -HindIII (Pesavento, 2011)	5'-CGTGACAAGCTTTTATGCGCGCTTCAGATAGCG-3'
<i>yhjH</i> -EcoRI	5'-GTACGAATTCATGATAAGGCAGGTTATCCAG-3'
<i>yhjH</i> -HindIII (Pesavento, 2011)	5'-GCTAAGCTTTTATAGCGCCAGAACCGCC-3'

VII. Primer für Klonierungen in den pETDuet-Vektor mit C-terminalen S-Tag

<i>ydaM</i> -NdeI	5'-GTCCATATGATTACGCACAACCTCAATACC-3'
<i>ydaM</i> -XhoI	5'-GCTCTCGAGTGCCGCCAGCACGCGGTTGC-3'
<i>mlrA</i> -NdeI	5'-GTCCATATGGCGCTTTACACAATTGGTG-3'

3 MATERIAL UND METHODEN

<i>mlrA</i> -XhoI	5'-GCTCTCGAGAATGCCGAGTGGGAAAATATCATGG-3'
-------------------	--

VIII. Primer für die Mutagenese von *ydaM*

YdaM-E334A/E335A (Weber <i>et al.</i> , 2006)	
<i>ydaM</i> -A-site-f	5'-CGTTGGGGAGGCGCAGCGTTTGTCTTATTGC-3'
<i>ydaM</i> -A-site-r	5'-TAAGACAAACGCTGCGCCTCCCCAACG-3'
YdaM-RD323/5GG (A. Mehliis)	
<i>ydaM</i> -I-site-f	5'-GCGCTGGCAAAGGCGGTTTGGTG-3'
<i>ydaM</i> -I-site-r	5'-CCAAACCGCCTTGGCCAGCGC-3'

IX. Primer für die Mutagenese von *yciR*

YciR-E440A (Pesavento, 2011)	
<i>yciR</i> -AAL-f	5'-CGCAGTCTGGCAGCACTAGTACG-3'
<i>yciR</i> -AAL-r	5'-CGTACTAGTGCTGCCAGACTGCG-3'
YciR-DE316+317AA (Pesavento, 2011)	
<i>yciR</i> -GGAAF-f	5'-CGTCCAGGTGGGGCTGCGTTTCTGGTACTGGC-3'
<i>yciR</i> -GGAAF-r	5'-GCCAGTACCAGAAACGCAGCCCCACCTGGACG-3'
YciR-R248A & GGDE314-317AAAA	
<i>yciR</i> -R248A-f	5'-GTATCACCGGACTGCCGAATGCGAACGCAATGCAGGATTT-3'
<i>yciR</i> -R248A-r	5'-CGATTAAATCCTGCATTGCGTTCGCATTCGGCAGTCCGGTG-3'
<i>yciR</i> -AAAAF-f	5'-GGTGTGGCGCGTCCAGCGGCGGCTGCGTTTCTGGTACTGGC-3'
<i>yciR</i> -AAAAF-r	5'-GGATGCCAGTACCAGAAACGCAGCCGCCGCTGGACGCGCCAAC-3'

X. Primer für die chromosomale Punktmutagenese von *ydaM*

<i>ydaM</i> - <i>ccdB</i> -f (step 1)	5'-CGTTTAAACACATTAACGATCTCTATGGGCATTCTAAAGGTGATGAG GCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGC-3'
<i>ydaM</i> - <i>ccdB</i> -r (step 1)	5'-CCGCGGCTTATGCCGCCAGCACGCGGTTGCGTCCATCATTTTTCGCCC GACGGATAACAGAAAGGCCGGG-3'
<i>ydaM</i> -f (step 2)	5'-GGATCTCAATGATTACGCACAACCTCAATACC-3'
<i>ydaM</i> -r (step 2)	5'-GCGGCTTATGCCGCCAGCACGC-3'

XI. Primer für die chromosomale Punktmutagenese von *yciR*

<i>yciR</i> - <i>ccdB</i> -f (step1)	5'-GCCTATGGGCATTTGTTTGGTGACCAGTTATTACGCGACGTGTCATTG GCCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGC-3'
<i>yciR</i> - <i>ccdB</i> -r (step1)	5'-GGCGTACGACATCGAGAATCACCCAACGGCCTAAAGGCACAATTAG CCCCGGATAACAGAAAGGCCGGG-3'
<i>yciR</i> -f	5'-CCGGAGGATATGCATCATGAAAACCG-3'
<i>yciR</i> -r	5'-CTACTTATGCGCGCTTCAGATAGCG-3'

XII. Primer zur Herstellung eines chromosomalen FLAG-Tags von *yciR*

<i>yciR</i> -FLAG-f (pSUB11- <i>yciR</i> -f)	5'-CCTTCGAACGCTGGTATAAACGCTATCTGAAGCGCGCAGACTACAAA GACCATGACGG-3'
---	--

<i>yciR-FLAG-r</i> (pSUB11-yciR-r)	5'-GACGGGATATAGCGCTAAGTATATATATTCATCTACTTACATATGAATA TCCTCCTTAG-3'
---------------------------------------	---

XIII. Primer zur Herstellung eines chromosomalen FLAG-Tags von *mlrA*

<i>mlrA-FLAG-f</i>	5'-CACCAGTTGGCAAGAACAAGGCCATGATATTTTCCCACTCGGCATTG ACTACAAAGACCATGACGG-3'
<i>mlrA-FLAG-r</i>	5'-GTTAACGAAAGGATTGTACAGTAAAGCGCATTGTGTTAACGAATCATT ACATATGAATATCCTCCTTAG-3'

XIV. Primer zur Herstellung der *csgD*-Promotorregion für UV-crosslinking Versuche

FMO-49 (F. Mika)	5'-CACCGAAATATTTTTTATATGC-3'
FMO-18 (F. Mika)	5'-GAAGCACCAGAAGTACTGACAGATG-3'

XV. Primer zur Herstellung der *csgD*-Promotorregion für die EMSA-Studien

FMO-49 (F. Mika)	5'-CACCGAAATATTTTTTATATGC-3'
FMO-50 (F. Mika)	5'-CAATCTAGCCATTACAAATCTTA-3'

3.5.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten oder verdauten PCR-Fragmenten erfolgte, wenn sie nicht über Agarosegelelektrophorese gereinigt wurden (siehe Kapitel 3.5.10), mit dem PCR purification Kit von Qiagen.

3.5.9 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben aus Restriktionsverdau- bzw. PCR-Ansätzen wurden mit 6-fach konzentriertem Gelauftragungspuffer versetzt und auf ein 1,0%-iges bis 2%-iges Agarosegel (in TAE) aufgetragen. Als Marker wurde der 100 bp extended von NEB verwendet, so dass die erwarteten Fragmentgrößen identifiziert werden konnten. Die DNA wurde bei 90-110 V und maximaler Stromstärke für etwa 1-1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Anschließend wurde die DNA 20-30 min in 5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Unter dem UV-Licht wurden die DNA-Fragmente im Gel sichtbar.

50x TAE-Stammlösung

242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
ad 1 l H₂O dest.

Gelauftragungspuffer (6x)

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

3.5.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpells aus Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem DNA-Extraktionskit QIAquick von Qiagen aus dem Gel aufgereinigt.

3.5.11 Restriktionsverdau

Zur Plasmidkonstruktion oder -analyse wurden Restriktionsverdau wie folgt angesetzt: ca. 0,2 - 1 µg DNA wurden mit ca. 2 - 8 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA in einem Gesamtvolumen von 10-50 µl verdaut. Die Wahl des Reaktionspuffers richtete sich nach den Herstellerangaben für das jeweils verwendete Enzym. Die Inkubationsdauer bei 37°C betrug mindestens 2 h. Wenn möglich, wurden die Restriktionsenzyme nach der Inkubation für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert, sonst ggf. mithilfe der Gelextraktion oder PCR purification nach Qiagen (siehe Kapitel 3.5.10 und 3.5.8) aufgereinigt. Nach dem Verdau von Vektoren wurde durch die Zugabe von 1 µl CIP (Calf alkaline phosphatase) für ca. 2 h eine Dephosphorylierung durchgeführt und so eine Religation vermindert. Anschließend wurden die Ansätze über eine PCR purification nach Qiagen gereinigt.

3.5.12 Ligation

Die Ligation eines geschnittenen Vektors mit einem PCR-Fragment erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase nach Standardvorschrift [Sambrook *et al.*, 1989]. Ein Ligationsansatz war i.d.R. in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit etwa 5-10 µg Insert-DNA, 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA, 1x Ligationspuffer und 1-2 Einheiten T4-Ligase und bidestillierten Wasser. Die Inkubation erfolgte i.d.R. in einem Thermocycler (140 Zyklen mit abwechselnd 30 sec 10°C, 30 sec 30°C).

3.5.13 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Von einer Kultur des entsprechenden Stammes (ER2566, FI1202, MC4100) wurde eine Übernachtskultur bei 37°C in 5 ml LB gezogen und zum Animpfen einer Hauptkultur (1:100 Verdünnung) verwendet, die in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 im Wasserbad oder Schüttler inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen geerntet und nach mehreren Zentrifugation- und Resuspensionsschritten mit eiskaltem destilliertem Wasser in eiskaltem 10%igem Glycerin mit einer 200-500fachen Konzentration des Ausgangsvolumen aufgenommen und aliquotiert bei -80°C gelagert.

3.5.14 Elektroporation

DNA aus Ligationsansätzen (0,1-1 µg) wurde durch Elektroporation [Calvin & Hanawalt, 1988] in kompetente Zellen (40 µl) transformiert. Dabei wurden die Zellen in in Elektroporationsküvetten

(0,2 cm, BioRad) überführt und über den Elektroporator ein Elektropuls von 2500 V abgegeben. Anschließend wurde sofort 0,5 ml LB dazugegeben, der Ansatz für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert.

3.5.15 Sequenzierungen

Sequenzierungen von PCR-Fragmenten oder Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC Biotech AG oder LGC Genomics durchgeführt.

3.5.16 Herstellung chromosomaler *lacZ*-Reporterfusionen

In dieser Arbeit wurden *lacZ*-Reporterfusionen von *csgB*, *mtrA*, *yciR* und *ydaM* verwendet, die durch G. Klauck bzw. N. Sommerfeldt-Impe in das Chromosom von *E. coli* gekreuzt wurden (siehe Tab. 3.3).

Dazu wurden in dem zunächst Plasmid-kodierte Fusionskonstrukte durch Klonierung in den *lacZ*-Fusionsvektor pJL28 kloniert [Lucht *et al.*, 1994] und anschließend mithilfe von *in vitro* Rekombination auf den Phagen λ RS45 oder λ RS74 übertragen [Simons *et al.*, 1987]. Anschließend erfolgt eine doppelt homologe Rekombination der Gene *lacZ'* und *bla'* des Phagen mit den auf den jeweiligen Fusionsplasmiden divergent orientierten Genen *lacZ* und *bla*. Über die Integration des Phagen an der *attB*-site von *E. coli* wird die Fusion stabil in das Chromosom gekreuzt und durch PCR-Tests [Powell *et al.*, 1994] auf Einzellysogenie geprüft.

3.5.17 Herstellung chromosomaler Knockout-Mutationen durch Ein-Schritt-Inaktivierung

Chromosomale Knockout-Mutationen wurden nach der Methode von Datsenko und Wanner [Datsenko & Wanner, 2000] durchgeführt. Dabei wurden Chloramphenicol-Resistenz – oder Kanamycin-Resistenzkassetten (*cat* oder *kan*) anstelle eines chromosomalen Gens von *E. coli* über homologe Rekombination inseriert.

Dies war durch PCR-Fragmente möglich, die die Resistenzkassette mit flankierenden, homologen Gensequenzen kodierte. Dazu wurden Primer konstruiert, die am 5'-Ende etwa 50 bp der homologen Sequenz zum mutierenden Gen enthielt und am 3'-Ende ca. 20 bp die Sequenz zur Amplifikation der Resistenzgenkassette. Als Template wurde hier das Plasmid pKD3 für das *cat*-Gen und pKD4 für das *kan*-Gen verwendet. Nach Amplifikation und Aufreinigung des PCR-Fragments wurde dieses durch Elektroporation in elektrokompetente Zellen transformiert. Diese Zellen haben durch die Arabinose-Induktion des temperatursensitiven pKD46-Plasmids die λ Red Rekombinase exprimiert. Die korrekte Insertion der Antibiotika-Resistenzkassette wurde mittels PCR überprüft [Datsenko &

Wanner, 2000]. Durch P1-Transduktion dieser Kreuzungen in demselben Stammhintergrund konnten unerwünschte Rekombinationsereignisse ausgeschlossen werden.

3.5.18 Herstellung chromosomaler Punktmutationen durch Zwei-Schritt-Mutagenese

Zur Herstellung einer chromosomalen Punktmutation wurde die sog. Zwei-Schritt-Mutagenese nach Datsenko & Wanner verwendet (B. Wanner, persönliche Kommunikation). Diese Methode basiert auf einer Modifikation der Ein-Schritt-Inaktivierung [Datsenko & Wanner, 2000] und wurde in dieser Arbeit für die Punktmutation konservierter Motive (GGDEF-, EAL-, I-site-Motiv) von *yciR* und *ydaM* verwendet.

Im ersten Schritt wurde zunächst ein Fragment mithilfe des Plasmids pKD45 amplifiziert. Dieses Plasmid kodiert für das CcdB-Toxin unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors, sowie für eine Kanamycin-Resistenzkassette. Nach der Amplifikation und Aufreinigung des PCR-Fragments, das flankierende, homologe Gensequenzen (nach dem Prinzip der Ein-Schritt-Inaktivierung, siehe Kapitel 3.5.17) für *yciR* und *ydaM* enthielt (für Primer siehe 3.5), wird dieses durch Elektroporation in den gewählten, mit pKD46-transformierten Stamm eingebracht. Die λ Red Rekombinase vermittelte, homologe Rekombination in die gewählte Genregion ließ eine Mutante mit einer Geninaktivierung durch die Substitution *yciR::kan::ccdB* bzw. *ydaM::kan::ccdB* entstehen. Eine Selektion wird hier zunächst durch die Kanamycin-Resistenz durchgeführt. Sofern eine Sensitivität gegenüber Rhamnose mithilfe von Rhamnose-M9-Platten (siehe Kapitel 3.2.1) festgestellt werden konnte, wurden Test-PCRs zur Verifizierung der Kreuzungen herangezogen.

Im zweiten Schritt wurde ein PCR-Fragment (Primer siehe 3.5), das die gewählte Punktmutation von *yciR* oder *ydaM* trug, in kompetente Zellen der im ersten Schritt hergestellten *kan::ccdB* Mutanten, die über pKD46 die λ Red Rekombinase exprimierten, durch Elektroporation transformiert. Durch die induzierte Expression der λ Red Rekombinase konnte wieder über homologe Rekombination eine Substitution in der gewünschten *yciR::kan::ccdB* bzw. *ydaM::kan::ccdB* Genregion mit Verlust der Kanamycinkassette sowie des *ccdB*-Toxingens stattfinden. Daher erfolgte eine Selektion auf Rhamnose-M9-Platten. Nach Verifizierung über PCR und Sequenzierung erhielt man einen Wildtyp-Stamm, der nur die gewünschte Punktmutation für *yciR* (AAL, GGAAF) oder *ydaM* (A⁻, I⁻) trug. Als Kontrolle wurde außerdem das Wildtyp-Gen zurückgekreuzt.

3.5.19 Herstellung chromosomaler 3xFLAG-Tag-Epitope

Chromosomale 3xFLAG-Tag-Epitope wurden durch Kreuzungen für *yciR* und *mlrA* nach Uzzau *et al.* [Uzzau *et al.*, 2001] hergestellt. Auch diese Methode basiert auf der Ein-Schritt-Inaktivierung (siehe Kapitel 3.5.17) [Datsenko & Wanner, 2000].

Hierbei wurde ein PCR-Fragment mithilfe des Plasmids pSUB11 (Primer siehe 3.5), das

den 3xFLAG-Tag und eine Kanamycin-Resistenzkassette kodiert, mit flankierenden, homologen Gensequenzen für *yciR*- und *mlrA* amplifiziert. Nach Aufreinigung des PCR-Fragments erfolgte die Elektroporation in den gewählten, mit pKD46-transformierten W3110-Stamm. Über die induzierte Expression der λ Red Rekombinase wurde das Fragment durch homologe Rekombination C-terminal im offenen Leseraster nach dem Codon der letzten Aminosäure inseriert. Dadurch erhielt man den Stamm für *yciR::FLAG::kan* bzw. *mlrA::FLAG::kan*. Die Selektion erfolgte über die gekreuzte Kanamycin-Resistenz und eine Verifizierung über PCR-Analyse und Sequenzierung. Durch P1-Transduktion der *yciR::FLAG::kan*- bzw. *mlrA::FLAG::kan*-Kreuzungen in demselben Stammhintergrund konnten unerwünschte Rekombinationsereignisse ausgeschlossen werden.

3.5.20 Entfernung chromosomaler Resistenzkassetten

Die chromosomale Kreuzung von Knockout- oder 3xFLAG-Tag-Fusionen ist gekoppelt mit der Kreuzung einer Antibiotikum-Resistenzkassette. Um diese wieder zu entfernen, wurde das Plasmid pCP20 genutzt, das temperatursensitiv die FLP-Rekombinase exprimiert [Datsenko & Wanner, 2000].

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Proteinextraktion aus bakteriellen Zellkulturen

Zur Extraktion von Proteinen aus Bakterienkulturen wurden Proben bei einer OD_{578} von 2, 3, 4 sowie eine Übernachtprobe entnommen. Dabei wurde die entnommene Menge so gewählt, dass 20-50 μ g Gesamtproteingehalt zur Analyse des Proteinspiegels (YciR::FLAG, YdaM, MlrA::FLAG) über SDS-PAGE aufgetrennt werden konnten. Folgende Beziehung zwischen der OD_{578} und der Proteinkonzentration wurde vorausgesetzt: 1 ml Zellsuspension einer OD_{578} von 1 entsprechen 107 μ g Gesamtprotein. Nach der Probenentnahme wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet wurde in 900 μ l 1x M9-Medium resuspendiert mit 10% Trichloressigsäure (TCA) versetzt und mindestens 20 min auf Eis gefällt. Dem Abzentrifugieren für 10 min bei 14.000 rpm folgte das Waschen mit 1 ml reinen, eiskaltem Aceton. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und Trocknung (RT) wurde das Pellet in 1x Probenpuffer (siehe Kapitel 3.6.2) aufgenommen und 5 min bei 100°C erhitzt. Die Proben wurden bis zum Gelauftrag bei -20°C aufbewahrt.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser Technik lassen sich Proteine nach ihrer Größe in einer Polyacrylamidmatrix auftrennen. Die Proteinproben werden dazu mit SDS-Probenpuffer (siehe unten) versetzt, der β -Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken und das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Entfaltung der Proteine enthält. Die spezifische Eigenladung der Proteine wird durch die starke

negative Ladung des SDS überdeckt, so dass die denaturierten Proteine durch das Anlegen einer Spannung nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. Generell wurde nach den allgemeinen Vorgaben verfahren [Laemmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989].

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in Mini-PROTEAN II- oder III-Apparaturen (BioRad) durchgeführt. Dabei wurde i.d.R. ein feinporiges 12%-iges Trenngel mit einem großporigen 4%-igen Sammelgel (siehe unten) überschichtet (Rotiphorese Gel 30 = Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1; Roth). Die Auftrennung erfolgte im SDS-PAGE Puffer (siehe unten) bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung.

1x SDS-Probenpuffer:	SDS-PAGE Puffer:	LT-Puffer
0,06 M Tris pH 6.8	25 mM Tris	36,34 g Tris
2% SDS	0,19 M Glycin	0,8 g SDS
10% Glycerin	0,1% SDS	ad 200 ml Wasser
3% β -Mercaptoethanol		pH 8.8
0,005% Bromphenolblau		
UP-Puffer	12%-iges Trenngel:	4%-iges Sammelgel
6,06 g Tris	2,5 ml LT-Puffer	1,25 ml UP-Puffer
0,8 g SDS	4 ml Rotiphorese Gel 30	0,65 ml Rotiphorese Gel 30
ad 100 ml Wasser	3,54 ml Wasser	3,07 ml Wasser
pH 6,8	100 μ l 10% APS	50 μ l 10% APS
	10 μ l TEMED	10 μ l TEMED

3.6.3 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen, die über Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) aufgetrennt wurden, erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (AppliChem). Dazu wurde das Gel in der Färbelösung (25% Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0.05 % Coomassie Brilliant Blue R-250) erhitzt und durch gleichmäßiges Schütteln abgekühlt. Eine Entfärbung des Gels wurde durchgeführt, indem es in 10 % Essigsäure erhitzt und für etwa 10 min schüttelnd abgekühlt wurde.

3.6.4 Immunoblotanalyse (Western Blot)

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe von Western Blots. Bei dieser Methode werden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran mithilfe der Mini TransBlot-Apparatur (BioRad) („wet blot“) transferiert. Für den Transfer wurde die Membran zuerst in Methanol, dann in Wasser und anschließend in Transblotpuffer (siehe unten) gewaschen, bevor sie luftblasenfrei auf das in Transblotpuffer äquilibrierte SDS-Gel gelegt wurde. Anschließend wurde das Gel mit der Membran zwischen Whatman-Papieren (Roth)

in der Blotapparatur fixiert. Das Blottransfer erfolgte für eine Stunde bei 100 V und maximaler Stromstärke in eiskaltem Transblotpuffer. Es folgte die Absättigung der unspezifischen Bindestellen auf der Membran durch Blocken mit Milchproteinen in TBSTM übernacht (siehe unten) bei 4°C oder 1 h bei RT und dann die Inkubation mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT (10 ml TBSTM mit 1:5.000 Verdünnung von Anti-His bzw. Anti-FLAG). Nach dreimaligem Waschen mit TBST (siehe unten) wurde für etwa 2 Stunden der sekundäre Antikörper inkubiert (10 ml TBSTM mit 1:10.000 Verdünnung von Anti-Rabbit-AP), der mit einer Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert ist. Nach einer Waschung der Membran in TBST folgte nun die Äquilibrierung in AP-Puffer (siehe unten). Der Immunoblot wurde mit einer Farbelösung aus BCIP/NBT (siehe unten) entwickelt. Nach Detektion eines Signal wurde die Farbreaktion durch Waschung in TE-Puffer oder Wasser gestoppt.

Transblotpuffer:	TBST:	TBSTM
25 mM Tris	20 mM Tris pH 7.5	TBST
192 mM Glycin	150 mM NaCl	5% Magermilchpulver
20% Methanol	0,05% Tween-20	
AP-Puffer:	Färbelösung:	TE-Puffer:
100 mM Tris pH 9.5	10 ml AP-Puffer	10 mM Tris pH 7.5
100 mM NaCl	66 µl NBT (50 mg/ ml in 70% DMF)	1 mM EDTA
5 mM MgCl ₂	33 µl BCIP (50 mg/ ml in DMF)	

3.6.5 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

In dieser Arbeit wurden C-terminal 6xHis-getaggte Protein von MlrA, YdaM und YciR über den QE60-Vektor mit einen p_{tac} Promotor i.d.R. im Stamm FI1202 (*E. coli* K-12 W3110) überexprimiert, der entweder eine *rpoS*-Mutation trug oder für die jeweiligen Interaktionspartner mutiert war. YciR-His6 wurde außerdem in *E. coli* K-12 MC4100 $\Delta mlrA ydaM::cat$ überexprimiert.

N-terminal 6xHis-getaggte Proteine von YdaM, MlrA, YciR und YhjH sowie C-terminal S-getaggte Proteine von MlrA und YdaM wurden über den pETDuet-Vektor mit einem T7-Promotor im Stamm ER2566 mit Einzel- oder Doppelmutationen für die jeweiligen Interaktionspartner überexprimiert. I.d.R. wurden für die Überexpression die Zellen bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,7 inkubiert und mit 100 µM IPTG über Nacht bei 16°C induziert. Für YciR-His6 wurde später die Überexpression optimiert ohne die Zugabe von IPTG durchgeführt, bei der die Zellen nach zweistündigen Anwachsen bei 37°C für 3 Nächte bei 18°C oder 4 Nächte bei 16°C inkubiert wurden. Nach der Zellernte wurden die Zellen in Lysispuffer (siehe unten) resuspendiert und für 20 min mit Lysozym (> 1mg/ml) auf Eis vorlysiert und anschließend über Durchfluss durch eine French Press aufgeschlossen. Zellysate mit löslichen Proteinen wurden aus dem Überstand nach Zentrifugation bei 17.000 rpm für 40

3 MATERIAL UND METHODEN

min erhalten, die dann mit Ni-NTA-Agarose (1-2 ml für YciR und MlrA, 3 ml für His6-YdaM; Macherey-Nagel) bei 4°C für 2 h oder über Nacht inkubiert wurden. Nach Durchfluss des Lysats und Waschung (Waschpuffer siehe unten) über eine Säule wurde in 1 ml Schritten eluiert (Elutionspuffer siehe unten). Die Proteinproben wurden entweder für die weitere Verwendung in den entsprechenden Puffer dialysiert oder bei -20°C weggefroren.

Für YciR und MlrA hat sich gezeigt, dass für UV-crosslinking Versuche (siehe Kapitel 3.6.14) diese Proteine undialysiert verwendet werden sollten. Zelllysate für S-getaggte Proteine wurden entweder direkt in den Pull-Down Assay (siehe Kapitel 3.6.10) eingesetzt oder ggf. bei -20°C eingefroren und vor der Benutzung abzentrifugiert. YciR und MlrA neigen leicht zur Präzipitation und wurden daher zumeist frisch gereinigt. Generell wurden Puffer zur Proteinreinigung nach den Angaben von Qiagen (QIAexpressionist Handbuch) modifiziert und vorzugsweise auf TRIS-Basis verwendet (siehe unten). Für die Aufreinigung von PleD* wurde nach den Angaben von Christen *et al.* vorgegangen [Christen *et al.*, 2005].

Lysispuffer für

YciR, YdaM, YhjH:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
150 mM NaCl
10 mM Imidazol
5 mM MgCl₂
Proteaseinhibitoren (Roche)

Waschpuffer

für YciR, YdaM, YhjH:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
1 mM MgCl₂
10 % Glycerin
1 mM β-Mercaptoethanol
0,1 % Triton-X-100

Elutionspuffer

YciR, YdaM, YhjH:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
200 mM NaCl
250 mM Imidazol
1 mM MgCl₂
10 % Glycerin

Lysis-/Waschpuffer

für MlrA:

50 mM Tris-HCl pH 8
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
10 % Glycerin
0,1 % Triton-X-100
10 mM β-ME

Elutionspuffer

für MlrA:

50 mM Tris-HCl pH 8
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
10 % Glycerin

Cyclase Reaction Buffer

25 mM Tris-HCl pH 7.5
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂
5 mM β-Mercaptoethanol
5 % Glycerin

DSS-Xlink Puffer:

50 mM NaH₂PO₄ pH 7.5
150 mM NaCl
5 mM MgCl₂
5 mM β-Mercaptoethanol
5 % Glycerin

3.6.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde im NanoDrop spectrometer die Absorption bei 280 nm mithilfe der Proteingröße und des spezifischen Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins bestimmt. Für verunreinigte Proteinproben wurde zusätzlich ein quantitativer Proteinmengenvergleich über SDS-PAGE mithilfe eines Proteinmengenmarkers (Low molecular weight marker, GE Healthcare) durchgeführt.

3.6.7 Trypsin-In-Gel-Verdau

Zur Identifizierung von unbekanntem Proteinbanden in einem SDS-Acrylamidgel wurden die Banden ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die entstehenden Peptide konnten dann extern mittels MALDI-Massenspektrometrie durch C. Weise (Freie Universität Berlin, Institut für Biochemie) analysiert werden.

Das Protokoll zum Verdau der Proteinbanden wurde von C. Weise zur Verfügung gestellt. Dabei wurden zunächst die entsprechenden Banden einzeln aus dem SDS-Acrylamidgel ausgeschnitten und in 20 µl 50 mM NH₄CO₃, 50 % Acetonitril für 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und es wurde 100 % Acetonitril hinzugefügt und für etwa 5 min inkubiert bis die Gelstücke milchig-weiß waren (ggf. Schritt wiederholen). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Gelstücke lyophilisiert und danach erfolgte die Reduktion der Gelproteine durch Inkubation mit 20 µl 100 mM DTT (gelöst in 100 mM NH₄CO₃) für 30 min bei 56°C. Nach Abnahme und Volumenbestimmung des Überstandes wurden die Gelstücke wieder mit 20 µl 100 % Acetonitril bei RT für 5-10 min geschrumpft und der Überstand wieder abgenommen. Nun wurden die Proteine carbamidomethyliert, wodurch die vorher geöffneten Disulfidbrücken modifiziert werden und so nicht mehr zurückgeschlossen werden können. Dies wurde erreicht durch die Zugabe von 20 µl 55 mM Iodacetamid (gelöst in 100 mM NH₄CO₃) und stehen lassen für 20 min im Dunkeln. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Gelstücke mit 100 mM NH₄CO₃ gespült (15 min, RT) und wieder mit 100 % Acetonitril geschrumpft. Der letzte Schritt wird wiederholt und nach Lyophilisierung der Gelstücke wurde 12,5 ng/µl Trypsin (Verdünnung in 25 mM NH₄CO₃ aus einer 1 mg/ml Trypsin-Stammlösung in 1 mM HCl) hinzugefügt und für 30 min auf Eis gestellt. Dabei wurde ein Volumen der Trypsin-Lösung hinzugefügt, dass 3 µl Überschuss zum festgestellten Volumen vorliegt, dass die Gele vorher aufgenommen haben. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und schließlich der Überstand abgenommen. Diese Proben wurden zunächst bei -20°C gelagert. Weiterhin konnte noch eine Nachextraktion vorgenommen werden, in dem man nun die Gelstücke mit 40 % Acetonitril versetzt hat und den Ansatz für mehrere Stunden bei RT inkubiert. Der Überstand wurde dann zusammen mit der Erstextraktion direkt an C. Weise abgegeben oder bei -20°C bis dahin gelagert.

C. Weise hat die Proben über MALDI-Massenspektrometrie analysiert und Links zu „Mascot Search Results“ zur Verfügung gestellt, durch die die identifizierten Peptide durch Übereinstimmungen mit einer Proteinsequenzsuche in „Scores“ als wahrscheinlichste Übereinstimmung ausgegeben wird.

In dieser Arbeit wurde diese Methode für die Analyse von gereinigtem YciR sowie MlrA verwendet.

3.6.8 Chemischer Crosslink von Proteinen

Mithilfe des chemischen Crosslinkers DSS (Disuccinimidylsuberat) konnten die Versuche zur Analyse der Oligomerisierung von His6-YdaM durchgeführt werden. DSS ist eine wasserunlösliche, unspaltbare und membranpermeable Verbindung, die durch N-hydroxysuccinimidester an jedem Ende seines 8fachen Kohlenstoffarmes im pH-Bereich von 7-9 aminoreaktiv ist. Gelöst in DMSO, kann DSS somit Proteine durch die Reaktion mit deren primären Amino-Gruppen, irreversibel quervernetzen.

Für den Crosslink von YdaM wurden 4 µg Protein in 19 µl Crosslink Puffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 7-8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerin, 5 mM β-ME) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mM DSS (Stammlösung: 20 mM) und erneute Inkubation für 30 min (RT). Die Reaktion wurde durch 20 mM TRIS-HCl pH 7.5 (15 min, RT) gestoppt. Die Proben wurden schließlich mit SDS-Probenpuffer versehen, 10 min bei 100°C gekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch einen Immunoblot gegen den 6xHis-Tag konnten die irreversiblen gekoppelten Oligomere von His6-YdaM bzw. His6-YdaM-ΔNTD detektiert werden.

3.6.9 Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA oder „Bandshift“)

Die in den EMSA-Studien eingesetzten Promotorregionfragmente von *csgD* wurden mittels PCR generiert (Primer siehe 3.5), wobei ein Plasmid, das die *csgD*-Promotorregion kodierte (pHW17 [Weber, 2007]), als Template diente. Nach der Gelaufreinigung des Fragments, wurden von diesem 200 bp großen Fragment etwa 40 ng (entspricht etwa 340 fmol) mit 100-500 nM Protein (MlrA, YciR, YdaM) für 30-45 min bei RT inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde 1x Bandshift-Puffer (10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, 10 mM NaCl, und 1 mM MgCl₂) in einem Endvolumen von 20 µl verwendet. Anschließend wurde der gesamte Ansatz über ein 5 %-iges natives Polyacrylamid Gel (0,5 ml 10 x TBE Puffer, 1,25 ml Rotiphorese Gel 40, 8,25 ml Wasser, 16 µl TEMED, 66 µl APS) in 0,5x TBE-Puffer für 80 min bei 80 V aufgetrennt. Schließlich wurde das Gel durch Ethidiumbromid gefärbt und mithilfe der Geldokumentationsanlage (Biozym) visualisiert. Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen für die EMSA-Studien entstammen Versuchsreihen mit His6-MlrA, His6-YdaM und His6-YciR und sind repräsentativ für alle durchgeführten Studien, die mit C- oder N-terminal getaggten Proteinen von MlrA, YdaM und YciR durchgeführt worden sind.

3.6.10 *In vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien durch Co-Elution

In vitro Interaktionsstudien (Co-Elution oder sog. Pull-Down Assays) wurden basierend auf Becker *et al.* bzw. Mika & Hengge [Becker *et al.*, 1999; Mika & Hengge, 2005] durchgeführt. Hier wurden Zellysate von überexprimierten Proteinen für eine Affinitätschromatographie mittels S-Protein-Agarose (Merck, früher: Novagen) genutzt.

Zunächst wurden die Proteine für C-terminal S-getaggttes YdaM und MlrA im *yciR*-Mutationshintergrund und für C-terminal 6xHis-getaggttes YdaM, YciR und in Stämmen mit Mutationshintergrund für *rpoS* (*ydaM*, *yciR* und *mlrA* werden RpoS-abhängig exprimiert) überexprimiert (siehe Kapitel 3.6.5). Die Zellen wurden mit etwa 100-facher Konzentration in Bindungspuffer resuspendiert (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) und mittels French Press lysiert. Nach Zentrifugation bei 17.000 rpm wurde die lösliche Proteinfraction durch SDS-PAGE auf Detektion einer Proteinüberexpression analysiert. Anschließend wurden 70-80 µl S-Protein-Agarose mit 1 ml des S-getaggtten Proteinzellextrakts von YdaM-S bzw. MlrA-S (oder MlrA-His6, das spezifisch an S-Protein-Agarose bindet) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und nach Zentrifugation bei 2000 rpm wurde der Überstand verworfen. Je nach relativen Mengengehalt der löslichen His6-getaggtten Proteinextrakte von YciR-His6, YdaM-His6, wurden 100-500 µl des entsprechenden Zellextrakts hinzugegeben und für 30-45 min (RT) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lysat des Leervektors pQE60 und andere Proteinextrakte von GGDEF- und EAL-Proteinen sowie die Bindung der 6xis-getaggtten Interaktionspartner nach Vorinkubation mit BSA (30 mg/ml). Nach vierfacher Waschung mit je 1 ml Bindungspuffer erfolgte die Elution mit 30-40 µl 3 M MgCl₂. Die eluierten Proben wurden durch 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot (siehe Kapitel 3.6.4) konnte die Interaktion durch einen Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden.

3.6.11 Bakterieller Two-Hybrid Assay

Das BacterioMatch[®] II Two-Hybrid System von Agilent Technologies (ehemals: Stratagene) ist eine Methode zur Detektion von Protein-Protein Interaktion *in vivo* und beruht auf Co-Transformation von zwei Hybridproteinen [Dove & Hochschild, 2004].

Zunächst wurden die zu untersuchende Proteine in die dafür notwendigen Vektoren, den Bait-Vektor (pBT) und Target-Vektor (pTRG), kloniert (siehe auch Tab. 3.4). Durch die Klonierung in den pBT-Vektor wurde das zu exprimierende Protein an den cI Repressor Protein des Bakteriophagen λ (λ cI) fusioniert und im pTRG-Vektor an die N-terminale α -Untereinheit der RNA-Polymerase (α RNAP). Die beiden Fusionsproteine werden mittels eines IPTG-induzierbaren *lac*-Promotors exprimiert. Das hierbei entstandene λ cI-Fusionsprotein bindet über die DNA-bindende Domäne an die λ Operator Sequenz der DNA. Wenn eine Interaktion zwischen den Bait- und

Target-Hybridproteinen stattfindet, erfolgt über die α NTD-RNAP des Target-Hybridproteins eine Rekrutierung und Stabilisierung der RNAP-Bindung an den Promotor der Reporterengkassette, so dass die Transkription des *HIS3*- bzw. *aadA*-Reportergens aktiviert wird. *HIS3* kodiert für eine Komponente des Histidin-Biosynthese, die eine *hisB*-Mutation im Reporterstamm (siehe Kapitel 3.3.1) komplementiert. Das *HIS3*-Genprodukt wird bei Abwesenheit von transkriptionaler Aktivierung von der Reporterengkassette nur in kleinen Mengen produziert, das dem Reporterstamm noch erlaubt, in Minimalmedium ohne Histidinquelle zu wachsen. Weiterhin enthält die Reporterengkassette neben *HIS3* das *aadA*-Gen, das eine zusätzliche Selektion über Streptomycin-Resistenz ermöglicht, das in dieser Arbeit nur teilweise zur Reproduktionen verwendet wurde. Zur Selektion der Protein-Protein-Interaktion wurde die Verbindung 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT) als kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts eingesetzt. Nur wenn durch die Protein-Protein-Interaktion die Expression vom *HIS3*-Genprodukt erhöht ist, kann die kompetitive Inhibierung durch 3-AT überwunden werden und somit auf eine Interaktion geschlossen werden.

