

---

**Das RpoS-Protein aus *Vibrio cholerae*:  
Funktionsanalyse und Charakterisierung der  
Proteolyse-Kaskade**

---

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Anja Halscheidt**  
aus Mühlhausen

**Würzburg, 2007**

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Gutachter: Prof. Dr. M. Steinert

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Reidl angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Außer dem Titel Diplom-Biologin (Univ.) habe ich bislang keine anderen akademischen Grade erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

.....

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und bei Herrn Prof. Dr. Michael Steinert für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Des Weiteren geht ein besonders herzliches Dankeschön an meinen Doktorvater Prof. Dr. Joachim Reidl für die engagierte Betreuung, sein Vertrauen in den Erfolg dieser Arbeit, seine ansteckende Begeisterung in jeder Planungsphase und so manches außergewöhnliches Gespräch.

Ein nicht minder aufrichtiges Dankeschön gebührt den anderen Mitgliedern der „Reidl-Familie“: Lieber DoDo, deine beständige Diskussionsbereitschaft, dein umfangreiches Wissen, aber vor allen Dingen deine Freundschaft habe ich mehr als schätzen gelernt und dich zu einem unverzichtbaren Bestandteil dieser Arbeit und meiner Zeit in Würzburg gemacht.

Liebe Gaby, dir danke ich von Herzen dafür, dass du mir nicht nur als geschätzte Kollegin mit einem schier unerschöpflichen Vorrat an wertvollen Ideen, sondern v. a. als fürsorgliche Freundin stets zur Seite gestanden hast. Einfach nur danke. P. S. Jetzt freue ich mich auf meinen Dreißigsten!

Lieber Daniel, eifriger Diskussionspartner und Leidensgenosse, unsere stürmischen Wasser- und Wortschlachten vermisse ich jetzt schon. Vielen Dank für jede Menge Spaß - auch außerhalb des Labors. Und immer daran denken: Alles wird gut!

Meine über alles geschätzte Karina, dir danke ich herzlich für die zahlreichen Kniffe und Tricks und deine wiederholte Bereitschaft, mir trotz des hohen Pensums durch Stefan zu helfen, was mich oft vor einer Überschwemmung gerettet hat!

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei den „Ehemaligen“ Melissa Merdanovic und Elisabetha Sauer, die mir gerade in der holprigen Anfangszeit jede noch so kleine Frage geduldig beantworteten; sowie bei Stefan Schild, der mir sein beeindruckendes Wissen mit unermüdlichem Eifer zu vermitteln verstand. Unserem Laborengel Anja Glück-Schramm danke ich für die kompetente Beratung und Einarbeitung in die Welt des Microarray.

Allen weiteren MitarbeiterInnen des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie desgleichen ein großes Dankeschön für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen danke ich: Meinen unübertrefflichen „Gilmore Girls“ und führenden Echi-Expertinnen Verena Gelmedin und Kerstin Epping für so viele unvergessliche Abende voller „philosophischer“ Diskussionen und unbändiger Lachanfalle und natürlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit! Meiner bezaubernden Lieblings-Grombühlerin Andrea Villwock und dem sympathischen Energiebündel Iwona Wozniok für die allzeit geduldigen Ohren und die aufbauenden Worte in so mancher Durststrecke. Ein dickes Extradankeschön gehört Dirk „DLMDW“ Radloff, der mich zwar nie in das Geheimnis von „DDD“ einweihte, mir dafür aber „HDA“ und jederzeit ein umwerfendes Lächeln schenkte. Den „Reidlmeiers“ Ursula Panzner, Joanna Nikulin, Florian Czapek sowie Kristina Keidl, Barbara Heyne und Paul Schuster danke ich nicht zuletzt für die tolle Zeit im Labor 305 und die berühmt berüchtigten Kaffeepausen.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen von Herzen bedanken. Besonders danke ich meinem „kleinen“ Bruder, der am Fortschritt meiner Arbeit immer reges Interesse zeigte und v. a. in den letzten sechs Monaten meine diversen Enttäuschungen darüber, dass es mal wieder nicht schnell genug voran ging, so tapfer ertrug.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>I Summary</b>	<b>4</b>
<b>II Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1. Das Bakterium <i>Vibrio cholerae</i></b>	<b>8</b>
1.1 Charakteristische Merkmale und Serotypisierung	8
1.2 Die Ökologie von <i>V. cholerae</i>	9
1.3 Verschiedene Aspekte der Cholera	11
1.3.1 Historie	11
1.3.2 Übertragung, Verlauf, Therapie	12
1.3.3 Molekulare Aspekte der Infektion	14
<b>2. Chemotaxis und Motilität beeinflussen die Virulenz von <i>V. cholerae</i></b>	<b>18</b>
<b>3. Alternative Sigmafaktoren</b>	<b>20</b>
<b>4. Der Masterregulator RpoS</b>	<b>23</b>
4.1 Das $\sigma^S$ -Regulon	23
4.2 Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration	25
4.3 Regulation der $\sigma^S$ -Proteolyse – Das „ $\sigma^S$ -Turnover“	27
<b>5. RpoS in der <i>V. cholerae</i> Pathogenese</b>	<b>30</b>
<b>6. Osmostress-Adaptation: Signalintegration für RpoS-kontrollierte Stress-Reaktionen?</b>	<b>31</b>
<b>7. Zielstellung der Arbeit</b>	<b>33</b>
<b>III Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>1. Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide</b>	<b>35</b>
<b>2. Geräte und Chemikalien</b>	<b>39</b>
<b>3. Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen</b>	<b>40</b>
3.1 Medien	41
3.2 Medienzusätze	42
3.3 Wachstumsbedingungen	43
<b>4. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>43</b>
4.1 Präparation von chromosomaler DNA	43
4.2 Präparation von Plasmid-DNA	44
4.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung und Ligation	44
4.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	45
4.5 PCR und Aufkoch-PCR	46
4.6 DNA-Sequenzierung	47
4.7 Southernblot	48
4.8 Plasmidkonstruktionen	50
4.8.1 Konstruktion von pGP704-Derivaten für Insertionsmutationen	51
4.8.2 Konstruktion von pCVD-Derivaten für Deletionsmutationen	51
4.8.3 Expressionsplasmide – pQE30-Derivate	52
4.8.4 Konstruktion des Komplementationsplasmids pBAD18-KanclpX	53
4.9 DNA-Microarray	53
4.9.1 Präparation von RNA aus Flüssigkultur	55
4.9.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA	56

4.9.3	Verdau der RNA mit DNase	57
4.9.4	Reverse Transkription – Synthese von cDNA mit Cy-Labeling	57
4.9.5	DNA-Microarray	58
<b>5.</b>	<b>Mikrobiologische und genetische Methoden</b>	<b>60</b>
5.1	Konjugation	60
5.2	Transformation	61
5.3	Stammkonstruktionen	62
5.3.1	Inaktivierung eines Gens durch Insertion	62
5.3.2	Inaktivierung eines Gens durch Deletion – Sucrose-Selektion	63
<b>6.</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>64</b>
6.1	Expression des <i>V. cholerae</i> RpoS als rekombinantes Protein mit N-terminaler HisTag-Fusion	64
6.2	Aufreinigung HisTag-fusionierter Proteine	65
6.3	Ultrafiltration	66
6.4	Präparation von Gesamtzellextrakten	67
6.5	SDS-PAGE	67
6.6	Coomassiefärbung	69
6.7	Immunoblot-Analysen	69
6.7.1	Das Semidry-Transfer-Verfahren	70
6.7.2	Immundetektion mit Anti-HisTag-Antikörpern	70
6.7.3	Immundetektion mit Anti-RpoS ( <i>V. cholerae</i> )-Antiserum	71
6.8	Zwei-dimensionale Gelelektrophorese	71
6.8.1	Probenvorbereitung – Isolierung von Gesamtzellextrakten	72
6.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	73
6.8.3	Isolelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten	74
6.8.4	SDS-PAGE – 2. Dimension	75
6.8.5	Proteinnachweis mit kolloidaler Coomassiefärbung	77
6.8.6	Auswertung	77
6.9	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität	77
<b>7.</b>	<b>Phänotypische Tests</b>	<b>79</b>
7.1	Wachstum unter verschiedenen Stress-Bedingungen	79
7.2	Überlebens-Assays	80
7.3	RpoS-Akkumulation unter Stress	80
7.4	Proteolyse-Assay	81
7.5	Protease-Assay	81
7.6	Katalasetest	82
7.7	Glycogensynthese	82
7.8	Motilitätstest	82
<b>8.</b>	<b>Computeranalysen</b>	<b>83</b>
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>84</b>
<b>1.</b>	<b>Das RpoS-Protein aus <i>V. cholerae</i></b>	<b>84</b>
1.1	Bioinformatische Analyse des RpoS-Proteins	84
1.2	Aufreinigung des <i>V. cholerae</i> RpoS als rekombinantes Protein mit N-terminaler HisTag-Fusion	85
<b>2.</b>	<b>Akkumulation von RpoS in verschiedenen Stress-Situationen</b>	<b>87</b>
2.1	Stationärphasen-induzierte C-Mangel-Bedingungen	87
2.2	Weitere Stress-Bedingungen	88
<b>3.</b>	<b>Post-translationale Kontrolle des RpoS-Proteins in <i>V. cholerae</i></b>	<b>90</b>
3.1	RpoS-Proteolyse unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	91
3.2	Komponenten der regulierten RpoS-Degradation in <i>V. cholerae</i>	93