Die Co-Transformation wurde nach dem „BacterioMatch® II Two-Hybrid System Vector Kit Instruction Manual“ von Agilent Technologies durchgeführt. Dabei wurden 50 μ l kompetente Reporterzellen und Plasmidmengen von 24 fmol eingesetzt. Alle weiteren Medienzusätze wurden entsprechend dieser Menge angepasst. Dazu wurden die Inkubationszeiten bei 37°C ggf. verlängert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (siehe Kapitel 3.4) wurden mit den in Tab. 3.5 aufgelisteten Primer konstruiert. Für die Positivkontrolle wurden von E. Klauk die Plasmide pBT-*rpoS* und pTRG-*rssB* bereitgestellt [Lindenberg *et al.*, 2013].

Die Ausplattierung des Co-Transformationsansatzes erfolgte auf nichtselektives Medium (siehe Kapitel 3.2.1) mit etwa 100-200 μ l einer 1:20 oder 1:40 Verdünnung des Ansatzes. Wenn das Wachstum auf nichtselektivem Medium ungenügend war, wurden die Zellen mit höherer Konzentration ausplattiert. Auf den selektiven Platten mit 4 mM 3-AT (*Ausnahme*: für GGDEF-Domänen mit MlrA-CTD wurde 5 mM 3-AT Platten verwendet; siehe Kapitel 3.2.1) erfolgte die Ausplattierung i.d.R. mit 200 μ l eines unverdünnten Ansatzes, für die Positivkontrolle von pBT-*rpoS* und pTRG-*rssB* wurden 50 μ l unverdünnt ausplattiert. Nach der Ausplattierung wurden alle Platten etwa 24 h bei 37°C wachsen gelassen. Nichtselektive Platten wurden weitere 24 h bei 28°C und selektive Platten etwa 48 h bei 28°C inkubiert. Für eine quantitative Analyse der Interaktion wurden die Kolonien ausgezählt und das prozentuale Verhältnis der cfu von selektiv zu nichtselektiv bestimmt. Zur qualitativen Analyse wurden Einzelkolonien der bewachsenen nichtselektiven Platten mit einem Zahnstocher auf selektive und nichtselektive Platten übertragen. Die Platten wurden wie zuvor inkubiert. Die Ergebnisse wurden in der Geldokumentation fotografiert. Da in dieser Arbeit die qualitative Auswertung der quantitativen entsprach, wurden hier nur diese Daten repräsentiert.

3.6.12 Nachweis der Diguanylatzyklase-Aktivität

Versuche zum Nachweis der Diguanylatzyklase-Aktivität wurden modifiziert nach den Angaben von Weber *et al.* und Paul *et al.* durchgeführt [Paul *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006]. Hierbei wurden i.d.R. in einem Reaktionsansatz von 19,5 µl von 1 µM His6-YdaM (bzw. seine punktmutierten Derivate) bzw. 3 µM His6-YdaM-ΔNTD in Reaktionspuffer (Cyclase Reaction Buffer (CRB) nach H. Weber: 25 mM TRIS-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-ME, 5 % Glycerin) mit 83 nM [^α³²P]-GTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic GmbH) versetzt und i.d.R. für 1 h bei 30°C inkubiert. Für 0,5 µM YdaM wurden nur 21 nM [^α³²P]-GTP eingesetzt. Wurden mehrere Proteine in einem Ansatz getestet (für YdaM zusammen mit YciR und/oder MlrA), wurden die Proteine vor Zugabe des [^α³²P]-GTP etwa 20 min bei RT vorinkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 µl der Probe abgenommen und mit 5 µl 0,5 M EDTA versetzt. Wurden mehr als 1 µM Protein im Ansatz verwendet, empfahl es sich, nun die Proben für 5 min bei 95°C zu kochen. Anschließend wurden die Proben auf eine Dünnschichtchromatographiefolie (Polygram CEL 300 PEI, Macherey-Nagel) aufgetragen und in gesättigtem NH₄SO₄ und 1,5 M KH₂PO₄ (1 : 1,5 v/v) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Phosphoimaging (Fuji).

3.6.13 Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität

Versuche zum Nachweis der Phosphodiesterase-Aktivität wurden modifiziert nach den Angaben von Weber *et al.* und Paul *et al.* durchgeführt [Paul *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006]. Dazu wurde anfangs selbst hergestelltes c-di-[³²P]GMP und später reines, von Hartmann Analytic geliefertes c-di-[³²P]GMP verwendet.

Selbst hergestellt wurde c-di-[³²P]GMP durch Inkubation von 19 µl gereinigtem PleD* (etwa 20 µM) mit 1 µl [^α³²P]-GTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic) für eine Stunde bei 30°C und anschließender Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95°C. Nach Abzentrifugieren des Reaktionsansatzes, erhielt man einen Überstand von 15 µl c-di-[³²P]GMP, das im günstigsten Fall durch kompletten GTP-Umsatz eine Konzentration von etwa 80 nM (6000 Ci/mmol) aufwies. Später konnte nach diesem Verfahren von Hartmann Analytic hergestelltes c-di-[³²P]GMP (1,68 µM; 10 mCi/ml; 6000 Ci/mmol) verwendet werden, das zusätzlich einer HPLC-Reinigung unterzogen wurde.

Von selbst hergestelltem c-di-[³²P]GMP wurde 1 µl in einen 20 µl Ansatz verwendet. Alternativ und gültig für die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurde 2,1 nM c-di-[³²P]GMP (Hartmann Analytic) eingesetzt und mit 0,5-1 µM YciR-His6 bzw. His6-YhjH im Reaktionspuffer (Cyclase Reaction Buffer (CRB) nach H. Weber: 25 mM TRIS-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-ME, 5 % Glycerin) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 µl der Probe abgenommen und mit 5 µl 0,5 M EDTA versetzt. Wurden mehr als 1 µM Protein im Ansatz verwendet, empfahl es sich, die Proben für 5 min bei

95°C zu kochen. Anschließend wurden die Proben wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 3.6.12) auf eine Dünnschichtchromatographiefolie (Polygram CEL 300 PEI, Macherey und Nagel) aufgetragen und in gesättigtem NH_4SO_4 und 1,5 M KH_2PO_4 (1 : 1,5 v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Phosphoimaging (Fuji).

3.6.14 UV-crosslinking von Proteinen mit Nukleotiden

Für den irreversiblen Crosslink (Quervernetzung) von YdaM (und seine punktmutierten Varianten, YdaM-A⁻, YdaM-I⁻) mit radioaktiv markiertem c-di-GMP wurde selbst hergestelltes c-di-[³²P]GMP (siehe Kapitel 3.6.13 6000 Ci/mmol) verwendet. Für alle weiteren Crosslinks mit YciR und MlrA wurde reines, durch Hartmann Analytic geliefertes c-di-[³²P]GMP (10 mCi/ml; 6000 Ci/mmol) verwendet.

Für den irreversiblen Crosslink von Proteinen mit radioaktiv markiertem GTP oder c-di-GMP wurden optimiert 1-2 µg Protein mit 0,5 µl 1,68 µM c-di-[³²P]GMP (10 mCi/ml; 6000 Ci/mmol; Hartmann Analytic; *alternativ*: 1-2 µl selbst hergestelltes c-di-[³²P]GMP) oder 0,5 µl 3,33 µM [³²P]-GTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 10 bis 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Transfer der Proben in eine ELISA-Platte wurden die Proben auf Eis in einem UV crosslinker (BLX 365, Peqlab) mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm und max. Intensität für 20 min lang bestrahlt. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer und ggf. Kochen für 10 min bei 70°C wurden 10 µl der Proben auf ein 12-15%-iges SDS-Gel aufgetragen und bei 25 mA aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels (BioRad) konnte schließlich die Detektion mit Phosphoimaging (Fuji) erfolgen.

His6-YdaM wurde hier dialysiert in CRB (Cyclase Reaction Buffer (CRB) nach H. Weber: 25 mM TRIS-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM β -ME, 5 % Glycerin) verwendet. Für YciR-His6 und MlrA-His6 wurden undialysierte Proben nach der Aufreinigung verwendet, da YciR-His6 dialysiert in CRB kein Crosslinking-Signal zeigt und MlrA-His6 in CRB stark präzipitiert.

3.6.15 β -Galaktosidase-Aktivitätstests

Die spezifische β -Galaktosidaseaktivität von Zellsuspensionen wurde nach Miller [Miller, 1972, 1992] bestimmt und in µmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Abweichend vom Protokoll wurde die optische Dichte der Zellsuspension bei 578 nm gemessen. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 1 ml Zellprobe aus der Flüssigkultur im 60 minütigen Abstand entlang der Wachstumskurve oder nach 24 h entnommen, abzentrifugiert und in 1 ml 1x Z-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von zwei Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0,1%-igem SDS aufgeschlossen. Nach kurzem Vortexen blieben die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG (4 mg/ml) gestartet. Bei Erreichen einer geeigneten Gelbfärbung bzw. nach spätestens

einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat abgestoppt. Die Reaktionsansätze wurden 10 min abzentrifugiert und die Absorption bei 415 nm im Microplate reader Model 550 (BioRad) gemessen. Als Referenz diente ein Testansatz, bei dem 1x Z-Puffer ohne Bakterienzellen enthalten war. Die in dieser Arbeit durchgeführten β -Galaktosidase Assays wurden mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Für die Versuche entlang der Wachstumskurve ist ein repräsentatives Experiment gezeigt und für die einfache Messung nach 24 h wurden die Mittelwerte mit der Standardabweichung berechnet.

3.7 Datenbanken und bioinformatische Analysen

Folgende online-Datenbanken wurden für Analyse von Genen und Proteinen sowie deren Sequenzen verwendet:

- NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- EcoCyc (ecocyc.org)
- Colibri (genolist.pasteur.fr/Colibri)
- ExPASy (web.expasy.org)

Homologe Proteine wurden mithilfe des BLAST-Programms (blast.ncbi.nlm.nih.gov) der NCBI-Datenbank [Altschul *et al.*, 1997] identifiziert. Proteinsequenzvergleiche wurden mit Hilfe von CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) generiert [Thompson *et al.*, 1994].

4 ERGEBNISSE

4.1 Zwei GGDEF/EAL-Module regulieren die Curli-Expression

Die Curli- wie auch Cellulose-Synthese sind wichtige Bestandteile der Biofilmbildung. Der Transkriptionsfaktor CsgD, der σ^S -abhängig exprimiert wird, ist dabei der zentrale Masterregulator und aktiviert die Expression der Curli-Bestandteile CsgBAC sowie der Diguanylatzyklase (DGC) YaiC, die für die Cellulose-Synthese benötigt wird [Hengge, 2009a].

Die Transkription von *csgD* ist komplex reguliert und es konnten zwei GGDEF/EAL-Module identifiziert werden, die für diese Regulation eine Rolle spielen: zum einen YdaM/YciR und zum anderen YegE/YhjH [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006].

Während das YegE/YhjH-Modul neben Curli auch die Motilität beeinflusst und daher vermutlich den zellulären c-di-GMP Spiegel beeinflusst [Pesavento *et al.*, 2008], ist das YdaM/YciR-Modul hochspezifisch für *csgD*-Transkription und wurde daher als lokales System postuliert [Weber *et al.*, 2006]. Die Expression von YegE, YdaM und YciR ist RpoS-abhängig, genauso wie die Expression von MlrA, einem MerR-ähnlichen Transkriptionsregulator, der als essentieller Aktivator für die *csgD*-Transkription beschrieben wurde [Brown *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006].

Zur Veranschaulichung ist zunächst in der Abb. 4.1A die Domänenstruktur von YegE, YhjH, YciR, YdaM und MlrA dargestellt. Das als Diguanylatzyklase (DGC) postulierte Protein YegE ist ein zusammengesetztes GGDEF-EAL Protein mit N-terminaler Transmembran- und PAS-Domäne. Für YegE konnte bisher gezeigt werden, dass dessen Mutation die Curli-Expression inhibiert und für die Motilität partiell die Mutation von *yhjH* supprimieren kann [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009]. YhjH hingegen ist im Vergleich ein kleines Protein mit nur einer konservierten EAL-Domäne (Abb. 4.1A), dessen Aktivität als Phosphodiesterase (PDE) *in vitro* schon nachgewiesen wurde [Pesavento

et al., 2008]. Eine Mutation von *yhjH* bewirkt zum einen den Verlust von Motilität und zum anderen eine Stimulierung der Curli-Expression [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009]. Neben YegE wirkt auch das GGDEF-Domänen-Protein YedQ antagonistisch zu YhjH hinsichtlich der Regulation der Motilität [Pesavento *et al.*, 2008]. Jedoch konnte beobachtet werden, dass YedQ für die hier untersuchten Bedingungen keinen relevanten Einfluss hat [Lindenberg, 2008] und wird daher in dieser Arbeit vernachlässigt.

Das YegE/YhjH-Modul nimmt Einfluss auf die Motilität und Curli-Expression durch Regulation des zellulären c-di-GMP-Spiegels, der mit erniedrigter Konzentration (durch die Enzymaktivität von YhjH) die Motilität fördert und mit erhöhter Konzentration (generiert hauptsächlich durch YegE) die Curli-Produktion anregt [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009]. Dabei schließen sich beide Kaskaden aus, so dass schlussfolgernd dieses GGDEF/EAL-Modul an der Umschaltung von der Motilität zur Curli-Synthese beteiligt ist. Jedoch war bisher unbekannt, über welchen Effektor das YegE/YhjH-Modul auf die Curli-Expression wirkt [Pesavento *et al.*, 2008].

Weiterhin ist YdaM ein konserviertes GGDEF-Domänen-Protein mit N-terminalen PAS-Domänen (Abb. 4.1A) und YciR hingegen ist ein zusammengesetztes GGDEF-EAL-Domänen-Protein, das N-terminal auch eine PAS-Domäne besitzt (Abb. 4.1A). Einzelmutationen haben bereits gezeigt, dass YdaM absolut essentiell als Aktivator für die Curli-Expression ist, während YciR diese inhibiert [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006]. Die Enzymaktivität als DGC von YdaM sowie von YciR als PDE ist bereits *in vitro* bestätigt [Weber *et al.*, 2006].

Vorhergehende Studien haben nun darauf hingewiesen, dass das YegE/YhjH-Modul möglicherweise über das YdaM/YciR-Modul die Curli-Expression reguliert. [G. Klauck & R. Hengge; Lindenberg, 2008]. Diese Daten sollten nun verifiziert und detailliert untersucht werden, um die Zusammenhänge zwischen diesen beiden GGDEF/EAL-Modulen zu klären.

4.1.1 Das YegE/YhjH-Modul reguliert über das YdaM/YciR-Modul die Curli-Expression

Um nun eine Wirkungsweise von YdaM, YciR, YegE und YhjH auf die Curli-Expression näher zu studieren und einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Modulen zu untersuchen, hat G. Klauck als initiales Experiment für alle möglichen Mutationskombinationen

die Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion gemessen (Abb. 4.1B). CsgB ist eine Komponente für die Curli-Synthese und wird abhängig von CsgD exprimiert. Da die Expression von CsgD durch die von CsgB widerspiegelt wird [Sommerfeldt *et al.*, 2009], kann die *csgB::lacZ*-Fusion Rückschluss auf die Curli-Expression geben.

Anhand dieser genetisch-basierten Daten konnten grundsätzliche, regulatorische Zusammenhänge abgelesen werden, die sich in vier verschiedenen Expressionsebenen für die *csgB::lacZ*-Expression abzeichneten: 1. ein Niveau der Wildtyp-Expression (wt), 2. ein Niveau der hyperstimulierten Expression durch bspw. einer *yciR*- oder *yhjH*-Einzelmutation, 3. ein Niveau der hyperreprimierten Expression durch bspw. einer *ydaM*-Einzelmutation und 4. ein Niveau einer Basalexpression bei bspw. der Doppelmutante von *ydaM/yciR* oder der Vierfachmutante von *ydaM/yciR/yegE/yhjH*.

Dass das YegE/YhjH-Modul nicht notwendig für die Curli-Expression ist, zeigte sich in der Doppelmutation von *yegE/yhjH* mit einer *csgB::lacZ*-Expression auf dem Wildtyp-Niveau. Jedoch ist dieses Modul wichtig für die Umschaltung zur Curli-Expression und moduliert diese [Pesavento *et al.*, 2008], wie auch in Abb. 4.1B anhand der *yegE*- und *yhjH*-Einzelmutation erkennbar wurde.

Hingegen zeigte sich ein Basalniveau der *csgB::lacZ*-Expression bei Abwesenheit des YdaM/YciR-Moduls (Doppelmutante *ydaM/yciR*) wie auch bei Abwesenheit beider Module (Vierfachmutante *ydaM/yciR/yegE/yhjH*), so dass die basale Expression somit unabhängig von c-di-GMP aus diesen beiden Systemen exprimiert wurde. Vielmehr zeigte sich, dass die An- und Abwesenheit von YegE und YhjH keine Rolle mehr spielte, wenn auch das YdaM/YciR-Modul abwesend war (Dreifachmutante *ydaM/yciR/yegE* bzw. *ydaM/yciR/yhjH*). Auch wirkten YhjH und YciR nicht additiv (Vgl. Einzelmutante von *yhjH* und *yciR* zu Doppelmutante *yciR/yhjH*). Daher lässt sich daraus schließen, dass das YegE/YhjH-Modul über das YdaM/YciR-Modul auf die Curli-Expression wirkt.

Dass *csgB* unabhängig von c-di-GMP in Abwesenheit vom YdaM/YciR-Modul reguliert ist, zeigte sich, als kein weiteres der 27 GGDEF- und EAL-Domänen-Proteine von *E. coli* K-12 einen Einfluss auf die Curli-Expression in einer *ydaM/yciR*-Doppelmutante nehmen konnte (Abb. 4.1C). Die einzige Mutation, die zusätzlich einen Rückgang der *csgB::lacZ*-Expression bewirkte, war die von *yhdA*, dessen positiver Einfluss auf die *csgD*-Expression bereits beschrieben wurde [Sommerfeldt-Impe, 2012; Sommerfeldt *et al.*, 2009]. Da außerdem YhdA

(auch CsrD genannt) ein degeneriertes GGDEF-EAL Protein ist, dessen beide Domänen nicht die notwendigen Aminosäuren für die Enzymaktivität als Diguanylatzyklase oder Phosphodiesterase enthält, ist diese Wirkung auch unabhängig von c-di-GMP.

Außerdem zeigte sich in Abb. 4.2A deutlich, dass die vom Plasmid überproduzierte Diguanylatzyklase YaiC und Phosphodiesterase YhjH keinen Einfluss auf die Basalexpression von *csgB* in Abwesenheit von YdaM und YciR hatten. D.h. auch hier konnte kein künstlich veränderter c-di-GMP-Spiegel durch Überexpression willkürlicher Diguanylatzyklasen oder Phosphodiesterasen einen Einfluss auf Curli-Expression ausüben. Das unterstützte weiterhin die Hypothese, dass das YdaM/YciR-Modul wahrscheinlich als Sensor von zellulärem c-di-GMP agiert.

Wenn man nun die Abb. 4.1B näher betrachtet, wird vielmehr deutlich, dass YciR der Effektor des YegE/YhjH-Moduls zu sein scheint, da in Abwesenheit von YciR kein Effekt durch *yegE* oder *yhjH*-Mutationen mehr erfolgen konnte (Vgl. Doppelmutante *yciR/yegE* zu *yciR/yhjH* und zu Dreifachmutante *yciR/yegE/yhjH*). Dagegen reagierte die Curli-Expression in Anwesenheit von YciR (und Abwesenheit von YdaM) wieder sensitiv auf YegE/YhjH (Vgl. Doppelmutante von *ydaM/yhjH* zu *ydaM/yegE*).

Bei weiterer Betrachtung der Wirkungsweise von YdaM und YciR, wurde deutlich, dass die Abwesenheit von YdaM in der Einzelmutante eine Hyperrepression hervorrief, der durch zusätzliche Mutation von *yciR* (Doppelmutante *ydaM/yciR*) entgegengewirkt wurde, so dass das Basalniveau der *csgB::lacZ*-Expression erreicht wurde (Abb. 4.1B). Das bedeutet, dass die hyperreprimierte *csgB::lacZ*-Expression durch die Einzelmutation von *ydaM* vielmehr eine additive Wirkung aus der fehlenden Aktivierung von YdaM und vorhandenen Repression von YciR darstellt. Das wird gestützt durch die Beobachtung, dass YciR nur durch die Abwesenheit von YdaM fähig ist, diese Hyperrepression zu bewirken, die wiederum nur durch die Anwesenheit von YegE (bei gleichzeitiger Abwesenheit von YhjH) wieder aufgehoben werden kann (Vgl. Einzelmutante von *ydaM*, Doppelmutante *ydaM/yegE* und Dreifachmutante *ydaM/yegE/yhjH* zu *ydaM/yhjH*).

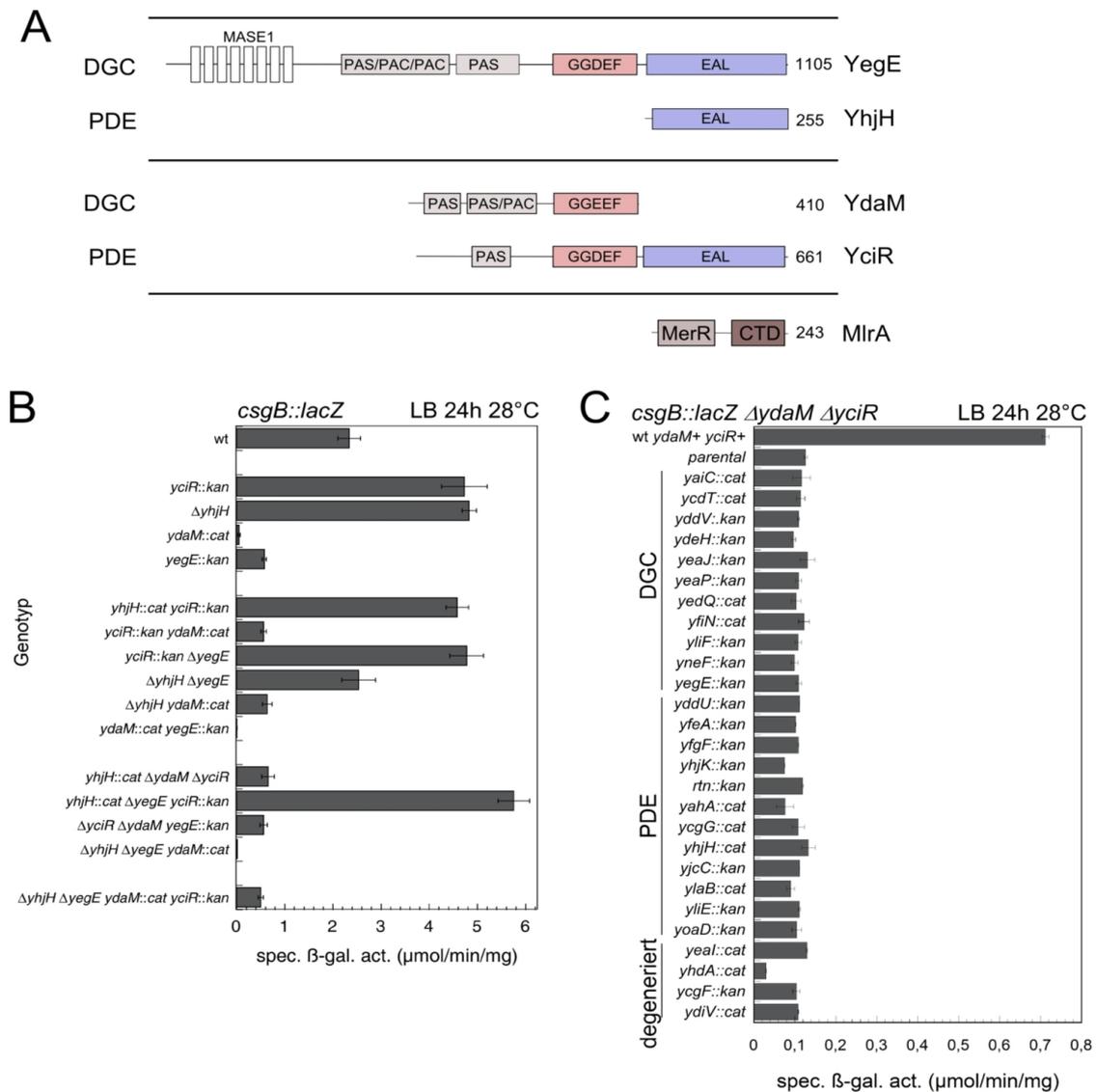


Abb. 4.1: Integration vom YdaM/YciR- und YegE/YhjH-Modul in der Curli-Expression.. A. Proteinstruktur der an der Curli-Expression beteiligten GGDEF/EAL-Proteine YdaM, YciR, YegE, YhjH sowie dem MerR-ähnlichen Transkriptionsaktivator MlrA. Die Diguanylatzyklase (DGC) YegE ist ein zusammengesetztes GGDEF-EAL-Domänen-Protein mit einer N-terminalen Membran- (MASE1) und PAS-Domäne. Die antagonistische Phosphodiesterase (PDE) YhjH ist ein einfaches EAL-Domänen-Protein. Die DGC YdaM ist ein GGDEF-Domänen-Protein mit N-terminalen PAS-Domänen. Die PDE YciR als Antagonist zu YdaM, ist ein zusammengesetztes GGDEF-EAL-Domänen-Protein mit einer N-terminalen PAS-Domäne. MlrA besitzt eine MerR-Domäne mit einem Helix-Turn-Helix Motiv am N-terminus (MerR) und eine C-terminale Domäne (CTD). Die Zahlen beschreiben die jeweilige Anzahl der Aminosäuren des Proteins aus *E. coli* K-12. B. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in *E. coli* K-12 W3110 und Einfluss der Einzel- oder Mehrfachmutation von *ydaM*, *yciR*, *yegE* und *yhjH* in allen Kombinationsmöglichkeiten (Genotyp wie angegeben). Dieser Versuch wurde von Gisela Klauk durchgeführt. C. *csgB::lacZ*-Expression in Abhängigkeit von allen 27 GGDEF- oder EAL-Proteinen aus *E. coli* K-12 mit einer parentalen *ydaM/yaciR*-Doppelmutation (Genotyp der Mutationen wie angegeben). Die GGDEF- und EAL-Proteine haben DGC oder PDE-Aktivität bzw. sind für diese Domänen degeneriert (entsprechende Kennzeichnung ist abgebildet). Zum Vergleich ist der Wert für die *csgB::lacZ*-Expression im Wildtyp angegeben (*ydaM*⁺ *yciR*⁺). Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert und nach 24 h Wachstum wurde die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Werte entstammen dem Mittelwert aus zwei (C) oder drei (B) unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Dieselbe Beobachtung konnte gemacht werden, wenn in einer *ydaM*-Mutante die DGC YaiC vom Plasmid überproduziert wurde und so eine leichte Stimulierung der Curli-Expression erfolgte (Abb. 4.2A). Dieser Effekt kann hier auch durch die Anwesenheit von YciR erklärt werden, dessen inhibierender Einfluss auf *csgB* durch die hohe c-di-GMP-Konzentration, generiert von YaiC, aufgehoben wurde und somit wieder das Basalniveau erreichte. Das weist darauf hin, dass YciR die Rolle eines Inhibitors in der Curli-Expression einnimmt, der scheinbar durch den zellulären c-di-GMP-Spiegel, der abhängig vom YegE/YhjH-Modul ist [Pesavento *et al.*, 2008], reguliert wird.

Zusammenfassend ließ sich hier feststellen, dass das YegE/YhjH-Modul über das YdaM/YciR-Modul die *csgD*-Transkription beeinflusste. Dabei wirkte YegE-generiertes c-di-GMP vermutlich der inhibitorischen Rolle von YciR entgegen, sodass die Umschaltung auf die Curli-Expression stattfinden konnte. Somit stellt YciR das Verbindungsglied zwischen dem YegE/YhjH- und YdaM/YciR-Modul dar, das in Abhängigkeit vom zellulären c-di-GMP Spiegel reguliert wird.

4.1.2 Das YdaM/YciR-Modul reguliert lokal die *csgD*-Transkription

Genomweite Studien haben gezeigt, dass das YdaM/YciR-Modul hochspezifisch die *csgD*-Transkription reguliert, weshalb dieses Modul als lokales System angesehen wird [Weber *et al.*, 2006]. Fortführend wurde nun deutlich, dass YdaM eher eine komplexe Rolle zukommt, da für eine *csgB::lacZ*-Expression ektopisch exprimiertes YaiC eine *yegE*-Einzelmutation vollständig komplementieren konnte, jedoch nicht eine *ydaM*-Einzelmutation (Abb. 4.2A). Das zeigte, dass die Wirkungsweise von YdaM nicht nur auf die Produktion von c-di-GMP beschränkt ist. Zudem unterstützt es die Hypothese, dass YegE-generiertes c-di-GMP dem zellulären c-di-GMP-Spiegel zugeführt wird und YdaM lokal wirkt.

Im Folgenden war die Frage nach der Regulation von *csgB::lacZ* durch den MerR-ähnlichen Transkriptionsregulator, der bekanntlich essentiell für die Curli-Synthese ist [Brown *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2006]. Dieser Aktivator besteht aus einer N-terminalen MerR-HTH- und einer C-terminalen Domäne (Abb. 4.1A). Hier sollte untersucht werden, wie MlrA die *csgB::lacZ*-Expression im Zusammenhang mit dem YdaM/YciR-Modul reguliert.

Dabei zeigte sich für die Curli-Expression, dass eine *mlrA*-Knockout-Mutation epistatisch

zu Mutationen von *ydaM*, *yciR*, *yegE*, *yhjH* wirkte, das mithilfe von unterschiedlichen Mutationskombinationen getestet wurde (Abb. 4.2B). Damit war die c-di-GMP unabhängige Basalexpression immer noch von MlrA abhängig. Es ist somit denkbar, dass das YdaM/YciR-Modul die *csgD*-Transkription lokal über MlrA regulierte. Der Mechanismus dieser Regulation soll im späteren Verlauf untersucht werden.

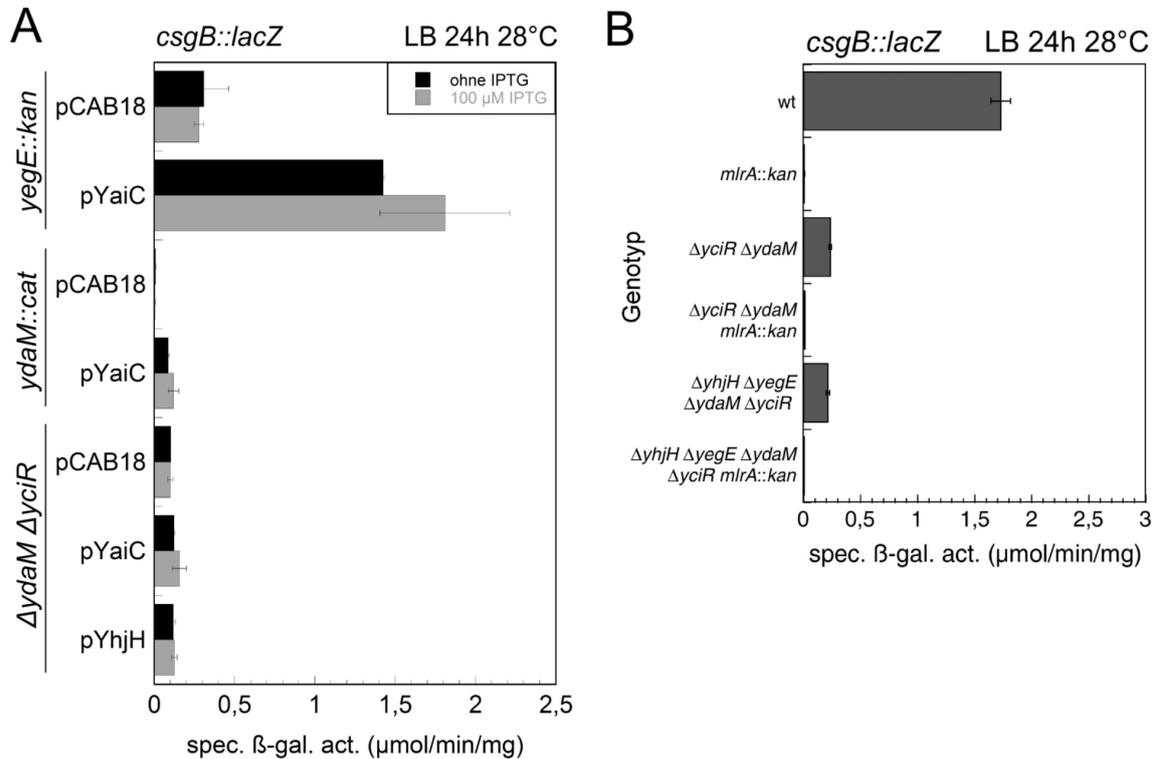


Abb. 4.2: C-di-GMP Signaltransduktion in der Curli-Expression in Abhängigkeit von YdaM, YciR und MlrA. A. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion im Stamm W3110 mit Einzelmutationen für *ydaM* (*ydaM::cat*) und *yegE* (*yegE::kan*), komplementiert durch Plasmid-kodiertes YaiC (pYaiC), sowie mit Komplementation einer *ydaM/yciR*-Doppelmutation ($\Delta ydaM \Delta yciR$) durch Plasmid-kodiertes YaiC (pYaiC) und YhjH (pYhjH). Eine Induktion der Plasmidexpression erfolgte mit 100 μM IPTG bei einer OD_{578} von 1. B. *csgB::lacZ*-Expression in Abhängigkeit von MlrA und der GGDEF/EAL-Module YdaM/YciR und YegE/YhjH, getestet mittels verschiedener Mutationskombinationen (wie gekennzeichnet). Diesen Versuch hat G. Klauck durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden in LB bei 28°C inkubiert. Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach Wachstum von 24 h bestimmt. Die dargestellten Werte entstammen dem Mittelwert aus zwei (A) bzw. drei (B) unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Weiterhin haben vorherige Studien gezeigt, dass *yegE*-, *ydaM*- oder *yciR*-Mutationen keinen Einfluss auf die Motilität haben, während eine *yhjH*-Mutation einen kompletten Verlust der Motilität bedeutete. Jedoch konnte eine *yegE/yedQ*-Doppelmutation die Abwesenheit von YhjH supprimieren. Da das YegE/YhjH-System neben der Motilität auch die Curli-Expression beeinflusst, wurde für dieses Modul eine globale Rolle in der Zelle angedacht [Pesavento *et al.*, 2008].

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass vom Plasmid exprimiertes YciR eine *yhjH*-Mutation komplementieren konnte, die abhängig von seiner Phosphodiesteraseaktivität ist [Pesavento, 2011]. Das bedeutet, dass YciR als Phosphodiesterase YegE-generiertes c-di-GMP abbauen kann. Das scheint physiologisch für die Motilität eher keine Bedeutung zu haben, da die Mutation von *yciR* keine Verminderung der Motilität zeigte [Pesavento *et al.*, 2008]. Jedoch könnte diese Beobachtung eine Bedeutung für die Funktion von YciR als Mediator zwischen dem YegE/YhjH- und YdaM/YciR-Modul haben.

Daher sollte nun im Folgenden getestet werden, ob eine ektopische Überproduktion von YdaM auch einen Effekt auf die Motilität zeigt. Dazu wurde YdaM und deren punktmutierte Derivate für die Komplementation einer *ydaM*-Einzelmutation sowie *ydaM/yciR*-Doppelmutation vom Plasmid exprimiert und auf Schwimmplatten getestet.

Dabei stellte sich heraus, dass YdaM und seine Derivate generell keinen Einfluss auf die Motilität ausübten (Abb. 4.3). Weder die *ydaM*-Einzelmutation noch überexprimiertes YdaM, mit oder ohne DGC-Aktivität (YdaM-A⁻ ist nicht aktiv als DGC, siehe Kapitel 4.4.1), bewirkten eine Minderung des Schwimmverhaltens. Da YdaM selbst in Abwesenheit seines Antagonisten YciR keine Auswirkung zeigte, deutet es daraufhin, dass die Aktivität von YdaM nicht für den zellulären c-di-GMP Spiegel relevant ist, um eine Rolle für die Motilität zu spielen. Das unterstützt die Hypothese, dass das YdaM/YciR-Modul lokal die Curli-Expression reguliert.

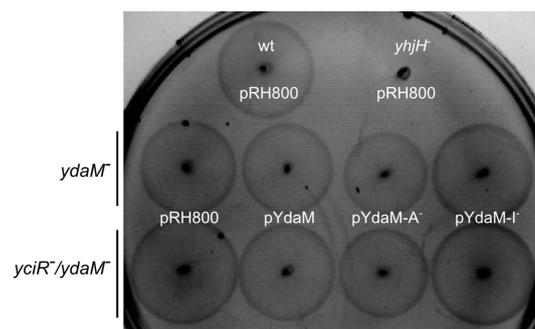


Abb. 4.3: YdaM beeinflusst nicht die Motilität von *E. coli*. Zellen des Stammes W3110 mit Einzelmutation für *ydaM* oder Doppelmutation für *ydaM/yciR* trugen Plasmid-kodierendes YdaM als Wildtyp (pYdaM) oder punktmutierte Derivate in der A-site (pYdaM-A⁻) oder I-site (pYdaM-I⁻) und wurden auf Motilität getestet. Als Kontrolle diente der Leervektor (pRH800). Die Inkubation erfolgte auf Schwimmplatten mit Ampicillin für etwa 4 h bei 37°C und ist repräsentativ für alternativ durchgeführte Ansätze bei 28°C.

Zusammenfassend ließ sich hier feststellen, dass YdaM unabhängig von YciR oder seiner Enzymaktivität keinen Einfluss auf die Motilität zeigte und nicht durch eine willkürliche

DGC komplementierbar war, wie es für YegE der Fall war. Das unterstützt die Hypothese, dass YdaM (mit YciR) lokal die *csgD*-Transkription reguliert, wobei dies vermutlich über den Transkriptionsaktivator MlrA erfolgt.

4.1.3 Das YegE/YhjH-Modul reguliert posttranslational das YdaM/YciR-Modul

Da die vorhergehenden Daten zeigten, dass das YegE/YhjH-Modul das YdaM/YciR-Modul reguliert, sollte geklärt werden, ob YciR und YdaM in ihrer Expression durch YegE und YhjH beeinflusst sind. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die Regulation durch YegE und YhjH auf der Proteinaktivitätsebene stattfindet. Dazu wurden translationale *lacZ*-Reporterfusionen von *ydaM* und *yciR* sowie der Proteinspiegel für YdaM und chromosomal FLAG-getaggtetes YciR für die jeweiligen Knockout-Mutationen bestimmt.

Es zeigte sich, dass *ydaM::lacZ* keine Regulation seiner Expression durch Mutationen in *yciR*, *yegE* oder *yhjH* erfuhr (Abb. 4.4A). Die Bestimmung des Proteinspiegels von YdaM war stets erschwert durch unspezifische Bindungen des YdaM-Antikörpers, wodurch häufig eine Detektion von überlagerten Proteinen zu beobachten war. Jedoch konnten insgesamt keine reproduzierbaren Veränderungen im Proteinspiegel von YdaM detektiert werden (Abb. 4.4B).

Dasselbe Ergebnis zeigte sich in der Expression von *yciR::lacZ*, bei der kein Einfluss durch Mutationen in *ydaM*, *yegE* und *yhjH* erkennbar waren (Abb. 4.4C) und ebenso den Proteinspiegel von YciR nicht reproduzierbar beeinflussten (Abb. 4.4D).

Schlussfolgernd lässt sich hier insgesamt sagen, dass die Regulation des YdaM/YciR-Moduls durch das YegE/YhjH-Modul wahrscheinlich über die Proteinaktivität des YdaM/YciR-Systems erfolgt, da die Expression von YdaM und YciR unabhängig von YegE und YhjH war. Damit reguliert vermutlich die c-di-GMP-Konzentration in der Zelle, kontrolliert durch das YegE/YhjH-Modul, die Aktivität des YdaM/YciR-Systems. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Hypothese weitergehend untersucht.

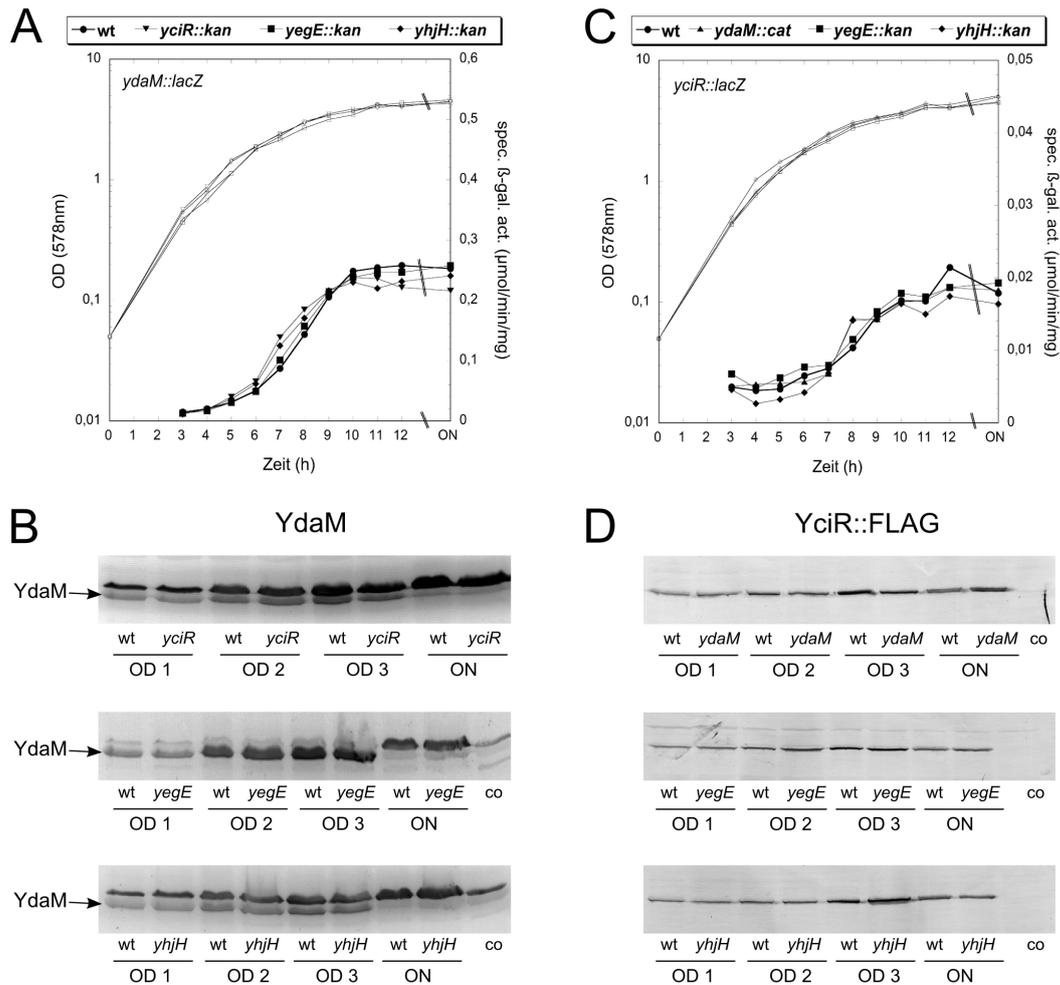


Abb. 4.4: Das YegE/YhjH-Modul reguliert nicht die Expression von YdaM und YciR. A. Bestimmung der YdaM-Expression mittels einer *ydaM::lacZ*-Reportergernefusion in Abhängigkeit von Mutationen in *yciR*, *yegE* und *yhjH* im Stamm *E. coli* K-12 W3110 (Genotyp wie angegeben). B. Immunoblot zur Proteinmengenbestimmung von YdaM mithilfe eines Anti-YdaM-Antikörpers zu verschiedenen Zeiten der Zelldichte (OD). C. Bestimmung der YciR-Expression mittels einer *yciR::lacZ*-Reportergernefusion in Abhängigkeit von Mutationen in *ydaM*, *yegE* und *yhjH* im Stamm *E. coli* K-12 W3110 (Genotyp wie angegeben). D. Immunoblot zur Proteinmengenbestimmung von chromosomalem YciR::FLAG mithilfe eines Anti-FLAG-Antikörpers. Alle Stämme wurden bei 28°C in LB-Medium inkubiert. Die Bestimmung der Expression von *ydaM* und *yciR* erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β -Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) bis zu einer Übernachtprobe (ON). Die Probenentnahme für die Proteinspiegelmessung wurde bei $OD_{578} = 1, 2$ und 3 sowie als Übernachtprobe (ON) durchgeführt.

4.2 Bildet das YdaM/YciR-Modul einen ternären Komplex mit MlrA?

Vorhergehende Studien zusammen mit den zuvor gezeigten Daten, haben nun darauf hingewiesen, dass YdaM und YciR lokal über den Transkriptionsaktivator MlrA die Transkription von *csgD* regulieren. Für solch eine lokale Regulation wären Protein-Protein-Interaktion notwendig, die durch Komplexbildung eine Abgrenzung zur restlichen Zelle ermöglichen.

In der vorhergehenden Arbeit wurde bereits eine mögliche Komplexbildung zwischen dem YdaM/YciR-Modul und MlrA in initialen *in vivo*-Studien untersucht. Hier konnte beobachtet werden, dass YciR möglicherweise mit seinem Antagonisten YdaM sowie dem Transkriptionsfaktor MlrA eine Interaktion eingeht. Es konnte jedoch keine Interaktion für YdaM mit MlrA festgestellt werden [Lindenberg, 2008].

In dieser Arbeit sollte nun eine detaillierte Untersuchung dieser Interaktionen durch *in vitro* und *in vivo* Analysen weitergeführt werden, um ein Verständnis für diese lokal funktionierende Regulation der *csgD*-Transkription durch das YdaM/YciR-Modul zu entwickeln.

4.2.1 YciR bildet einen Komplex mit YdaM und MlrA

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob die detektierten Interaktionen der vorhergehenden Studie [Lindenberg, 2008] *in vitro* bestätigt werden können. Dafür wurde der sog. „Pull-Down Assay“ (auch Co-Elution genannt), basierend auf einer Affinitätschromatographie, herangezogen.

Dazu wurden in dieser Arbeit Zellysate mit überproduzierten His6- oder S-getaggtten Proteinen genutzt, die in Stämmen mit einer *rpoS*-Mutation (*mlrA*, *ydaM* und *yciR* werden *rpoS* abhängig exprimiert) oder mit Mutationen für den jeweiligen Interaktionspartner überexprimiert wurden. Dadurch konnte verhindert werden, dass die chromosomale Expression des entsprechenden Proteins mit dem überexprimierten Protein kompetitiert.

Generell wurde in diesen Versuchen ein S-getaggttes Protein aus einem Zellysat an S-Protein-Agarose immobilisiert und mit einem Lysat des His6-getaggtten Proteins inkubiert, so dass das His6-getaggtte Protein bei Interaktion mit dem S-getaggtten Protein später co-eluiert wurde und letztlich im Eluat mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. Der Vorteil des Verwendens von Zellysaten war hier, dass neben dem überproduzierten

Protein auch eine Vielzahl von anderen Zellproteinen vorhanden war, so dass eine starke und spezifische Interaktion notwendig war, um den Interaktionspartner „herauszufischen“. Dieser Versuch konnte jedoch nur für S-getaggtetes YdaM und MlrA durchgeführt werden, da YciR-S schwer löslich war und sich in Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) akkumuliert.

Es zeigte sich nun für immobilisiertes MlrA-S, dass YdaM wie auch YciR im Eluat nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.5A). Das bestätigt zum einen die vorher detektierte Protein-Protein-Interaktion zwischen YciR und MlrA [Lindenberg, 2008] und zeigte zum anderen, dass YdaM unter diesen Bedingungen auch mit MlrA interagiert, das nicht zuvor beobachtet werden konnte. Außerdem fiel auf, dass bei Anwesenheit von YdaM-His6 und YciR-His6 im Assay mit immobilisiertes MlrA stets die Bindung durch YdaM-His6 schwächer erschien als in Abwesenheit von YciR-His6, so dass man vermuten könnte, YciR kann YdaM teilweise verdrängen.

Im weiteren Verlauf ließ sich durch immobilisiertes YdaM-S eine Interaktion mit seinem Antagonisten YciR-His6 beobachten. Diese kann auch als spezifisch angesehen werden, da das EAL-Domänen-Protein YhjH nicht co-eluiert werden konnte. Damit bestätigte sich die Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen Proteinen.

Ein Test auf Co-Elution von YdaM-S mit MlrA-His6 war hier nicht möglich, da sich herausgestellt hatte, dass MlrA-His6 selbst spezifisch an die Matrix der S-Protein-Agarose bindete, das in Abb. 4.5B (rechte Hälfte) deutlich erkennbar ist. Dadurch wurde für Folgeuntersuchungen auch MlrA-His6 als immobilisierbares Protein für die S-Protein-Agarose-Matrix genutzt.

Da der Einfluss von YegE-generiertem c-di-GMP scheinbar über die Proteinaktivität von YciR erfolgt, sollte außerdem untersucht werden, ob c-di-GMP oder GTP (als Kontrolle) möglicherweise die Protein-Protein-Interaktion beeinflusst. Dafür wurden zu diesem Assay verschiedene Mengen an c-di-GMP und GTP zugegeben, mit dem Ergebnis, dass unter diesen Versuchsbedingungen weder durch c-di-GMP noch durch GTP die Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst wurden (Abb. 4.5B).

Bei Detektion der Interaktionspartner fiel generell auf, dass YdaM-His6 eine weitere Bande im Immunoblot aufzeigt (YdaM*-His6, Abb. 4.5A+B). Diese Bande ist vermutlich am N-Terminus degradiertes YdaM, da der C-terminale Tag noch detektierbar war. Dass

YdaM am N-Terminus degradiert, konnte auch bereits durch die Analyse von gereinigtem Protein durch Massenspektrometrie aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt) und könnte bedeuten, dass YdaM möglicherweise autokatalytisch prozessiert.

Zuletzt sollte noch erwähnt werden, dass anfangs bei der Proteinaufreinigung von YciR stets weitere Proteine als Verunreinigung detektierbar waren. Diese Banden wurden für manche Proteinproben mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. Dabei hat sich herausgestellt, dass in Proben von YciR-His6, gereinigt aus einem Stamm ohne *rpoS*-Mutation, MlrA und YdaM detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

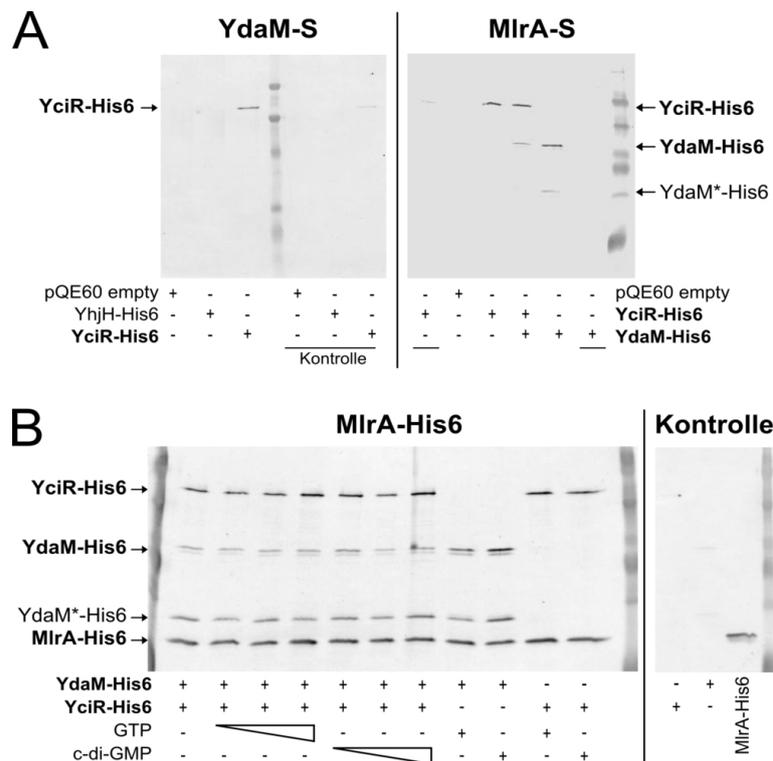


Abb. 4.5: *In vitro* Interaktionsstudien von MlrA, YciR und YdaM. Mithilfe von Affinitätschromatographie wurde (A) S-getaggtetes YdaM (YdaM-S) bzw. MlrA (MlrA-S) sowie (B) MlrA-His6 an S-Protein-Agarose gebunden und mit Zellysaten His6-getaggtter Proteine (YdaM-His6, YciR-His6, YhjH-His6; Kontrolle: Leervektor „pQE60-empty“) inkubiert. Mit Elution des S-getaggtten Protein wurde der His6-getaggtte Interaktionspartner co-eluiert und durch einen Immunoblot mithilfe eines Anti-His6-Antikörper detektiert. Die gekennzeichneten Kontrollen enthielten kein S-getaggttes Protein. A. Immunoblot zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mit immobilisiertem YdaM-S (links) und MlrA-S (rechts). B. Immunoblot zur Detektion der Protein-Protein-Interaktionen mit immobilisiertem MlrA-His6 unter Zugabe von steigenden Mengen an GTP (1 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) und c-di-GMP (1 nM, 100 nM, 10 μ M), mit jeweils der maximalen Konzentration (+) als Kontrolle.

Zusammenfassend zeigten die *in vitro* Interaktionsstudien, dass MlrA und YciR, MlrA und YdaM sowie YdaM und YciR miteinander interagierten. Damit bestätigen sich die vorherigen Beobachtungen in erweiterter Form [Lindenberg, 2008] und lassen die Bildung

eines ternären Komplexes vermuten. Ein Einfluss von c-di-GMP auf die Interaktion konnte nicht beobachtet werden.

4.2.2 Die Komplexbildung von YdaM/YciR/MlrA erfolgt über multiple Domänenkontakte

Zur detaillierten Analyse, welche Domänen an den Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, wurden die Interaktionen aus der vorhergehenden Studie [Lindenberg, 2008] reproduziert bzw. weitergehend untersucht. Dazu wurde ein bakterielles Two-Hybrid System (BacterioMatch® II Two-Hybrid) verwendet, das auf der Co-Transformation von zwei Plasmiden basiert, die jeweils für ein Interaktionshybridprotein kodieren: zum einen für eine Fusion an den λ Repressor cI (als Köder oder „bait“; pBT) und zum anderen für eine Fusion an die α -N-terminale Domäne der RNA-Polymerase (α -NTD-RNAP; als Ziel oder „target“, pTRG). Nur durch Protein-Protein-Interaktion der Hybridproteine kann die erhöhte Expression des Reportergens *His3* (aus Hefe) ein Wachstum des Histidin-auxotrophen Reporterstammes auf selektiven Platten mit einem kompetitiven Inhibitor (3-AT) bewirken (Details siehe Material und Methoden, Kapitel 3.6.11) [Dove & Hochschild, 2004].

Wie zuvor beschrieben, weisen die Proteine von YdaM, YciR und MlrA komplexe Strukturen mit mehreren Domänen auf. Daher wurden die einzelnen Domänen gemäß Abb. 4.1A auf die vorgegebenen Vektoren kloniert [Lindenberg, 2008]. Von YciR und YdaM wurden als N-terminale Domäne (NTD) die sog. PAS/PAC-Domänen zusammengefasst, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Für YdaM wurde außerdem noch die GGDEF-Domäne und für YciR einzeln die GGDEF- sowie EAL-Domäne kloniert. Für MlrA wurde die N-terminale MerR-Domäne (NTD) sowie die C-terminale Domäne (CTD) untersucht.

Das Gesamtergebnis ist nun in Abb. 4.6 dargestellt. Als Positivkontrolle dienten die von E. Klauk bereitgestellten Konstrukte für RpoS und RssB, deren starke Protein-Protein-Interaktion für die Proteolyse von RpoS beschrieben wurde [Becker *et al.*, 1999]. Zunächst zeigte sich in der Reproduktion, dass YciR mit seinen drei Domänen (NTD, GGDEF- und EAL-Domäne) eine Interaktion mit dem Gesamtprotein von YdaM einging (Abb. 4.6A, zweites Feld) und im Gegenzug nur die YdaM-NTD mit dem YciR-Gesamtprotein interagierte (Abb. 4.6A, erstes Feld). Dabei schien die stärkste

Interaktion zwischen der YciR-EAL-Domäne und der YdaM-NTD detektierbar zu sein (Abb. 4.6A, drittes Feld). Weitergehend zeigte sich, dass eine starke Protein-Interaktion zwischen der YciR-GGDEF-Domäne und der YdaM-GGDEF-Domäne stattfand (Abb. 4.6A, viertes Feld), die jedoch nur sichtbar wurde, wenn diese Domänen für sich allein exprimiert waren. Man könnte durch die ähnliche Domänenstruktur auf eine unspezifische Interaktion schließen, jedoch wird das durch die nicht-detektierbare Interaktion zwischen YdaM-GGDEF und YeaP-GGDEF widerlegt (Abb. 4.6D, letzte Zeile). Das deutet auf eine spezifische und regulierte Protein-Interaktion hin, die scheinbar durch eine YciR-Domäne (NTD oder EAL-Domäne) verhindert wird, da die GGDEF-Domäne von YdaM keine Interaktion mit dem Gesamtprotein eingehen konnte. Damit spielt wahrscheinlich die Konformation von YciR eine große Rolle, um die jeweiligen Domänenkontakte zu formieren.

In der weiteren Interaktionsanalyse zeigte sich, dass MlrA mit seiner C-terminalen Domäne (CTD) mit dem YciR-Gesamtprotein interagiert (Abb. 4.6B, erstes Feld). Dazu interagiert YciR mit all seinen Domänen (NTD, GGDEF, EAL), besonders stark jedoch durch seine EAL-Domäne, mit dem Gesamtprotein von MlrA (Abb. 4.6B, zweites Feld) bzw. mit der für sich allein exprimierten MlrA-CTD (Abb. 4.6B, drittes Feld). Eine Interaktion mit der MlrA-NTD, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit nicht detektiert werden (Abb. 4.6B, viertes Feld).

Die Interaktion zwischen MlrA und YdaM gestaltete sich in dieser Interaktionsstudie etwas komplexer. In der vorherigen Arbeit [Lindenberg, 2008] wie auch in dieser Arbeit konnte durch das bakterielle Two-Hybrid System keine Interaktion zwischen beiden Gesamtproteinen festgestellt werden. Im Gegenzug wurde durch die *in vitro* Interaktionsstudien (siehe Kapitel 4.2.1) deutlich, dass doch eine Interaktion zwischen beiden Proteinen möglich ist. Daher sollten nun mögliche Domänenkontakte genauer untersucht werden.

Dabei konnte zunächst eine schwache Interaktion von beiden YdaM-Domänen (NTD und GGDEF) mit dem MlrA-Gesamtprotein detektiert werden (Abb. 4.6C, erstes Feld). Dazu zeigte die N-terminale Domäne von MlrA weder eine Interaktion mit dem N-Terminus von YdaM noch mit dessen GGDEF-Domäne (Abb. 4.6C, zweites Feld). Vielmehr stellte sich heraus, dass die C-terminale Domäne von MlrA mit der GGDEF-Domäne von YdaM eine starke Interaktion einging, die nur detektierbar war, wenn beide Domänen allein

exprimiert wurden (Abb. 4.6C, drittes Feld). Diese Interaktion konnte auch spezifisch angesehen werden, da MlrA-CTD unter stringenteren Bedingungen (durch erhöhte Zugabe des kompetitiven Inhibitors) keine Interaktion mit anderen GGDEF-Domänen (von YciR, YegE, YaiC) zeigte (Abb. 4.6D). Da das YdaM-Gesamtprotein keine Interaktion mit der MlrA-CTD zeigte, scheint die Interaktion zwischen YdaM und MlrA zum einen in der Hinsicht reguliert zu sein, dass die N-terminale Domäne von YdaM inhibierend auf den Kontakt der GGDEF-Domäne mit MlrA-CTD wirkt. Zum anderen könnte auch zusätzlich die Kontaktstelle von MlrA im Gesamtprotein nicht ganz zugänglich gewesen zu sein, da die YdaM-GGDEF-Domäne mit dem MlrA-Gesamtprotein schwach interagiert. Damit ist die Protein-Protein-Interaktion möglicherweise von der Konformation beider Proteine abhängig.

Zur besseren Übersicht sind alle detektierten Interaktionen in einem Schema zusammengefasst (Abb. 4.6E).

Zusammengefasst lässt aus den *in vivo* Interaktionsstudien schlussfolgern, dass YciR, YdaM und MlrA vermutlich einen Komplex bilden, der über mehrere Kontaktstellen ihrer Domänen geformt wird. Dieser Komplex reguliert vermutlich lokal die *csgD*-Transkription, da MlrA am *csgD*-Promotor bindet [Ogasawara *et al.*, 2010b; Pesavento, 2011]. Für die Komplexbildung hat scheinbar die YciR-EAL-Domäne eine wichtige Funktion, da sie am stärksten mit der YdaM-NTD und der MlrA-CTD interagiert. Regulierte Interaktionen konnten außerdem für die GGDEF-Domäne von YdaM beobachtet werden, die bei einzelner Expression sehr stark mit dem C-Terminus von MlrA sowie mit der GGDEF-Domäne von YciR interagiert. Dabei spielt vermutlich zum einen die Zugänglichkeit der MlrA-CTD und YciR-GGDEF-Domäne eine Rolle und zum anderen, dass der N-Terminus von YdaM (bestehend aus PAS-Domänen) einen Kontakt mit der MlrA-CTD verhindert. Das deutet darauf hin, dass die regulierten Interaktionen vermutlich von der Konformation der einzelnen Proteine abhängen und dynamisch sind, weshalb sie hier nur durch die Expression einzelner Domänen sichtbar wurden.

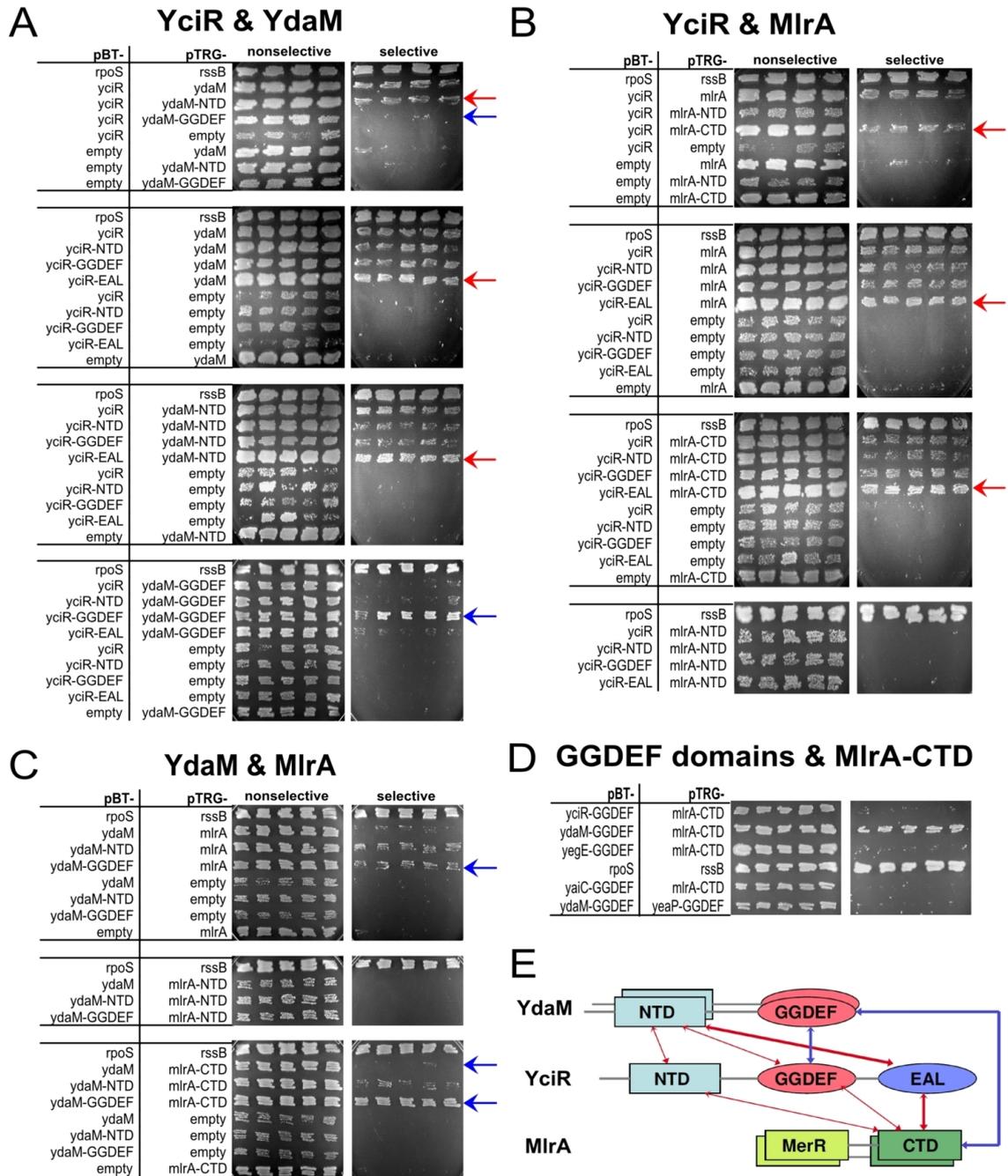


Abb. 4.6: *In vivo* Interaktionsstudien zur Analyse der Domänen-Interaktionen von MirA, YciR und YdaM. BacterioMatch® II Two-Hybrid Analyse für Hybridproteine oder -domänen von YdaM, YciR und MirA, fusioniert an den λ CI-Repressor (über pBT) oder der α NTD-RNAP (über pTRG). Eine Co-Transformation wurde durch Wachstum auf nicht-selektivem Medium verifiziert („nonselective“) und Protein-Interaktionen wurden durch Wachstum auf selektivem Medium („selective“) detektiert. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen RpoS und RssB [Becker *et al.*, 1999]. Die selektiven Platten enthielten 4 mM 3-AT als Kompetitor des Reportergenprodukts *HIS3* mit Ausnahme von (D) mit 5 mM 3-AT. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 37°C und 24-48 h bei 28°C. Detaillierte Domänen-Interaktionen wurden für (A) YciR und YdaM, (B) YciR und MirA, (C) YdaM und MirA sowie (D) von verschiedenen GGDEF-Domänen und MirA-CTD getestet. E. Schematische Zusammenfassung der Interaktionen (verändert nach Regine Hengge [Lindenberg *et al.*, 2013]). YdaM und MirA sind als Dimer dargestellt, da sie vermutlich als Dimer aktiv sind [Brown *et al.*, 2003; Schirmer & Jenal, 2009]. Die Dicke der Linie entspricht der Stärke der Interaktion und regulierte Interaktionen sind mit blauen Pfeilen dargestellt. Die Farbe zur Markierung der Interaktion in (A-C) entspricht den in (E) verwendeten Pfeilen.

4.3 Die Rolle von MlrA in der Curli-Expression

Wie bereits beschrieben wurde und zuvor gezeigt wurde, ist der MerR-ähnliche Transkriptionsfaktor MlrA essentiell für die Aktivierung der Curli-Expression in *E. coli* [Brown *et al.*, 2001] und wird vermutlich über das YdaM/YciR-Modul lokal am *csgD*-Promotor reguliert (siehe Kapitel 4.1.2).

Zuvor wurde deutlich, dass eine Protein-Protein-Interaktion von MlrA mit YciR wie auch YdaM stattfindet, an der die C-terminale Domäne von MlrA beteiligt ist (siehe Kapitel 4.2.2), die bekanntlich auch die Liganden-bindende Domäne von MerR-ähnlichen Regulatoren darstellt [Brown *et al.*, 2003]. Natürlich stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus einer Regulation durch den YdaM/YciR/MlrA-Komplex, der im Folgenden weiter untersucht wurde.

4.3.1 MlrA wird auf posttranslationaler Ebene reguliert

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass die Expression von MlrA durch YciR oder YdaM reguliert wird. Dafür wurde die translationale *lacZ*-Reporterfusion von *mlrA* sowie der Proteinspiegel mithilfe eines chromosomalen FLAG-Tags in Abhängigkeit von Knockout-Mutationen für *yciR* und *ydaM* untersucht.

Es stellte sich heraus, dass weder eine *yciR*- noch eine *ydaM*-Mutation die *mlrA::lacZ*-Expression (Abb. 4.7A) oder die Proteinmenge von MlrA::FLAG beeinflussten (Abb. 4.7B). Das bedeutet, dass YdaM und YciR auf posttranslationaler Ebene die Aktivität von MlrA über die detektierten Protein-Protein-Interaktion beeinflussen.

Um nun zu untersuchen, ob ein YciR/YdaM/MlrA-Komplex an der *csgD*-Promotor-DNA lokalisiert ist, wurde in sog. „Elektrophoretischen Mobilität-Shift-Assays“ (EMSA oder Bandshift) getestet, ob in einem nativen Acrylamidgel das Laufverhalten eines *csgD*-Promotorfragments durch die zusätzliche Zugabe von YdaM und YciR beeinflusst wird. Da MerR-ähnliche Proteine generell an der DNA-gebunden sind [Brown *et al.*, 2003], wurde ein sog. „Supershift“ erwartet.

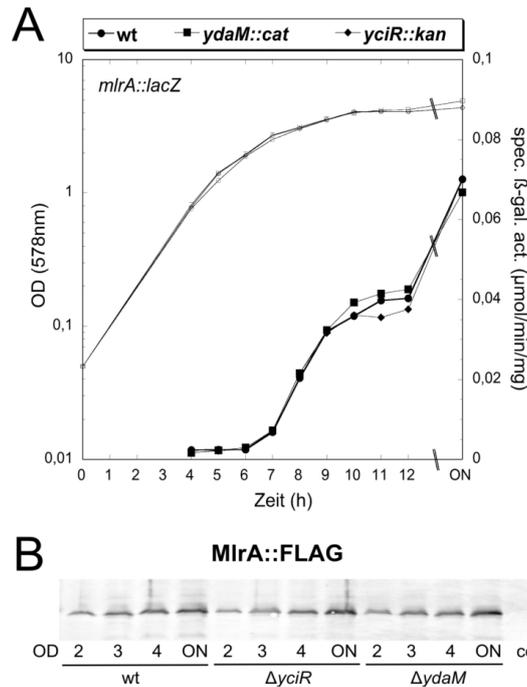


Abb. 4.7: Die Expression von MlrA wird nicht durch YdaM und YciR beeinflusst. A. Bestimmung der MlrA-Expression mittels einer *mlrA::lacZ*-Reportergenfusion im Mutationshintergrund für *yciR* (*yciR::kan*) und *ydaM* (*ydaM::cat*). Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der Expression erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole). B. Immunoblot zur Bestimmung der Proteinmenge von chromosomal FLAG-getagtem MlrA (MlrA::FLAG) im Mutationshintergrund für *yciR* ($\Delta yciR$) und *ydaM* ($\Delta ydaM$) mithilfe eines Anti-FLAG-Antikörpers. Proteinproben wurden zu den benannten Zeitpunkten der optischen Dichte (OD; ON = Übernachtprobe) entnommen.

Nun zeigte sich, dass weder durch die Zugabe von YdaM noch durch YciR eine Veränderung des Laufverhaltens des durch MlrA gebundenen *csgD*-Fragments zu beobachten war (Abb. 4.8). Möglicherweise waren die Reaktionsbedingungen bei diesem Versuch nicht optimal zur Komplexbildung, so dass diese Hypothese nicht ausgeschlossen werden kann.

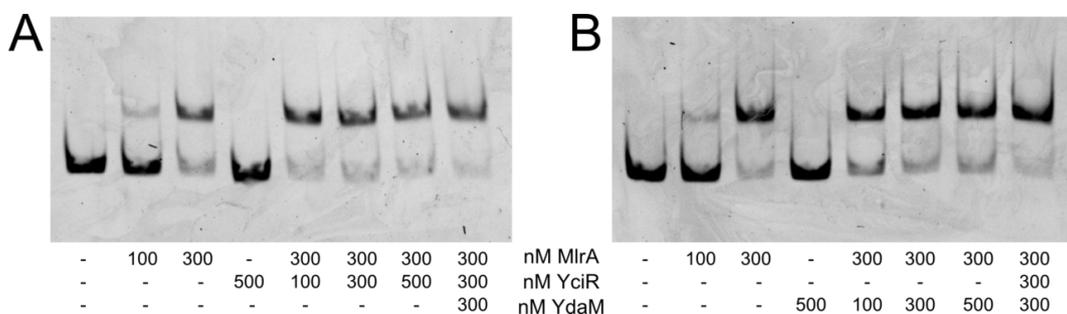


Abb. 4.8: Bindung von MlrA an den *csgD*-Promotor unter Einfluss von YciR und YdaM. EMSA-Studien von His6-MlrA mit einem *csgD*-Promotorfragment (199 bp, 340 fmol) unter steigender Zugabe von (A) His6-YciR und (B) His6-YdaM (Proteinmenge jeweils wie gekennzeichnet). Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte durch Ethidiumbromid.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass MlrA nicht auf transkriptionaler oder translationaler Ebene durch YciR oder YdaM reguliert wurde. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass YciR und YdaM durch ihre Protein-Protein-Interaktion mit MlrA seine Aktivität regulieren. In EMSA-Studien konnte keine Komplexbildung am *csgD*-Promotor nachgewiesen werden, die jedoch nicht als Hypothese ausgeschlossen werden kann, da ein „Shift“ nicht Proteinbindung per se nachweist, sondern eine proteinbedingte Konformationsänderung des DNA-Fragments.

4.3.2 MlrA ist kein c-di-GMP Effektor

MerR-ähnliche Proteine sind dafür bekannt, kleine Liganden wie bspw. Metallionen über die C-terminale Domäne zu binden, wodurch eine Konformationsänderung die Aktivierung der Transkription bewirken kann [Brown *et al.*, 2003; Hobman, 2007]. Für MlrA ist bisher noch kein Ligand bekannt und sollte daher in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Da die C-terminale Domäne von MlrA eine starke Protein-Protein-Interaktion mit der GGDEF-Domäne von YdaM einging (siehe Kapitel 4.2.2), ließ sich natürlich vermuten, dass das durch die GGDEF-Domäne synthetisierte c-di-GMP als Ligand an MlrA bindet. Dazu hat MlrA in seiner Aminosäuresequenz gleich zwei RxxD-Motive (auch als I-site bei Diguanylatzyklasen bekannt; Abb. 4.10A), die dafür bekannt sind, c-di-GMP zu binden [Schirmer & Jenal, 2009]. Diese befinden sich bei MlrA zum einen im N-Terminus in der MerR-Domäne und zum anderen in der Dimerisierungshelix nahe der Gelenkregion, die für andere MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren bekannt ist, Metall-Ionen zu binden [Brown *et al.*, 2003; Changela *et al.*, 2003; Newberry & Brennan, 2004]. Nach der Voraussage der Sekundärstruktur durch www.predict.protein.org wurden beide Motive als potentiell exponierte Bereiche beschrieben. Außerdem wurde in einem Sequenzvergleich deutlich, dass diese beiden RxxD-Motive nicht in den anderen vier MerR-ähnlichen Proteinen von *E. coli* vorkommen und sogar das Protein YcgE (auch als BluR bekannt), das zu 49 % mit MlrA identisch ist und als Paralog von MlrA beschrieben wurde [Tschowri *et al.*, 2012], keines dieser Motive kodiert hat (Abb. 4.10A). Daher wurden diese Motive zusätzlich als potentielle Bindestellen für c-di-GMP untersucht.