3.2.1	Der Proteolyse-, „Targeting“-Faktor RssB	93
3.2.2	Identifizierung der RpoS-degradierenden Protease	95
3.2.3	Die Sensor-Histidinkinase FexB	97
3.2.4	Komplementationsstudien mit ClpX ( <i>E. coli</i> ) und RssB ( <i>E. coli</i> )	97
<b>4.</b>	<b>Phänotypische Analyse der P27459Δ<i>rpoS</i>-Mutante</b>	<b>99</b>
4.1	Überleben in verschiedenen Stress-Situationen	100
4.1.1	Langzeit-Nährstoffmangel	100
4.1.2	Überleben in weiteren Stress-Situationen	102
4.2	Die HA/Protease steht unter der Kontrolle eines RpoS-induzierten Promotors	102
4.3	Katalasetest und Glycogensynthese	103
4.4	Komplementation von <i>rpoS</i> -Phänotypen	104
<b>5.</b>	<b>Identifizierung RpoS-regulierter Gene</b>	<b>107</b>
5.1	2D-Gelelektrophorese	107
5.2	Microarray	109
5.3	Mutationen in <i>rpoS</i> , <i>lon</i> , <i>clpX</i> und <i>rssB</i> beeinflussen die <i>V. cholerae</i> Motilität	110
5.4	Ausprägung eines Chemotaxis-Phänotypen in Abhängigkeit der drei CheA-Homologe von <i>V. cholerae</i>	113
5.5	Die RpoS-Proteolyse in Abhängigkeit der CheA-Kinasen	114
<b>6.</b>	<b>OsmRK und RpoS: Signal-Integration für die post-translationale Kontrolle eines alternativen Sigmafaktors?</b>	<b>115</b>
6.1	Charakterisierung des putativ osmosensitiven Zwei-Komponentensystems OsmRK	116
6.2	Wachstum unter Salzstress	117
6.3	Identifizierung OsmRK-regulierter Gene	119
<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	<b>124</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>142</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang</b>	<b>154</b>
<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>154</b>
<b>2.</b>	<b>Zusätzliche Abbildungen</b>	<b>156</b>
<b>3.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>157</b>
<b>4.</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>158</b>

## I ZUSAMMENFASSUNG

Der alternative Sigmafaktor RpoS ( $\sigma^S$ ) wurde ursprünglich als zentraler Regulator des Stationärphasen-Wachstums in *E. coli* entdeckt. Inzwischen wird dem Transkriptionsaktivator in zahlreichen humanpathogenen Bakterien ebenso die Funktion des Masterregulators der generellen Stressantwort zugesprochen und dessen potentielle Rolle für das jeweilige Virulenzverhalten erforscht. Für das *rpoS*-Homolog des Gram-negativen Pathogens *V. cholerae* wurde in früheren Arbeiten bereits eine Funktion in der generellen Stress-Reaktion demonstriert. Aktuellen Untersuchungen zufolge, konnte zudem die bislang kontrovers diskutierte Rolle des *rpoS*-Genproduktes in der Pathogenese des Cholera-Erregers endgültig belegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Konservierung bekannter RpoS-assoziiierter Funktionen für das *V. cholerae* Homolog untersucht. Dabei ergab die phänotypische Analyse der *rpoS*-Deletionsmutante, dass analog zu der Bedeutung als Regulator des Stationärphasen-Wachstums in *E. coli*, definierte Zelldichte-abhängige Eigenschaften (z. B. zunehmende Glycogensynthese und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz, HapA-Sekretion) in *V. cholerae* gleichermaßen der Kontrolle von  $\sigma^S$  unterliegen. In weiterführenden Experimenten konnte daraufhin die Konservierung der entsprechenden Promotorstrukturen über die funktionelle Komplementierung *rpoS*-abhängiger Gene durch das jeweils speziefremde Protein aufgedeckt werden.

Dahingegen konnte die weitere RpoS-Funktion, welche bei der Ausprägung der generellen Stress-Resistenz u. a. in *E. coli* von Bedeutung ist, für das *V. cholerae* Homolog über den gewählten experimentellen Ansatz nicht belegt werden. Beispielsweise wurden bei der Gegenüberstellung der Überlebensfähigkeiten von *rpoS*-Mutante und Wildtyp entgegen den Angaben früherer Arbeiten für keine der getesteten Stress-Bedingungen signifikante Unterschiede ermittelt. Die in *E. coli* bekannte intrazelluläre Anreicherung des  $\sigma^S$ -Faktors unter diversen Stress-Situationen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der potentiellen Stellung von RpoS als globaler Regulator für Virulenz-assoziierte Gene, unterstützen und ergänzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die gegenwärtige Theorie, wonach RpoS das Ablösen der *V. cholerae* Zellen vom Darm-Epithel fördert. Die postulierte Bedeutung des alternativen Sigmafaktors in dieser letzten Phase des Infektionszyklus („mucosal escape response“) wurde über die  $\sigma^S$ -abhängige Sekretion der Mukin-degradierenden Protease HapA und die hier unabhängig nachgewiesene



Transkriptionskontrolle von Chemotaxis-Genen bestätigt. In diesem Zusammenhang deckten die aktuellen Daten außerdem auf, dass die Motilitätseigenschaften des Bakteriums durch Faktoren der RpoS-Proteolyse-Kaskade beeinflusst werden.

In *E. coli* wird als entscheidender Parameter für die dargelegten RpoS-Funktionen die intrazelluläre Konzentration des Masterregulators angegeben. Deshalb war ein weiteres zentrales Thema dieser Arbeit die Regulation des RpoS-Levels in *V. cholerae*. Neben der Identifizierung von Bedingungen, welche die RpoS-Expression beeinflussen, wurde vorrangig der Kontrollmechanismus der RIP („regulated intracellular proteolysis“) analysiert. In Anlehnung an die detailliert charakterisierte Kaskade in *E. coli* wurden als RpoS-degradierende Komponenten in *V. cholerae* die Homologe des Proteolyse-Targetingfaktors RssB (VC1050) und des ATP-abhängigen Protease-Komplexes ClpXP (VC1922, VC1921) identifiziert. Die weitere Untersuchung der RpoS-Proteolyse ergab außerdem, dass bestimmte Stress-Signale (einschließlich pH, oxidativer Stress, Hitzeschock und Membranstress) den Abbau stark verzögern. Die verlängerte Halbwertszeit des  $\sigma^S$ -Faktors unter diversen Stress-Bedingungen wurde für *E. coli* bereits beobachtet. Allerdings förderten die gleichen Signale zusätzlich die Akkumulation von RpoS, was interessanterweise für das *V. cholerae* Protein nicht beobachtet wurde. Obwohl demnach die post-translationale Kontrolle des alternativen Sigmafaktors in beiden Spezies über vergleichbare Signale vermittelt wird, differieren die molekularen Details. In diesem Zusammenhang zeigte sich beispielsweise, dass das *V. cholerae* Homolog der *E. coli* RssB-aktivierenden Kinase ArcB (VC2369) an der RpoS-Proteolyse nicht beteiligt ist. Indessen deuten die Ergebnisse weiterführender Experimente auf den Einfluss der Kinasen CheA-1 und CheA-3 des *V. cholerae* Chemotaxis-Systems auf die RpoS-Degradation. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein zu *E. coli* abweichendes Modell der RIP für das RpoS-Protein aus *V. cholerae* postuliert, in welchem die aktiven CheA-Kinasen den Targetingfaktor RssB phosphorylieren und somit die RpoS-Proteolyse einleiten. Die Beteiligung von MCP-Rezeptoren an der Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration und damit an der Transkription der Chemotaxis-Gene selbst, beschreibt erstmalig ein Regulationssystem, wonach innerhalb der Chemotaxis-Kaskade die Rezeptoraktivität wahrscheinlich über einen positiven „Feedback-Loop“ mit der eigenen Gen-Expression gekoppelt ist.

Darüber hinaus deutete sich die Beteiligung der ATP-abhängigen Protease Lon an der RpoS-Proteolyse-Kaskade in *V. cholerae* an. Die Inaktivierung der in *E. coli* unter Hitzeschock-Bedingungen induzierten Protease resultierte in einem extrem beschleunigten RpoS-Abbau. Die beobachtete RssB-Abhängigkeit dieses bislang noch nicht beschriebenen Aspektes der

RpoS-Regulation spricht für die Interaktion des unbekanntes Lon-Substrates mit den Faktoren der RIP. Im Ganzen betrachtet, indizieren die gewonnenen Daten zu diesem Zeitpunkt ein zu *E. coli* überwiegend divergentes System für die post-translationale Kontrolle des alternativen  $\sigma^S$ -Faktors in *V. cholerae*.

Ein letztes Teilprojekt dieser Arbeit stellte die Aufklärung der komplexen Regulationsmechanismen der *V. cholerae* Osmostress-Adaptation in den Mittelpunkt des Interesses. Während in *E. coli* dabei der alternative  $\sigma^S$ -Faktor eine zentrale Rolle spielt, konnte die Beteiligung des *V. cholerae* RpoS an der Osmostress-Regulation jedoch nicht aufgedeckt werden. Dafür wurde das neu definierte Osmostress-assoziierte Regulationssystem OsmRK näher charakterisiert. Dabei konnte über die für die Funktionsanalyse des Zwei-Komponentensystems durchgeführten Microarray-Experimente *ompU* als OsmRK-reguliertes Gen unter hypertonen Bedingungen identifiziert werden. Dieses Ergebnis überraschte, da bislang nur der Virulenzfaktor ToxR als Regulator für das Außenmembranporin beschrieben wurde. Die nachgewiesene *ompU*-Transkriptionskontrolle durch zwei Regulatoren führte zu der Hypothese eines unbekanntes regulativen Netzwerkes, welchem mindestens 52 weitere Gene zugeordnet werden konnten.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die in dieser Arbeit durchgeführte molekulare Charakterisierung der RpoS-Proteolyse in *V. cholerae* Beweise für eine mögliche Verbindung zwischen der Transkriptionskontrolle für Motilitäts- und Chemotaxisgene mit der Chemotaxis-Reizwahrnehmung erbrachte. Eine derartige intermolekulare Verknüpfung wurde bislang für keinen anderen Organismus beschrieben und stellt somit eine neue Variante der Signaltransduktion innerhalb der Virulenz-assoziierten Genregulation dar.

## I SUMMARY

The alternative sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ) was identified to be the central regulator of stationary growth control in *E. coli*. This transcriptional activator is also well characterized as master regulator of general stress response in many human-pathogenic bacteria and its potential role for regulating virulence properties was reported, too. For the Gram-negative pathogen *V. cholerae*, previous investigations on RpoS-function already revealed a possible role in general stress response, and only recently a controversial discussion about RpoS involved in cholera pathogenesis came to the conclusion, that in a spartial and timly co-ordinated fashion, the alternative sigma factor serves as major regulator for motility and chemotaxis.

In the present work conserved function of RpoS in *E. coli* was approached for the homologue in *V. cholerae*. Comprehensive phenotypical analysis of  $\Delta rpoS$  mutant and wildtype revealed the involvement of  $\sigma^S$  control in glycogen-synthesis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistance, and secretion of HapA in *V. cholerae*, according to RpoS-function as stationary phase regulator in *E. coli*. In further experiments it could be demonstrated, that transcription of *rpoS*-dependent genes was possible in both *E. coli* and *V. cholerae* by simply exchanging the *rpoS* genes, and so far the conservation of RpoS-promoters in both species was shown.

To the contrary, other well-known  $\sigma^S$ -function of *E. coli*, e. g. providing advances in general stress response, could not be demonstrate for *V. cholerae*. For example by testing several stress conditions in survival assays, no significant differences were determined between *rpoS* mutant and wildtype. Additionally, the intracellular mode of RpoS accumulation in *E. coli* due to different stress conditions was also not observed for RpoS in *V. cholerae*.

Regarding the putative role of RpoS as a regulator for virulence-associated genes, the inhere described data support and complement the current theory of RpoS beeing involved in mucosal detachment of *V. cholerae* cells.

In *E. coli* the intracellular concentration of RpoS is a decisive parameter for its described function. Therefore the regulation of RpoS accumulation and degradation was a central issue in this work, and the mechanism and the components involved in RpoS regulated intracellular proteolysis (RIP) were addressed.

Based on the detailed characterizied regulatory cascade of  $\sigma^S$ -proteolysis in *E. coli* the homologs of the proteolysis targeting factor RssB (VC1050) and ATP-depending terminal protease complex ClpXP (VC1922, VC1921) were identified in *V. cholerae*. Further characterization also unravelled, that various stress signals (including pH, oxidative stress,

heat shock and membrane stress) slow down that degradation. The increase of half-life of  $\sigma^S$  under stress and subsequent accumulation was observed in *E. coli* previously. However, in *V. cholerae* such conditions did not yield in RpoS accumulation.

To summarize: Although both species use the same molecular pathways for post-translational control of RpoS proteolysis, the dynamics of degradation were of complete differences. Therefore, additional investigations were performed to gain more insights into the regulatory path of RpoS degradation in *V. cholerae*.

In *E. coli* the ArcB kinase is the sensor kinase for regulating the activity of RssB. In *V. cholerae* an *arcB* homolog (*fexB*, VC2369) was identified. In this study, *fexB* was knocked-out and RpoS stability was monitored, but no effect could be observed. Therefore, it can be excluded that the ArcB-system is influencing RpoS stability in *V. cholerae*.

Knowing, that RpoS is a major regulator for motility and chemotaxis in *V. cholerae*, it was investigated next whether other signal-kinases are involved in RpoS proteolysis. Thereby, the chemotaxis kinases CheA-1,-2, and -3 were tested. Knockout mutants of *cheAs* and subsequent analysis of RpoS half-life revealed, that *cheA-1* and *cheA-3* did alter  $\sigma^S$  proteolysis to slow down the degradation, whereas *cheA-2* mutant did not. Therefore, it can be postulated, that a different mode of RpoS-RIP is operating in *V. cholerae* in which active CheA-1 and CheA-3 may be responsible for RssB phosphorylation, hence leading to RpoS proteolysis. That kind of interaction may also include the output signalling of the MCP-receptors regulating CheA kinase activity, hence controlling the intracellular RpoS-concentration. Since the *cheA* genes are also under  $\sigma^S$  transcriptional control, as shown by others, a new regulation system can be postulated, where MCP signal output links transcriptional regulation of motility and chemotaxis via RpoS stability in a “positive feedback loop”.

Additionally, data are presented, where the ATP depending protease Lon is also involved in RpoS proteolysis in an inverted manner. Lon, which in *E. coli* is a heat shock induced protease, seems to recognize and degrade substrates in *V. cholerae* operating in  $\sigma^S$  degradation in the RssB-depending branch. That phenotype was observed as an accelerated RpoS degradation in a *lon* knockout background.

Altogether these data indicate, that at least two proteases and the chemotaxis system seems to operate on RpoS-RIP in *V. cholerae*, and this is not known for *E. coli*.

Finally, the complex regulatory pathway of osmo-regulation was characterized. In *E. coli* RpoS plays a central role. However, in *V. cholerae* RpoS could not be identified to participate in osmo-regulation, instead a new defined osmostress-associated regulator, termed OsmRK, was characterized.

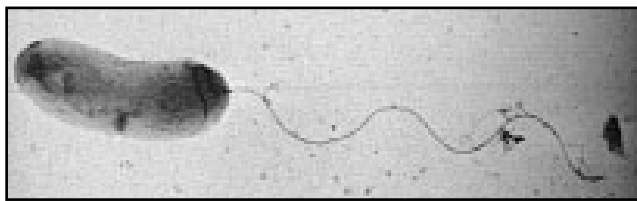
In first analysis, it was found that *osmRK* knockout mutants showed a deregulated *ompU* expression under hyperosmotic conditions. Considering, that so far only the well known virulence regulator ToxR was identified to act on the *ompU* promoter, a novel regulatory network was suggested, which regulates at least further 52 genes.

In summary, the components of RpoS proteolysis in *V. cholerae* were unravelled and characterized. Additionally, evidence could be gathered, which indicates a linkage between transcriptional control of motility and chemotaxis genes and the chemotaxis-signalling pathway. So far, such an regulatory pathway has not been described before and would represent a novel branch of signal transduction in bacteria. As for *V. cholerae*, the RpoS regulatory branch would serve for virulence properties and therefore will extend the so far existing virulence gene regulation system extensively.

## II EINLEITUNG

*„Die Cholera ist in Berlin ausgebrochen; man erwartet sie hier jeden Tag, weil niemand glaubt, dass der Elbkordon sie abhalten werde. Die Stadt ist in sieben Gesundheitsbezirke abgeteilt, und in jedem steht eine Bude auf der Straße, welche das Nötige für schleunige Fälle enthält. Die Wohnungen sind erfüllt von den widerwärtigsten Apparaten. Man kommt zusammen, will nicht vom Unglück des Tages reden – das Gespräch spinnt sich in Hast und Pein eine Zeitlang fort, stockt, man sieht einander stumm an – und unversehens befindet sich die ganze Gesellschaft wieder in der Pestregion [...].“*

(Karl Immerman: Die Cholera droht (Reisebericht, Herbst 1831). In: Peter Schwinning: Die erste Choleraepidemie in Deutschland 1831. Dr. Karl Heinrich Ebermaier: Beobachtungen und Resultate [...] Düsseldorf 1997, p. 117)



**Abb. II-1: Der Cholera-Erreger *V. cholerae*.** Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde von K. E. Klose zur Verfügung gestellt.

Diese erste Cholera-Epidemie in Deutschland kündigte den Vormarsch einer Krankheit an, die aufgrund der begrenzten Behandlungsmöglichkeiten und der hohen Sterblichkeitsrate zu dieser Zeit in allen Bevölkerungsschichten gefürchtet war. Seither wurden dem Cholera-Erreger mindestens acht Pandemien nachgewiesen. Dabei wird der letzte größere Ausbruch der Neuzeit auf den 19. Februar 2006 datiert: Bis zum 19. Juni forderte die Cholera in Angola 46.758 Opfer einschließlich 1.893 Todesfälle (WHO 2007). Trotz der beständigen Fortschritte im Verständnis der Krankheit, beweisen solche regelmäßig auftretenden, lokalen Ausbrüche, dass Cholera noch immer nicht vollständig unter Kontrolle ist. Im Gegenteil: In Entwicklungsländern, in denen sauberes Trinkwasser und medizinische Versorgung nicht gewährleistet werden können, zählt Cholera nach wie vor zu den Hauptgesundheitsproblemen (WHO).