Um die Bindung von c-di-GMP zu testen, wurde hier der sog. UV-crosslinking Versuch herangezogen. Dazu wurde radioaktiv markiertes c-di-GMP (c-di-[³²P]GMP)

sowie radioaktiv markiertes GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$) mit den Proteinen durch UV-Licht irreversibel quervernetzt, sofern dieses Molekül gebunden wurde. Durch SDS-PAGE und „Phosphoimaging“ konnte Rückschluss auf eine c-di-GMP Bindung gezogen werden.

In der Arbeit von H. Weber wurde bereits in solchen Versuchen mit c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ die Bindung von gereinigtem MlrA getestet und es konnte nicht als c-di-GMP-Bindeprotein nachgewiesen werden [Weber, 2007].

Auf dieser Grundlage sollte in dieser Arbeit nun analysiert werden, ob MlrA unter anderen Bedingungen, wie der Anwesenheit von YdaM, YciR oder einem *csgD*-Promotorfragment in der Lage ist, radioaktiv-markiertes c-di-GMP zu binden. Dafür wurde zum einen c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ zu den Versuchsreihen hinzugegeben und zum anderen auch $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ verwendet, das durch YdaM im Assay zu radioaktiv markiertem c-di-GMP umgesetzt wird und so direkt an MlrA weitergegeben werden könnte. Als Kontrolle konnte hier der Vergleich zu einem Ansatz mit dem im aktiven Zentrum („A-site“) mutierten YdaM (YdaM-A⁻) verwendet werden, das nicht in der Lage ist, c-di-GMP zu generieren (siehe Kapitel 4.4). Auch wurde die gereinigte GGDEF-Domäne von YdaM getestet, die ja, wie zuvor gezeigt wurde (siehe Kapitel 4.2.2), eine starke Interaktion mit MlrA eingeht und noch enzymatisch aktiv ist (siehe Kapitel 4.4). Letztlich wurde außerdem getestet, ob MlrA nur im Komplex mit YdaM und YciR eine Bindung mit c-di-GMP eingehen kann, weshalb dieser Assay in Anwesenheit von YciR-wt wie auch YciR-AAL, das nicht in der Lage ist, c-di-GMP abzubauen (siehe Kapitel 4.5), durchgeführt wurde.

Diese Versuchsreihe zeigte nun, dass weder durch den YdaM-Wildtyp (YdaM-wt) noch durch die GGDEF-Domäne YdaM-generiertes c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ aus radioaktiv markiertem GTP an MlrA transferiert wurde (Abb. 4.9A). Auch zeigte sich keine verstärkte Bindung von zugegebenen c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ in Anwesenheit von YdaM oder seiner Derivate (Abb. 4.9B). Weiterhin war kein Einfluss durch die Anwesenheit von *csgD*-Promotor-DNA auf eine mögliche c-di-GMP-Bindung von MlrA zu erkennen (Abb. 4.9A+B). Für die Tests mit der zusätzlichen Anwesenheit von YciR (neben YdaM und MlrA) zur Bildung eines ternären Komplexes als mögliche Grundlage der c-di-GMP Bindung, hatte weder durch YdaM-generiertes c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ aus zugegebenem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (Abb. 4.9C), noch die direkte Zugabe von c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ (Abb. 4.9D) deutliche Signale für die Bindung ergeben.

Dass durch YdaM generiertes c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ transferiert wurde, ist in Abb. 4.9C ganz klar

ersichtlich, bei dem YciR-wt erst als Bande erkennbar wurde, wenn YdaM-wt im Ansatz war. Das Signal war nicht detektierbar, wenn YdaM-A⁻ vorhanden war, da es nicht in der Lage ist, c-di-GMP zu produzieren.

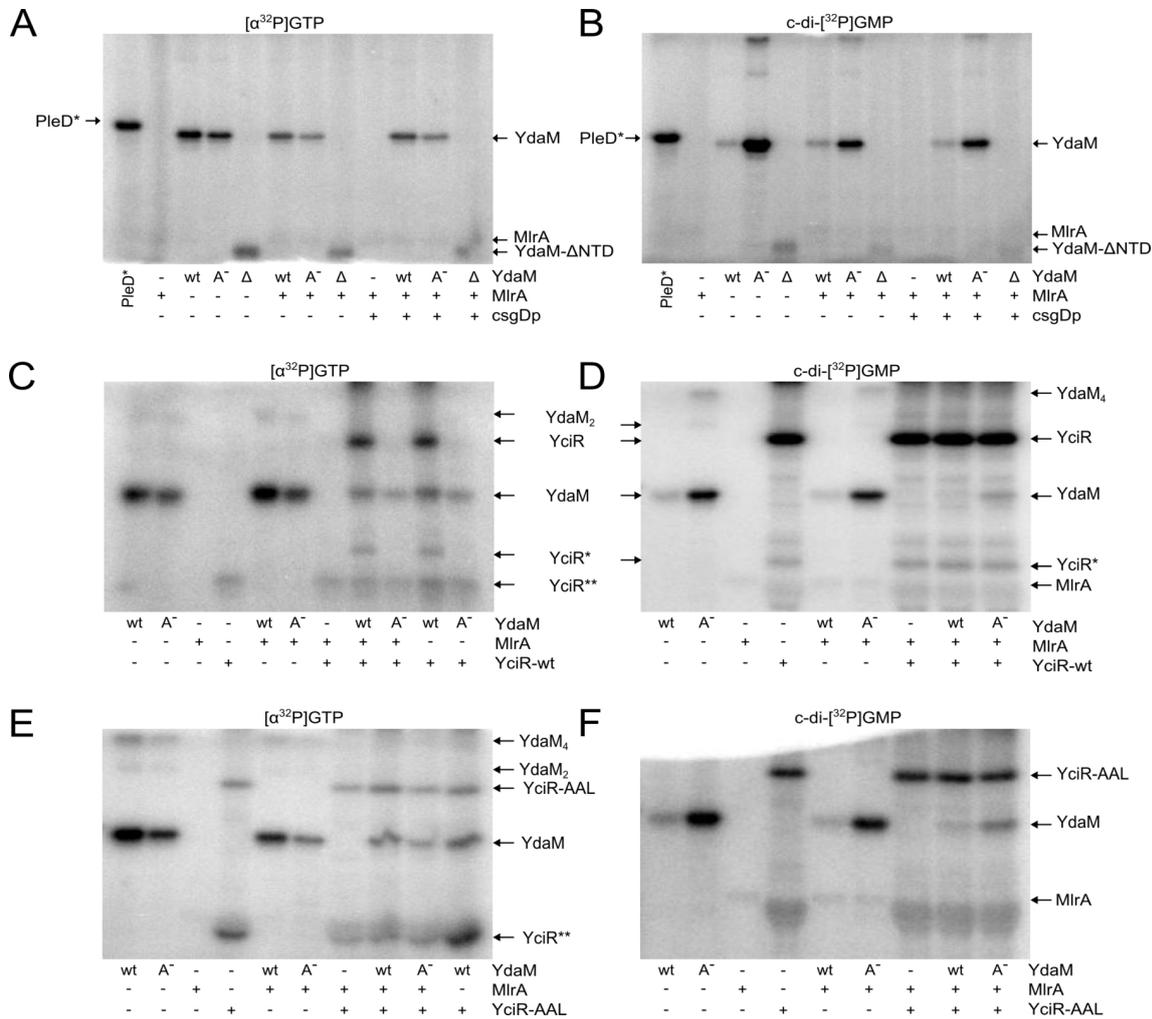


Abb. 4.9: Studien zur Bindung von c-di-GMP an MrA. UV-crosslinking Versuche zur Detektion der c-di-GMP- (bzw. GTP-) Bindung mit radioaktiv markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) bzw. c-di-GMP (c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$; 6000 Ci/mmol). A und B. Detektion der c-di-GMP Bindung von MrA bei Anwesenheit von YdaM-wt bzw. seinen Derivaten (YdaM-A⁻ und YdaM-ΔNTD), *csgD*-Promotor-DNA durch (A) $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bzw. (B) c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$. C und D. Detektion der c-di-GMP Bindung von MrA bei Anwesenheit von YdaM-wt (bzw. YdaM-A⁻), YciR-wt durch (C) $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bzw. (D) c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$. E und F. Detektion der c-di-GMP Bindung von MrA bei Anwesenheit von YdaM-wt (bzw. YdaM-A⁻), YciR-AAL durch (E) $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bzw. (F) c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$. Die Proben wurden vor Zugabe der radioaktiven Nukleotide für 20-60 min bei RT und nach Zugabe der radioaktiven Nukleotide für 10-15 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch UV-Licht quervernetzt. Durch SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und mittels Phosphoimaging detektiert.

Ein letzter Versuch mit YciR-AAL, das kaum c-di-GMP abbauen kann, zeigte hinsichtlich der c-di-GMP-Bindung von MrA kein anderes Resultat wie zuvor mit YciR-wt (Abb. 4.9E+F). D.h. auch YciR oder eine mögliche Komplexbildung hatte keinen Einfluss auf eine verstärkte Bindung von c-di- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ durch MrA, unabhängig davon, ob es von YdaM generiert

wurde oder nicht.

Insgesamt konnte durch diese Versuche keine eindeutige Aussage zu der Bindung von MlrA an c-di-GMP getroffen werden, da in diesen UV-crosslinking Versuchen MlrA generell als schwach bindende Bande mit c-di-[³²P]GMP detektierbar war und dieses Signal nicht viel schwächer als das für YdaM-wt war (Abb. 4.9B,D,F). Teilweise waren solche Banden auch für Assays mit [α ³²P]GTP detektierbar (nicht gezeigt). Deshalb sollte zum Abschluss dieser Analyse noch genauer untersucht werden, ob das detektierte Signal spezifisch war und ob die vorgenannten RxxD-Motive von MlrA eine Auswirkung auf die Curli-Expression sowie auf eine c-di-GMP-Bindung im UV-crosslinking haben.

Nach Austausch der Aminosäuren Arginin55/Asparaginsäure58 (R55/D58) und Arginin107/Asparaginsäure110 (R107/D110) in jeweils Alaninreste (Abb. 4.10A) wurde der Einfluss dieser MlrA-RxxD-Derivate auf eine *csgB::lacZ*-Reporterfusion durch Expression vom pQE60-Vektor mit Komplementation einer *mlrA*-Mutation getestet. Dabei zeigte sich, dass beide mutierten Motive (R55A/D58A und R107A/D110A) keine Auswirkungen auf die *csgB::lacZ*-Expression hatten und dabei keine unterschiedliche Mengen der Proteinexpression vorlag (Abb. 4.10B).

Im UV-crosslinking Versuch mit c-di-[³²P]GMP wurde deutlich, dass das Wildtyp-MlrA wie auch seine punktmutierten RxxD-Derivate immer als schwach bindend detektierbar waren, dessen Signale aber nicht durch nicht-radioaktives c-di-GMP kompetitiv verdrängt werden konnten (Abb.4.10C). Daher kann die c-di-GMP-Bindung von MlrA als unspezifisch angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass MlrA unter den hier getesteten Bedingungen, d.h. weder im Komplex mit YdaM und YciR, noch mit *csgD*-Promotor-DNA oder bei Anwesenheit seines starken Interaktionspartners, der YdaM-GGDEF-Domäne, c-di-GMP spezifisch bindete. Die RxxD-Motive konnten als c-di-GMP-Bindestellen ausgeschlossen werden und spielen auch keine Rolle für die Curli-Expression.

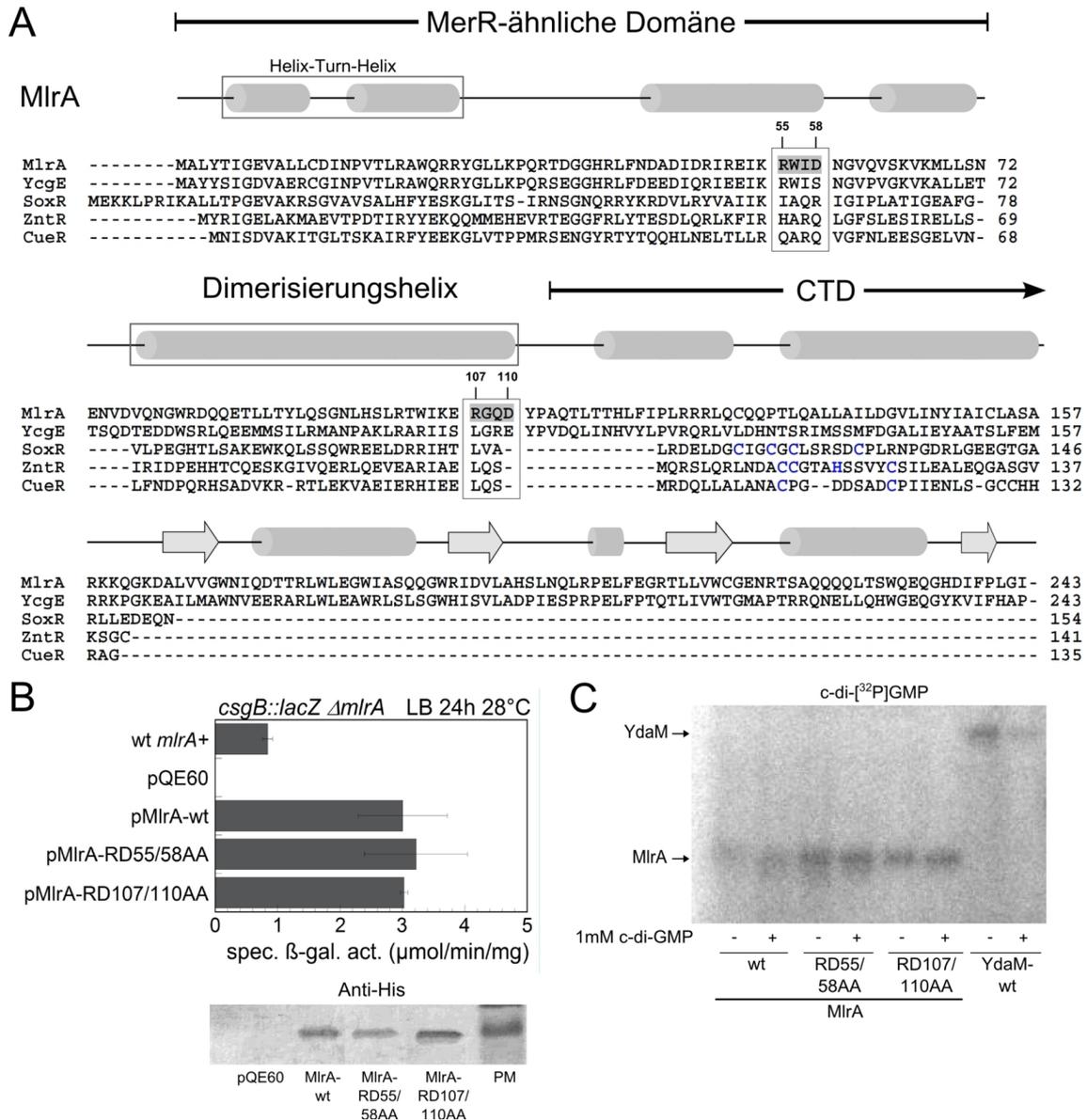


Abb. 4.10: Bedeutung der RxxD-Motive von MlrA für die Curli-Expression. A. Sequenzvergleich der fünf MerR-ähnlichen Proteine aus *E. coli*. MlrA besitzt ein RxxD-Motiv in der N-terminalen MerR-Domäne, sowie ein weiteres in der sog. Dimerisierungshelix, die zur Ausbildung einer „coiled-coil“-Struktur im Dimer verantwortlich ist; beide Motive sind grau unterlegt und mit der Position gekennzeichnet. Die sekundäre Struktur wurde für MlrA nach dem Web-basierten Programm <http://www.predictprotein.org/> vorausgesagt und als α -Helices (Zylinder) oder β -Stränge (Pfeile) über dem Sequenzvergleich dargestellt. Die Benennung der strukturgebenden Domänen erfolgte anhand der CueR-Struktur [Changela *et al.*, 2003]. Für SoxR, ZntR und CueR sind die an der Metall-Ionen-Bindung beteiligten Aminosäuren blau dargestellt [Changela *et al.*, 2003; Pomposiello & Demple, 2001]. B. Bestimmung der Curli-Expression (oben) anhand einer *cskB::lacZ*-Reporterfusion mit Expression von Plasmid-kodiertem MlrA und seinen punktmutierten RxxD-Derivaten (R55A/D58A und R107A/D110A) vom pQE60-Vektor (exprimiert mit C-terminalen His6-Tag) im Stamm W3110 *laqI*⁺ mit *mlrA*-Mutationshintergrund ($\Delta mlrA$). Zum Vergleich ist der Wildtyp (wt *mlrA*+) dargestellt. Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert und nach 24 h Wachstum wurde die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Werte entstammen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Immunoblot (unten) zur Bestimmung der Proteinmenge von MlrA anhand der Detektion des C-terminalen His6-Tags aus Kulturproben nach 24 h Wachstum. (PM = Proteinmarker) C. Detektion einer c-di-GMP-Bindung mithilfe von radioaktiv markiertem c-di-GMP (c-di-[³²P]GMP) an MlrA-wt und seinen punktmutierten RxxD-Derivaten (MlrA-R55A/D58A und MlrA-R107A/D110A) mit Kompetition durch 1 mM nicht-radioaktiv markiertem c-di-GMP. Als Kontrolle wurde YdaM-wt verwendet.

4.4 Charakterisierung und Funktion von YdaM

Vorhergehende Studien haben bereits gezeigt, dass YdaM eine aktive Diguanylatzyklase ist [Weber *et al.*, 2006] und vielmehr auch eine besondere Rolle in der Regulation der Curli-Expression einnimmt, da sie nicht durch andere Diguanylatzyklasen (DGC) komplementierbar war (siehe Kapitel 4.1.2). Seine lokale Wirkung auf die *csgD*-Transkription wurde durch die zuvor beobachtete Protein-Protein-Interaktion mit seinem Antagonisten, der Phosphodiesterase (PDE) YciR, sowie dem Transkriptionsfaktor MlrA weiter unterstützt (siehe Kapitel 4.2).

DGC sind bekannt dafür, dass sie Dimere bilden um aktiv zwei GTP-Moleküle zu c-di-GMP umzusetzen. Viele DGC haben eine sog. I-site („inhibitory site“ oder inhibitorisches Zentrum), über die sie ihr Produkt (c-di-GMP) binden und so in ihrer Aktivität gehemmt werden (nicht-kompetitive Produktinhibition, Produktfeedbackinhibition) [Schirmer & Jenal, 2009].

Daher sollte im Folgenden die Diguanylatzyklase-Aktivität von YdaM genauer untersucht werden, in dem die Struktur von YdaM näher analysiert und die Regulation seiner Enzymaktivität geklärt wird. Auch ist interessant, ob eine Abhängigkeit der Curli-Expression von YdaM-generiertes c-di-GMP zu beobachten ist.

4.4.1 Die aktive Diguanylatzyklase bildet Dimere und Tetramere

YdaM besitzt, wie viele DGC, neben einem konservierten GGEEF-Motiv im aktivem Zentrum („A-site“) auch ein sog. inhibitorisches Zentrum („I-site“) mit einem RxxD-Motiv, das 5 Aminosäuren N-terminal zur A-site positioniert ist (siehe auch Abb. 4.19A).

Zunächst wurden YdaM-Derivate aufgereinigt, bei denen Punktmutationen in der A-site (GGEEF zu GGAAF) sowie der I-site (RxxD zu GxxG) kodiert waren. Außerdem wurde YdaM als trunkierte Version mit einer deletierten N-terminalen Domäne (YdaM- Δ NTD) aufgereinigt.

Zu Beginn sollte geklärt werden, welche DGC-Aktivität YdaM und seine Derivate besitzen. Dazu wurde ein Diguanylatzyklase-Assay durchgeführt, bei dem YdaM mit radioaktiv markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$) inkubiert wurde und über Dünnschichtchromatographie die Produkte aufgetrennt und analysiert werden konnten. Das GTP enthielt an der α -Phosphat-Position das markierte Isotop (^{32}P), damit das Produkt als c-di- ^{32}P GMP

detektierbar war.

Wie in Abb. 4.11 erkennbar ist, hat der Wildtyp von YdaM (YdaM-wt) eine eindeutige Syntheseaktivität von c-di-GMP, während für die punktmutierte Variante der A-site (YdaM-A⁻) keine Aktivität detektierbar war. Weiterhin war erkennbar, dass die für die I-site mutierte Variante (YdaM-I⁻) eine geringere Aktivität zu verzeichnen war als für den Wildtyp. Hier war eigentlich eine höhere Aktivität zu erwarten, da die I-site normalerweise für die Produktinhibition bei DGC verantwortlich ist.

Außerdem war die YdaM-GGDEF-Domäne fähig c-di-GMP zu synthetisieren, jedoch sehr viel schwächer als der Wildtyp. Dazu war hier ein Signal detektierbar, das möglicherweise eine Anhäufung des linearen Zwischenprodukts pppGpG zeigt, wo die Zirkularisierung zu c-di-GMP nicht abgeschlossen werden konnte. Auch bei YdaM-I⁻ zeigte sich ein schwaches Signal für dieses Zwischenprodukt, das darauf schließen lässt, dass die Mutation in der I-site YdaM in seiner Struktur möglicherweise destabilisiert und so vielleicht auch die verringerte Enzymaktivität verursachte.

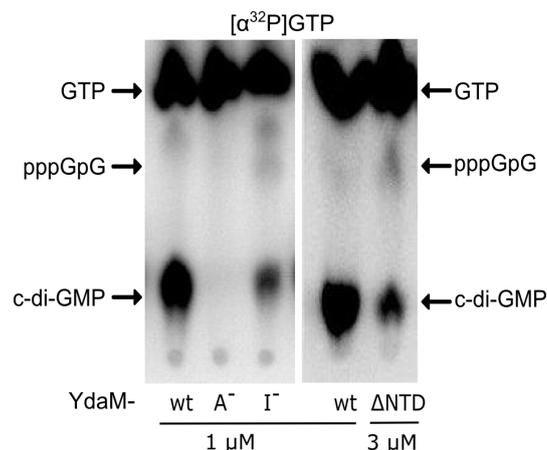


Abb. 4.11: Diguanylatzyklase-Aktivität von YdaM und seinen Derivaten. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays von 1 μM gereinigtem YdaM-wt, YdaM-A⁻ oder YdaM-I⁻ bzw. 3 μM YdaM-ΔNTD mit 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ([α³²P]GTP; 3000 Ci/mmol) nach Inkubation für 1 h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

Für die Analyse der Struktur von YdaM sollte nun die Oligomerisierung untersucht werden. Dabei wurde die chemische Crosslinker-Verbindung DSS (Disuccinimidylsuberat, Details siehe Material und Methoden, Kapitel 3.6.8) verwendet, die über Aminogruppen interagierende Polypeptide miteinander quervernetzt.

Dabei stellte sich heraus, dass YdaM unter diesen Versuchsbedingungen bevorzugt Tetramere bildete (Abb. 4.12A) und durch erhöhte GTP-Konzentration in der Umgebung

eine leichte Verschiebung zur Dimerbildung erfolgte. Da DGC als aktive Diguanylatzyklasen als Dimer vorliegen und zum Teil schon als Tetramer in Lösung beobachtet wurden [De *et al.*, 2008; Schirmer & Jenal, 2009], war diese Struktur insgesamt nicht ungewöhnlich. C-di-GMP hatte keine Auswirkungen auf die Oligomerisierung von YdaM-wt. Im Gegensatz dazu zeigt die GGDEF-Domäne von YdaM (YdaM- Δ NTD) eine unorganisierte Strukturanordnung, bei der keine bevorzugte Oligomerformierung mehr erkennbar war (Abb. 4.12B). Hier erklärt sich die geringe Aktivität der c-di-GMP-Synthese, da die GGDEF-Domäne alleine nicht stabil Dimere formen kann.

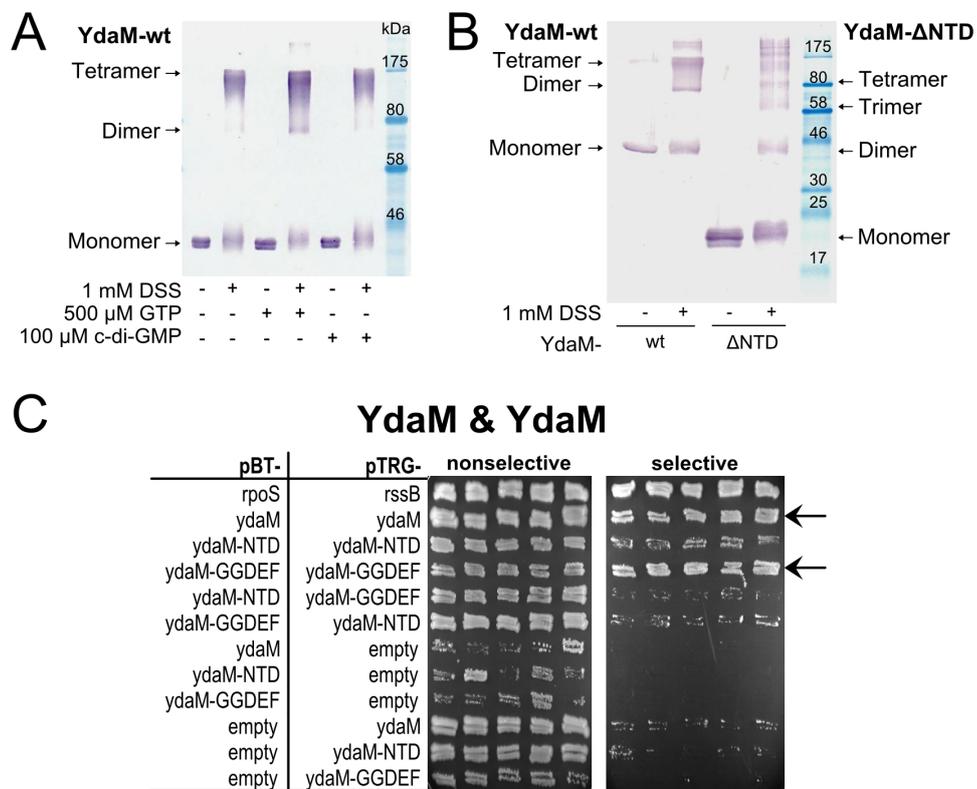


Abb. 4.12: YdaM dimerisiert über die GGDEF-Domäne. Analyse zur Oligomerisierung von YdaM mithilfe eines chemischen Crosslinks (A und B). Die Detektion erfolgte über einen Immunoblot mit einem Anti-His-Antikörper gegen den N-terminalen His6-Tag von YdaM. A. Chemischer Crosslink von YdaM-wt mit 1 mM DSS in Anwesenheit von 500 μ M GTP oder 100 μ M c-di-GMP. B. Chemischer Crosslink der YdaM-GGDEF-Domäne (YdaM- Δ NTD) mit 1 mM DSS. C. Bakterielle Two-Hybrid Analyse zur Detektion von Protein-Interaktionen der YdaM-Domänen untereinander. Diese wurden als Hypridproteine, fusioniert an λ cI (pBT) oder α NTD-RNAP, exprimiert. Die selektiven Platten enthielten 4 mM 3-AT als Kompetitor. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 37°C und 24-48 h bei 28°C.

Weiterhin konnte für die Struktur von YdaM das bakterielle Two-Hybrid System Aufschluss über die Interaktion der YdaM-Domänen untereinander und somit einer möglichen Konformation geben. Es war erkennbar, dass YdaM als Gesamtprotein mit sich

selbst sowie die GGDEF-Domänen untereinander eine sehr starke Interaktion eingingen (Abb. 4.12C). Die N-terminalen Domänen, bestehend aus zwei PAS-Domänen (Abb. 4.1A), zeigten eher eine schwache Interaktion untereinander, und keine Interaktion mit der GGDEF-Domäne (Abb. 4.12C). Das deutet daraufhin, dass YdaM vermutlich über seine GGDEF-Domäne dimerisiert, und die PAS-Domänen möglicherweise diese Formierung unterstützen oder stabilisieren können. Damit könnten GGDEF-Domänen selbst initiiierend zur Dimerisierung sein, ohne dabei abhängig von anderen Domänen (wie den PAS-Domänen) zu sein. Das widerlegt somit eine vorherige Hypothese, dass GGDEF-Domänen-Proteine nicht allein dimerisieren können [Jenal & Malone, 2006; Schirmer & Jenal, 2009].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass YdaM eine aktive Diguanilatzyklase ist. Dazu nimmt YdaM vermutlich als aktive Diguanilatzyklase die Struktur eines Dimers ein und in Lösung bevorzugt die eines Tetramers. Die Dimerisierung von YdaM wird womöglich durch die GGDEF-Domäne initiiert wird und durch die N-terminalen PAS-Domänen stabilisiert.

4.4.2 Die Diguanilatzyklase-Aktivität von YdaM wird nicht durch c-di-GMP reguliert

Diguanilatzyklasen (DGC) unterliegen normalerweise der Produktfeedbackinhibition durch die Bindung von c-di-GMP über ihr inhibitorisches Motiv (I-site). Dadurch wird verhindert, dass Übermengen an c-di-GMP produziert werden und ein energetischer Nachteil für die Zelle entsteht. Daher stellte sich natürlich die Frage, welcher Regulation YdaM unterliegt. Und da YdaM auch eine I-site besitzt, sollte eine mögliche Regulation über die I-site untersucht werden.

YciR und YdaM haben keine Regulation der Expression durch YegE oder YhjH gezeigt, daher sollte weitergehend untersucht werden, ob das YegE-generierte c-di-GMP YdaM in seiner Aktivierung der Curli-Expression beeinflusst. Dafür wurden Punktmutationen für die konservativen Motive von *ydaM* ins Chromosom gekreuzt und deren Einfluss auf die *csgB::lacZ*-Expression in Abhängigkeit von YegE und YhjH untersucht.

Für YdaM wurde wie zuvor zum einen die A-site (durch Austausch des GGDEF-Motivs zu GGAAF) und zum anderen die I-site (durch Austausch von RxxD zu GxxG) mutiert. Zur Kontrolle sollte hier zusätzlich die Rückkreuzung des Wildtyp-Allels (*ydaM::ydaM-wt*) dienen. Der Einfluss durch das YegE/YhjH-Modul zeigte nun im Hinblick auf die

csgB::lacZ-Expression wie zuvor (siehe Abb. 4.1A) eine starke Stimulierung durch die Abwesenheit von YhjH und eine starke Inhibierung bei Abwesenheit von YegE (Abb. 4.13). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen dem exprimierten Wildtyp von YdaM (*ydaM*⁺ *yciR*⁺; Abb. 4.13A) und dem zurückgekreuztem Wildtyp-Allel (Abb. 4.13B).

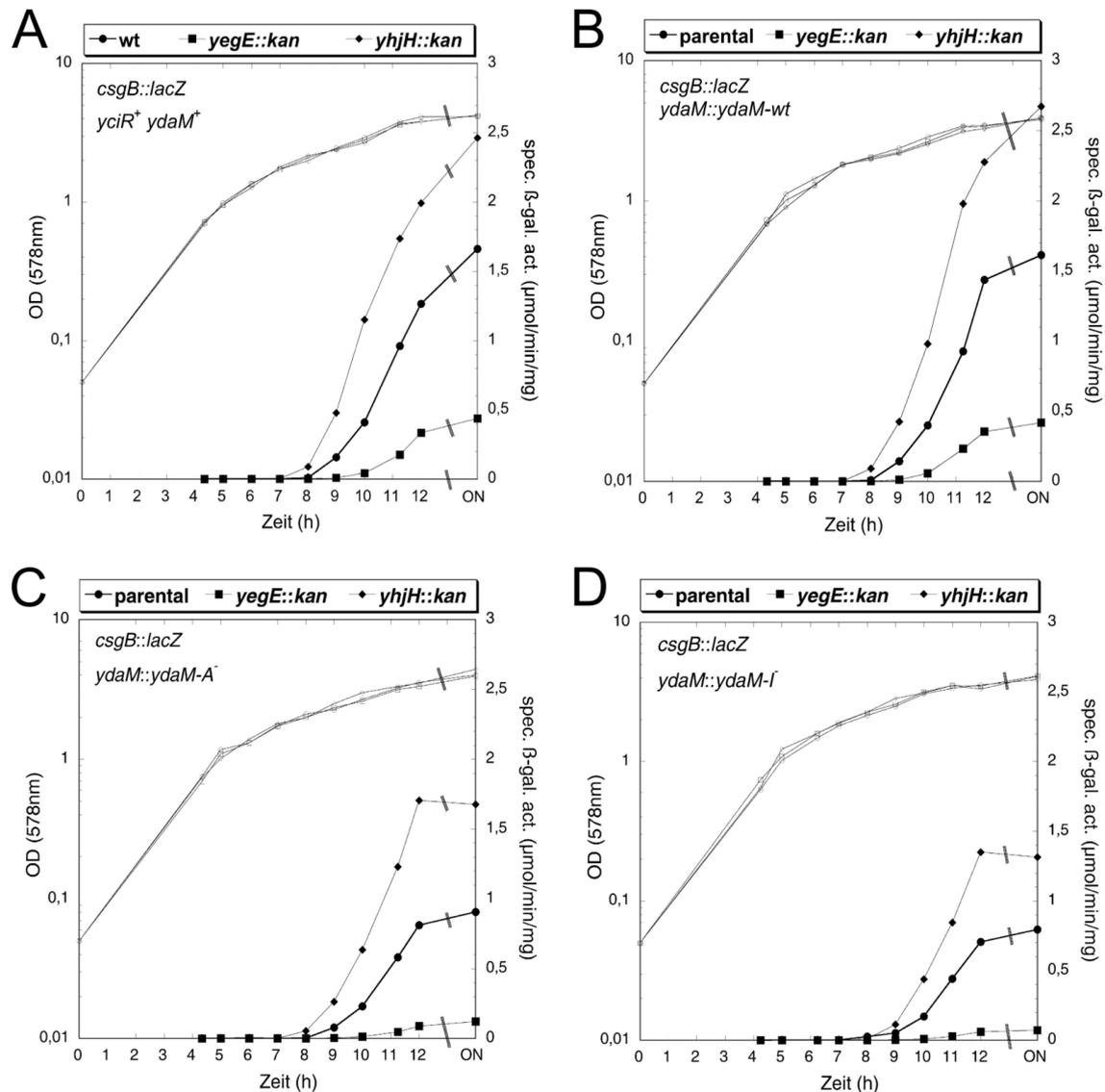


Abb. 4.13: Einfluss des YegE/YhjH-Moduls auf die Curli-Expression in Abhängigkeit von YdaM und seinen konservativen Motiven. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion im Stamm *E. coli* K-12 W3110 mit A. Wildtyp-Hintergrund (*ydaM*⁺ *yciR*⁺), B. einem zurückgekreuztem Wildtyp-Allel von *ydaM* (*ydaM::ydaM-wt*) als Kontrolle, C. dem in der A-site mutierten *ydaM*-Allel (*ydaM::ydaM-A⁻*), D. dem in der I-site mutierten *ydaM*-Allel (*ydaM::ydaM-I⁻*) als jeweils parentaler Stammhintergrund (Kreis) sowie mit Mutationen für *yegE::kan* (Quadrat) und *yhjH::kan* (Raute). Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der *csgB::lacZ*-Expression erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β -Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) bis zu einer Übernachtsprobe (ON).

Vergleicht man nun den *ydaM-wt*-Hintergrund mit dem der mutierten A- oder I-site (*ydaM::ydaM-A⁻* und *ydaM::ydaM-I⁻*; Abb. 4.13C+D) zeigte sich, dass zwar insgesamt die *csdB::lacZ*-Expression niedriger ausfiel, aber diese noch sensitiv für Mutationen von *yegE* und *yhjH* war (siehe auch Kapitel 4.4.4). Damit kann ausgeschlossen werden, dass YdaM und seine konservierten Motive ein Angriffspunkt für YegE/YhjH-kontrolliertes c-di-GMP ist.

Nun war natürlich interessant, ob YdaM überhaupt c-di-GMP bindet. Durch UV-crosslinking Versuche von YdaM mit radioaktiv-markiertem c-di-GMP (c-di-[³²P]GMP) konnte festgestellt werden, dass YdaM-wt wie auch YdaM-A⁻ c-di-GMP gebunden haben. Jedoch war für YdaM-I⁻ kein Signal für eine Bindung von c-di-GMP zu detektieren (Abb. 4.14A), woraus zu schließen ist, dass YdaM über seine I-site c-di-GMP bindet. Außerdem hatte sich reproduzierbar gezeigt, dass bei YdaM-A⁻ die Fähigkeit c-di-GMP zu binden deutlich verstärkt war. Vielleicht begünstigt die Konformation von YdaM-A⁻ die Bindung von c-di-GMP, während der Wildtyp durch seinen aktiven Zustand nur leicht c-di-GMP binden konnte.

Im Diguanylatzyklase-Assay sollte nun geklärt werden, inwieweit diese Bindung von c-di-GMP einen Einfluss auf die Aktivität von YdaM hat. Das konnte durch die zusätzliche Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP zu den Reaktionen analysiert werden. Als Kontrolle wurde hier PleD* verwendet, das durch Mutationen in seiner N-terminalen Receiver-Domäne (Rec) als DGC konstitutiv aktiv ist [Paul *et al.*, 2004]. Für PleD* zeigte sich nun eindeutig, dass seine Aktivität durch hohe c-di-GMP Konzentrationen (ab 50 µM) komplett gehemmt war (Abb. 4.14B). Für YdaM wiederum war erkennbar, dass mit Zugabe von bis zu 100 µM nicht-radioaktivem c-di-GMP YdaM in der Synthese von c-di-GMP keine Verringerung zeigte. Somit ist YdaM trotz seiner I-site nicht durch das Syntheseprodukt regulierbar.