Der Erreger als solcher wurde erstmals 1883 während der 5. Cholera-Pandemie in Ägypten von Robert Koch isoliert. Koch erkannte in dem von ihm als „kommaförmig“ beschriebenen Isolat die Ursache der typischen Cholera-Symptome (150). Später wurde das Bakterium aufgrund seiner Morphologie (Abb. II-1) und der Zuordnung zu dem Krankheitsbild „Cholera“ *Vibrio cholerae* genannt.

## 1. Das Bakterium *Vibrio cholerae*

### 1.1 Charakteristische Merkmale und Serotypisierung

*Vibrio cholerae* ist ein fakultativ humanpathogenes, halophiles, polar monotrich begeißeltes Bakterium, welches zur Familie der *Vibrionaceae* gehört. Die Vertreter dieser Familie sind Gram-negative, teilweise gekrümmte Stäbchen, die sich durch die Befähigung zur Motilität und einem fakultativ anaeroben Energiestoffwechsel auszeichnen. Alle Mitglieder der *Vibrionaceae* sind zudem Oxidase-positiv (168) und können folglich zu der nah verwandten, jedoch Oxidase-negativen Familie der *Enterobacteriaceae*, zu welcher die gut erforschten Gattungen *Escherichia* und *Salmonella* gehören, abgegrenzt werden.

Neben dem bekannten Cholera-Erreger sind aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften noch einige andere *Vibrio* spp. hervorzuheben. So zeigt z. B. *V. fischeri* das Phänomen der Biolumineszenz, deren Mechanismus und Regulation inzwischen gut untersucht sind (182). Andere Mitglieder, wie *V. fluvialis* oder *V. parahaemolyticus*, sind ebenfalls Krankheitserreger und können Durchfall- und Gastrointestinalerkrankungen auslösen (130, 133) oder wie im Fall von *V. alginolyticus* auch extraintestinale Wundinfektionen verursachen (30).

Inzwischen sind mehr als 200 O-Serogruppen von *V. cholerae* bekannt, aber nur die Serogruppen O1 und O139 wurden bisher mit ernsthaften Erkrankungen und Cholera-Pandemien in Verbindung gebracht. Vertreter anderer Serogruppen, die als Nicht O1/ O139-Stämme zusammengefasst werden, sind bisher nur als Verursacher einzelner Durchfallerkrankungen und extraintestinaler Infektionen in Erscheinung getreten (75), obwohl einige dieser Umweltisolate durchaus Virulenzfaktoren besitzen (60, 69, 196, 200). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang ein größerer Ausbruch einer Cholera-ähnlichen Durchfallerkrankung 1968 im Sudan durch die Serogruppe O37 (2, 24), die jedoch seitdem epidemiologisch nicht mehr aufgefallen ist.

Die *V. cholerae*-Stämme der Serogruppe O1 werden auf der Basis physiologischer und biochemischer Parameter in zwei Biotypen unterteilt (281). Dabei unterscheidet sich der O1 „El Tor“ Biotyp durch eine höhere Polymyxin B-Toleranz, eine hämolytische Aktivität sowie die Produktion des Mannose-sensitiven Hämagglutinins (MSHA) von dem „klassischen“ O1-Biotyp (170, 281). In Abhängigkeit vom Methylierungsgrad ihres O-Antigens werden beide Biotypen nochmals in die abundanten Serotypen Ogawa und Inaba, sowie dem wenig verbreiteten Hikojima-Serotyp differenziert (123). Während bei Ogawa-Stämmen

Methylgruppen am O-Antigen nachweisbar sind, fehlen sie bei Inaba komplett. Im Vergleich dazu besitzt der Serotyp Hikojima sowohl methylierte als auch nicht-methylierte LPS-Moleküle (89, 212). Für letzteren *V. cholerae* Serotypen wird zudem über einen weiteren, spezifischen Antigenfaktor diskutiert, der bisher allerdings noch nicht definiert werden konnte (217).

O139-Stämme unterscheiden sich von der Serogruppe O1 hauptsächlich durch ihre Bekapselung. Darüber hinaus wurde 2002 aufgedeckt, dass - von den Genclustern für die Kapsel- bzw. LPS-Synthese abgesehen - die Genome der Serotypen O1 El Tor und O139 im Prinzip identisch sind (64). Diese Beobachtung unterstützt die bis dahin bestehende Vermutung, dass die epidemische Serogruppe O139 durch Serogruppenkonversion aus O1 El Tor-Stämmen hervorgegangen ist (20, 102, 115). Dabei wurden vermutlich die O1-Antigen codierenden Gene über horizontalen Gentransfer mit den Kapsel-Biosynthesegenen ausgetauscht, was wiederum zur Ausbildung der für O139 charakteristischen Kapsel und Antigene führte (23, 131). Strukturanalysen bestätigten, dass die Untereinheiten der O139-Kapsel und die der O139 Antigene identisch sind (148, 149) und dem Kapseltyp 4 angehören (293).

## **1.2 Die Ökologie von *V. cholerae***

*V. cholerae* kommt in der Natur als Bewohner aquatischer Ökosysteme vor (53, 54, 121). Obwohl auch die Serogruppen O1 und O139 durchaus in dieser Umwelt zu finden sind, werden wesentlich häufiger Nicht O1/ O139-Stämme aus Flüssen und Meeresküsten isoliert. Zudem sind die meisten O1-Umweltisolate nicht-toxisch (55). Dieser Umstand führte zu der Hypothese, dass der Gastrointestinaltrakt von Säugetieren das natürliche Habitat endemischer O1- und O139-Stämme ist. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Umwandlung nicht-toxischer Umweltstämme in Cholera toxin (CT)-exprimierende *V. cholerae* der Transduktion mit dem CT-codierenden Phagen CTX $\Phi$  bedarf (75). Dieses mobile genetische Element codiert wichtige Virulenzfaktoren (106) und überträgt diese durch horizontalen Gentransfer auf seinen Wirt. Die dafür notwendige Anreicherung beider Elemente wird im Gastrointestinaltrakt erleichtert, da der CTX $\Phi$  Phage ebenfalls in aquatischer Umwelt vorkommt (151, 221, 284) und somit zusammen mit den Vibrio-Zellen aufgenommen wird.



In seiner Umwelt ist *V. cholerae* O1 häufig auf der Oberfläche mariner Organismen wie Phytoplankton (v. a. Cyanobakterien und Grünalgen), Zooplankton (z. B. Copepoda) oder Crustaceen und Insekten zu finden (53, 166). Diese Assoziation erscheint in Anbetracht des beobachteten zeitlichen Zusammentreffens von Cholera-Ausbrüchen mit der saisonal bedingten Zunahme an Phyto- und Zooplankton besonders interessant (53, 70, 122). Dennoch gibt es keine direkten Beweise, dass die Algenblüte zur Anreicherung pathogener *V. cholerae* per se führt, insbesondere da 2001 gezeigt wurde, dass O1 El Tor und O139 auch an Chitinoberflächen adhärieren können (50). Die Anlagerung wird durch den Typ IV Pilus MSHA („mannose-sensitive hemagglutinin“) vermittelt und vermutlich durch chitinbindende Proteine verstärkt (270). Demnach wird u. a. die Expression des Chitin-regulierten Pilus‘ (ChiRP, früher Pil) durch die Anwesenheit von Chitin induziert und trägt somit zur Kolonisierung bei (86, 181). Darüber hinaus wird spekuliert, dass Chitin nach der Anheftung auch als C- und N-Quelle dienen könnte. Dieser Annahme gemäß konnten sowohl Chitinasen (56, 206) als auch entsprechende Transportsysteme (181) in *V. cholerae* nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang ist des Weiteren bekannt, dass sich die Biotypen O1 klassisch und O1 El Tor hinsichtlich der Expression des MSHA-Pilus unterscheiden: Klassische O1-Stämme weisen zwar *msh*-Gene auf, sind jedoch nicht in der Lage, funktionsfähige Pili auszubilden (50). Das ist insofern für den Lebenszyklus entscheidend, da aufgrund der Assoziation mit Chitin die Ausbildung eines dreidimensionalen Biofilms begünstigt wird, der wiederum das Überleben der Bakterien in andauernden interepidemischen Perioden sichert. Die Entwicklung eines Biofilms an abiotischen Oberflächen bedarf ferner der Expression des Exopolysaccharids VPS und wurde bisher für die Serotypen O1 El Tor und O139 beobachtet (289, 290, 299). Demnach konnten die entsprechenden *vps*-Mutanten die abiotische Oberfläche zwar kolonisieren, scheiterten jedoch an der Ausbildung des Biofilms. Die Produktion von VPS resultiert in einem „Rugose“-Phänotypen und vermittelt eine erhöhte Phagenresistenz (209, 299). Interessanterweise wurde im infantilen Mausmodell nachgewiesen, dass mit der VPS-Synthese die intestinale Kolonisation inhibiert ist (290). Infolgedessen wird vermutet, dass die Expression eines Umweltpersistenz-verstärkenden Faktors die Virulenzfähigkeit einschränkt.

## 1.3 Verschiedene Aspekte der Cholera

### 1.3.1 Historie

Dokumentierte Cholera-Ausbrüche können bis zu den Zeiten von Hippokrates (460-377 v. Chr.) und Buddha zurückverfolgt werden (11). Doch erst mit den epidemiologischen Aufzeichnungen Anfang des 19. Jahrhunderts wurde die „moderne“ Cholera-Forschung eingeleitet. Demnach wird der Zeitpunkt des ersten pandemischen Ausbruchs der Neuzeit auf 1817 datiert. Berichten zufolge ging die bis 1823 währende Pandemie von Indien aus und erstreckte sich entlang der Handelsrouten nach Westen über den gesamten indischen Subkontinent bis nach Südrussland. Im gleichen Jahrhundert folgten fünf weitere Pandemien über die Zeiträume 1829-1851, 1852-1859, 1863-1879, 1881-1893 und 1899-1923 (226), die ausnahmslos von Indien ausgingen, aber 1830 auch europäische Städte und 1866 schließlich Nordamerika erreichten. Ob die Cholera vor 1817 außerhalb von Asien auftrat, ist dabei ebenso ungewiss, wie die Frage nach den Erregerstämmen der 1. bis 4. Pandemie. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der klassische O1 der Verursacher der 5. und 6. Pandemie ist (11). Den verbesserten hygienischen Verhältnissen und der medizinischen Behandlung ist es zu verdanken, dass nachfolgend die Cholera schrittweise zurückgedrängt werden konnte, bis sie 1950 nur noch in Asien zu finden war. Dennoch konnte der Ausbruch der 7. Pandemie 1961 nicht verhindert werden. Diese bisher längste und am weitesten verbreitete Ausbruchswelle geht auf den bis dahin unbekanntes *V. cholerae* Biotyp O1 El Tor zurück. Dieser Erregertyp breitete sich von Indonesien über den mittleren Osten nach Afrika (1970) und weiter nach Südamerika (1991) aus (271). 1992 wurde eine weitere Epidemie mit dem Ursprung in Bangladesch und Indien von *V. cholerae* O139 ausgelöst (1, 233). Späteren Auslegungen zufolge, wurde dadurch nicht nur die 8. Pandemie eingeleitet (268), sondern auch die geläufige These widerlegt, wonach nur Stämme der Serogruppe O1 Cholera verursachen könnten. Der O139 Erreger breitete sich schnell über Pakistan, China, Thailand, Afghanistan und Malaysia aus (51, 250). Darüber hinaus wurden aus Großbritannien und den USA ebenfalls Infektionen gemeldet (57).

Seitdem sind die *V. cholerae* Serotypen O1 klassisch, O1 El Tor und O139 in den endemischen Gebieten nebeneinander zu finden, wobei letzterer immer wieder saisonale Cholera-Ausbrüche bewirkt (75). Aus diesem Grund verstarben beispielsweise im Jahr 2002 innerhalb weniger Wochen 30.000 Menschen in Dhaka, Bangladesch, weit mehr als jemals durch O1-Infektionen in einem vergleichbaren Zeitraum (76).

Die durchschnittliche Infektionsrate wird derzeit auf 200.000 Fälle pro Jahr geschätzt, wobei ca. 2000-3000 der Erkrankungen tödlich verlaufen. Zu den bekannten aktuellen endemischen Gebieten gehören 28 Länder in Afrika, 17 in Amerika und 26 in Asien. Für den Normaltouristen besteht jedoch mit 1:500.000 pro Reisemonat ein relativ geringes Erkrankungsrisiko (WHO 1995).

### 1.3.2 Übertragung, Verlauf, Therapie

Die Übertragung des Erregers auf seinen menschlichen Wirt erfolgt oral über die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel (z. B. Krabben, Muscheln) oder verunreinigten Trinkwassers (61, 140). In Abhängigkeit von der Infektionsdosis beträgt die Inkubationszeit 12-72 h (46). Aus entsprechenden Studien mit *V. cholerae* O1 Stämmen an Freiwilligen geht hervor, dass für die Ausprägung von Cholera-Symptomen die Aufnahme von mindestens  $10^8$  Bakterien notwendig ist (19). Diese recht hohe Infektionsdosis erklärt sich dadurch, dass die aufgenommenen Bakterien zunächst gegen den niedrigen pH-Wert des Magens bestehen müssen, bevor sie ihren eigentlichen Kolonisationsort, den Dünndarm, erreichen. Gestützt wird diese These durch Experimente, in denen *V. cholerae* O1 in Kombination mit einem pH-Puffer verabreicht wurden, wonach die Krankheitssymptome bereits durch  $10^4$  Bakterien hervorgerufen wurden (19).

1-2 h nach der Aufnahme erreicht der Erreger dann den oberen Dünndarmtrakt (Duodenum). Unter Verwendung der Flagelle und sekretierter hydrolytischer Enzyme penetriert *V. cholerae* die Mukosa des Darms und adhärirt schließlich an die Epithelzellen (79, 136). Die Sekretion des Symptom-auslösenden Cholera-toxins erfolgt nach der erfolgreichen Bildung von Mikrokolonien an den Epithelzellen (161). Das CT selbst bewirkt den Aufbau eines osmotischen Gradienten, der einen passiven Wasserausstrom aus den Epithelzellen in das Darmlumen zur Folge hat. Mit dem daraus resultierenden, sogenannten Reiswasser-Stuhl gelangen die toxischen *V. cholerae* Stämme zurück in die Umwelt, wo sie erneut Infektionen auslösen können (für Details siehe Abschnitt II-1.3.3 „Das Cholera-toxin“).

Für die Betroffenen äußert sich eine Erkrankung meist sehr plötzlich in heftigen Durchfällen, Erbrechen und Magenkrämpfen. Ein an Cholera erkrankter Erwachsener kann bis zu 20 l Wasser pro Tag über seinen Stuhl verlieren (8). Die Gefahr der Cholera besteht damit in dem extremen Wasserverlust und der damit verbundenen Dehydrierung lebenswichtiger Organe. Ein Austrocknen der Haut, eingesunkene Augen und das Eindicken des Blutes sind die Folgen. Weitere Symptome sind Hypotonie, Tachycardie, eine erhöhte Atemfrequenz und

Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma. Ohne medizinische Behandlung führt der rasche Wasserverlust bei über 20% der Patienten zum Tod (19).

Die bisher wirksamste Therapie ist ein schneller Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolytverlustes über intravenöse Applikation. Antibiotika können den Verlauf der Krankheit zwar verlangsamen, sind jedoch ohne gleichzeitige Rehydrierung unwirksam (241).

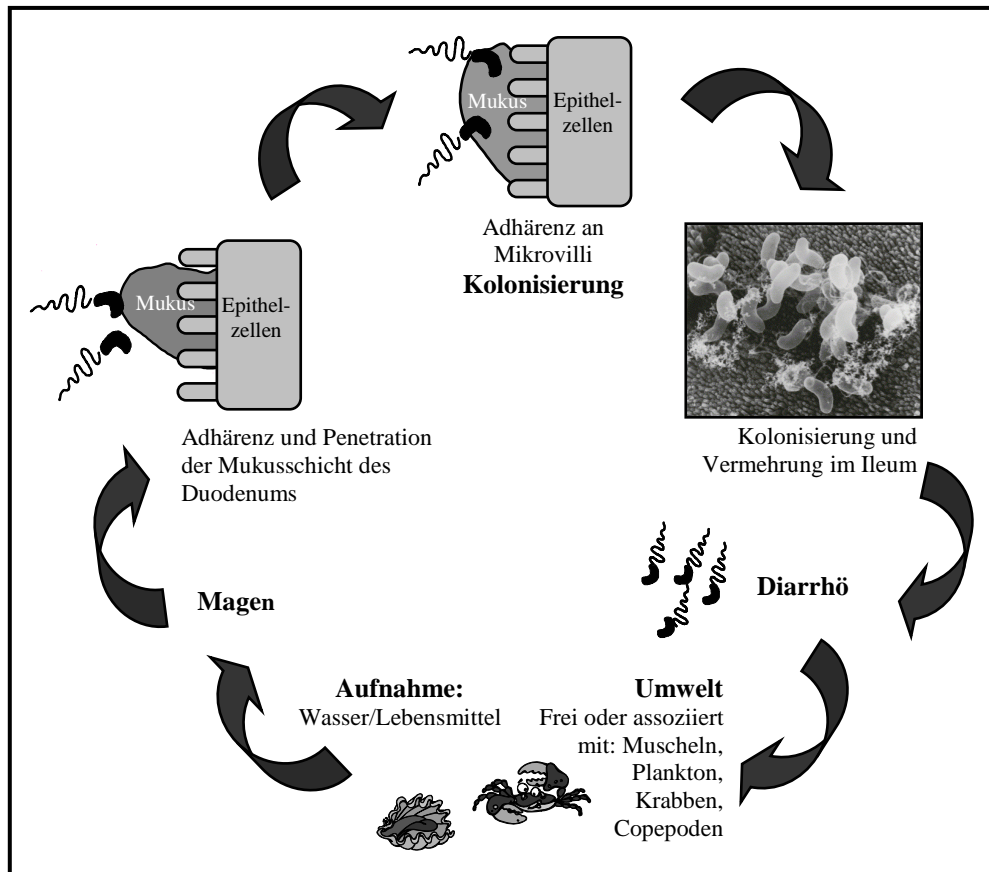


Abb. II-2: Der Infektionszyklus von *V. cholerae* (modifiziert nach 235).