Damit ließ sich insgesamt schlussfolgern, dass YdaM eine Diguanylatzyklase ist, die zwar über ihre I-site c-di-GMP bindet, aber nicht wie andere DGC durch diese Bindung inhibiert wird und dadurch keine Regulation durch Produktfeedbackinhibition zeigte. Diese fehlende Regulation verhindert wiederum, dass ein hoher c-di-GMP-Spiegel in der Zelle, generiert durch YegE, die Enzymaktivität von YdaM hemmt.

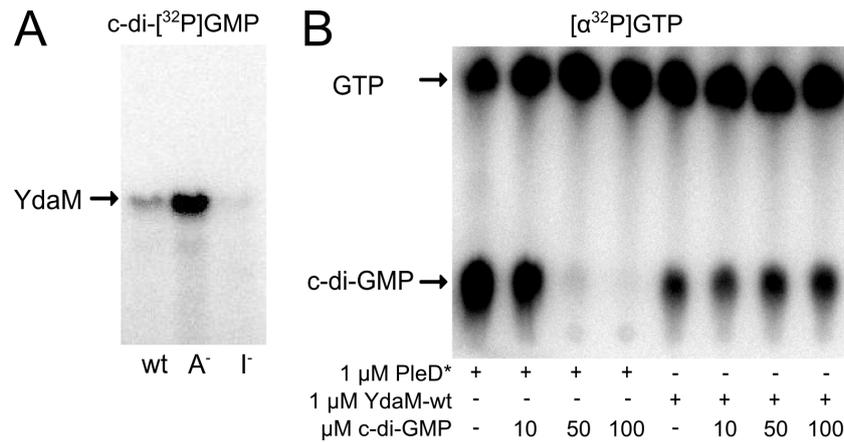


Abb. 4.14: Die Enzymaktivität von YdaM zeigt keine Produktfeedbackinhibition. A. UV-crosslinking mit c-di-[³²P]GMP zur Detektion einer c-di-GMP-Bindestelle von YdaM. 1 μg Protein von YdaM-wt, YdaM-A⁻ und YdaM-I⁻ wurden mit etwa 8 nM c-di-[³²P]GMP (6000 Ci/mmol) für 10 min bei 30°C inkubiert und durch UV-Licht quervernetzt. Die Detektion erfolgte durch SDS-PAGE und Phosphoimaging. B. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays von 1 μM gereinigtem YdaM-wt bzw. PleD* mit 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ([³²P]GTP; 3000 Ci/mmol) unter steigender Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP mit Inkubation für 1 h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

4.4.3 YciR reguliert die Enzymaktivität von YdaM

Da YdaM keine Regulation durch sein Syntheseprodukt zeigte, war nun die Frage, ob möglicherweise die zuvor beobachtete Protein-Protein-Interaktionen mit MlrA oder YciR (siehe Kapitel 4.2) eine Rolle für die DGC-Aktivität von YdaM spielen.

Dazu wurde zunächst in einem Diguanylatzyklase-Assay mit YdaM eine äquivalente Menge von MlrA hinzugegeben und die Synthetisierung von c-di-GMP durch YdaM untersucht.

In Abb. 4.15 ist eindeutig erkennbar, dass die c-di-GMP Synthese durch YdaM unbeeinflusst durch die Anwesenheit von MlrA sowie durch die zusätzliche Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP war. Das bedeutet, dass die Protein-Protein-Interaktion von YdaM mit MlrA keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von YdaM hat.

Nun sollte als letzte Möglichkeit die Regulation von YdaM durch YciR untersucht werden. YciR baut zwar als PDE c-di-GMP ab [Weber *et al.*, 2006], jedoch muss die detektierte Protein-Protein-Interaktion mit YdaM auch eine Rolle für die Curli-Expression spielen.

Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von YciR zu dem Enzymassay von YdaM hinzugegeben. Natürlich musste hier die Problematik beachtet werden, dass YciR vermutlich YdaM-generiertes c-di-GMP gleich wieder abbaut. Daher wurde in vielen Variationen ausgetestet, welches Verhältnis der beiden Proteine Aufschluss über eine

mögliche Regulation geben kann.

Und es wurde deutlich, dass bereits mit Zugabe substöchiometrischer Mengen von YciR die c-di-GMP-Synthese von YdaM abnahm (Abb. 4.16A). Vielmehr zeigte sich, dass eine steigende Konzentration von YciR eine Verringerung von c-di-GMP und pGpG, dem Abbauprodukt von c-di-GMP, bewirkte. Das weist auf eine insgesamt niedrigere Entstehung von c-di-GMP hin, da mit erhöhter YciR-Menge eigentlich mehr Abbauprodukt (pGpG) zu erwarten war. Außerdem war in den Proben ohne YdaM mit steigender Menge von YciR-wt genauso ein Signal auf der Höhe von pGpG zu detektieren, wodurch die Entstehung von pGpG hier nicht unbedingt als Abbau von YdaM-generiertem c-di-GMP anzusehen wäre. Diese Beobachtung soll aber später genauer untersucht werden (siehe Kapitel 4.5.2). Insgesamt ließ sich aber feststellen, dass YdaM durch die Zugabe von YciR daran gehindert wurde, c-di-GMP zu synthetisieren, das möglicherweise durch eine Hemmung über die detektierte Protein-Protein-Interaktion erklärbar wäre.

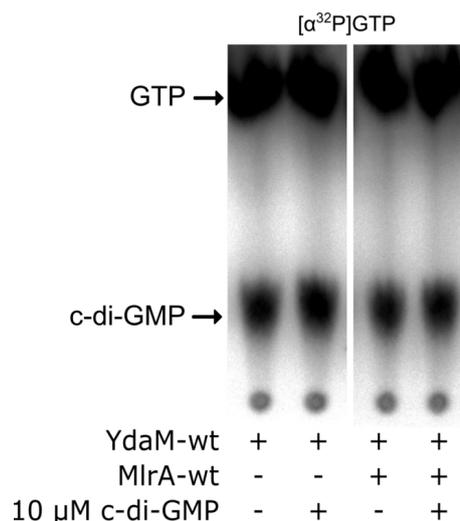


Abb. 4.15: Einfluss von MlrA auf die Enzymaktivität von YdaM. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays von 1 μM gereinigtem YdaM-wt mit 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) unter Anwesenheit von 1 μM MlrA sowie unter Zugabe von 10 μM nicht-radioaktivem c-di-GMP mit Inkubation für 1 h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

Um diesen inhibitorischen Effekt von YciR weiter zu untersuchen, wurde zum Vergleich gereinigtes YciR-AAL zu dem Assay hinzugefügt, das durch dessen mutiertes EAL-Motiv nicht mehr in der Lage ist, effektiv c-di-GMP abzubauen (siehe Kapitel 4.5.1). Hier zeigte sich, dass mit steigender Konzentration von YciR-AAL auch eine Abnahme der c-di-GMP-Synthese durch YdaM bewirkt wurde (Abb. 4.16B). Dieser Effekt war vergleichsweise nicht so stark wie der durch den Wildtyp. Diese Differenz könnte aber

dadurch zu erklären sein, dass YciR-AAL nicht als Nebenaktivität auch noch c-di-GMP abbaute. Insgesamt wurde jedoch deutlich, dass auch YciR-AAL in stöchiometrischen Verhältnissen die Synthese von c-di-GMP durch YdaM verhindern konnte, d.h. YdaM durch Protein-Protein-Interaktion inhibierte.

Ein weiterer Effekt, der in Abb. 4.16A+B auffiel, ist, dass mit erhöhter Zugabe von YciR zum DGC-Assay eine vermehrte Anhäufung eines Nebenprodukts erschien, das aufgrund der Laufhöhe und radioaktiven ^{32}P -Markierung an der α -Phosphat-Position nur auf Phosphatreste schließen ließ. Dieser Effekt soll ebenfalls im späteren Verlauf weiter untersucht werden (siehe Kapitel 4.5.3).

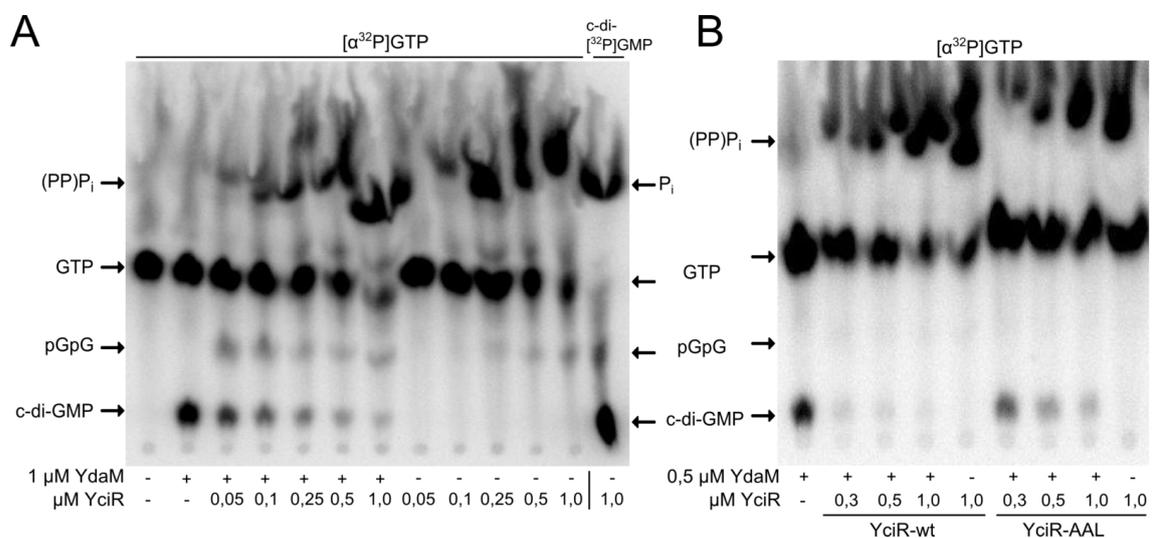


Abb. 4.16: YciR inhibiert die c-di-GMP Synthese von YdaM. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays (A) von 1 µM gereinigtem YdaM-wt mit 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) unter steigender Zugabe von YciR-wt (Kontrolle: ohne YdaM-wt); (B) von 0,5 µM gereinigtem YdaM-wt mit 21 nM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (3000 Ci/mmol) unter steigender Zugabe von YciR-wt und YciR-AAL. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Protein-Protein-Interaktion mit MlrA keine Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität von YdaM zeigte. Die Phosphodiesterase YciR hingegen, konnte auch unabhängig von seiner c-di-GMP abbauenden Wirkung die c-di-GMP Synthese durch YdaM hemmen und reguliert somit YdaM wahrscheinlich über Protein-Protein-Interaktion.

4.4.4 YdaM-generiertes c-di-GMP ist nicht essentiell für die Curli-Expression

Da YdaM essentiell für die Curli-Synthese ist [Weber *et al.*, 2006] und, wie bereits zuvor gezeigt, auch eine aktive Diguanylatzyklase ist, stellte sich natürlich die Frage der

Notwendigkeit von YdaM-generiertem c-di-GMP, da auch beobachtet wurde, dass der direkte Interaktionspartner MlrA kein c-di-GMP-bindendes Protein ist.

Dazu wurden die zuvor erwähnten chromosomalen Mutationen der YdaM-A-site und -I-site von *E. coli* hinsichtlich der *csgB::lacZ*-Expression verglichen. Zusätzlich sollte die Abwesenheit von YciR Rückschlüsse ermöglichen, ob ggf. YdaM-generiertes c-di-GMP teilweise zum zellulären c-di-GMP-Spiegel beiträgt und damit über ein positives Feedback verstärkend wirkt.

Wie zuvor gezeigt wurde, kann YdaM-A⁻ kein c-di-GMP mehr synthetisieren (Abb. 4.11) und bei chromosomaler Expression zeigte sich interessanterweise gegenüber dem Wildtyp-Allel nur eine um etwa die Hälfte reduzierte Expression von *csgB* (Abb. 4.17A). Hingegen war für YdaM-I⁻, eine noch weiter reduzierte *csgB::lacZ*-Expression (mit einem Drittel des Wildtyps) erkennbar, obwohl dieses YdaM-Derivat noch in der Lage ist c-di-GMP zu synthetisieren. Das bedeutet zum einen, dass die Synthese von c-di-GMP durch YdaM nicht essentiell, sondern vielmehr stimulierend auf die Curli-Synthese wirkt. Daher lässt sich vermuten, dass neben der Anwesenheit von YdaM auch dessen c-di-GMP-synthetisierende Konformation bei der Aktivierung von MlrA eine wichtige Rolle spielt. Da die Expression von YdaM-I⁻ aber nicht das Wildtypniveau von *csgB* erreichen kann, deutet dies noch mehr daraufhin, dass das produzierte c-di-GMP nicht die Hauptrolle spielt. Es scheint somit, dass die Konformation von YdaM-I⁻ MlrA nicht mehr effektiv aktivieren kann.

Im weiteren Verlauf konnte außerdem in Abwesenheit von YciR beobachtet werden, dass YdaM-A⁻ gegenüber YdaM-wt die Curli-Expression nur leicht nach 12 h verringert (Abb. 4.17B). Da YdaM vermutlich keinen bedeutenden Einfluss auf den zellulären c-di-GMP-Spiegel nimmt und durch die Abwesenheit von YciR dieses Modul nicht mehr sensitiv für c-di-GMP ist, kann dieser kleine Effekt hier nur bedeuten, dass die vorliegende Konformation von YdaM-A⁻ für diese Verringerung verantwortlich ist. Jedoch weist der sonstige Verlauf der *csgB::lacZ*-Expression darauf hin, dass YdaM-generiertes c-di-GMP YciR antagonisiert und somit seine eigene aktivierende Rolle positiv unterstützt.

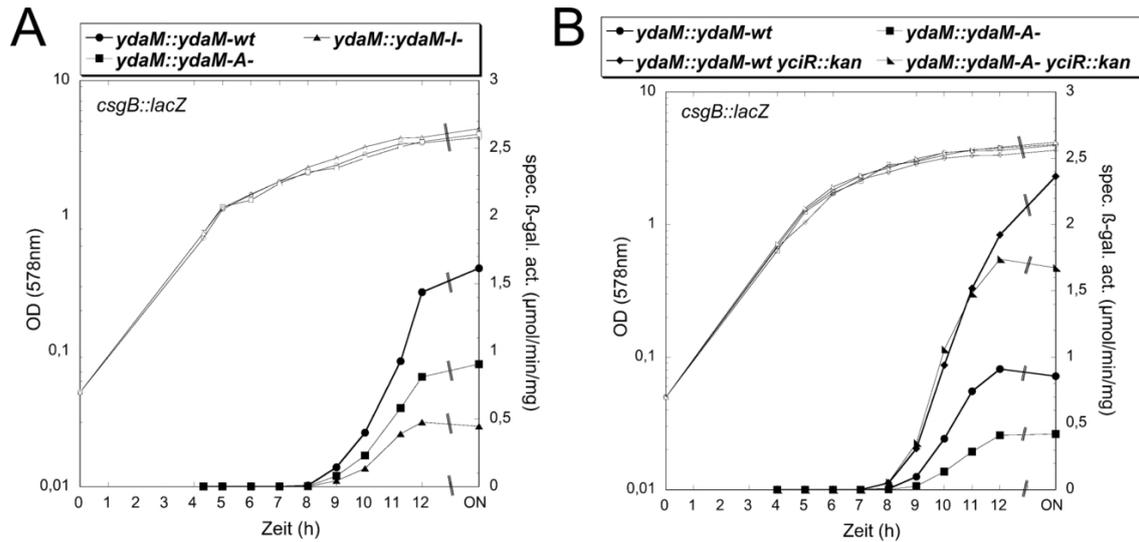


Abb. 4.17: YdaM-generiertes c-di-GMP ist nicht essentiell für die Curli-Expression. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion im Stamm *E. coli* K-12 W3110 mit (A) chromosomaler Expression von *ydaM*-wt (*ydaM::ydaM-wt*), *ydaM*-A⁻ (*ydaM::ydaM-A-*) und *ydaM*-I⁻ (*ydaM::ydaM-I-*); (B) chromosomaler Expression von *ydaM*-wt (*ydaM::ydaM-wt*) und *ydaM*-A⁻ (*ydaM::ydaM-A-*) in Abhängigkeit von einer *yciR*-Mutation (*yciR::kan*). Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der Expression erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) bis zu einer Übernachtprobe (ON).

Insgesamt zeigt sich durch diese Daten, dass die c-di-GMP Synthese durch YdaM für die Curli-Expression nicht essentiell notwendig ist und nur stimulierend wirkt. Das lässt vermuten, dass der Kontakt durch die Protein-Protein-Interaktion zwischen YdaM und MlrA allein schon aktivierend auf *csgD* wirkt und zusätzlich durch die Konformation von c-di-GMP-generierendes YdaM stimuliert wird. Dazu wirkt die Diguanylatzyklase-Aktivität von YdaM vermutlich durch ein positives Feedback verstärkend in der Antagonisierung von YciR.

4.5 Charakterisierung und Funktion von YciR

Der Einfluss von YciR wurde als hochspezifisch für die *csgD*-Transkription beschrieben [Weber *et al.*, 2006] und die beobachteten Protein-Protein-Interaktionen von YciR mit MlrA und YdaM befürworten die Hypothese einer lokalen Regulation. Zusammen mit vorherigen Studien zeichnete sich in dieser Arbeit ab, dass YciR ein Inhibitor der CsgD-Expression ist [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006], der die Rolle eines Verbindungsglieds zwischen zwei GGDEF/EAL-Modulen einnimmt und dabei durch zelluläres c-di-GMP reguliert wird.

Wie zuvor beschrieben, ist YciR ein zusammengesetztes GGDEF-EAL-Domänen-Protein

(Abb. 4.1), bei dem beide Domänen konserviert sind und eine PDE-Aktivität nachweisbar ist [Weber *et al.*, 2006]. Die Funktion der GGDEF-Domäne konnte bisher nicht geklärt werden. Jedoch ist bekannt, dass bei solchen zusammengesetzten Proteine die GGDEF-Domäne die Enzymaktivität der EAL-Domäne reguliert [Christen *et al.*, 2005; Kazmierczak *et al.*, 2006].

Im Folgenden sollte nun näher untersucht werden, wie der Mechanismus von YciR als Inhibitor der Curli-Expression und als Sensor von zellulärem c-di-GMP erfolgt. Es war die Frage, ob die PDE-Aktivität durch die GGDEF-Domäne reguliert wird bzw. welche Funktion die YciR-GGDEF-Domäne einnehmen könnte.

4.5.1 YciR ist eine aktive 3'-Phosphodiesterase

Phosphodiesterasen (PDE) sind in der Lage an der 3'-Position des zyklischem di-GMP (c-di-GMP) das Phosphat von der Ribose zu spalten, so dass die lineare pGpG-Verbindung als Zwischenprodukt sowie GMP als Endprodukt entsteht [Schirmer & Jenal, 2009]. Aufgrund dieses Mechanismus kann diese Aktivität auch als 3'-Phosphodiesteraseaktivität beschrieben werden.

Für YciR sollte zunächst untersucht werden, ob die konservierten Aminosäuremotive einen Einfluss auf die 3'-PDE-Aktivität haben. Dazu wurde der sog. Phosphodiesterase-Assay durchgeführt, bei dem YciR mit radioaktiv-markiertem c-di-GMP (c-di-[³²P]GMP) inkubiert wurde und die umgesetzten Verbindungen (wie beim DGC-Assay) über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und analysiert wurden.

Zur Analyse wurden hier YciR-wt sowie seine Derivate, die Punktmutationen für das GGDEF-Motiv (YciR-GGAAF oder YciR-GG; Austausch von D316 und E317 zu Alanin) und für das EAL-Motiv (YciR-AAL; Austausch von E440 zu Alanin) trugen, verwendet. Die Glutaminsäure (E) des EAL-Motivs ist zur Bindung von Magnesiumionen zuständig, das wiederum notwendig ist für die Hydrolyse von c-di-GMP [Rao *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2005; Tamayo *et al.*, 2005]. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass bei Mutation des EAL-Motivs zu AAL der Abbau von c-di-GMP verhindert wird [Pesavento *et al.*, 2008; Tamayo *et al.*, 2005].

Hier war jedoch für die Umsetzung von c-di-[³²P]GMP erkennbar, dass YciR-AAL noch eine geringe PDE-Aktivität hatte (Abb. 4.18A). YciR-GGAAF hingegen verhielt sich wie der Wildtyp bzw. es fiel sogar häufiger auf, dass diese Version noch eine verstärkte

Enzymaktivität hatte.

Für diesen Versuch wurde noch eine erweiterte GGDEF-Mutante von YciR (YciR-G/R) verwendet, die statt dem GGDEF-Motiv ein AAAAF-Motiv besitzt sowie eine weitere Mutation im Arginin248 kodiert, das die GTP-Bindung stabilisieren soll [Chan *et al.*, 2004] (siehe auch Kapitel 4.5.2). Diese Aminosäuren wurden mutiert, um eine mögliche Bindung von GTP zu verhindern.

Im PDE-Assay zeigte sich nun, dass YciR-G/R noch effektiv c-di-GMP abbaut, jedoch der Abbau leicht verringert gegenüber dem YciR-wt war. Da dieser Effekt nicht signifikant war, kann insgesamt geschlussfolgert werden, dass das GGDEF-Motiv keinen Einfluss auf die PDE-Aktivität hatte.

Außerdem wurde hier weiter getestet, ob YciR in seiner Enzymaktivität durch die Protein-Protein-Interaktion mit YdaM regulierbar ist. Es zeigte sich bei Anwesenheit von YdaM, dass der Abbau von c-di-GMP durch YciR sich nicht veränderte (Abb. 4.18A). Das bedeutet, dass die Protein-Protein-Interaktion von YciR und YdaM zwar die Enzymaktivität von YdaM beeinflusst, jedoch nicht die von YciR.

Die c-di-GMP-Bindefähigkeit von YciR wurde durch UV-crosslinking Versuche näher untersucht. Hier wurde zunächst zu den Ansätzen mit YciR und c-di-[³²P]GMP nicht-radioaktives c-di-GMP in steigenden Mengen hinzugegeben, um eine steigende Konkurrenz zu bewirken. Es konnte hier detektiert werden, dass bereits bei 1 μ M nicht-radioaktivem c-di-GMP die Bandenintensität von YciR-wt um mehr als die Hälfte abnahm (Abb. 4.18B). Das heißt, dass die Dissoziationskonstante K_D (c-di-GMP) für YciR schätzungsweise unter 1 μ M liegt, was den physiologischen Bedingungen für c-di-GMP in der Zelle entspricht [Hengge, 2009a]. Die Affinität für c-di-GMP von YciR scheint auch höher zu sein als die von YdaM, da in vorherigen UV-crosslinking Versuchen (siehe Abb. 4.9D+F) erkennbar wurde, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von YciR und YdaM das radioaktive c-di-GMP eher an YciR bindet als an YdaM, wodurch das Signal für YdaM verschwand oder stark abgeschwächt wurde. Auch diese Beobachtung entspricht physiologischen Vorgängen [Hengge, 2009a].

Um nun auch einen Vergleich der Bindefähigkeit von c-di-GMP durch die YciR-Derivate (GGAAF, G/R, AAL, GGAAF/AAL) zu haben, wurden diese auch in einem UV-crosslinking Versuch getestet. Es zeigte sich hier, dass YciR-AAL nur noch eine schwache Bindung

von c-di-GMP hatte (Abb. 4.18C). Da YciR auch keine I-site in seiner GGDEF-Domäne besitzt, ist es wahrscheinlich, dass c-di-GMP auch nur über die EAL-Domäne gebunden wird. Und es lässt sich damit die vorhergehende Beobachtung erklären, dass YciR-AAL durch seine abgeschwächte Bindefähigkeit eine geringe PDE-Aktivität hat. Hingegen schien YciR-GGAAF eine verstärkte Bindung zu c-di-GMP zu haben, das zu der Beobachtung einer verstärkten Enzymaktivität passen würde (Abb. 4.18A). Aber wiederum passt dieses Ergebnis nicht für YciR-G/R, wo zwar eine verstärkte Bindung von c-di-GMP detektierbar war (Abb. 4.18B), aber auch eine leicht verringerte Enzymaktivität (Abb. 4.18A). Ob diese Beobachtung so reproduzierbar ist und miteinander zusammenhängt, müsste in weitergehenden Studien geklärt werden.

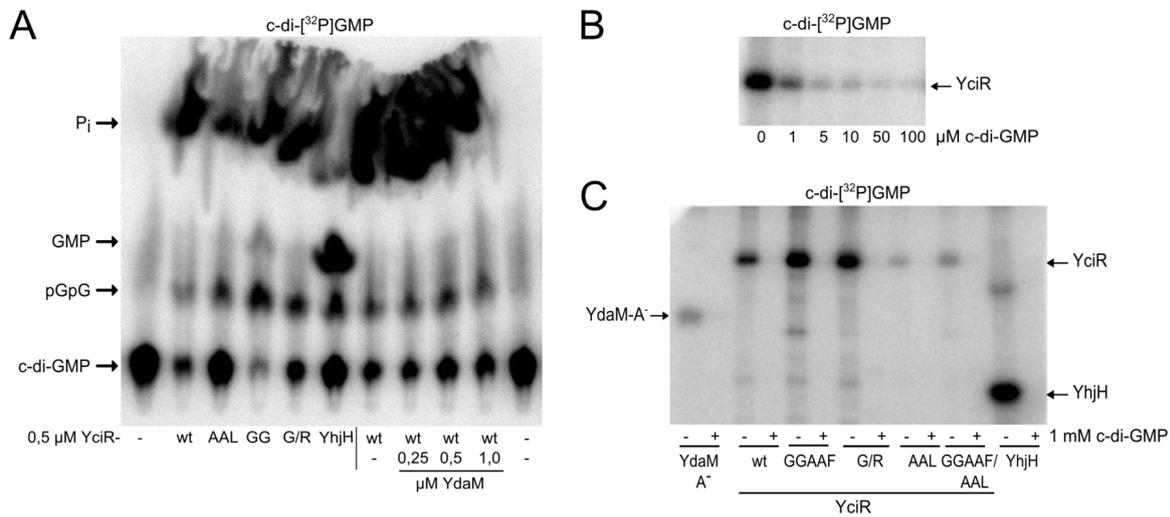


Abb. 4.18: C-di-GMP-Bindung und Phosphodiesteraseaktivität von YciR und seinen Derivaten. A. Dünnschichtchromatographie eines Phosphodiesterase-Assays von 0,5 μM gereinigtem YciR (wt, AAL, GG(AAF), G/R; Erklärung siehe Text) mit 2,1 nM c-di-[^{32}P]GMP (6000 Ci/mmol) und unter Zugabe steigender Mengen von YdaM-wt (Menge wie gekennzeichnet). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 30°C. Als Kontrolle wurde die PDE YhjH verwendet. B+C. UV-crosslinking zur Detektion der c-di-GMP Bindung von YciR unter Verwendung von 0,5 μM Protein und 42 nM c-di-[^{32}P]GMP (6000 Ci/mmol) B. unter steigender Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP (Konzentration wie angegeben), C. unter zusätzlicher Verwendung der YciR-Derivate (GGAAF, G/R, AAL, GGAAF/AAL) und Konkurrenz mit 1 mM nicht-radioaktivem c-di-GMP. Die Quervernetzung durch UV-Licht erfolgte nach Inkubation für 10 min bei 30°C. Als Kontrollansatz diente 1,7 μM YhjH-Protein. Die Detektion erfolgte für alle Versuche durch Phosphoimaging.

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass YciR eine effektive 3'-Phosphodiesterase-Aktivität unter physiologischen Bedingungen hat. Ob diese Aktivität durch die GGDEF-Domäne moduliert werden kann, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die verminderte Bindung von c-di-GMP durch eine Mutation im EAL-Motiv resultierte in einer stark abgeschwächten PDE-Aktivität.

4.5.2 Besitzt YciR Diguanylatzyklase-Aktivität?

Wie bei vielen anderen zusammengesetzten GGDEF-EAL-Proteinen ist natürlich die Frage bei dieser konservierten GGDEF-Domäne, ob nicht eine Restaktivität als Diguanylatzyklase zu finden ist. Im Sequenzvergleich dieser Domäne mit anderen GGDEF-Domänen-Proteinen wie PleD, YdaM und YegE, wurde deutlich, dass alle Aminosäuren, die zur Bindung von GTP und Katalyse von c-di-GMP notwendig sind [Chan *et al.*, 2004; Schirmer & Jenal, 2009], bei YciR vorhanden sind (Abb. 4.19A). Nur die I-site (RxxD-Motiv) fehlt hier und diese kommt bekanntlich auch nicht bei allen DGC vor [Schirmer & Jenal, 2009]. Das heißt, der Sequenz nach wäre eine DGC-Aktivität zu vermuten.

Zu Beginn sollte erst einmal getestet werden, ob YciR die Fähigkeit hat GTP zu binden. Das wurde wieder mithilfe eines UV-crosslinking Versuches mit radioaktiv markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$) durchgeführt. Durch Zugabe von nicht-radioaktivem GTP sollte diese Bindung kompetitiv verdrängt werden.

Dabei zeigte sich in Abb. 4.19B, dass YciR $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bindet und diese Bindung bereits durch Zugabe von 1 μM nicht-radioaktivem GTP nur noch die etwa halbe Intensität hatte. Das bedeutet, dass YciR nicht nur spezifisch, sondern auch in niedrigen Micromolarbereich GTP und somit unter physiologischen Bedingungen der Zelle bindet (die GTP-Konzentration in *E. coli* ist im Millimolarbereich [Buckstein *et al.*, 2008]).

Zur weiteren Untersuchung der GTP-Bindestelle von YciR wurden nun die punktmutierten Derivate getestet (Abb. 4.19C). Dabei zeigte sich für YciR-GGAAF eine schwache GTP-Bindung, die bei YciR-G/R mit kompletter Mutation des GGDEF-Motivs zu AAAAF (mit einer weiteren Mutation für Arginin248) verschwindet. Somit ist eindeutig, dass das GGDEF-Motiv verantwortlich für die GTP-Bindung ist. Auch wenn hier ein schwächeres Signal für YciR-AAL zur GTP-Bindung detektierbar war, war diese Beobachtung nicht reproduzierbar.

Nachdem deutlich war, dass YciR GTP bindet, sollte getestet werden, ob eine Diguanylatzyklase-Aktivität detektierbar ist. Dazu sollte ein DGC-Assay von YciR und seinen punktmutierten Derivaten mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ Aufschluss darüber geben. Wie in Abb. 4.19D erkennbar ist, war generell kein c-di-GMP Signal detektierbar. Es zeigte sich jedoch bei einigen YciR-Proben auf Höhe des linearen Abbauprodukts pGpG (Vgl. Abb. 4.16A und 4.19D) ein schwaches Signal, das möglicherweise durch einen schnellen Abbau direkt aus

synthetisiertem c-di-GMP entstand. Im Vergleich der YciR-Derivate wird jedoch deutlich, dass hier kein Zusammenhang mit dem GGDEF-Motiv gezogen werden kann, da selbst bei YciR-G/R dieses Signal detektierbar war, obwohl nachweislich dieses Derivat keine GTP-Bindung mehr eingehen konnte.

A

PleD	YLRNNLDHSLELAVT-DQLTGLHNRRYMTGQLDSLVRKATLGGDPVSALLIDIDFFKKIN	335
YdaM	QKR--LEEQLHAHHDAMTGLLNRRQFYHITEPGMQHLAIAQDYSLLIIDTDRFKHIN	299
YegE	SRK--MLRQLSYSASHDALTHLANRASFEKQLRILLQTVNSTHQRHALVFIDLDRFKAVN	728
YciR	ERR--AQERLRILANTDSITGLPNRRNAMQDLIDHAINHADN--NKVGVVYLDLNFKKVN	281

|
248

PleD	DTFGHDIGDEVLREFALRLASNVRVIDLPCRYGGEEFVVIIMPDTALADALRIAERIRMHV	395
YdaM	DLYGHSGKDEVLCALARTLESCARKGDLVFRWGGEEFVLLLPRTPLDTALSLAETIRVSV	359
YegE	DSAGHAAGDALLRELASLMLSLRSDVLRARLGGDEFGLLLPDCNVESARFIATRIISAV	788
YciR	DAYGHLFGDQLLRDVSLAILSLEHDQVLARPGGDEFVLVASNTSQSALEAMASRILTRL	341

|
314

PleD	SGSPFTVAHGREMLNVTISIGVSATAGEGDTPEALLKRADEGVYQAKASGRNAVVGKAA-	454
YdaM	AKVSISGLP-----RFTVSIQVAHHEGN-ESIDELFKRVDDALYRAKNDGRNRVLA---	410
YegE	NDYHFIWEG--RVHRVGASAGITLIDNNHQAAEVMSQADIACYASKNGGRGRVTVYEPQ	846
YciR	R---LPFRIGLIEVYTSCSVGIALSPEHGSSTAIIRHADTAMYTAKEGGRGQFCVFTPE	398

■ GTP Bindung ■ c-di-GMP Katalyse ■ c-di-GMP Bindung

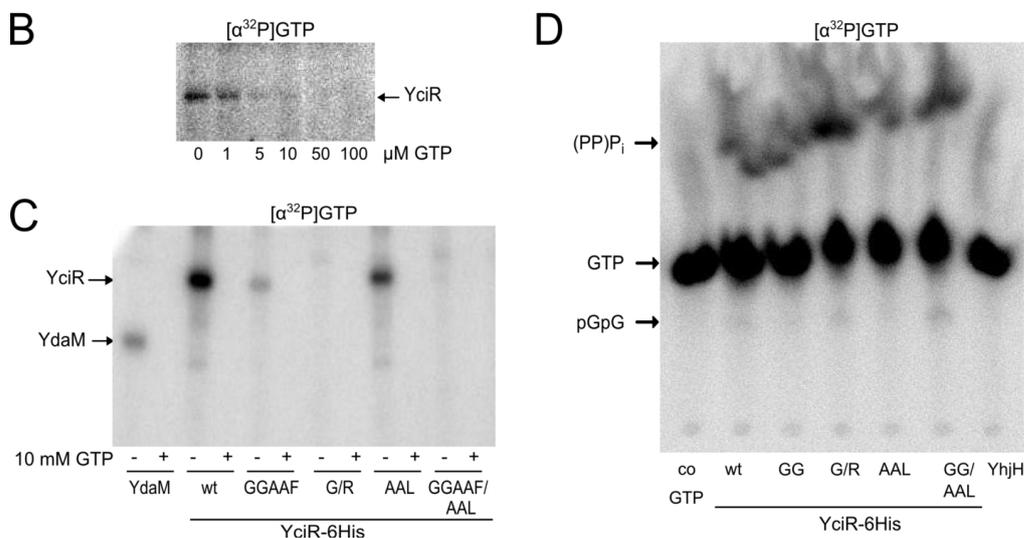


Abb. 4.19: Studien zur Diguanylatzyklase-Aktivität von YciR. A. Sequenzvergleich der GGDEF-Domäne von YciR mit YdaM und YegE aus *E. coli* K-12 und PleD aus *Caulobacter crescentus*. Die konservierten Aminosäuren für die GTP-Bindung und c-di-GMP-Katalyse nach Chan *et al.* und Schirmer & Jenal sind farbig dargestellt und entsprechend gekennzeichnet [Chan *et al.*, 2004; Schirmer & Jenal, 2009]. Das RxxD-Motiv der I-site ist grau unterlegt. Die Positionen der für die Punktmutationen relevanten Aminosäuren in YciR sind gekennzeichnet (R248, GGDEF). B. UV-crosslinking zur Detektion der Bindung von GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$) an YciR-wt unter steigender Zugabe von nicht-radioaktiv markiertem GTP als Kompetitor, C. Detektion der Bindung von $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ an YciR-wt und seinen punktmutierten Derivaten ((GG)AAF, G/R, AAL, GGAAF/AAL; detaillierte Beschreibung siehe Text) unter Zugabe von 10 mM nicht-radioaktivem GTP als Kontrolle. D. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays mit 1 μM YciR-wt und 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) nach Inkubation für 1 h bei 30°C. Als Kontrolle diente $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ inkubiert mit YhjH (1 μM) sowie ohne Protein. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

Insgesamt ist dieser Versuch nicht eindeutig und zeigte häufig unterschiedliche Ergebnisse. Dazu war hier außerdem das Alter der Proteinproben sehr kritisch. Betrachtet man zusammen die Abb. 4.16A und Abb. 4.19D kann man zumindest auf ein Signal von pGpG schließen, jedoch kann kein Zusammenhang mit der GGDEF-Domäne von YciR gefolgert werden.

Eine rudimentäre DGC-Aktivität kann aber nicht ausgeschlossen werden und diese wäre auch sehr gering und nicht relevant für physiologische Vorgänge. Das heißt, es lässt sich zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über eine DGC-Aktivität von YciR treffen, daher könnte dies Bestandteil für weitere Untersuchungen sein.

Zusammenfassend lässt sich hier schlussfolgern, dass YciR möglicherweise eine Restaktivität als Diguanylatzyklase hat, diese konnte hier aber nicht abschließend nachgewiesen werden. Grundsätzlich hätte YciR mit seiner konservierten Domäne und der nachweisbaren GTP-Bindung alle Voraussetzungen um c-di-GMP zu synthetisieren. Dass teilweise ein Nebenprodukt auf der Größe des Abbauprodukts pGpG entsteht, könnte zwar ein Hinweis auf eine solche Aktivität sein, jedoch konnte dies nicht in Verbindung mit einer GGDEF-abhängigen Diguanylatzyklase-Aktivität gebracht werden. Möglicherweise können zukünftige Studien Aufschluss darüber geben.