Weiterführende Infektionsversuche mit klinischen Isolaten ergaben, dass *V. cholerae* Zellen, die den Magen-Darmtrakt erfolgreich passieren konnten, im Vergleich zu *in vitro*-Kulturen ein signifikant höheres Virulenzpotential besitzen (184). Dies erscheint in Anbetracht des Infektionszyklus (vgl. Abb. II-2) nicht verwunderlich, ist das Bakterium doch fortwährend wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt: Neben Temperatur- und Osmolaritätsschwankungen infolge des Eintritts in den Wirt, variiert der pH-Wert beim Übertritt vom Magen (pH ~2) in den Dünndarm (pH ~5,6). Das Überleben von *V. cholerae* im Gastrointestinaltrakt ist außerdem von Gallensäuren und Verdauungsenzymen bedroht. Zudem sind in den Epithelzellen des Dünndarms Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Defensine und Faktoren des Komplementsystems, wirksam (5, 169). Die Besiedlung des lebensfeindlichen Raums erfordert demnach die Expression spezifischer Virulenzfaktoren.

### 1.3.3 Molekulare Aspekte der Infektion: Die Virulenzfaktoren von *V. cholerae*

Das Interesse an dem humanpathogenen Cholera-Erreger führte im Rahmen des *V. cholerae* Genomprojektes im Jahr 2000 zur Veröffentlichung der kompletten DNA-Sequenz des Stammes O1 El Tor N16961 (106). Daraus geht hervor, dass auf zwei zirkulären Chromosomen 3885 offene Leseraster (ORFs) codiert werden. Auf dem Chromosom 1 (2,96 Mb) befinden sich hauptsächlich Gene, die eine Rolle in Bezug auf Wachstum, Aufrechterhaltung essentieller Zellfunktionen, Virulenz, Sekretion und LPS-Biosynthese spielen. Dahingegen sind auf dem kleineren 2. Chromosom (1,07 Mb) zahlreiche zusätzliche metabolische Funktionen lokalisiert.

Mit der Verfügbarkeit der kompletten Genom-Sequenz wurde die Aufschlüsselung der Cholera-Pathogenese entscheidend vorangetrieben. Demnach ist für die Ausprägung der Krankheit das Zusammenwirken von Kolonisierung, koordinierter Expression von Virulenzfaktoren und Wirkungsweise des Toxins nötig (235).

#### **Kolonisationsfaktoren**

Die bisher bekannten Genprodukte, welche die Kolonisierung des eigentlichen Wirkungsortes von *V. cholerae* vermitteln, wurden im Tiermodell aufgedeckt. Dazu zählen neben TCP („toxin-coregulated pilus“, 272), ACFs („accessory colonization factors“, 222), MFRHA („mannose-fucose-resistant hemagglutinin“, 82), TolC (25), regulatorische Proteine (z. B. ToxR/S, TcpP/H, ToxT, 45, 47, 272), Biotin- und Purin-Biosynthesegene (48) sowie Bestandteile des LPS („Lipopolysaccharid“) (9, 10, 49). Des Weiteren sind verschiedene Außenmembranporine, u. a. OmpU und OmpT, zu nennen, die wiederum die Resistenz des Bakteriums gegenüber Gallensäuren und antimikrobiellen Peptiden bedingen (174, 228, 229). Darüber hinaus scheint das Eisen-regulierte Protein IrgA (93) eine essentielle Rolle zu spielen; *irgA*-Mutanten sind im Tiermodell attenuiert (92). Gleiches gilt für Stämme mit defekter oder fehlender Flagelle (237, 290).

Neben TCP verfügt *V. cholerae* über zwei weitere Typ IV-Pili. Doch im Gegensatz zu MSHA und ChiRP, die bei der Anheftung des Bakteriums in seiner aquatischen Umgebung von Bedeutung sind, übernimmt bei der Besiedlung des Dünndarms nur TCP eine essentielle Funktion (6, 86, 114, 181). Dabei tritt TCP als homogenes Polymer in Erscheinung, welches sich aus dem *tcpA*-codierten Genprodukt zusammensetzt und zudem dem Phagen CTX $\Phi$  als Rezeptor dient (284). In seiner Funktion als Besiedlungsfaktor scheint TCP jedoch nicht direkt an das intestinale Epithel zu adhären. Vielmehr wird seine Beteiligung an der Ausbildung von Mikrokolonien postuliert (145).

Die für die TCP-Synthese benötigten Gene sind zusammen mit anderen Kolonisationsfaktoren wie den *acf*-Genen und jenen für die Transkriptionsaktivatoren ToxT und TcpP, auf einem ca. 40 kb großem Sequenzabschnitt codiert, der als VPI („*Vibrio* pathogenicity island“) bezeichnet wird (138, 151).

### **Das Cholera-Toxin**

Die Cholera-typischen Symptome werden durch das Choleratoxin ausgelöst (272). Über die Wirkungsweise des aus fünf B-Untereinheiten und einer A-Polypeptidkette zusammengesetzten Toxins ist bekannt, dass die B-Komponenten zunächst die Adhäsion des Toxins an den GM<sub>1</sub>-Gangliosidrezeptor der intestinalen Epithelzellen vermitteln. Während dieser Bindung wird die A-Kette in das Cytoplasma der Wirtszelle eingeschleust. Nach ihrer Aktivierung durch eine Thiol-abhängige Reduktion interagiert die A-Untereinheit mit der  $\alpha$ -Untereinheit von G<sub>S</sub>-Proteinen und führt zu deren ADP-Ribosylierung. Das nun geblockte G<sub>S $\alpha$</sub>  ist nicht mehr in der Lage, GTP zu GDP zu hydrolysieren, was die konstitutive Aktivierung der Adenylatzyklase zur Folge hat. Dadurch wiederum steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel, infolgedessen der Signaltransduktionsweg der Proteinkinase A aktiviert wird. Die von der Kinase phosphorylierten Targetproteine inhibieren die aktive Aufnahme von Natrium- und Chloridionen, fördern aber gleichzeitig die Chlorid- und Bicarbonat-Sekretion. Der daraus resultierende Ionenverlust der Epithelzellen bedingt einen passiven Wasserstrom ins Darmlumen (135), wodurch nicht nur das Ausströmen des Bakteriums aus seinem Wirt begünstigt wird, sondern letztlich auch die typischen Symptome der Cholera verursacht werden.

Über die Bedeutung des CT für *V. cholerae* außerhalb des Wirts ist bislang nichts bekannt. Zumal die benötigten Gene nicht im *V. cholerae* Genom selbst, sondern auf dem filamentösen Phagen CTX $\Phi$  codiert werden (285). Somit erfordert die CT-Synthese zunächst eine Transduktion, bevor die entsprechenden Gene über den Phagen spezifisch in das Chromosom 1 von *V. cholerae* integriert werden. Andererseits kann der Phage auch extrachromosomal im Cytoplasma in Plasmidform replizieren. In dieser Form ist die CT-Expression einer ToxT-unabhängigen Phagen-Regulation unterworfen (159).

### **Koordinierte Regulation wichtiger Virulenzfaktoren**

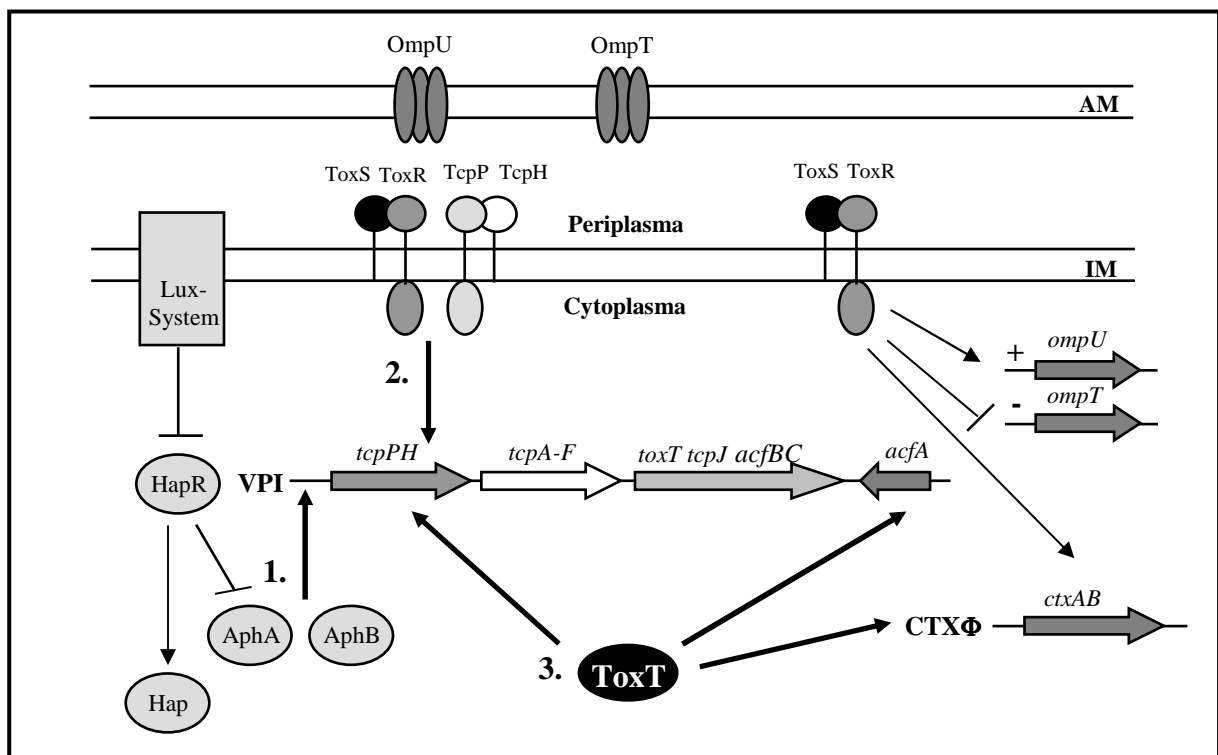
Zu den wichtigsten und infolgedessen am besten charakterisierten Virulenzfaktoren zählen das CT und der TCP. Die Expression beider Proteine wird durch ein Regulationssystem