4.5.3 Besitzt YciR eine 5'-Phosphodiesterase-Aktivität?

Was interessanterweise in diversen Versuchsansätzen wie in Abb. 4.18A auffiel, war, dass für alle YciR-Derivate im PDE-Assay ein Nebenprodukt im oberen Bereich der Dünnschichtplatte erschien. Aufgrund der Laufweite und der Position des radioaktiv markierten Isotops (c-di-[³²P]GMP), schien der Abbau von c-di-GMP über pGpG und GMP bis hin zum Phosphat erfolgt zu sein. Dabei zeigte sich für die Reaktion mit YciR-Wildtyp nur eine schwache Akkumulation für pGpG und GMP und ein starkes Signal für Phosphat.

Im Vergleich der YciR-Derivate untereinander, war erkennbar, dass dabei die geringste Menge an Phosphat durch YciR-AAL entstanden ist. Das zeigte, dass Phosphat ein Folgeprodukt aus dem Abbau zu pGpG und GMP ist, der durch die AAL-Mutation verringert war. Da jedoch für die GGDEF-mutierten Derivate von YciR (YciR-GGAAF und YciR-G/R) keine Verminderung in der Phosphatmenge detektierbar war, lässt sich hier auch vermuten, dass das GGDEF-Motiv von YciR nicht für diesen Abbau verantwortlich war.

Im Gegenzug zeigte die Phosphodiesterase YhjH deutlich ein Signal für pGpG und eine starke Anhäufung von GMP ohne dass ein weiterer Abbau von GMP erkennbar war (Abb. 4.18A). Das weist darauf hin, dass dies keine generelle Aktivität von Phosphodiesterasen ist. Da bisher eine solche Aktivität auch nicht beschrieben wurde, könnte das bedeuten, dass YciR im Vergleich zu der 'gewöhnlichen' 3'-Phosphodiesterase YhjH möglicherweise eine unorthodoxe, erweiterte 5'-Phosphodiesterase-Aktivität besitzt, die auch an der 5'-Position Phosphat von der Ribose abspaltet und so Guanosin und Phosphat entstehen ließ.

Nach weiterer Analyse fiel nun auf, dass ähnliche Phosphatprodukte auch im Diguanylatzyklase-Assay von YdaM bei Anwesenheit von YciR detektierbar waren (siehe Abb. 4.16). Hier war nicht eindeutig, ob dieser Abbau über GMP oder auch anwesendem GTP erfolgt. Jedoch kann aus dem zuvor durchgeführten Assay zur DGC-Aktivität von YciR dieser Versuch nun auch zur Untersuchung der Phosphat-Produktentstehung herangezogen werden (Abb. 4.19D). Dabei zeigte sich für alle YciR-Derivate, dass Phosphatreste entstanden, so dass diese Aktivität nicht in Zusammenhang mit dem GGDEF- oder EAL-Motiv von YciR gebracht werden konnte. Jedoch konnte in diversen Assays beobachtet werden, dass GTP abgebaut wurde. Das ist in Abb. 4.20A in den Kontrollspuren für radioaktives GTP deutlich, wo das Signal für GTP durch Zugabe von YciR abnimmt und hingegen eine Zunahme von Phosphatresten detektierbar war. Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch in 4.16A.

Um abzuklären, ob der Abbau von c-di-GMP durch GTP beeinflusst ist, wurde die PDE-Aktivität von YciR unter steigender Zugabe von nicht-radioaktivem GTP analysiert (Abb. 4.20A). Es wurde deutlich, dass in der Probe mit YciR bei Abwesenheit von nicht-radioaktivem GTP das radioaktive c-di-[³²P]GMP bis hin zu Phosphatresten abgebaut wurde. Mit steigender Zugabe von GTP im Ansatz nahm dann das Phosphat-Signal ab und das GMP-Signal nahm zu. Außerdem verstärkte sich das Signal für pGpG ab einer Konzentration von 5 mM GTP im Ansatz und mit 10 mM GTP war sogar die c-di-[³²P]GMP Menge erhöht. Das zeigte, dass das nicht-radioaktive GTP das radioaktive GMP als Substrat verdrängen konnte und in sehr hohen Konzentration auch den Abbau von c-di-GMP hemmte.

Für diesen Versuch können jedoch die hohen GTP-Konzentrationen ab 5 mM vernachlässigt werden, da beobachtet wurde, dass YhjH durch diese hohen GTP-Konzentration auch in seiner PDE-Aktivität gehemmt war, was durch eine verminderte

c-di-GMP-Bindung zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt). Es konnte dafür kein Effekt auf YhjH bei Konzentrationen von 1 mM beobachtet werden, weshalb die vorherige Beobachtung für YciR als mögliche Regulation angenommen werden kann. Das bedeutet nun vielmehr, dass bei den YciR-Proben dieselbe Enzymaktivität GTP wie auch GMP abbaute. Und dies kann nur eine 5'-Phosphodiesterase-Aktivität sein, da aufgrund der ^{32}P -Markierung die Spaltung zwischen dem α -Phosphat und Ribose erfolgte.

Ein letzter Versuch sollte hier aber noch klären, ob die 3'-PDE-Aktivität die 5'-PDE-Aktivität beeinflusst, indem nicht-radioaktives c-di-GMP zu dem DGC-Assay mit YciR hinzugegeben wurde (Abb. 4.20B). Dabei konnte nun festgestellt werden, dass c-di-GMP bis zu hohen Konzentrationen von 1 mM keine Auswirkung auf den Abbau von GTP hatte. Das bedeutet, dass scheinbar beide Phosphodiesterase-Aktivitäten voneinander getrennt sind und sich nicht gegenseitig beeinflussen.

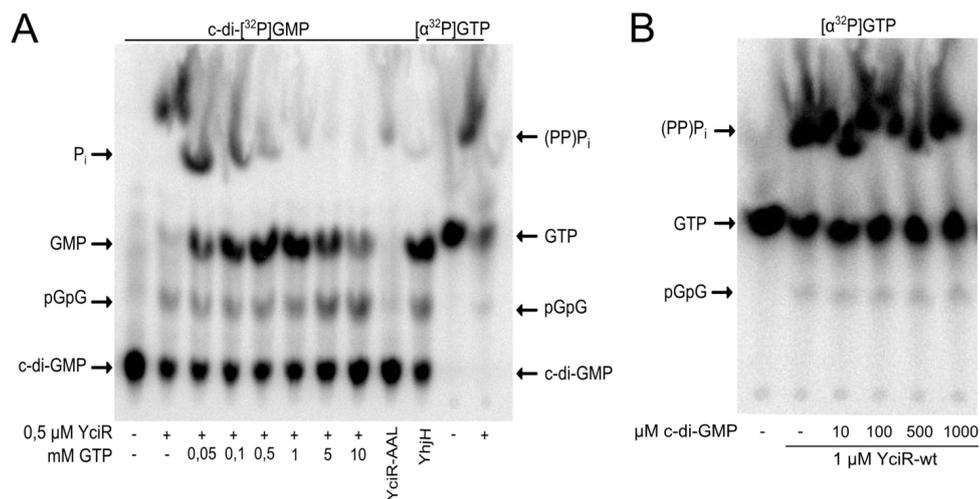


Abb. 4.20: Phosphodiesteraseaktivitäten von YciR in Abhängigkeit von GTP und c-di-GMP. A. Dünnschichtchromatographie eines Phosphodiesterase-Assays mit 1 μM gereinigtem YciR-wt mit 2,1 nM c-di- ^{32}P GMP (6000 Ci/mmol) und unter Zugabe steigender Mengen von nicht-radioaktivem GTP (Menge wie gekennzeichnet). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 30°C. Als Kontrolle wurde die PDE YhjH und das inaktive Derivat YciR-AAL verwendet. Zur Kontrolle des Laufverhaltens wurde radioaktives GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) inkubiert mit YciR-wt (1 μM) sowie ohne Protein aufgetragen. B. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays mit 1 μM YciR-wt mit 42 nM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (3000 Ci/mmol) unter Zugabe steigender Mengen von nicht-radioaktivem c-di-GMP (Menge wie gekennzeichnet). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 30°C. Als Kontrolle diente $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ohne Protein. Für beide Versuche erfolgte die Detektion über Phosphoimaging.

Da diese PDE-Aktivitäten keine Abhängigkeit voneinander zeigten und auch bei der Bindung von GTP in UV-crosslinking Versuchen häufig mehrere Banden erkennbar waren (Abb. 4.9C-E), kann die 5'-PDE-Aktivität möglicherweise auch aus Verunreinigungen der Proteinpräparation entstanden sein. Alternativ könnten natürlich auch Degradationsbanden

von YciR, die durch Massenspektrometrie bereits identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt), bei der GTP-Bindung sichtbar geworden sein (YciR* und YciR** in Abb. 4.9C-E). Insgesamt bleibt jedoch die hier beobachtete 5'-PDE-Aktivität ungeklärt und könnte Ansatz für weitere Untersuchungen sein.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass für YciR-Proben eine 5'-PDE-Aktivität beobachtet wurde, bei der GMP und GTP zu Guanosin und Phosphat abgebaut wurde. Diese Enzymaktivität erfolgte unabhängig von dem Abbau von c-di-GMP (3'-PDE-Aktivität). Ob diese Aktivität von YciR (oder eventuellen Verunreinigungen) ausging, konnte hier nicht nachgewiesen werden und muss in weitergehenden Studien geklärt werden.

4.5.4 YciR wirkt als Inhibitor auf YdaM und MlrA

In einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass vom Plasmid exprimiertes YciR-AAL bei Komplementation einer *yciR*-Mutation immer noch fähig ist, die Curli-Expression zu unterdrücken [Lindenberg, 2008; Pesavento, 2011]. D.h. YciR-AAL konnte unabhängig von seiner PDE-Aktivität die Curli-Synthese inhibieren. In dieser Arbeit konnte weiterhin beobachtet werden, dass YciR, unabhängig von seiner PDE-Aktivität und somit wahrscheinlich durch Protein-Protein-Interaktion, fähig ist, die Enzymaktivität von YdaM zu hemmen (siehe Kapitel 4.4.3).

Jedoch wurde auch deutlich, dass YciR in Abwesenheit von YdaM eine Inhibition der Curli-Expression bewirken konnte (siehe Kapitel 4.1.1), weshalb zu vermuten ist, dass YciR an mehreren Mechanismen zur Inhibition der Curli-Expression beteiligt ist.

Daher sollte zunächst geklärt werden, welche Domänen von YciR bei der Inhibition beteiligt sind, so dass nun trunkeierte YciR-Derivate auf eine *csgB::lacZ*-Expression untersucht wurden. Dabei hatte die Deletion der N-terminalen Domäne kaum Auswirkungen in der Wirkungsweise von YciR (Abb. 4.21A), so dass die N-terminale PAS-Domäne für die Inhibition der Curli-Expression scheinbar nicht notwendig ist. Da diese Domäne aber auch möglicherweise an der Protein-Protein-Interaktion mit MlrA und YdaM teilnimmt (siehe Kapitel 4.2.2), könnte der PAS-Domäne eher eine strukturelle Funktion in der Konformation zukommen.

Mit Deletion der EAL-Domäne hingegen konnte YciR nur noch eine 50 %-ige Inhibition der Curli-Expression erreicht werden, was zeigt, dass neben der EAL-Domäne auch die

GGDEF-Domäne von YciR inhibierend auf die Curli-Expression wirkt. Da beide Domänen womöglich auch an einer Protein-Protein-Interaktion mit YdaM und MlrA beteiligt sind (siehe Kapitel 4.2.2), könnte sich hier diese Beobachtung erklären.

Weiterhin stellte sich natürlich die Frage, ob die Inhibition von MlrA ein weiterer Mechanismus von YciR zur Unterdrückung der Curli-Synthese ist. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass die basale *csgB::lacZ*-Expression (in einer Vierfachmutante von *ydaM/yCiR/yegE/yhjH*) zwar unabhängig von c-di-GMP, aber abhängig von MlrA ist (siehe Kapitel 4.1.2), sollte nun getestet werden, ob YciR-AAL (d.h. YciR unabhängig von seiner PDE-Aktivität) noch einen Einfluss ausüben kann. Und es konnte hier festgestellt werden, dass Plasmid-kodiertes YciR-AAL die Curli-Expression vollständig inhibierte (Abb. 4.21B). Es war hier auch kein Unterschied mehr zwischen dem Wildtyp von YciR und der AAL-Mutante erkennbar, das durch die c-di-GMP-Unabhängigkeit des Systems erklärbar ist. Das deutet darauf hin, dass YciR über seine Protein-Protein-Interaktion MlrA inhibiert.

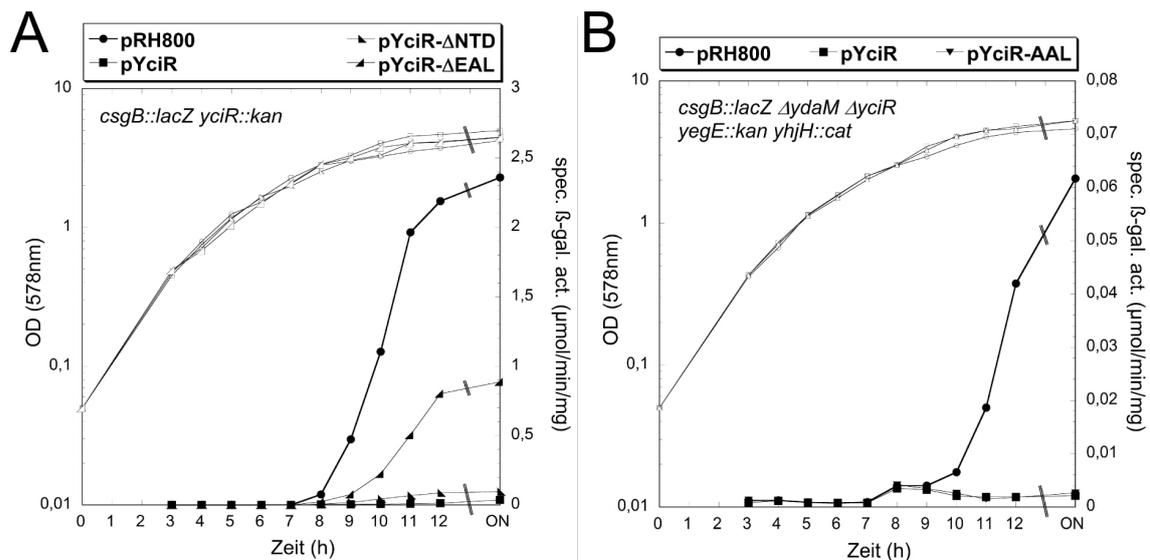


Abb. 4.21: YciR inhibiert über seine GGDEF- und EAL-Domäne die Curli-Expression. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion im Stamm *E. coli* K-12 W3110 mit (A) Expression von Plasmid-kodiertes YciR-wt sowie den Domänen-deletierten Derivaten YciR-ΔNTD und YciR-ΔEAL, (B) Expression von Plasmid-kodiertes YciR-wt und YciR-AAL in einer *ydaM/yCiR/yegE/yhjH*-Vierfachmutante. Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der *csgB::lacZ*-Expression erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β-Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) bis zu einer Übernachtprobe (ON).

Zusammengefasst lässt sich hier sagen, dass YciR wahrscheinlich über seine GGDEF- und EAL-Domäne MlrA und YdaM durch Protein-Protein-Interaktion inhibiert und dadurch die Curli-Synthese unterdrücken kann.

4.5.5 Die EAL-Domäne von YciR ist der Effektor für YegE-generiertes c-di-GMP

Zuvor konnte gezeigt werden, dass YciR eine aktive Phosphodiesterase ist, die durch Protein-Protein-Interaktionen zusätzlich die Rolle eines Inhibitors von YdaM und MlrA einnimmt und so vermutlich die *csgD*-Transkription unterdrückt. Die inhibitorische Funktion muss natürlich überwunden werden können, damit eine Curli-Expression ermöglicht wird. Dass der von YegE-generierte c-di-GMP-Spiegel dieser inhibitorischen Wirkung von YciR entgegenwirken kann, konnte in genetischen Untersuchungen schon ansatzweise beobachtet werden (siehe Kapitel 4.1.1).

Um zu verstehen, wie YciR als Effektor für YegE-kontrolliertes c-di-GMP reguliert wird, wurden die konservierten Motive für YciR im Chromosom mutiert und die Abhängigkeit vom YegE/YhjH-Modul auf eine *csgB::lacZ*-Expression getestet. Dabei waren wie zuvor wurden die Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) des konservierten GGDEF-Motiv zu Alanin (GGDEF zu GGAAF; D316A/E317A) sowie die Glutaminsäure (E) des konservierten EAL-Motivs zu Alanin (EAL zu AAL; E440A) ausgetauscht.

Zunächst konnte für das zurückgekreuzte Wildtyp-Allel von *yciR* (*yciR::yciR-wt*; Abb. 4.22A) kein Unterschied zum Wildtyp-Hintergrund (*ydaM⁺ yciR⁺*; siehe Abb. 4.13A) festgestellt werden, bei dem die Sensitivität gegenüber dem YegE/YhjH-Modul detektierbar war. Dasselbe Ergebnis war auch für das chromosomal exprimierte YciR-GGAAF erkennbar (*yciR::yciR-GGAAF*; Abb. 4.22B) erkennbar.

Interessanterweise zeigte sich jedoch für YciR-AAL eine starke Inhibition der *csgB::lacZ*-Expression, die weder sensitiv für den Einfluss von YegE noch von YhjH war (*yciR::yciR-AAL*; Abb. 4.22C). Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da für die Mutation im EAL-Motiv zu AAL ja ein Verlust der Phosphodiesteraseaktivität beobachtet wurde (siehe Kapitel 4.5.1). Daher wäre durch die fehlende Phosphodiesterase-Aktivität eine Stimulierung der Curli-Expression denkbar gewesen.

Derselbe Effekt wird außerdem für die Doppelmutante von YciR-GGAAF/AAL bestätigt (Abb. 4.22D), wo die Mutation für AAL dominant bleibt und dadurch eine starke Inhibition von *csgB* verursacht, die nicht mehr sensitiv für YegE oder YhjH ist.

Da hier nun eine konstitutive Inhibition der Curli-Expression erkennbar war, die auch nicht mehr durch c-di-GMP regulierbar war, konnte darauf geschlossen werden, dass das EAL-Motiv bzw. die EAL-Domäne von YciR der Sensor für das zelluläre c-di-GMP ist,

das durch YegE generiert wird. Vielmehr wurde auch deutlich, dass die Mutation im EAL-Motiv verhinderte, dass der Inhibition durch YciR entgegengewirkt werden kann, wodurch dieser Effekt konstitutiv wurde. Genauer genommen bedeutet das, dass mit Verlust der 3'-PDE-Aktivität von YciR auch ein Verlust der Wahrnehmung und Regulation durch zelluläres c-di-GMP erfolgte. Das zeigte, dass die c-di-GMP abbauende Rolle von YciR doch eine zentrale Rolle für die Curli-Expression spielt.

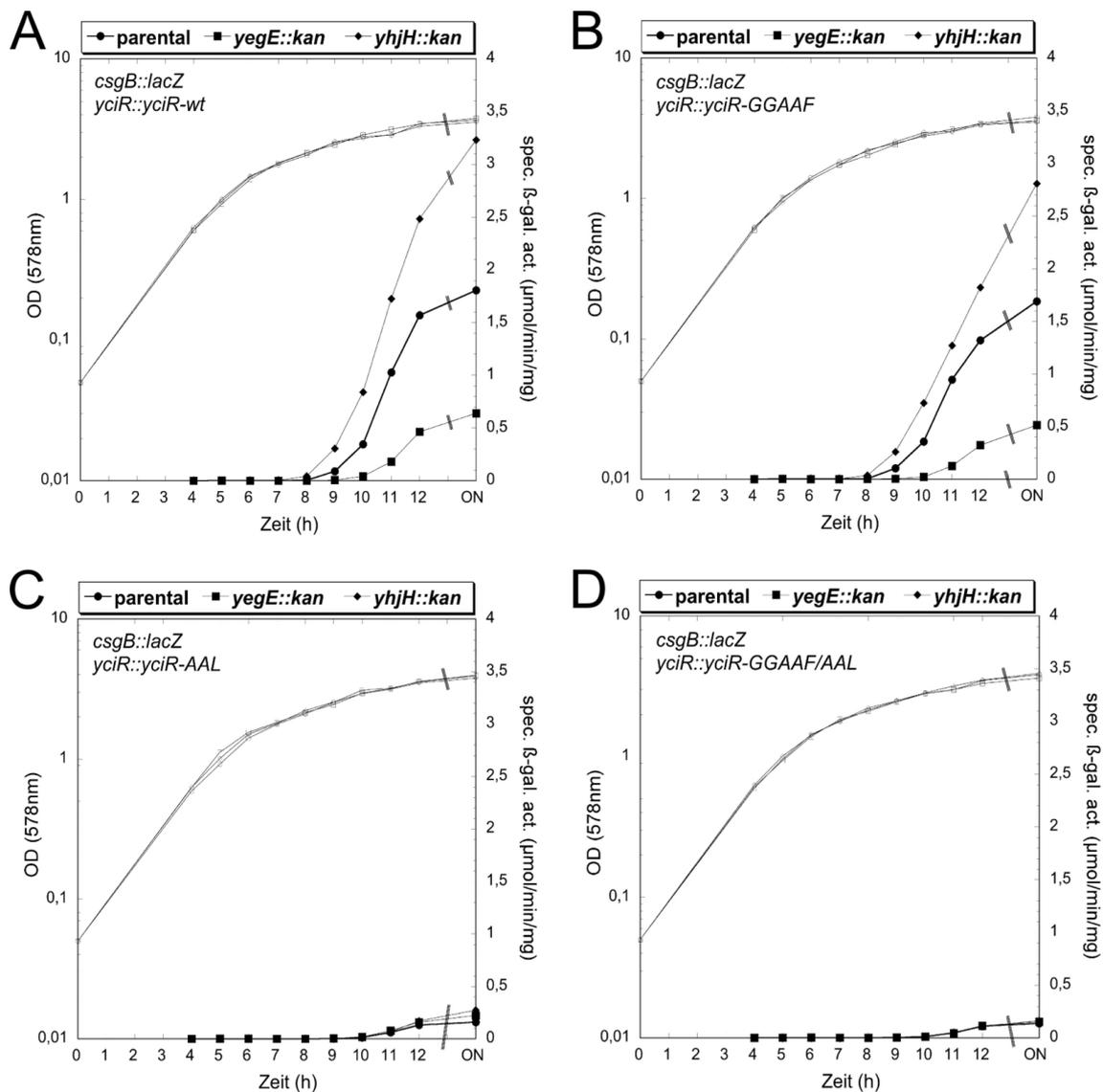


Abb. 4.22: Die EAL-Domäne von YciR wird durch das YegE/YhjH-Modul reguliert. Bestimmung der Curli-Expression mithilfe einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion im Stamm *E. coli* K-12 W3110 mit A. zurückgekreuztem Wildtyp-Allel von *yciR* (*yciR::yciR-wt*), B. dem im GGDEF-Motiv mutierten *yciR*-Allel (*yciR::yciR-GGAAF*), C. dem im EAL-Motiv mutierten *yciR*-Allel (*yciR::yciR-AAL*), D. dem im GGDEF- und EAL-Motiv mutierten *yciR*-Allel (*yciR::yciR-GGAAF/AAL*). Alle Stämme wurden in LB-Medium bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Die Bestimmung der Expression erfolgte entlang der Wachstumskurve (offene Symbole) anhand der β -Galaktosidase-Aktivität (geschlossene Symbole) bis zu einer Übernachtprobe (ON).

Nun sollte noch geklärt werden, ob YciR diesen Mechanismus auch *in vitro* zeigt. Dafür wurde ein Diguanylatzyklase-Assay mit YdaM in Anwesenheit von YciR und nicht-radioaktiven c-di-GMP durchgeführt. Natürlich ist hier wieder problematisch, dass YciR selbst auch c-di-GMP abbaut, wodurch generell schon ein verstärktes Signal von c-di-GMP in Anwesenheit von YciR und nicht-radioaktivem c-di-GMP zu erwarten wäre. Daher wurde hier auch YciR-AAL eingesetzt, das nur in geringem Maß fähig ist, c-di-GMP abzubauen (siehe Kapitel 4.5.1).

Wie in Abb. 4.23A sichtbar ist, konnte erneut beobachtet werden, dass mit steigender Menge an YciR-wt im DGC-Assay mit YdaM eine Abnahme von radioaktivem c-di-GMP (c-di-[³²P]GMP) erfolgte, aber auch eine Abnahme des Degradationsprodukts pGpG zu erkennen war, das, wie zuvor, auf eine Hemmung der DGC-Aktivität von YdaM hinweist (siehe Kapitel 4.4.3). Nun kommt jedoch hinzu, dass durch die Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP dieser Effekt fast vollständig aufgehoben werden konnte, d.h. nur für die höchste YciR-Konzentration im Assay konnte eine geringe Abnahme des c-di-[³²P]GMP-Signals bemerkt werden. Dieses Ergebnis deutet daher auf eine Aufhebung der Inhibition durch YciR hin.

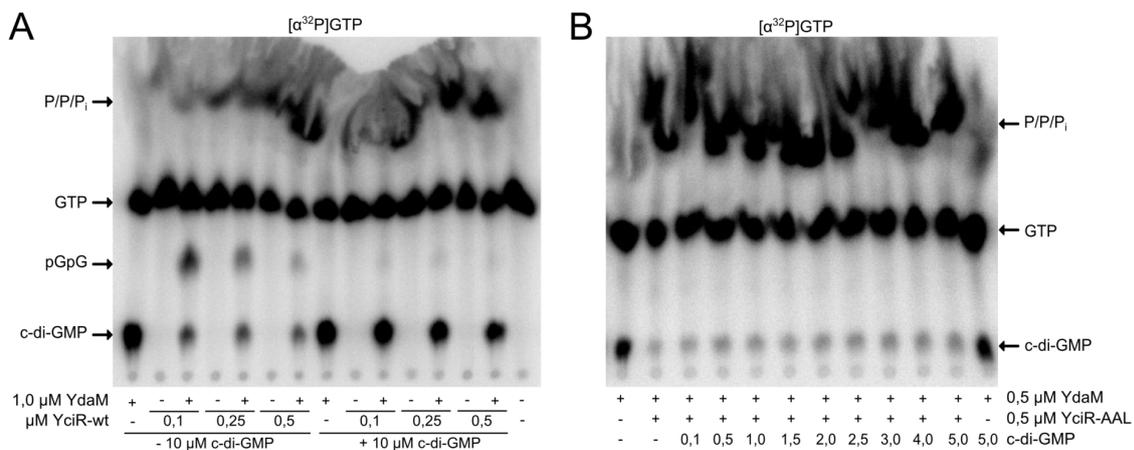


Abb. 4.23: C-di-GMP verhindert eine Hemmung der YdaM-Enzymaktivität durch YciR. Dünnschichtchromatographie eines Diguanylatzyklase-Assays von (A) 1 μ M gereinigtem YdaM-wt mit 83 nM radioaktiv-markiertem GTP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$; 3000 Ci/mmol) unter steigender Zugabe von YciR-wt und Anwesenheit von 10 μ M nicht-radioaktivem c-di-GMP, (B) 0,5 μ M gereinigtem YdaM-wt und 0,5 μ M YciR-AAL mit 21 nM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ und unter steigender Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 30°C. Die Detektion erfolgte durch Phosphoimaging.

Im Gegensatz dazu, zeigte sich für YciR-AAL innerhalb dieser Versuchsreihe, dass YdaM nur geringe Mengen von c-di-[³²P]GMP in Anwesenheit von YciR-AAL generierte (Abb. 4.23B), d.h. auch hier gehemmt war. Weiterhin wurde deutlich, dass die Hemmung der

Synthese durch YciR-AAL fast nicht durch die Zugabe von nicht-radioaktivem c-di-GMP aufgehoben werden konnte. Somit bestätigen diese *in vitro* Versuche die zuvor beobachteten *in vivo* Daten.

Zusammenfassend zeigte sich hier, dass YciR bzw. seine EAL-Domäne als Effektor von YegE/YhjH-kontrolliertem c-di-GMP agiert und wahrscheinlich diese Wahrnehmung seine Funktion als Inhibitor reguliert. Dadurch konnte mit Mutation des EAL-Motivs *in vivo* und *in vitro* keine Aufhebung der Inhibition mehr stattfinden.

5 DISKUSSION

5.1 YciR ist das Verbindungsglied der global und lokal c-di-GMP-kontrollierten Curli-Expression

Die Biofilmbildung in *E. coli* beginnt mit dem Eintritt in die stationäre Phase, eingeleitet mit der Expression adhäsiver Curli-Fimbrien und gleichzeitiger Inhibition der Motilität [Pesavento *et al.*, 2008]. Dabei ist dieser Prozess abhängig von dem sekundären Botenstoff c-di-GMP, der in hoher Zellkonzentration die Biofilmbildung fördert und in niedriger Konzentration die Motilität stimuliert [Jenal & Malone, 2006; Pesavento *et al.*, 2008; Povolotsky & Hengge, 2012; Römling *et al.*, 2005; Simm *et al.*, 2004; Wolfe & Visick, 2008]. Die Curli-Expression ist ein Netzwerks innerhalb der σ^S -abhängigen Genexpression und wird durch weitere vielfältige Regulationsmechanismen induziert [Hengge, 2011b].

Besonders wichtig ist hier der Masterregulator der Biofilmbildung, CsgD, der als Transkriptionsaktivator die Expression der strukturellen Curli-Komponenten CsgBAC wie auch die Diguanylatzyklase YaiC induziert, die für die Cellulose-Synthese eine bedeutende Rolle spielt [Brombacher *et al.*, 2003; Hammar *et al.*, 1995; Römling *et al.*, 2000; Zogaj *et al.*, 2001]. Die Expression von CsgD selbst unterliegt einer komplexen Kontrolle auf Ebene der Transkription, Translation und post-translationale Modifikation [Boehm & Vogel, 2012; Gerstel & Romling, 2001; Gerstel *et al.*, 2003; Hengge, 2011a; Ogasawara *et al.*, 2010a; Prigent-Combaret *et al.*, 2001; Zakikhany *et al.*, 2010]. Auch findet eine Regulation der *csgD*-Transkription in Abhängigkeit des c-di-GMP-Moleküls statt, dessen Synthese durch konservierte GGDEF-Domänen-Proteine mit einer Diguanylatzyklase-Aktivität (DGC) katalysiert wird und dessen Abbau durch EAL-Domänen-Proteine (bzw. HD-GYP, die nicht in *E. coli* vorkommen) mit einer Phosphodiesterase-Aktivität (PDE) vermittelt wird [Hengge, 2011a; Pesavento *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 1987; Simm *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2006].

Bekanntlich regulieren zwei GGDEF/EAL-Module die Transkription von *csgD* und haben somit bedeutenden Einfluss auf die Biofilmbildung. Dies ist zum einen das

YegE/YhjH-Modul und zum anderen das YdaM/YciR-Modul [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006]. In der generellen Stressantwort wird mit vermehrter σ^S -abhängiger Expression der Diguanylatzyklase (DGC) YegE ein erhöhter c-di-GMP-Spiegel produziert und gleichzeitig die antagonistische Wirkung der Phosphodiesterase (PDE) YhjH mit seiner verringerten Expression (YhjH wird abhängig von FliA exprimiert) überwunden [Pesavento *et al.*, 2008]. Folglich kann c-di-GMP durch die Bindung an YcgR den flagellaren Motor hemmen, wodurch es zur Abschaltung der Motilität kommt [Boehm *et al.*, 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul *et al.*, 2010; Ryjenkov *et al.*, 2006]. Neben der Motilität beeinflusst YegE-generiertes c-di-GMP auch indirekt die Transkription von *csgD*, so dass dieser c-di-GMP-Spiegel als vermutlich frei diffundierbar in der Zelle angenommen wird und auf einen bislang unbekanntem Effektor wirkt [Pesavento *et al.*, 2008], der in dieser Arbeit nun aufgeklärt werden konnte.

Es wurde deutlich, dass das YegE/YhjH-Modul wahrscheinlich über die Regulation der c-di-GMP-Konzentration das YdaM/YciR-Modul auf Proteinaktivitätsebene reguliert (Abb. 4.1B und 4.4). Vielmehr konnte zusammen mit vorherigen Daten verifiziert werden [Lindenberg, 2008], dass YciR der Effektor von YegE-kontrolliertem c-di-GMP ist, so dass in Abwesenheit von YciR die Curli-Synthese nicht mehr sensitiv gegenüber dem YegE/YhjH-Modul ist (Abb. 4.1B). Zwar sind bisher degenerierte GGDEF- und EAL-Proteine als mögliche Effektoren bekannt [Boyd & O'Toole, 2012; Newell *et al.*, 2009; Römling *et al.*, 2013], jedoch konnte noch kein konserviertes EAL-Protein als solches beschrieben werden und stellt somit einen neuen c-di-GMP Effektormechanismus dar.

YciR wurde zusammen mit seinem Antagonisten bereits als hochspezifisch für die *csgD*-Transkription beschrieben, wobei YdaM einen essentiellen Aktivator darstellt und YciR einen Inhibitor [Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006]. YdaM wie auch YciR werden σ^S -abhängig exprimiert. Interessanterweise ist die Expression von YdaM besonders bei Temperaturen unter 30°C induziert, was mit den benötigten Temperaturbedingungen der Curli-Expression korreliert [Sommerfeldt *et al.*, 2009]. Bisher wurde angenommen, dass sich die hochspezifische Wirkung des YdaM/YciR-Moduls durch einen lokalen Mechanismus stattfindet [Weber *et al.*, 2006], da YciR auch unabhängig von seiner PDE-Aktivität die Curli-Expression inhibierte [Lindenberg, 2008; Pesavento, 2011].

In dieser Arbeit bestätigt sich auch weiterhin eine lokale Regulation, da YdaM als aktive

DGC keinen Einfluss auf die Motilität hat (Abb. 4.11 und 4.3) und seine komplexe Rolle in der Aktivierung der Curli-Synthese nicht durch eine beliebige DGC (wie *YaiC*) ersetzt werden kann (Abb. 4.2A).

Dazu ist nun deutlich, dass in Abwesenheit des *YdaM/YciR*-Moduls für die Curli-Synthese zwar keine Sensitivität mehr für c-di-GMP regulierende Systeme vorhanden ist (Abb. 4.1B+C und 4.2A+B), jedoch immer noch eine Abhängigkeit von *MrA* vorliegt, so dass schlussfolgernd die lokale Regulation von *YdaM/YciR* über *MrA* stattfindet. Mit dem Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion zwischen allen drei Proteinen (Abb. 4.5 und 4.6), kann vielmehr auf Proteinkomplexbildung geschlossen werden, die *MrA* in seiner Proteinaktivität reguliert, da auch die Expression und der Proteinspiegel von *MrA* nicht durch *YciR* und *YdaM* beeinflusst waren. Durch einen solchen Proteinkomplex erklärt sich auch, warum *YdaM* nicht durch andere GGDEF-Proteine „austauschbar“ ist oder *YciR* unabhängig von seiner PDE-Aktivität die Curli-Expression hemmt [Lindenberg, 2008; Pesavento, 2011], in dem *YdaM* als direkter Aktivator und *YciR* als direkter Inhibitor von *YdaM* und *MrA* wirken könnte. Da nun *MrA* auch bekanntlich an den Promotor von *csgD* bindet [Ogasawara *et al.*, 2010b; Pesavento, 2011], wäre es durchaus denkbar, dass die Organisation eines ternären Proteinkomplexes lokal an der DNA stattfindet, da dieser Transkriptionsfaktor als MerR-ähnlicher Regulator auch stets an DNA gebunden ist [Brown *et al.*, 2003]. Auch wenn in hiesigen EMSA-Studien keine Hinweise auf ein verändertes Laufverhalten durch eine Protein-Komplexbildung erkennen ließen (Abb. 4.8), kann diese Hypothese nicht ausgeschlossen werden, da diese Versuche nicht optimal zur Untersuchung waren und weitergehende Versuche genutzt werden sollten, um dies zu klären. Doch würde hier eine Komplexbildung somit ein lokales c-di-GMP-Kontrollmodul beschreiben, wie es schon mehrfach als Konzept der spezifischen c-di-GMP-Signaltransduktion aufgeworfen wurde, da Bakterien teilweise eine hohe Anzahl von GGDEF- und EAL-Proteinen (*E. coli* hat 29 GGDEF-EAL-Proteine) kodieren [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006; Kulasakara *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006b, 2010; Weber *et al.*, 2006].

Als neuer Mechanismus zeichnete sich hier interessanterweise ab, dass die inhibitorische Rolle von *YciR* in dieser lokalen Anordnung durch *YegE*-generiertes c-di-GMP antagonisiert wird (Abb. 4.1B und 4.2A). Erst mit einem erhöhten c-di-GMP-Spiegel in der Zelle, wird der inhibitorische Effekt von *YciR* aufgehoben und aktiviert im Gegenzug die

csgD-Transkription.

Damit nimmt YciR eine zentrale Rolle in dieser Regulation ein und verhindert wahrscheinlich eine unkontrollierte Transkription von *csgD*. Dazu nimmt YciR als Mediator oder Verbindungsglied die c-di-GMP-Konzentration in der Zelle wahr und mit Erreichen bestimmter c-di-GMP-Schwellenwerte wird YciR gehemmt, dass in der Aktivierung der *csgD*-Transkription resultieren könnte.