kontrolliert, dessen Hauptkomponenten, die Transkriptionsaktivatoren ToxT, TcpP und ToxR, gleichermaßen eine Rolle bei der Ausprägung der Virulenzeigenschaften spielen (45, 47, 272). Ursprünglich wurde das ToxR-Regulon als eine Gruppe von Genen definiert, die mit Ausnahme von *ompU* und *ompT* vorwiegend auf der *V. cholerae* Pathogenitätsinsel (VPI) bzw. dem CTX $\Phi$ -Phagen lokalisiert sind (222). Aktuelle Transkriptom-Analysen zufolge unterliegen mindestens 150 Gene der Kontrolle von ToxR (26). Allerdings konnten die Umweltsignale, welche die ToxR-Kaskade beeinflussen, *in vivo* noch nicht definiert werden. Dahingegen konnte die Induktion des Regulons durch Stimuli wie pH, Temperatur, Osmolarität, die Anwesenheit von Gallensäuren oder Aminosäuren *in vitro* nachgewiesen werden (258). Außerdem wurde die Expression der Virulenzgene durch die Kultivierung der Bakterien in dem tryptonreichen, alkalischen AKI-Medium erzielt (124, 180).

Eine Schlüsselstellung in dem ToxR-Regulationssystem nimmt der Transkriptionsaktivator ToxT ein (Abb. II-3). Die Inaktivierung von *toxT* resultierte dementsprechend in avirulenten Stämmen (47). Dieser AraC-ähnliche Regulator wird ebenfalls auf der VPI codiert, wobei die Transkription von *toxT* wiederum durch die Proteine ToxR und TcpP synergistisch aktiviert wird (104, 116). Beide Transmembranproteine liegen an der inneren Zellmembran jeweils als ToxR/ ToxS- bzw. TcpP/ TcpH-Paar vor. Innerhalb der Regulationskaskade wird dabei für TcpH eine stabilisierende Funktion für seinen Partner postuliert. Diese These beruht auf der Beobachtung, dass Mutationen in *tcpH* zu einer massiven Degradation von TcpP führten, ohne dessen Expression zu beeinflussen (13). Die Schutzfunktion von ToxS vor proteolytischen Angriffen gegen ToxR wurde in ähnlichen Experimenten beschrieben (223). Zudem wird eine Rolle von ToxS bei der Faltung und Dimerisierung von ToxR vermutet (62, 65). Auf molekularer Ebene stellt sich die Situation dahingegen wie folgt dar: Während *tcpP* neben *tcpH* auf der VPI lokalisiert ist (138), befindet sich *toxR* in einem Operon mit *toxS* in einer anderen Region des Chromosoms (62, 151).

Zusammengefasst ergibt sich damit für die Expressionskontrolle der Virulenzfaktoren in *V. cholerae* folgende Koordination: Die Transkription der für die Ausprägung der Virulenz verantwortlichen Genprodukte wird erst unter intestinalen Bedingungen aktiviert. Dabei induzieren Signale wie der veränderte pH-Wert, Temperatur- und Osmolaritätsschwankungen zunächst die Expression des Schlüsselfaktors der Kaskade, ToxT. Die Aktivität des Regulators wird zudem durch die Anwesenheit von Gallensäuren beeinflusst. (248). Das ist insofern von Bedeutung, da in den ersten Phasen der Infektion ToxT zwar synthetisiert wird, die nachgeschalteten Virulenzfaktoren jedoch nicht exprimiert werden. Erst wenn das Bakterium in das Darmepithel übertritt und damit die Gallensäurekonzentration sinkt, wird ToxT aktiv

und leitet die Expression der Virulenzgene ein (Abb. II-3-3). ToxT wiederum wird vermutlich durch die Transkriptionsaktivatoren TcpP und ToxR gemeinsam kontrolliert (Abb. II-3-2). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Signale, welche die Transkription von *toxT* stimulieren, auch die Synthese von TcpP induzieren (203). Diese Kontrolle des *tcpP*-Gens wird durch das AphA/B-System vermittelt (Abb. II-3-1, 154, 203, 258). Die fehlende Expression von ToxT oder TcpP in *aphA*- und *aphB*-Mutanten stützt diese Annahme (152). Das resultierende *tcpP*-Genprodukt trägt seinerseits über die Aktivierung von ToxT zur regulatorischen Kaskade bei.



**Abb. II-3: Regulationskaskade zur Kontrolle der wichtigsten *V. cholerae* Virulenzfaktoren (modifiziert nach 235, 302).** 1. Das AphA/B-System induziert die Transkription von VPI-Genen. 2. Das Genprodukt TcpP aktiviert zusammen mit ToxR den Regulator ToxT. 3. ToxT induziert die Expression der Virulenzfaktoren. Weitere Details sind im Text beschrieben. AM) Außenmembran, IM) Innenmembran.

In dem Regulationssystem der *V. cholerae* Virulenzfaktoren nimmt ToxR eine Sonderstellung ein: Neben seiner Funktion als Transkriptionsaktivator von ToxT fungiert ToxR zusätzlich als Regulator für die Außenmembranporine OmpU und OmpT. Dabei wird die Transkription von *ompU* durch ToxR aktiviert, während gleichzeitig die Expression von *ompT* reprimiert wird (58, 164, 262). In Übereinstimmung dazu konnte gezeigt werden, dass in einer *toxR*-Mutante OmpU nicht mehr exprimiert wird (192).

Aktuelle Untersuchungen postulieren für die Expressionskontrolle der Virulenzgene eine Beteiligung des „Quorum-Sensing“-Systems LuxOPQU (153, 302). Demnach inhibiert dieses



System bei geringer Zellzahl zu Beginn einer Infektion den Virulenzgen-Repressor HapR, wodurch die Synthesekaskade der Virulenzfaktoren eingeleitet wird. Nach der effektiven Besiedlung des Wirts nimmt aufgrund der hohen Zellzahl die Konzentration des Autoinduktors AI-2 zu, infolgedessen die Expression von HapR induziert wird. HapR wiederum reprimiert *aphA*, was die reduzierte Expression der Virulenzfaktoren zur Folge hat. Gleichzeitig aktiviert HapR die HA-Protease (Hap) und fördert somit das Ablösen der Zellen vom Mukus und auf diese Weise die Freisetzung von *V. cholerae* aus dem Darm (80, 254).

## 2. Chemotaxis und Motilität beeinflussen die Virulenz von *V. cholerae*

Der Infektionszyklus des aquatischen Humanpathogens *V. cholerae* lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Außerhalb seines Wirtes befindet sich das Bakterium in einer frei-schwimmenden Phase, die sich durch die fehlende Expression der Hauptvirulenzfaktoren CT und TCP auszeichnet (285). Es folgt die sessile Kolonisationsphase des Pathogens, in der sich *V. cholerae* auf der Basis nun produzierter Virulenzfaktoren an das Epithelium des Dünndarms anheftet, repliziert und die typischen Cholera-Symptome hervorruft. Daraufhin löst sich das Bakterium von seinem Kolonisationsort und verlässt den Wirt über den reiswasserartigen Stuhl zurück in die Umwelt (zusammengefasst in Abb. II-2).

Die Motilität der *V. cholerae* Zellen während der frei-schwimmenden Phase lässt sich auf die Verwendung eines polaren, mit LPS ummantelten Flagellums zurückführen. Folglich ist die Expression der entsprechenden Synthesegene ein wichtiger Aspekt dieser Phase. Darüber hinaus begünstigt die Befähigung zur Motilität die Ausprägung einer Chemotaxis-Reaktion. Beiden Eigenschaften wurde in der Vergangenheit eine essentielle Rolle bei der Etablierung der Infektion zugesprochen (85, 237). Inzwischen wurde gezeigt, dass definierte, nicht-motile Mutanten des O1 El Tor Biotyps, mit und ohne Flagellum, im Infektionsmodell mit infantilen Mäusen stark attenuiert, aber dennoch hypervirulent sind (162). Im Gegensatz dazu hatte der Verlust der Chemotaxis allein keine Beeinträchtigung der *V. cholerae* Infektionsfähigkeit zur Folge (83, 162). Im Gegenteil: Motile, nicht-chemotaktische O1 El Tor setzten sich im Infektionsmodell im Vergleich zum Wildtyp deutlich durch (83, 162).