Zusammengefasst wird somit wird der folgende Ablauf in der c-di-GMP abhängigen Expression von CsgD deutlich: i) YegE-generiertes c-di-GMP erhöht sich in Folge der σ^S -abhängigen Expression von YegE und inhibiert die Motilität; ii) die σ^S -abhängige Expression von YciR, YdaM und MlrA ermöglicht eine lokale Organisation am *csgD*-Promotor, wobei YciR als Inhibitor von YdaM und MlrA die *csgD*-Transkription zunächst zurückhält; iii) mit steigendem c-di-GMP-Spiegel wird YciR als Inhibitor gehemmt, so dass eine Aktivierung der *csgD*-Transkription durch YdaM und MlrA erfolgen kann.

Hierbei sind die beiden c-di-GMP-Module, YegE/YhjH und YdaM/YciR, seriell angeordnet und diese Expressionsregulation basiert auf einem globalen c-di-GMP-Signal und einer lokal organisierten YdaM/YciR/MlrA-Struktur, so dass eine fein-regulierte Reaktion stattfinden kann. Das erfolgt über neue Art eines Effektormechanismus, da bisher konservierte EAL-Proteine nicht als mögliche Effektoren beschrieben worden sind. Dies könnte auch für andere c-di-GMP abhängige Regulationen von Bedeutung sein.

5.2 Ein dynamischer Komplex aus YdaM/YciR/MlrA reguliert die *csgD*-Transkription

Voraussetzung für eine lokale Wirkung von YdaM und YciR im Hinblick auf die MlrA-abhängige Curli-Synthese ist die Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen Proteinen, die bereits ansatzweise durch vorherige Studien [Lindenberg, 2008] und letztlich durch diese Arbeit detailliert untersucht wurde.

Dabei interagieren *in vitro* die DGC YdaM und die PDE YciR miteinander sowie beide auch mit dem Transkriptionsfaktor MlrA (Abb. 4.5). Die Komplexbildung zwischen YdaM/YciR/MlrA scheint dabei unabhängig von c-di-GMP zu bestehen bleiben, da keine Auswirkungen von zusätzlich anwesendem c-di-GMP auf die Bindefähigkeiten (also Schwächung oder Verstärkung der Interaktion) untereinander sichtbar wurde. Es lässt

sich schlussfolgern, dass YegE-generiertes c-di-GMP zwar YciR antagonisiert, aber keinen Einfluss auf die Bindung von YciR im Komplex mit MlrA und YdaM hat.

Eine Regulation der Protein-Protein-Interaktion durch c-di-GMP konnte bereits für Proteine der Pga-Sekretionsmaschinerie beschrieben werden, bei der PgaC und PgaD durch Bindung von c-di-GMP eine Umlagerung der Konformation erfahren, das in einer verstärkten Interaktion beider resultiert [Steiner *et al.*, 2012]. Zwar konnte für YdaM/YciR/MlrA keine Veränderung der Protein-Protein-Interaktion beobachtet werden, doch wäre es zu vermuten, dass hier eine dynamische Verschiebung der Konformationen innerhalb des Komplexes durch c-di-GMP bewirkt wird.

Näheres Verständnis der Komplexbildung ergaben *in vivo* Interaktionsstudien, die eine genaue Kontaktbeteiligung der Multi-Domänen-Proteine klären sollte. YciR hat die größte Polypeptidkette und gliedert sich in drei Domänen: eine N-terminale Domäne (NTD; eine PAS-Domäne beinhaltend), eine GGDEF-Domäne und eine C-terminale EAL-Domäne (CTD; Abb. 4.1A). YdaM hat N-terminal zur GGDEF-Domäne mehrere PAS-Domänen im N-Terminus vereint. MlrA als MerR-ähnlicher Regulator besitzt N-terminal die MerR-ähnliche Domäne mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) zur DNA-Bindung, gefolgt von einer größeren C-terminalen Domäne unbekannter Funktion.

Die *in vivo* Interaktionsstudien zu allen Kombinationsmöglichkeiten der genannten Domänen verweist auf unterschiedliche Arten der Interaktion: zum einen gibt es starke wie auch schwache Interaktionen und zum anderen sind regulierte Interaktionen vorhanden, die hier erst durch die Expression einzelner Domänen sichtbar wurden (Abb. 4.6).

Schwache und starke Interaktionen wurden vor allem bei den Domänenkontakten von YciR erkennbar, die über seine drei Domänen (NTD, GGDEF, EAL) mit der N-terminalen Domäne von YdaM sowie mit der C-terminalen Domäne von MlrA erfolgten und dabei jedoch die EAL-Domäne verhältnismäßig die stärkste Interaktion zeigte (Abb. 4.6A+B).

Diese starke Interaktion von YciR-EAL mit MlrA-CTD lässt auf einen inhibitorischen Kontakt schließen, da YciR selbst in Abwesenheit von YdaM noch eine Hemmung der Curli-Expression auszulösen vermag (Abb. 4.1A und 4.21B). Daher könnte diese Interaktion wichtig sein, um einen Kontakt von MlrA mit der RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription zu verhindern.

Interessanterweise gibt es in *E. coli* noch einen weiteren MerR-ähnlichen Regulator, YcgE

(BluR), der zu 49 % identisch mit MlrA ist und vermutlich aus einer Genduplikation von *mlrA* entstand [Tschowri *et al.*, 2012]. Auch YcgE geht eine Protein-Protein-Interaktion mit einem EAL-Protein (das degeneriert ist), YcgF (BluF), ein [Tschowri *et al.*, 2009]. Während MlrA zur Aktivierung von *csgD* benötigt wird, ist YcgE ein Repressor eines Operons der kleinen Gene *ycgZ-ymgABC*. Letztlich agiert YcgF über Protein-Protein-Interaktion als Anti-Repressor und verhindert die Bindung von YcgE an die DNA. Daher ist es hier nicht ungewöhnlich, dass die Interaktion der YcgF-EAL-Domäne mit der N-terminalen MerR-ähnlichen Domäne von YcgE stattfindet, um so die DNA-Bindung abzuwenden. Für MlrA allerdings zeigt sich ein anderer Mechanismus auf, bei dem die MlrA-CTD eine Protein-Protein-Interaktion mit einem Inhibitor und Aktivator eingeht. MlrA zählt als MerR-ähnlicher Regulator zu den Aktivatoren und ermöglicht in Abwesenheit des YdaM/YciR-Moduls nur eine basale *csgD*-Expression (Abb. 4.1B und 4.2B), die für die Transkriptionsinitiation noch aktiviert werden muss. Daher wäre hier generell eine Antagonisierung der DNA-Bindung auch nicht sinnvoll und zeigt auf, dass über die Interaktion von MlrA über seine C-terminale Domäne der Signal-Input stattfindet.

Für die schwächeren Interaktionen der YciR-NTD und YciR-GGDEF mit der YdaM-NTD bzw. MlrA-CTD kann nicht genau auf spezifische oder unspezifische Kontakte geschlossen werden. Da jedoch die N-terminale Domäne von YciR *in vivo* auch keinen Einfluss auf die *csgB::lacZ* Expression zeigte (Abb. 4.21A), könnte diese möglicherweise als falsch-positiv eingeordnet werden. Andererseits können diese Interaktionen auch darauf hindeuten, dass diese Kontakte vielleicht eine stabilisierende oder stützende Funktion haben, die bei einer Änderung der Konformation wichtig wird und so bei der Überproduktion von YciR nicht zum tragen kam.

Für die YciR-GGDEF-Domäne wiederum konnte ein Einfluss auf die Curli-Expression gesehen werden (Abb. 4.21A). Diese Domäne geht nicht nur möglicherweise eine schwache Interaktion mit MlrA und YdaM ein, sondern auch eine regulierte, aber sehr starke Protein-Protein-Interaktion mit der YdaM-GGDEF-Domäne, die nur detektierbar war, wenn beide Domänen einzeln exprimiert wurden. Diese ist auch als spezifisch zu deuten, da die YdaM-GGDEF-Domäne keine Interaktion mit einer weiteren GGDEF-Domäne (von YeaP) aufwies (Abb. 4.6A+D). Da die YciR-GGDEF-Domäne mit dem Gesamtprotein von YdaM interagiert, jedoch nicht die YdaM-GGDEF-Domäne mit dem YciR-Gesamtprotein, ist die

Zugänglichkeit der YciR-GGDEF-Domäne ein möglicher Grund für diese Regulation, die eine Umlagerung im Protein erfordert, um diese regulierte Interaktion einzugehen. Solch eine Konformationsänderung könnte möglicherweise von dem ternären Gesamtkomplex, bestehend aus YciR/YdaM/MlrA, abhängen.

Im Hinblick auf die Oligomerisierungsstruktur von YdaM ist deutlich, dass die Dimerisierung wahrscheinlich initial von der GGDEF-Domäne ausgeht (Abb. 4.12C). Aber vermutlich stabilisieren die N-terminalen PAS-Domänen die Konformation, da die YdaM-GGDEF-Domänen nur instabile Oligomere bilden (Abb. 4.12B). Zwar bildet YdaM in Lösung auch Tetramere (Abb. 4.12A), aber die dimerisierte Form wird wahrscheinlich die aktive DGC sein, da über die zwei Polypeptidketten eines Dimers zwei GTP-Moleküle gebunden und zyklisch verknüpft werden [Schirmer & Jenal, 2009]. Da DGC somit generell als Homodimere aktive Enzyme sind [Schirmer & Jenal, 2009], ist zu vermuten, dass eine Heterodimerisierung mit YciR über die GGDEF-Domäne die Grundlage einer Inhibition von YdaM sein könnte. Es lässt sich auch spekulieren, dass die Protein-Protein-Interaktion von YdaM-NTD mit der YciR-EAL-Domäne ein initialer Kontakt zwischen beiden Proteinen ist und (im Komplex mit MlrA) möglicherweise in einer Destabilisierung der GGDEF-Dimerisierung resultiert, wodurch eine Umverlagerung der Konformation in eine heterodimere Organisation der YciR-GGDEF/YdaM-GGDEF-Domänen erfolgen kann.

Bisher konnten diverse Protein-Protein-Interaktionen zwischen GGDEF- und EAL-Proteinen beschrieben werden [Abel *et al.*, 2011; Bobrov *et al.*, 2008]. Zum Beispiel kontrolliert in *Yersinia pestis* ein Komplex aus dem GGDEF-Proteins HmsT und dem EAL-Protein HmsP die Synthese von Exopolysacchariden [Bobrov *et al.*, 2008] oder in *Caulobacter crescentus* interagieren das GGDEF-Protein DgcB und das EAL-Protein PdeA bei der Regulation der Zellzyklusentwicklung [Abel *et al.*, 2011]. Auch Interaktionen zwischen GGDEF- und HD-GYP-Proteinen konnten beschrieben werden [Andrade *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2010, 2012], weshalb Proteininteraktionen scheinbar generell als Mechanismus zur Regulation vorkommen und gerade auch innerhalb lokaler Systeme von Bedeutung sind [Hengge, 2009a; Jenal & Malone, 2006]. Jedoch konnte bislang keine mögliche Heterodimerisierung beobachtet werden, da dieser Mechanismus auch von einem zusammengesetzten GGDEF/EAL-Protein abhängt. Aber die Existenz solcher Proteine könnte somit nicht nur zur Regulation der Enzymaktivität einer Domäne innerhalb des

Proteins sein [Christen *et al.*, 2005; Hengge, 2011a], sondern auch für inter-Proteinkontakte eine Bedeutung haben.

Weiterhin geht aber YdaM über seine GGDEF-Domäne eine starke, aber regulierte Interaktion mit der MlrA-CTD ein, die nicht mit beliebigen GGDEF-Domänen vorkommt (Abb. 4.6C+D). Daher ist diese Interaktion als spezifisch anzusehen und wird wahrscheinlich die Grundlage zur Aktivierung von MlrA sein. Dabei scheint zum einen die N-terminale Domäne inhibitorisch auf diese Interaktion zu wirken und zum anderen könnte die C-terminale Domäne von MlrA im Gesamtprotein auch nicht komplett zugänglich sein. Doch da die MlrA-CTD bereits auch eine Interaktion mit der YciR-EAL-Domäne eingeht und auch die GGDEF-Domänen von YciR und YdaM miteinander in Kontakt stehen, könnte man vermuten, dass YciR die Interaktion zwischen MlrA und YdaM behindert und schwächt, wie es auch ansatzweise die *in vitro* Studien zeigten (Abb. 4.5).

Somit wäre die inhibitorische Funktion von YciR nicht nur in einer Heterodimerisierung mit YdaM, sondern gleichzeitig in einer (vielleicht auch sterischen) Hinderung der Interaktion zwischen YdaM-GGDEF und MlrA-CTD.

Da aber auch die YdaM-NTD scheinbar einen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion der YdaM-GGDEF-Domäne mit der MlrA-CTD hat, könnte man vermuten, dass noch weitere Regulationen innerhalb oder außerhalb diesen Komplexes stattfinden. Da sich jedoch bei Abwesenheit von YciR eine absolute Aktivierung der Curli-Synthese zeigt (Abb. 4.1 und [Pesavento *et al.*, 2008; Sommerfeldt *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006]), wäre hieraus zu schließen, dass keine Verlagerung im YciR/YdaM/MlrA-Komplex den Kontakt zwischen MlrA-CTD und YdaM-GGDEF stimuliert. Doch ist der *csgD*-Promotor durch viele Transkriptionsfaktoren besetzt [Ogasawara *et al.*, 2010a], weshalb womöglich eine Interaktion mit einem weiteren Faktor stattfinden kann, der die N-terminale Domäne von YdaM „neutralisiert“.

Insgesamt ließen die Daten auf auch ein Mikrokompartiment schließen, wo Entstehungs- und Wirkungsort von c-di-GMP derselbe ist und der Proteinkomplex eine Abgrenzung zum umgebenden Raum schafft. Zwar wurde bereits ein Komplex aus YddV (DGC; GGDEF-Protein), YddU (PDE; GGDEF-EAL-Protein) mit der c-di-GMP bindenden PNPase in *E. coli* beschrieben, das möglicherweise als lokales Kontrollmodul agiert [Tuckerman *et al.*, 2011], jedoch konnte bisher noch kein Komplex aus DGC/PDE mit einem

Transkriptionsfaktor beschrieben werden und es ist nicht auszuschließen, dass es noch mehrere solcher Komplexe gibt. Daher nahm natürlich der Transkriptionsfaktor MlrA die Rolle eines potentiellen Effektors für YdaM-generiertes c-di-GMP ein, da sich auch die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus von MlrA durch YdaM stellt.

5.3 YdaM aktiviert MlrA unabhängig von seinem Enzymprodukt

MlrA ist ein MerR-ähnlicher Transkriptionsaktivator und bindet etwa 80 bp stromaufwärts zum *csgD*-Kernpromotor [Ogasawara *et al.*, 2010b; Pesavento, 2011]. Das ist ungewöhnlich für MerR-Transkriptionsregulatoren, die typischerweise innerhalb einer verlängerten (19-20 bp) Spacer-Region im Promotor binden und eine Aktivierung der Transkription ermöglichen, in dem sie kleine Liganden wie z.B. Metall-Ionen binden und mit einer resultierenden Konformationsänderung eine topologische Drehung der DNA verursachen und so den Kontakt des Promotors mit dem RNAP-Holoenzym stimulieren.

Jedoch hat der aktive *csgD*-Promotor auch nur einen 15 bp-langen Spacer [Hammar *et al.*, 1995] und interessanterweise entspricht die Bindestelle von MlrA wiederum einer fast perfekten σ^S -Promotorregion, wo hier die Bindung überlappend mit dem Spacer und der -35-Region wäre [Pesavento, 2011], und somit eher der Funktionsweise von MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren nachkommt [Brown *et al.*, 2003]. Auch macht der Vergleich mit YcgE, der auch in einer Kernpromotorregion überlappend mit der Spacer- und -35-Region bindet, deutlich, dass vermutlich für MlrA die DNA-Bindung nicht grundlegend anders ist wie bei anderen MerR-Regulatoren. Da aber bisher keine Aktivität für diese potentielle Promotorregion nachgewiesen werden konnte [Weber, 2007], bleibt der aktivierende Mechanismus von MlrA an dieser Position ungeklärt.

Doch zumindest lässt sich vermuten, dass MlrA über seine Konformation als Aktivator reguliert ist, wie es bei MerR-Regulatoren durch die Bindung eines Liganden erfolgt. D.h. MlrA wird vermutlich konstitutiv an der DNA-gebunden sein, während es durch die Protein-Protein-Interaktion mit YdaM und YciR über seine C-terminale Domäne reguliert wird. Da YdaM und YciR c-di-GMP-kontrollierende Enzyme sind, könnte hier c-di-GMP ein potentiell bindender Ligand von MlrA sein. Auch war bisher ein möglicher Ligand zur Aktivierung unbekannt und die Interaktion der c-di-GMP-synthetisierenden YdaM-GGDEF-Domäne mit der MlrA-CTD hat natürlich auf einen direkten Transfer des

Enzymprodukts hingedeutet. Dazu sind auch bereits Transkriptionsfaktoren bekannt, die c-di-GMP binden. Hier gibt es zum einen FleQ in *Pseudomonas aeruginosa*, das durch die Bindung von c-di-GMP vom Repressor zum Aktivator wird [Baraquet *et al.*, 2012; Hickman & Harwood, 2008] und somit entfernt an den Aktivierungsmechanismus von MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren erinnert. Zum anderen gibt es das CPR/FNR-ähnliche Protein XcCLP in *Xanthomonas campestris*, das durch c-di-GMP-Bindung sich von der DNA löst [Chin *et al.*, 2010], das aber für MerR-ähnliche Regulatoren eher nicht zutreffen würde. Auch können MerR-ähnliche Transkriptionsregulatoren neben Metall-Ionen organische Verbindungen binden, wie z.B. das Arznei- und Farbstoff-bindende Protein BmrR aus *Bacillus subtilis* [Ahmed *et al.*, 1994], wodurch c-di-GMP als organischer Ligand nicht ungewöhnlich wäre.

Außerdem kodiert MlrA zwei RxxD-Motive, die bekanntlich auch außerhalb von Diguanylatzyklasen als Bindemotiv für c-di-GMP nachgewiesen wurden [Lee *et al.*, 2007; Schirmer & Jenal, 2009]. Davon befindet sich ein Motiv nahe der Gelenk-Region, die für die Ligandenbindung und Konformationsänderung eine Bedeutung hat (Abb. 4.10A) [Changela *et al.*, 2003; Newberry & Brennan, 2004]. Dadurch ist es natürlich leicht vorstellbar, dass MlrA ein potentiell c-di-GMP bindendes Protein wäre.

Doch innerhalb dieser Arbeit wurden vielfache Möglichkeiten zu einer c-di-GMP-Bindung von MlrA ausgetestet, wie die Abhängigkeit einer Komplexbildung mit YdaM, der YdaM-GGDEF-Domäne, der *csgD*-Promotor-DNA oder auch die Abhängigkeit eines ternären Komplexes aus YdaM/YciR/MlrA sowie des Transfers von YdaM-generiertem c-di-GMP (Abb. 4.9). Auch wurden die potentiellen Bindestellen durch Mutation der RxxD-Motive getestet (Abb. 4.10). Jedoch konnte für alle Versuchsreihen keine spezifische c-di-GMP-Bindung festgestellt werden, weshalb hier ausgeschlossen werden kann, dass MlrA als spezifischer c-di-GMP-Effektor agiert.

Doch weiterhin wurde deutlich, dass die Funktion der c-di-GMP-Produktion durch YdaM nur stimulierend in der Curli-Expression wirkt (Abb. 4.17A) und somit gar nicht essentiell ist. Das bedeutet, schon der Kontakt zwischen MlrA und YdaM bewirkt eine Aktivierung. Vielmehr wirkt YdaM-generiertes c-di-GMP in der Antagonisierung von YciR (Abb. 4.17B), während auch scheinbar die Konformation des aktiven Enzyms bei der Aktivierung von MlrA noch zu einem geringem Maß beiträgt. Durch die Antagonisierung von YciR ergibt sich jedoch eine verstärkende Wirkung über ein positives Feedback, dass vermutlich auch

eine zeitliche Verlängerung der Aktivierung ermöglicht.

Damit wäre klar, warum bisher kein Ligand für MlrA gefunden wurde und das auslösende Moment zur Aktivierung wäre somit die Protein-Protein-Interaktion, die selbst einer Regulation unterliegt. Daher wäre es denkbar, dass sich mit der aktivierenden Interaktion von YdaM mit der MlrA-CTD auch die Konformation von MlrA und der DNA ändert, wie es für MerR-ähnliche Regulatoren üblich ist. Spekulativ wäre es auch vorstellbar, dass MlrA vielleicht einmal die Fähigkeit hatte, c-di-GMP zu binden und diese in seiner evolutiven Entwicklung verloren hat. Insgesamt wird hier ein neuer c-di-GMP-Effektormechanismus deutlich, bei dem MlrA zwar als Effektor eines c-di-GMP-Kontrollmoduls angeordnet ist, jedoch eher eine regulatorische Zielstruktur dieser Signaltransduktion darstellt. Interessanterweise wurde in *Xanthomonas campestris* auch bereits ein System beschrieben, bei dem GGDEF-Proteine im Komplex mit dem HD-GYP-Protein RpfG wie auch einem PilZ-Domänen-Protein (dessen Domäne als c-di-GMP-Bindedomäne bekannt ist), unabhängig von c-di-GMP in einem dynamischen Komplex die Motilität regulieren [Ryan *et al.*, 2012]. Daher lässt sich vermuten, dass es noch andere c-di-GMP-Kontrollmodule gibt, die durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert sind und nicht unbedingt von der c-di-GMP Bindung abhängig sind. Damit könnte es sich hier um einen gängigen Mechanismus eines c-di-GMP Kontrollmoduls handeln.

Da nun klar ist, dass YdaM-generiertes c-di-GMP zumindest teilweise in der Aktivierung von MlrA wirkt, aber besonders durch Antagonisierung von YciR bedeutend für die Aktivierung ist, ist die Regulation dieser Enzymaktivität wichtig für das Verständnis dieses Aktivierungsmechanismus. Bekanntlich werden DGC durch c-di-GMP selbst reguliert, sofern sie eine sog. I-site („inhibitory site“) besitzen, über die eine allosterische Regulation durch nicht-kompetitive Produktinhibition erfolgt [Schirmer & Jenal, 2009].

YdaM kodiert eine konservierte I-site, die auch schwach c-di-GMP bindet (Abb. 4.14A). Jedoch scheint diese Bindung entweder instabil zu sein, die sich durch Mutation des aktiven Zentrums (YdaM-A⁻) festigt oder es liegen hier unterschiedliche Konformationen vor, die es dem Wildtyp von YdaM erlaubt, c-di-GMP schnell zu entlassen. Nichtsdestotrotz zeigt YdaM *in vitro* keine allosterische Produktfeedbackinhibition seiner Enzymaktivität (Abb. 4.14B). Dadurch kann YdaM auch nicht durch YegE-kontrolliertes c-di-GMP beeinflusst werden (Abb. 4.13), dass mit dem Eintritt in die stationäre Phase stetig steigt. Somit entsteht

hier kein Nachteil, weil die Enzymaktivität von YdaM nicht schon durch YegE-generiertes c-di-GMP gehemmt wird und später so den positiven Feedback in der Antagonisierung von YciR gewährleistet.

Damit YdaM aber keine unkontrollierte DGC-Aktivität ausübt, das einem ineffizienten Energieverbrauch gleichkommt, ist es natürlich sinnvoll, dass die Protein-Protein-Interaktion von YciR diese reguliert, insbesondere da es inhibitorisch auf YdaM wirkt. Während MlrA keinen Einfluss auf die Aktivität von YdaM hatte (Abb. 4.15), übt YciR scheinbar eine weitere inhibitorische Rolle in der Regulation der Enzymaktivität von YdaM aus (Abb. 4.16). Auch wenn es in den hier durchgeführten *in vitro* Studien schwierig war, eine solche nachzuweisen, zumal YciR als PDE c-di-GMP abbaut, hemmt YciR bereits in substöchiometrischen Konzentrationen die Synthese von c-di-GMP durch YdaM. Mit Zunahme von YciR konnte sogar beobachtet werden, dass nicht nur weniger Syntheseprodukt, sondern auch weniger Abbauprodukt erkennbar waren. Außerdem ist YciR auch ohne seine PDE-Aktivität fähig die Synthese von c-di-GMP durch YdaM zu hemmen, wie es für die in dem EAL-Motiv mutierte Version von YciR (YciR-AAL) erkennbar war (Abb. 4.16B) und die nur noch eine schwache PDE-Aktivität hat (Abb. 4.18). Das bedeutet, dass mit Hemmung YdaM-Enzymaktivität YciR seiner eigenen Hemmung entgegen wirkt. Dies macht natürlich die Hypothese einer Heterodimerisierung von YciR-GGDEF/YdaM-GGDEF umso bedeutender, da diese Formation die Basis dieser Hemmung sein kann.

5.4 YciR ist der zentrale Schalter in der c-di-GMP abhängigen Curli-Expression

YciR ist ein Inhibitor der Curli-Expression, dem mehrere Mechanismen zur Regulation der *csgD*-Transkription unterliegen. YciR ist aber auch ein komplexes Protein ist, das wahrscheinlich besonders seine konservierte GGDEF- und EAL-Domäne für seine Rolle als direkter Inhibitor über Protein-Protein-Interaktionen nutzt. Zusätzlich ist seine Enzymaktivität als Phosphodiesterase (PDE) wichtig für die Hemmung der Curli-Synthese, da es einer Erhöhung des c-di-GMP-Spiegels entgegen wirkt [Pesavento, 2011; Pesavento *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006] und damit auch eine vorzeitige Curli-Expression unterdrückt.

Der Abbau von c-di-GMP erfolgt von EAL-Proteinen durch eine 3'-PDE-Aktivität, bei der

an der 3'-Position der Ribose eine Spaltung des zyklischen Moleküls erfolgt, so dass zunächst das lineare Produkt 5'-pGpG entsteht, das weiter abgebaut wird zu zwei Molekülen GMP [Christen *et al.*, 2005; Hengge, 2009a; Pesavento *et al.*, 2008; Schirmer & Jenal, 2009; Schmidt *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2006]. Eine solche Aktivität zeigte YciR deutlich und wie es auch für eine PDE typisch ist, bindet YciR über seine EAL-Domäne mit hoher Affinität c-di-GMP (Abb. 4.18), das mit den physiologischen Bedingungen der Zelle korreliert [Hengge, 2009a]. Mit Mutation der Glutaminsäure des EAL-Motivs (zu AAL) lässt sich nur noch eine schwache 3'-PDE-Aktivität nachweisen, das sich durch ein schwaches c-di-GMP-Bindevermögen erklärt, während durch Mutation des GGDEF-Motivs (zu GGAAF) sich keine signifikanten und reproduzierbaren Änderungen ergab (Abb. 4.18).

Insgesamt scheint es aber, als würde *in vitro* das GMP Produkt noch weiter durch YciR abgebaut werden, dessen Aktivität auch durch GTP als Substrat ersetzbar ist (Abb. 4.18 und 4.20). Ein Abbau von GTP und GMP wiederum würde einer 5'-Phosphodiesterase-Aktivität entsprechen und könnte eine neue Aktivität von YciR sein. Doch ob dies eine spezifische Aktivität für YciR ist oder vielleicht eine Nebenaktivität der stets verunreinigten Proteinproben ist, konnte nicht abschließend in dieser Arbeit nachgewiesen werden und kann auch nicht als Enzymaktivität von YciR ausgeschlossen werden. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass YciR über sein GGDEF-Motiv GTP unter Konzentrationen bindet, die den physiologischen Bedingungen entsprechen (Abb. 4.20). Diese Bindung könnte daher auch in einer schwachen DGC-Aktivität resultieren, die hier zwar nicht direkt detektierbar war, aber durch Detektion des Abbauprodukts (pGpG) vermuten lässt, dass die stärkere 3'-PDE-Aktivität eine schwache DGC-Aktivität in YciR überspielt. Generell wäre durch die konservierten Aminosäuren der GGDEF-Domäne eine solche Aktivität denkbar. Doch EAL-Proteine agieren typischerweise als Monomer [Schirmer & Jenal, 2009], wie es auch für YciR als aktive 3'-PDE zu vermuten ist. Das könnte eine potentielle DGC-Aktivität erschweren, die eine Dimerkonformation mit antiparalleler Monomer-Anordnung benötigt, um die Verknüpfung von zwei GTP-Molekülen zu einem zyklischen Molekül zu bewirken [Schirmer & Jenal, 2009]. Ob eine DGC-Aktivität von YciR eine physiologische Rolle spielt, bleibt anzuzweifeln, sondern lässt weiterhin auf eine Heterodimerisierung mit YdaM spekulieren, die wahrscheinlich kein c-di-GMP Produkt hervorbringt. Möglicherweise sind die hier detektierten YciR-Enzymaktivitäten als DGC und 5'-PDE generell durch die *in vitro*

Bedingungen entstanden.

Aber welche Rolle nun GTP für YciR spielt, ist damit nicht ganz klar. Zumindest kann ausgeschlossen werden, dass GTP den Abbau von c-di-GMP beeinflusst (Abb. 4.20), wie es bei dem GGDEF-EAL-Protein PdeA in *C. crescentus* erfolgt [Christen *et al.*, 2005]. Interessant ist jedoch, dass die GTP-Konzentration in der Zelle in der post-exponentiellen Wachstumsphase fällt und mit Beginn der stationären Phase in einem Tiefpunkt erreicht [Buckstein *et al.*, 2008], weshalb man vermuten könnte, dass YciR vielleicht nicht nur c-di-GMP in der Zelle wahrnimmt, sondern auch GTP. Vielleicht hat GTP auch eine Bedeutung für die Regulation des YdaM/YciR/MlrA-Komplexes. Doch im Hinblick auf die Curli-Expression konnte auch kein signifikanter Einfluss durch das GGDEF-Motiv von YciR festgestellt werden (Abb. 4.22B), aber wiederum kann YciR-GGAAF auch noch in geringem Maße GTP binden. Daher wäre es nur vorstellbar, dass GTP eine unterstützende Funktion ausübt, die vielleicht durch Stimulierung einer Heterodimerisierung von YciR-GGDEF/YdaM-GGDEF erfolgt. Das sind jedoch Spekulationen und könnte für weitere Untersuchungen interessant sein.

In jedem Fall wurde deutlich, dass die c-di-GMP-Konzentration in der Zelle die Hauptrolle spielt und besonders zur Antagonisierung von YciR von Bedeutung ist, wodurch YciR die Rolle eines Mediators oder Verbindungsgliedes zwischen zwei seriell hintereinander geschalteten GGDEF/EAL-Modulen (YegE/YhjH und YdaM/YciR) zukommt. Dadurch kann ein globaler Signal-Input über YciR in das lokale Modul eingespeist werden, der in der hochspezifischen Regulation der *csgD*-Transkription eine Reaktion oder Output hervorruft. Somit ist YciR ein Kontrollpunkt, der durch seine verschiedenen inhibitorischen Mechanismen eine Hürde darstellt, die überwunden werden muss, um die Transkription von *csgD* zu initiieren. Doch wie funktioniert die Hemmung von YciR durch c-di-GMP? Zumindest ist klar, dass c-di-GMP nicht die Protein-Protein-Interaktion von YciR mit YdaM und MlrA in der Hinsicht beeinflusst, dass YciR nicht mehr im Komplex gebunden bleibt. Sondern vielmehr scheint der Komplex in seiner Organisation weiter zu bestehen und womöglich Konformationsänderungen zu durchstehen.

Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die EAL-Domäne von YciR die Rolle des Effektors für zelluläres c-di-GMP zukommt. Bei chromosomaler Expression des schwach als 3'-PDE aktiven Derivats von YciR-AAL wurde sogar eine konstitutive Inhibition

einer *csdB::lacZ*-Expression bewirkt, die nicht mehr sensitiv für YegE/YhjH-kontrolliertes c-di-GMP war (Abb. 4.22). Damit scheint YciR-AAL durch die Mutation des EAL-Motivs in einer Konformation „gefangen“ zu sein, die keine Aufhebung der Inhibition mehr erlaubt. Dadurch konnte auch kein zelluläres c-di-GMP, reguliert durch YegE und YhjH, wahrgenommen werden.

Dieselbe Wirkung zeigte sich auch *in vitro* in Enzymassays mit radioaktivem GTP. Durch die Anwesenheit von YciR wird die c-di-GMP-Synthese von YdaM gehemmt. Wird jedoch ein Überschuss an „externen“ nicht-radioaktivem c-di-GMP zugegeben, wird diese Hemmung der Synthese wiederum aufgehoben. Im Vergleich zeigte sich mit YciR-AAL auch eine verminderte Synthese von c-di-GMP, aber nur eine geringe Aufhebung der Hemmung durch „externes“ c-di-GMP. Dieser schwach aufhebende Effekt erklärt sich dadurch, dass YciR-AAL noch eine geringe PDE-Aktivität besitzt (Abb. 4.18), die durch das nicht-radioaktive c-di-GMP nun „ausgeblendet“ wurde. Dadurch blieb, unabhängig von der Menge des nicht-radioaktivem c-di-GMP, das Signal für YdaM-generiertes c-di-GMP auf einem gleichbleibenden Niveau und zeigte keine Veränderungen mehr. Das bedeutet, dass auch *in vitro* YciR-AAL effektiv YdaM in seiner Enzymaktivität inhibierte und c-di-GMP diesen Effekt nicht aufheben konnte. Das entspricht den Beobachtungen *in vivo*, bei der YciR-AAL als „Superinhibitor“ die Curli-Expression unterdrückte und keine Reaktion mehr auf YegE/YhjH-reguliertes c-di-GMP möglich machte (Abb. 4.22). Somit war hier mit dem Verlust der Enzymaktivität ein konstitutiv agierender Inhibitor vorhanden, der keine Regulation mehr erlaubte.

Das bedeutet also, dass die YciR-EAL-Domäne als sensorische Domäne für das zelluläre c-di-GMP agiert und die inhibitorische Rolle von YciR reguliert. Da diese Domäne auch zuständig ist für den Abbau von c-di-GMP und für die Inhibition von MlrA und YdaM durch Protein-Protein-Interaktion, deuten diese Daten darauf hin, dass vielmehr die Konformation von YciR, je nach Enzymaktivität, ausschlaggebend für seine Wirkungsweise ist.

Damit ergibt sich ein simpler Mechanismus zur Anti-Inhibition: mit Erhöhung des zellulären c-di-GMP-Spiegel durch YegE wird YciR vermehrt aktiv als PDE, dass wahrscheinlich bei Sättigung durch das Substrat (c-di-GMP) zu einer permanenten Konformationsänderung führt und letztlich auch eine Verschiebung der Konformation im Komplex hervorruft. Dadurch wird möglicherweise die Heterodimerisierung von YdaM

und YciR aufgehoben und YdaM ist „frei“ zur c-di-GMP-Synthese, das zur Antagonisierung von YciR beiträgt. Zum anderen kann dadurch auch nicht mehr ein Kontakt zwischen YdaM-GGDEF und MlrA verhindert werden, der zur Aktivierung von MlrA und somit *csgD*-Transkription führt.

Dieses Prinzip lässt sich vielmehr in die Gruppe der sog. „Trigger“ (Schalter-) Enzyme einordnen, dass durch Commichau & Stülke beschrieben wurde [Commichau & Stülke, 2008]. Diese Art von Proteinen werden als bifunktionale Enzyme beschrieben, die in Abhängigkeit ihres Substrates (also Enzymaktivität) die Genexpression durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder Protein-DNA/RNA-Interaktion regulieren. Unter anderem wurde dabei eine Klasse von Proteinen beschrieben, die als Enzyme die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch inhibitorische Protein-Protein-Interaktion regulieren [Commichau & Stülke, 2008]. Dabei ist ein Beispiel für diese Funktionsweise der Transkriptionsaktivator MalT, der durch Protein-Protein-Interaktion mit den drei Enzymen, die ATPase MalK, die Esterase Aes und die β C-S Lyase MalY, reguliert ist [Joly *et al.*, 2002, 2004; Schreiber *et al.*, 2000]. Generell wird aber deutlich, dass dieser Mechanismus auch für die Funktionsweise von YciR anwendbar ist, jedoch wurden bisher keine globalen sekundäre Botenstoffe, sondern Metabolite als Substrate dieser Schalterenzyme beschrieben. Angewendet auf YciR reguliert somit die Substratverfügbarkeit von c-di-GMP und der daraus resultierenden Enzymaktivität die inhibitorischen Protein-Protein-Interaktionen von YciR und damit die *csgD*-Transkription. Auch für YdaM könnte dieses Konzept in geringem Umfang eine Bedeutung haben, da die Konformation der aktiven DGC von YdaM zumindest teilweise eine Rolle für die Aktivierung von MlrA spielt.

Schlussfolgernd nimmt YciR eine zentrale Rolle eines Kontrollpunkts in der Curli-Expression ein, der zunächst durch viele inhibitorische Mechanismen eine verfrühte *csgD*-Transkription verhindert und dessen c-di-GMP abbauende Aktivität einen Schalter zur Aktivierung darstellt. Dabei unterliegt der lokale Komplex einer strengen Kontrolle durch YciR, das einer doppelt-negativen Feedback-Schleife gleichkommt und das Signal über c-di-GMP entscheidet, welcher Schicksalszustand des Komplexes folgt [Dubnau & Losick, 2006]. Damit wird eine fein-regulierte *csgD*-Transkription ermöglicht, die wiederum eine Bedeutung in der bistabilen Expression von CsgD haben könnte, wie sie bereits beobachtet werden konnte [Grantcharova *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2013].

5.5 Das Gesamtkonzept der c-di-GMP-abhängigen Curli-Expression

Zusammenfassend weisen die Daten aus dieser Arbeit auf den in der Abb. 5.1 dargestellten Mechanismus der c-di-GMP vermittelten Curli-Expression hin. Diese beginnt mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase durch die Erhöhung der zellulären c-di-GMP Konzentration durch die σ^S -induzierte Expression der DGC YegE und Überwindung der PDE-Aktivität von YhjH, so dass die Motilität über die Bindung von c-di-GMP an YcgR eine Verringerung der Flagellenrotation und Schwimgeschwindigkeit bewirkt.

Die Transkription des Biofilmregulators CsgD erfolgt σ^S -abhängig und in Abhängigkeit von zwei c-di-GMP-Kontrollmodulen, YegE/YhjH und YdaM/YciR. Diese beiden Module sind seriell hintereinander geschaltet, bei dem globales YegE-generiertes c-di-GMP über die PDE YciR als Verbindungsglied den lokalen Komplex aus YdaM/YciR/MlrA moduliert. Auch diese lokalen Komponenten werden durch σ^S induziert. MlrA ist ein MerR-ähnlicher Transkriptionsfaktor, der am *csgD*-Promotor über die Bindung seiner N-terminalen Domäne (NTD) lokalisiert ist und wahrscheinlich über die C-terminale Domäne (CTD) reguliert wird. Eine Aktivierung von MlrA findet über die Protein-Protein-Interaktion seiner CTD mit der YdaM-GGDEF-Domäne statt. Bis zu einem bestimmten Schwellenwert der c-di-GMP-Konzentration in der Zelle wird YdaM möglicherweise durch YciR über eine heterodimere Konformation beider GGDEF-Domänen inhibiert, die in einer gehemmten Enzymaktivität von YdaM wie auch Hinderung der Protein-Protein-Interaktion mit der MlrA-CTD resultieren würde. Dazu wird MlrA durch die Protein-Protein-Interaktion mit YciR (vermutlich EAL-Domäne) inhibiert.

Mit Erhöhung des YegE-generierten c-di-GMP-Spiegels wird YciR verstärkt als 3'-PDE aktiv und erfährt dadurch wahrscheinlich eine Konformationsänderung, die auch vermutlich dynamische Verschiebungen der Konformationen im Proteinkomplex mit YdaM und MlrA mit sich zieht. Dadurch kann YciR beide Interaktionspartner (YdaM und MlrA) nicht mehr inhibieren, so dass die YdaM-GGDEF-Domäne über seine Protein-Protein-Interaktion mit der MlrA-CTD vermutlich eine Änderung der Konformation des MlrA-Gesamtproteins bewirkt, die eine Rekrutierung der RNAP oder Repositionierung des Promotors bewirkt, so dass die *csgD*-Transkription aktiviert wird und die Curli-Synthese erfolgen kann. Dazu spielt die c-di-GMP Synthese von YdaM für die Aktivierung von MlrA keine essentielle Rolle, aber wirkt stimulierend über ein positives Feedback durch die Antagonisierung von

YciR. D.h. YdaM generiertes c-di-GMP wird vermutlich in den zellulären Spiegel eingespeist.

Generell stellt YciR durch verschiedene, inhibitorische Mechanismen einen Kontrollpunkt dar, der nicht nur eine vorzeitige Initiation der Curli-Expression verhindert, sondern auch eine spezifische Fein-Regulation innerhalb der globalen c-di-GMP Signaltransduktion ermöglicht.

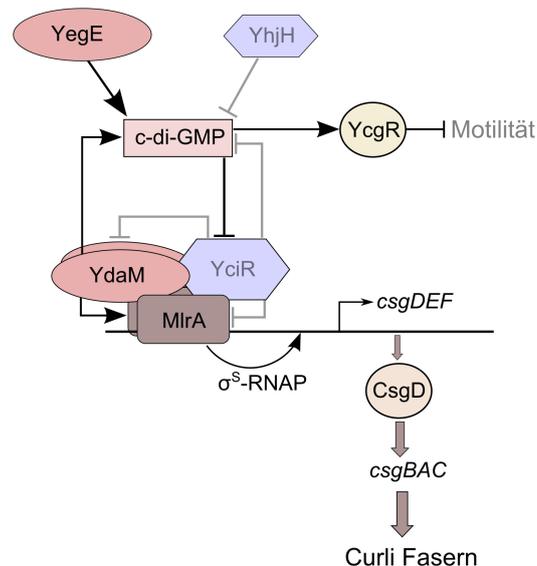


Abb. 5.1: Schema zur c-di-GMP-abhängigen Regulation der Curli-Expression. Die Transkription von *csgD* wird durch zwei seriell hintereinander geschaltete GGDEF/EAL-Module reguliert. Dabei moduliert das global agierende YegE/YhjH-Modul über die c-di-GMP-Kontrolle das YdaM/YciR-Modul, das als lokales Kontrollmodul zusammen mit dem MerR-ähnlichen Transkriptionsaktivator MlrA am Promotor von *csgD* lokalisiert ist. YciR ist das Verbindungsglied dieser beiden Module, der den lokalen Komplex über Protein-Protein-Interaktion inhibiert, solange der c-di-GMP-Spiegel der Zelle niedrig ist. Mit Erhöhung des zellulären c-di-GMP-Spiegels durch die Aktivität von YegE, wird YciR als PDE aktiv und erfährt eine Konformationsänderung die innerhalb des Komplex eine dynamische Anpassung bewirkt. YdaM wird nicht mehr inhibiert und aktiviert MlrA, das in der Transkriptionsinitiation von *csgD* über Rekrutierung des RNAP-Holoenzym resultiert. YdaM verstärkt die Wirkung durch die Synthese von c-di-GMP, das YciR antagonisiert (positives Feedback). Das Genprodukt von CsgD aktiviert schließlich die Genexpression der strukturellen Curli-Komponenten CsgBAC. YdaM und MlrA sind aktiv als Dimer und deshalb als solche dargestellt. Die Curli-inhibierenden bzw. Motilität-fördernden Signalwege sind grau dargestellt.

Hier wird somit ein neuartiger c-di-GMP Regulationsmechanismus deutlich, bei dem ein Diguanylatzyklase und eine Phosphodiesterase direkt über Protein-Protein-Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor diesen regulieren und einen Output in der *csgD*-Transkription bewirken. Dabei ist eine konservierte PDE eine neue Art eines c-di-GMP-Effektors, dessen Enzymaktivität der Schalter zur Aktivierung ist. Ein solcher Mechanismus über „Trigger“-Enzyme könnte eine weit verbreitete Regulation in der c-di-GMP Signaltransduktion sein und ermöglicht ein einfaches Prinzip zu einer spezifischen Regulation eines global agierenden Systems.

Literaturverzeichnis

- Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaever, V., Laub, M. T., Baker, T. A. & Jenal, U. (2011). »Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks«. *Mol. Cell* **43** (4):550–560.
- Ahmed, M., Borsch, C. M., Taylor, S. S., Vazquez-Laslop, N. & Neyfakh, A. A. (1994). »A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates«. *J. Biol. Chem.* **269** (45):28506–28513.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). »Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs«. *Nucleic Acids Res.* **25** (17):3389–3402.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006). »PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein«. *Bioinformatics*, **22** (1):3–6.
- Amsler, C. D., Cho, M. & Matsumura, P. (1993). »Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth«. *J. Bacteriol.* **175** (19):6238–6244.
- Anderson, G. G. & O'Toole, G. A. (2008). »Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms«. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**:85–105.
- Andoy, N. M., Sarkar, S. K., Wang, Q., Panda, D., Benitez, J. J., Kalininskiy, A. & Chen, P. (2009). »Single-molecule study of metalloregulator CueR-DNA interactions using engineered Holliday junctions«. *Biophys. J.* **97** (3):844–852.
- Andrade, M. O., Alegria, M. C., Guzzo, C. R., Docena, C., Rosa, M. C., Ramos, C. H. & Farah, C. S. (2006). »The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*«. *Mol. Microbiol.* **62** (2):537–551.
- Ansari, A. Z., Chael, M. L. & O'Halloran, T. V. (1992). »Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR«. *Nature* **355** (6355):87–89.
- Ansari, A. Z., Bradner, J. E. & O'Halloran, T. V. (1995). »DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism«. *Nature* **374** (6520):371–375.
- Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D. G. & Normark, S. (1992). »The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101«. *Mol. Microbiol.* **6** (17):2443–2452.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. & Lindberg, M. (2001). »Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity«. *FEMS Microbiol. Lett.* **204** (1):163–167.
- Azam, T. A. & Ishihama, A. (1999). »Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity«. *J. Biol. Chem.* **274** (46):33105–33113.
- Babitzke, P. & Romeo, T. (2007). »CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins«. *Curr. Opin. Microbiol.* **10** (2):156–163.

- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. & Harwood, C. S.** (2012). »The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP«. *Nucleic Acids Res.* **40** (15):7207–7218.
- Barends, T. R., Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A., Reinstein, J., Shoeman, R. L., Gomelsky, M. & Schlichting, I.** (2009). »Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase«. *Nature* **459** (7249):1015–1018.
- Barnhart, M. M. & Chapman, M. R.** (2006). »Curli biogenesis and function«. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:131–147.
- Becker, G., Klauck, E. & Hengge-Aronis, R.** (1999). »Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (11):6439–6444.
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J. M.** (2008). »*Escherichia coli* biofilms«. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**:249–289.
- Benach, J., Swaminathan, S. S., Tamayo, R., Handelman, S. K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J. E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J., Camilli, A. & Hunt, J. F.** (2007). »The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains«. *EMBO J.* **26** (24):5153–5166.
- Bijlsma, J. J. & Groisman, E. A.** (2003). »Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems«. *Trends Microbiol.* **11** (8):359–366.
- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D. & Perry, R. D.** (2008). »Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production«. *Environ. Microbiol.* **10** (6):1419–1432.
- Boehm, A. & Vogel, J.** (2012). »The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs«. *Mol. Microbiol.* **84** (1):1–5.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V. & Jenal, U.** (2010). »Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity«. *Cell* **141** (1):107–116.
- Boyd, C. D. & O’Toole, G. A.** (2012). »Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems«. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**:439–462.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L. & Morby, A. P.** (1999). »ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*«. *Mol. Microbiol.* **31** (3):893–902.
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A. J. & Landini, P.** (2003). »The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*«. *Microbiology (Reading, Engl.)* **149** (Pt 10):2847–2857.
- Brown, N. L., Ford, S. J., Pridmore, R. D. & Fritzinger, D. C.** (1983). »Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase«. *Biochemistry* **22** (17):4089–4095.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. & Hobman, J. L.** (2003). »The MerR family of transcriptional regulators«. *FEMS Microbiol. Rev.* **27** (2-3):145–163.

- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J. & Curtiss, R.** (2001). »MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium*«. *Mol. Microbiol.* **41** (2):349–363.
- Browning, D. F. & Busby, S. J.** (2004). »The regulation of bacterial transcription initiation«. *Nat. Rev. Microbiol.* **2** (1):57–65.
- Buckstein, M. H., He, J. & Rubin, H.** (2008). »Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*«. *J. Bacteriol.* **190** (2):718–726.
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Vance, R. E.** (2011). »STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP«. *Nature* **478** (7370):515–518.
- Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C.** (1988). »High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation«. *J. Bacteriol.* **170** (6):2796–2801.
- Camilli, A. & Bassler, B. L.** (2006). »Bacterial small-molecule signaling pathways«. *Science* **311** (5764):1113–1116.
- Chambers, J. R. & Sauer, K.** (2013). »Small RNAs and their role in biofilm formation«. *Trends Microbiol.* **21** (1):39–49.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. & Schirmer, T.** (2004). »Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (49):17084–17089.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. & Mondragon, A.** (2003). »Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR«. *Science* **301** (5638):1383–1387.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. & Hultgren, S. J.** (2002). »Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation«. *Science* **295** (5556):851–855.
- Checa, S. K., Espariz, M., Audero, M. E., Botta, P. E., Spinelli, S. V. & Soncini, F. C.** (2007). »Bacterial sensing of and resistance to gold salts«. *Mol. Microbiol.* **63** (5):1307–1318.
- Chevance, F. F. & Hughes, K. T.** (2008). »Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine«. *Nat. Rev. Microbiol.* **6** (6):455–465.
- Chilcott, G. S. & Hughes, K. T.** (2000). »Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica serovar typhimurium* and *Escherichia coli*«. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (4):694–708.
- Chin, K. H., Lee, Y. C., Tu, Z. L., Chen, C. H., Tseng, Y. H., Yang, J. M., Ryan, R. P., McCarthy, Y., Dow, J. M., Wang, A. H. & Chou, S. H.** (2010). »The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*«. *J. Mol. Biol.* **396** (3):646–662.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. & Jenal, U.** (2006). »Allosteric control of cyclic di-GMP signaling«. *J. Biol. Chem.* **281** (42):32015–32024.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U.** (2005). »Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP«. *J. Biol. Chem.* **280** (35):30829–30837.

- Christen, M., Christen, B., Allan, M. G., Folcher, M., Jenö, P., Grzesiek, S. & Jenal, U.** (2007). »DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (10):4112–4117.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H.** (1989). »One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution«. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **86** (7):2172–2175.
- Commichau, F. M. & Stülke, J.** (2008). »Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression«. *Mol. Microbiol.* **67** (4):692–702.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P.** (1999). »Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections«. *Science* **284** (5418):1318–1322.
- Cotter, P. A. & Stibitz, S.** (2007). »c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation«. *Curr. Opin. Microbiol.* **10** (1):17–23.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L.** (2000). »One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products«. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (12):6640–5.
- De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P. V., Bae, N., Raghavan, R. V. & Sondermann, H.** (2008). »Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR«. *PLoS Biol.* **6** (3):e67.
- Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M. A.** (2000). »Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor«. *Biochemistry* **39** (10):2685–2691.
- Demple, B.** (1996). »Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon—a review«. *Gene* **179** (1):53–57.
- Donlan, R. M.** (2002). »Biofilms: microbial life on surfaces«. *Emerging Infect. Dis.* **8** (9):881–890.
- Donlan, R. M.** (2008). »Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?« *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**:133–161.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W.** (2002). »Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms«. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (2):167–193.
- Dove, S. L. & Hochschild, A.** (2004). »A bacterial two-hybrid system based on transcription activation«. *Methods Mol. Biol.* **261**:231–246.
- Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Ryan, R. P.** (2006). »The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants«. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19** (12):1378–1384.
- Dubnau, D. & Losick, R.** (2006). »Bistability in bacteria«. *Mol. Microbiol.* **61** (3):564–572.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. & Jenal, U.** (2009). »Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression«. *Genes Dev.* **23** (1):93–104.
- Dunne, W. M.** (2002). »Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?« *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (2):155–166.
- Fang, X. & Gomelsky, M.** (2010). »A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility«. *Mol. Microbiol.* **76** (5):1295–1305.
- Ferrieres, L. & Clarke, D. J.** (2003). »The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface«. *Mol. Microbiol.* **50** (5):1665–1682.

- Fic, E., Bonarek, P., Gorecki, A., Kedracka-Krok, S., Mikolajczak, J., Polit, A., Tworzydło, M., Dziejzicka-Wasylewska, M. & Wasylewski, Z.** (2009). »cAMP receptor protein from *Escherichia coli* as a model of signal transduction in proteins—a review«. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17** (1):1–11.
- Fiedler, U. & Weiss, V.** (1995). »A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules«. *EMBO J*, **14** (15):3696–3705.
- Flemming, H. C. & Wingender, J.** (2010). »The biofilm matrix«. *Nat. Rev. Microbiol.* **8** (9):623–633.
- Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I. & Yao, M.** (2013). »The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit A«. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431** (4):802–807.
- Galperin, M. Y.** (2004). »Bacterial signal transduction network in a genomic perspective«. *Environ. Microbiol.* **6** (6):552–567.
- Galperin, M. Y.** (2005). »A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts«. *BMC Microbiol.* **5**:35.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V.** (2001). »Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems«. *FEMS Microbiol. Lett.* **203** (1):11–21.
- Gerstel, U. & Romling, U.** (2001). »Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*«. *Environ. Microbiol.* **3** (10):638–648.
- Gerstel, U., Park, C. & Romling, U.** (2003). »Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins«. *Mol. Microbiol.* **49** (3):639–654.
- Gomelsky, M. & Klug, G.** (2002). »BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms«. *Trends Biochem. Sci.* **27** (10):497–500.
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W. A. & Saier, M. H.** (2004). »Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*«. *J. Bacteriol.* **186** (11):3516–3524.
- Gottesman, S. & Storz, G.** (2011). »Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations«. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3** (12).
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K. & Romling, U.** (2010). »Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium«. *J. Bacteriol.* **192** (2):456–466.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. & Normark, S.** (1995). »Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12«. *Mol. Microbiol.* **18** (4):661–670.
- Hammar, M., Bian, Z. & Normark, S.** (1996). »Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (13):6562–6566.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H. & Horiuchi, T.** (2006). »Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110«. *Mol Syst Biol*, **2**:2006.0007.

- Helmann, J. D.** (2011). »Regulation by alternative sigma factors«. *Bacterial Stress Responses*. Ed. by **G. Storz & R. Hengge**. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 31–43.
- Helmann, J. D., Ballard, B. T. & Walsh, C. T.** (1990). »The MerR metalloregulatory protein binds mercuric ion as a tricoordinate, metal-bridged dimer«. *Science* **247** (4945):946–948.
- Hengge, R.** (2009a). »Principles of c-di-GMP signalling in bacteria«. *Nat. Rev. Microbiol.* **7** (4):263–273.
- Hengge, R.** (2009b). »Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*«. *Res. Microbiol.* **160** (9):667–676.
- Hengge, R.** (2010). »Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world«. *Sci Signal* **3** (149):pe44.
- Hengge, R.** (2011a). »Role of Cyclic Di-GMP in the Regulatory Networks of *Escherichia coli*«. *The Second Messenger Cyclic Di-GMP*. Ed. by **A. J. Wolfe & K. L. Visick**. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 230–52.
- Hengge, R.** (2011b). »The general stress response in Gram-negative bacteria«. *Bacterial Stress Responses*. Ed. by **G. Storz & R. Hengge**. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, pp. 251–89.
- Hickman, J. W. & Harwood, C. S.** (2008). »Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor«. *Mol. Microbiol.* **69** (2):376–389.
- Hidalgo, E., Leautaud, V. & Demple, B.** (1998). »The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator«. *EMBO J.* **17** (9):2629–2636.
- Higuchi, R.** (1990). »Recombinant PCR«. *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*. Ed. by **M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White**. San Diego, California.: Academic Press, Inc.
- Ho, Y. S., Burden, L. M. & Hurley, J. H.** (2000). »Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor«. *EMBO J.* **19** (20):5288–5299.
- Hobman, J. L.** (2007). »MerR family transcription activators: similar designs, different specificities«. *Mol. Microbiol.* **63** (5):1275–1278.
- Hobman, J. L., Wilkie, J. & Brown, N. L.** (2005). »A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators«. *Biometals* **18** (4):429–436.
- Holmqvist, E., Reimegard, J., Sterk, M., Grantcharova, N., Romling, U. & Wagner, E. G.** (2010). »Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis«. *EMBO J.* **29** (11):1840–1850.
- Huang, B., Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S.** (2003). »FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*«. *J. Bacteriol.* **185** (24):7068–7076.
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., Beveridge, T. J., Preston, J. F. & Romeo, T.** (2008). »Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine«. *J. Bacteriol.* **190** (10):3670–3680.
- Jenal, U.** (2004). »Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria?«. *Curr. Opin. Microbiol.* **7** (2):185–191.
- Jenal, U. & Malone, J.** (2006). »Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria«. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385–407.

- Joly, N., Danot, O., Schlegel, A., Boos, W. & Richet, E.** (2002). »The Aes protein directly controls the activity of MalT, the central transcriptional activator of the *Escherichia coli* maltose regulon«. *J. Biol. Chem.* **277** (19):16606–16613.
- Joly, N., Bohm, A., Boos, W. & Richet, E.** (2004). »MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator MalT by antagonizing inducer binding«. *J. Biol. Chem.* **279** (32):33123–33130.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J. M., Lazzaroni, J. C., Lejeune, P. & Dorel, C.** (2005). »CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*«. *J. Bacteriol.* **187** (6):2038–2049.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. & Romling, U.** (2006). »Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium«. *Mol. Microbiol.* **60** (3):602–616.
- Kazmierczak, B. I., Lebron, M. B. & Murray, T. S.** (2006). »Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*«. *Mol. Microbiol.* **60** (4):1026–1043.
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S. & Yoshida, S.** (2005). »Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells«. *Microbiol. Immunol.* **49**:875–884.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D. G., Neely, A. N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F. M. & Lory, S.** (2006). »Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (8):2839–2844.
- Kulshina, N., Baird, N. J. & Ferre-D'Amare, A. R.** (2009). »Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch«. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (12):1212–1217.
- Laemmli, U. K.** (1970). »Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4«. *Nature* **227** (5259):680–685.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R.** (1994). »The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability«. *Genes Dev.* **8** (13):1600–12.
- Lee, D. J., Minchin, S. D. & Busby, S. J.** (2012). »Activating transcription in bacteria«. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**:125–152.
- Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. & Breaker, R. R.** (2010). »An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger«. *Science* **329** (5993):845–848.
- Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S.** (2007). »A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production«. *Mol. Microbiol.* **65** (6):1474–1484.
- Levet-Paulo, M., Lazzaroni, J. C., Gilbert, C., Atlan, D., Doublet, P. & Vianney, A.** (2011). »The atypical two-component sensor kinase Lpl0330 from *Legionella pneumophila* controls the bifunctional diguanylate cyclase-phosphodiesterase Lpl0329 to modulate bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP synthesis«. *J. Biol. Chem.* **286** (36):31136–31144.
- Lewis, M.** (2013). »Allostery and the *lac* Operon«. *J. Mol. Biol.* **425** (13):2309–2316.

- Lindenberg, S.** (2008). »Untersuchungen zur molekularen Interaktion von an der Expression der Curli-Fimbrien beteiligten GGDEF/EAL-Proteinen in *E. coli*«. Diplomarbeit. Berlin: Freie Universität.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E. & Hengge, R.** (2013). »The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control«. *EMBO J* [Epub ahead].
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. & Bremer, E.** (1994). »Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of *Escherichia coli*«. *J. Biol. Chem.* **269** (9):6578–6578.
- Lund, P. A. & Brown, N. L.** (1989). »Regulation of transcription in *Escherichia coli* from the *mer* and *merR* promoters in the transposon Tn501«. *J. Mol. Biol.* **205** (2):343–353.
- Madan Babu, M. & Teichmann, Sarah A.** (2003). »Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*«. *Nucleic Acids Research* **31** (4):1234–1244.
- McLeod, S. M. & Johnson, R. C.** (2001). »Control of transcription by nucleoid proteins«. *Curr. Opin. Microbiol.* **4** (2):152–159.
- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S.** (2007). »The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*«. *Mol. Microbiol.* **65** (4):876–895.
- Mika, F. & Hengge, R.** (2005). »A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*«. *Genes Dev* **19** (22):2770–2781.
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M. & Hengge, R.** (2012). »Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*«. *Mol. Microbiol.* **84** (1):51–65.
- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, J. H.** (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics. A laboratory handbook for Escherichia coli and its related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. & Miller, S. I.** (2011). »The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling«. *Cell. Microbiol.* **13** (8):1122–1129.
- Minasov, G., Padavattan, S., Shuvalova, L., Brunzelle, J. S., Miller, D. J., Basle, A., Massa, C., Collart, F. R., Schirmer, T. & Anderson, W. F.** (2009). »Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains«. *J. Biol. Chem.* **284** (19):13174–13184.
- Monds, R. D. & O'Toole, G. A.** (2009). »The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review«. *Trends Microbiol.* **17** (2):73–87.
- Navarro, M. V., De, N., Bae, N., Wang, Q. & Sondermann, H.** (2009). »Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX«. *Structure* **17** (8):1104–1116.
- Newberry, K. J. & Brennan, R. G.** (2004). »The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus«. *J. Biol. Chem.* **279** (19):20356–20362.

- Newell, P. D., Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009). »LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (9):3461–3466.
- Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H. & O'Toole, G. A. (2011). »A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage«. *PLoS Biol.* **9** (2):e1000587.
- Nichols, B. P., Shafiq, O. & Meiners, V. (1998). »Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of *Escherichia coli* strains used for genetic mapping and strain construction«. *J. Bacteriol.* **180** (23):6408–11.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010a). »Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors«. *Microbiology* **156** (Pt 8):2470–2483.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2010b). »Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*«. *FEMS Microbiol. Lett.* **312** (2):160–168.
- Olsen, A., Jonsson, A. & Normark, S. (1989). »Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*«. *Nature* **338** (6217):652–655.
- Ostrovsky de Spicer, P. & Maloy, S. (1993). »PutA protein, a membrane-associated flavin dehydrogenase, acts as a redox-dependent transcriptional regulator«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (9):4295–4298.
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J. & O'Halloran, T. V. (2000). »Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR«. *J. Biol. Chem.* **275** (40):31024–31029.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F. & Harshey, R. M. (2010). »The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism«. *Mol. Cell* **38** (1):128–139.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. (2004). »Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain«. *Genes Dev.* **18** (6):715–727.
- Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. & Jenal, U. (2007). »Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization«. *J. Biol. Chem.* **282** (40):29170–29177.
- Pei, J. & Grishin, N. V. (2001). »GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase«. *Proteins* **42** (2):210–216.
- Perez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. (2000). »The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12«. *Nucleic Acids Res.* **28** (8):1838–1847.
- Pesavento, C. (2011). »Regulatory mechanisms in the coordination of motility and curli fimbriae-mediated adhesion in *Escherichia coli*«. PhD thesis. Berlin: Freie Universität.
- Pesavento, C. & Hengge, R. (2010). »Cyclic-di-GMP signaling«. *Bacterial Signaling*. Ed. by K. Jung & R. Kraemer. Weinheim: Wiley VHC, pp. 377–94.
- Pesavento, C. & Hengge, R. (2012). »The global repressor FliZ antagonizes gene expression by σ^S -containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity«. *Nucleic Acids Res.* **40** (11):4783–4793.

- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. & Hengge, R.** (2008). »Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*«. *Genes Dev*, **22** (17):2434–46.
- Peters, J. E., Thate, T. E. & Craig, N. L.** (2003). »Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array«. *J Bacteriol*, **185** (6):2017–21.
- Pomposiello, P. J. & Demple, B.** (2001). »Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors«. *Trends Biotechnol.* **19** (3):109–114.
- Povolotsky, T. L. & Hengge, R.** (2012). »'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP«. *J. Biotechnol.* **160** (1-2):10–16.
- Powell, B. S., Rivas, M. P., Court, D. L., Nakamura, Y. & Turnbough, C. L.** (1994). »Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR«. *Nucleic Acids Res.* **22** (25):5765–5766.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A.** (2007). »PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*«. *J. Biol. Chem.* **282** (17):12860–12870.
- Pratt, L. A. & Kolter, R.** (1998). »Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili«. *Mol. Microbiol.* **30** (2):285–293.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P.** (1999). »Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*«. *J. Bacteriol.* **181** (19):5993–6002.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. & Dorel, C.** (2001). »Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene«. *J. Bacteriol.* **183** (24):7213–7223.
- Prüß, B. M., Besemann, C., Denton, A. & Wolfe, A. J.** (2006). »A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*«. *J. Bacteriol.* **188** (11):3731–3739.
- Qi, Y., Chuah, M. L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K. & Liang, Z. X.** (2011). »Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change«. *J. Biol. Chem.* **286** (4):2910–2917.
- Ralston, D. M. & O'Halloran, T. V.** (1990). »Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87** (10):3846–3850.
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. & Liang, Z. X.** (2008). »Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*«. *J. Bacteriol.* **190** (10):3622–3631.
- Reisner, A., Haagen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L. & Molin, S.** (2003). »Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms«. *Mol. Microbiol.* **48** (4):933–946.
- Richet, E., Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O.** (1991). »A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator«. *Cell* **66**:1185–1195.
- Robert-Paganin, J., Nonin-Lecomte, S. & Rety, S.** (2012). »Crystal structure of an EAL domain in complex with reaction product 5'-pGpG«. *PLoS ONE* **7** (12):e52424.

- Robinson, L. S., Ashman, E. M., Hultgren, S. J. & Chapman, M. R.** (2006). »Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein«. *Mol. Microbiol.* **59** (3):870–881.
- Römling, U.** (2002). »Molecular biology of cellulose production in bacteria«. *Res. Microbiol.* **153** (4):205–212.
- Römling, U.** (2005). »Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae«. *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (11):1234–1246.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. & Reinkoster, J.** (2000). »AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways«. *Mol. Microbiol.* **36** (1):10–23.
- Römling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y.** (2005). »C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system«. *Mol. Microbiol.* **57** (3):629–639.
- Römling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M.** (2013). »Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger«. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77** (1):1–52.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., Vroom, E. de, Marel, G. A. van der, Boom, J. H. van & Benziman, M.** (1987). »Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid«. *Nature* **325** (6101):279–281.
- Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M.** (1991). »Cellulose biosynthesis and function in bacteria«. *Microbiol. Rev.* **55** (1):35–58.
- Russell, M. H., Bible, A. N., Fang, X., Gooding, J. R., Campagna, S. R., Gomelsky, M. & Alexandre, G.** (2013). »Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway«. *MBio* **4** (2):00001–13.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. & Dow, J. M.** (2006a). »Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (17):6712–6717.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Dow, J. M.** (2006b). »Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles«. *J. Bacteriol.* **188** (24):8327–8334.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M.** (2010). »Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (13):5989–5994.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Kiely, P. A., O'Connor, R., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M.** (2012). »Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in *Xanthomonas campestris*«. *Mol. Microbiol.* **86** (3):557–567.
- Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V. & Gomelsky, M.** (2005). »Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain«. *J. Bacteriol.* **187** (5):1792–1798.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U. & Gomelsky, M.** (2006). »The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria«. *J. Biol. Chem.* **281** (41):30310–30314.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Torres, V., Hu, H. & Wood, T. K.** (2011). »GGDEF proteins YeaI, YedQ, and YfiN reduce early biofilm formation and swimming motility in *Escherichia coli*«. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90** (2):651–658.
- Schembri, M. A., Kjaergaard, K. & Klemm, P.** (2003). »Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms«. *Mol. Microbiol.* **48** (1):253–267.
- Schirmer, T. & Jenal, U.** (2009). »Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling«. *Nat. Rev. Microbiol.* **7** (10):724–735.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M.** (2005). »The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains«. *J. Bacteriol.* **187** (14):4774–4781.
- Schreiber, V., Steegborn, C., Clausen, T., Boos, W. & Richet, E.** (2000). »A new mechanism for the control of a prokaryotic transcriptional regulator: antagonistic binding of positive and negative effectors«. *Mol. Microbiol.* **35** (4):765–776.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F. & Hengge, R.** (2013). »Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm«. *MBio* **4** (2):e00103–00113.
- Seshasayee, A. S., Fraser, G. M. & Luscombe, N. M.** (2010). »Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity«. *Nucleic Acids Res.* **38** (18):5970–5981.
- Seshasayee, A. S., Sivaraman, K. & Luscombe, N. M.** (2011). »An overview of prokaryotic transcription factors : a summary of function and occurrence in bacterial genomes«. *Subcell. Biochem.* **52**:7–23.
- Shin, M., Kang, S., Hyun, S. J., Fujita, N., Ishihama, A., Valentin-Hansen, P. & Choy, H. E.** (2001). »Repression of deoP2 in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor«. *EMBO J.* **20** (19):5392–5399.
- Silhavy, T. J., W., M. L. Berman L. & Enquist** (1984). *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nitz, M. & Romling, U.** (2004). »GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility«. *Mol. Microbiol.* **53** (4):1123–1134.
- Simons, R. W., Houtman, F. & Kleckner, N.** (1987). »Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions«. *Gene* **53** (1):85–96.
- Smith, K. D., Lipchock, S. V., Ames, T. D., Wang, J., Breaker, R. R. & Strobel, S. A.** (2009). »Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch«. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (12):1218–1223.
- Smith, K. D., Shanahan, C. A., Moore, E. L., Simon, A. C. & Strobel, S. A.** (2011). »Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches«. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108** (19):7757–7762.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. & Lasa, I.** (2002). »Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose«. *Mol. Microbiol.* **43** (3):793–808.

- Sommerfeldt-Impe, N.** (2012). »Regulation von Biofilmfunktionen durch c-di-GMP in *Escherichia coli*«. PhD thesis. Berlin: Freie Universität.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N. & Hengge, R.** (2009). »Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*«. *Microbiology* **155** (Pt 4):1318–1331.
- Sondermann, H., Shikuma, N. J. & Yildiz, F. H.** (2012). »You've come a long way: c-di-GMP signaling«. *Curr. Opin. Microbiol.* **15** (2):140–146.
- Stanisich, V. A., Bennett, P. M. & Richmond, M. H.** (1977). »Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*«. *J. Bacteriol.* **129** (3):1227–1233.
- Steiner, S., Lori, C., Boehm, A. & Jenal, U.** (2012). »Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction«. *EMBO J.* **32** (3):354–368.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N.** (2000). »Two-component signal transduction«. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183–215.
- Storz, G., Vogel, J. & Wassarman, K. M.** (2011). »Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers«. *Mol. Cell* **43** (6):880–891.
- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H. & Breaker, R. R.** (2008). »Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP«. *Science* **321** (5887):411–413.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R. & Romeo, T.** (2006). »Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E«. *Genes Dev.* **20** (18):2605–2617.
- Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T. & Hughes, K. T.** (2012). »YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex«. *Mol. Microbiol.* **83** (6):1268–1284.
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P. & Benziman, M.** (1998). »Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes«. *J. Bacteriol.* **180** (17):4416–4425.
- Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A.** (2005). »The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase«. *J. Biol. Chem.* **280** (39):33324–33330.
- Tamayo, R., Pratt, J. T. & Camilli, A.** (2007). »Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis«. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:131–148.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M.** (2006). »An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP«. *J. Biol. Chem.* **281** (46):34751–34758.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B.** (1999). »PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light«. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (2):479–506.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J.** (1994). »CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice«. *Nucleic Acids Res.* **22** (22):4673–4680.
- Tischler, A. D. & Camilli, A.** (2004). »Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation«. *Mol. Microbiol.* **53** (3):857–869.
- Tschowri, N.** (2012). »Ein Blaulicht-kontrolliertes regulatorisches Netzwerk der Biofilmbildung in *Escherichia coli*«. PhD thesis. Berlin: Freie Universität.
- Tschowri, N., Busse, S. & Hengge, R.** (2009). »The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*«. *Genes Dev.* **23** (4):522–534.
- Tschowri, N., Lindenberg, S. & Hengge, R.** (2012). »Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*«. *Mol. Microbiol.* **85** (5):893–906.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Sousa, E. H., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M. & Gilles-Gonzalez, M. A.** (2009). »An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control«. *Biochemistry* **48** (41):9764–9774.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M. A.** (2011). »Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing«. *J. Mol. Biol.* **407** (5):633–639.
- Typas, A., Becker, G. & Hengge, R.** (2007). »The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase«. *Mol. Microbiol.* **63** (5):1296–1306.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L.** (2001). »Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*«. *PNAS*, **98** (26):15264–9.
- Vianney, A., Jubelin, G., Renault, S., Dorel, C., Lejeune, P. & Lazzaroni, J. C.** (2005). »*Escherichia coli* tol and rcs genes participate in the complex network affecting curli synthesis«. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151** (Pt 7):2487–2497.
- Volz, K.** (1993). »Structural conservation in the CheY superfamily«. *Biochemistry* **32** (44):11741–11753.
- Wada, T., Morizane, T., Abo, T., Tominaga, A., Inoue-Tanaka, K. & Kutsukake, K.** (2011). »EAL domain protein YdiV acts as an anti-FlhD4C2 factor responsible for nutritional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium«. *J. Bacteriol.* **193** (7):1600–1611.
- Wada, T., Hatamoto, Y. & Kutsukake, K.** (2012). »Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene *ydiV* in *Escherichia coli*«. *Microbiology* **158** (Pt 6):1533–1542.
- Wang, S., Fleming, R. T., Westbrook, E. M., Matsumura, P. & McKay, D. B.** (2006). »Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription«. *J. Mol. Biol.* **355** (4):798–808.
- Wang, X., Preston, J. F. & Romeo, T.** (2004). »The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation«. *J. Bacteriol.* **186** (9):2724–2734.
- Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U. & Schirmer, T.** (2007). »Structure of BeF3- -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition«. *Structure* **15** (8):915–927.
- Weber, H.** (2007). »Regulatorische Module innerhalb des σ^S -Netzwerkes von *Escherichia coli*«. PhD thesis. Berlin: Freie Universität.

- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). »Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity«. *J. Bacteriol.* **187** (5):1591–1603.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. & Hengge, R. (2006). »Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*«. *Mol Microbiol.* **62** (4):1014–34.
- Weickert, M. J. & Adhya, S. (1993). »The galactose regulon of *Escherichia coli*«. *Mol. Microbiol.* **10** (2):245–251.
- Wilksch, J. J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J. L., Short, K. R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C. E., Whitchurch, C. B., Schembri, M. A., Chuah, M. L., Liang, Z. X., Wijburg, O. L., Jenney, A. W., Lithgow, T. & Strugnell, R. A. (2011). »MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression«. *PLoS Pathog.* **7** (8):e1002204.
- Wilson, C. J., Zhan, H., Swint-Kruse, L. & Matthews, K. S. (2007). »The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding«. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (1):3–16.
- Wolfe, A. J. & Visick, K. L. (2008). »Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility«. *J. Bacteriol.* **190** (2):463–475.
- Wood, T. K., Gonzalez Barrios, A. F., Herzberg, M. & Lee, J. (2006). »Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*«. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72** (2):361–367.
- Zakikhany, K., Harrington, C. R., Nitz, M., Hinton, J. C. & Romling, U. (2010). »Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium«. *Mol. Microbiol.* **77** (3):771–786.
- Zogaj, X., Nitz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Romling, U. (2001). »The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix«. *Mol. Microbiol.* **39** (6):1452–1463.