Im Gegensatz zu *Vibrio* sp. sind die Chemotaxis-Systeme der verwandten *Enterobacteriaceae*-Vertreter *E. coli* und *S. typhimurium* bereits weitreichend charakterisiert. Demnach ist für die chemotaktische Adaptation an die bisher bekannten Stimuli (Aspartat, Ribose, Galaktose, Serin, Dipeptide, Zitrat, das Redoxpotential der Cytoplasmamembran) die

Kooperation eines membranständigen Rezeptors (auch Transduktor oder „methyl-accepting chemotaxis protein“ genannt) mit sechs cytoplasmatischen Proteinen - CheA, CheW, CheR, CheB, CheY und CheZ - erforderlich.

In beiden Spezies bilden die homodimeren Chemorezeptoren mit der ebenfalls homodimeren Sensor-Histidinkinase CheA, dem Kopplungsprotein CheW sowie den Response-Regulatoren CheY und CheB einen Komplex (Abb. II-4). Die Formierung des Komplexes aktiviert die ATP-abhängige Autophosphorylierung von CheA, wobei das  $\gamma$ -ständige Phosphat des ATP auf ein Histidin der Kinase transferiert wird. Das Phosphat wird daraufhin auf einen Aspartylrest von CheY übertragen, was wiederum die Aktivierung des Regulators zur Folge hat. Das phosphorylierte CheY interagiert daraufhin mit dem Flagellenmotor und verändert dessen Rotationsstatus von CCW („counterclockwise“, gegen den Uhrzeigersinn) zu CW („clockwise“, im Uhrzeigersinn), infolgedessen die geradlinige Schwimmbewegung in ein unkoordiniertes Taumeln übergeht. Dieses Taumeln ermöglicht die Neuorientierung der Zelle in eine andere, zufällig gewählte Richtung. Der Zeitpunkt der Bewegungsänderung erfolgt in Abhängigkeit der Konzentration des chemotaktischen Reizes, die das Bakterium während des gesamten Laufes senst. Ergibt der Vergleich des aktuellen Ergebnisses eine Differenz zu dem vorher bestimmten Wert, erfolgt die Umschaltung in die Taumelphase.

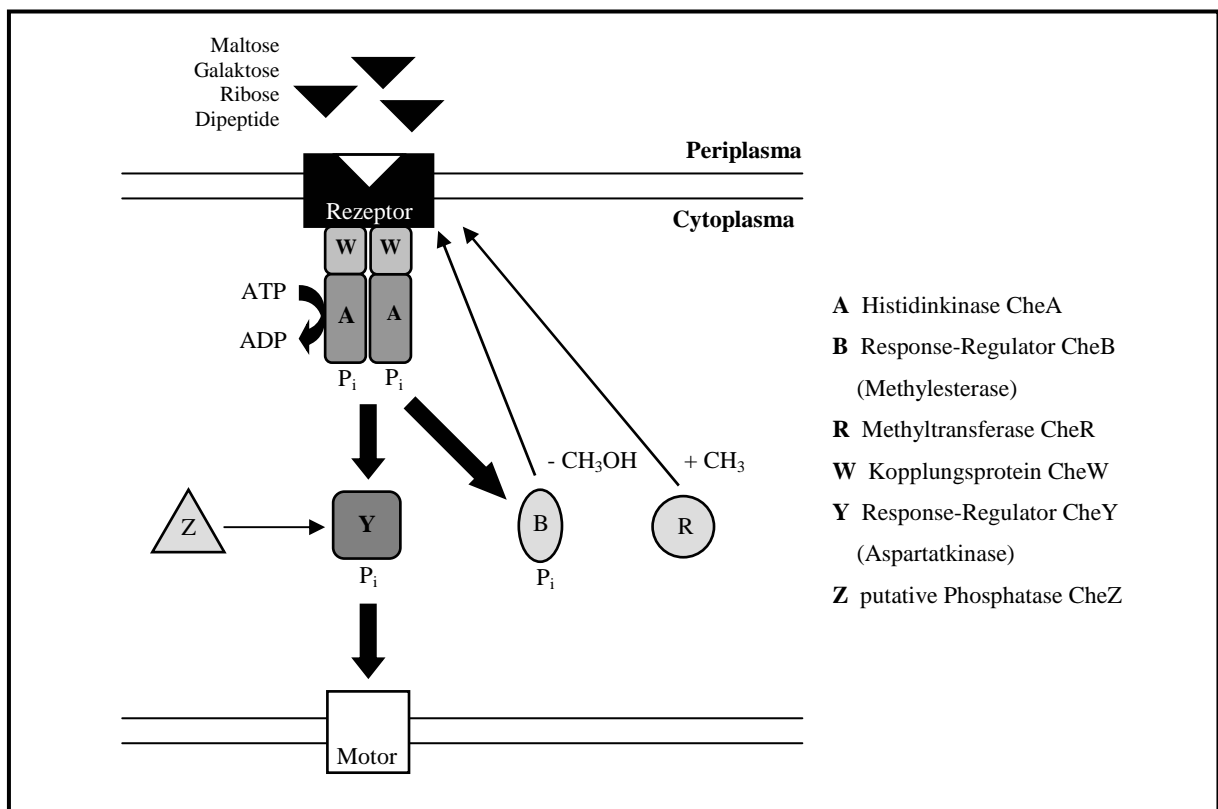


Abb. II-4: Komponenten des Chemotaxis-Systems in *E. coli* und *S. typhimurium* und ihre Vernetzung. Zusammengefasst nach 22, 29, 63, 73, 236, 238.

Ohne den Gradienten eines chemotaktischen Reizes unterliegt die Kontrolle des Chemotaxis-Systems CheZ. Die Phosphatase stimuliert die schnelle, natürliche Hydrolyse des phosphorylierten CheY, wodurch die intrazelluläre Konzentration des Response-Regulators ein gewisses Basislevel nicht übersteigt. In dieser Situation verursacht das phosphorylierte CheY eine zufällige 3D-Wanderung des Bakteriums, bedingt durch den Wechsel zwischen Schwimmen und Taumeln. Wird dahingegen ein Gradient wahrgenommen, bewirkt das Binden der chemotaktischen Stimuli an die Chemorezeptoren die Inhibierung der CheA-Autophosphorylierung. In der Folge sinkt der zelluläre Gehalt an phosphoryliertem CheY, was die Möglichkeit des Taumelns reduziert, so dass sich die Phase der geradlinigen Schwimmbewegung verlängert.

Insgesamt betrachtet ergibt sich die Chemotaxis demnach überwiegend aus der Modifikation der Flagellenrotation. Aufgrund des einzelnen, polaren Flagellums taumelt *V. cholerae* jedoch nicht per se. Statt dessen bewirkt eine schnelle Umkehr der Schlagrichtung eine zufällige Neuorientierung des Bakteriums (40) und damit die Befähigung zur Chemotaxis. Diese Eigenschaft ist für *V. cholerae* insofern von Bedeutung, als dass sie nicht zuletzt die Überlebenschancen in dessen natürlicher Umgebung maßgeblich erhöht. Darüber hinaus wird der - wenn auch noch nicht klar definierte - Beitrag in der sessilen Kolonisationsphase des aquatischen Humanpathogens postuliert: Nach dem Erreichen des Dünndarms muss das Bakterium die Mukosa der Darmwand durchdringen, um seinen eigentlichen Kolonisationsort, die Epithelzellen, zu erreichen. Dieser Vorgang wird vermutlich durch Chemotaxis und die flagellen-abhängige Motilität vermittelt (41, 84, 207).

Obwohl eine detaillierte genetische Analyse des Chemotaxisverhalten für *V. cholerae* noch aussteht, ist bereits bekannt, dass im Genom des Erregers multiple Paraloge der bekannten Chemotaxisgene vorhanden sind (106). Darüber hinaus werden die Chemotaxis-assoziierten Gene insgesamt drei Gruppen zugeordnet. Nach Gosink et al. (95) ist jedoch nur eines der drei Cluster tatsächlich für die Ausprägung des chemotaktischen Verhaltens verantwortlich. Über die Funktion der verbleibenden Gene kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden.

### **3. Alternative Sigmafaktoren**

Bis in die frühen 1980er hinein wurde davon ausgegangen, dass eine hochspezifische Anpassung des humanpathogenen Erregers *V. cholerae* an seinen Wirt die

Überlebensfähigkeit des Bakteriums außerhalb des menschlichen Gastrointestinaltraktes auf wenige Stunden bis Tage beschränkt (282). Nachfolgende Studien, in denen *V. cholerae* als freilebendes Bakterium oder in Assoziation mit Phytoplankton, Zooplankton, Crustaceen und Mollusken isoliert werden konnte (70, 118, 119, 121), widerlegten diese These. An ihre Stelle trat die Überzeugung, dass das Bakterium in der Lage sei, mehr als eine ökologische Nische in einer Vielzahl aquatischer Habitats zu erobern zu können (298). Dass sich *V. cholerae* durch physiologische und morphologische Veränderungen nachweislich an schwankende Umweltbedingungen anzupassen vermag (255, 256), stützt diese Theorie. Dabei scheint die wiederholt beobachtete Adaptationsfähigkeit nicht nur beim Überdauern interepidemischer Phasen von Vorteil zu sein, vielmehr erleichtert sie dem Bakterium den stress-reichen Übertritt in seinen Wirt.

Die zelluläre Reaktion auf völlig veränderte Milieubedingungen wird durch eine Klasse von Proteinen vermittelt, welche als Sigmafaktoren bekannt sind. Dabei handelt es sich um essentielle, abtrennbare Untereinheiten der prokaryotischen RNA-Polymerase (141). Die  $\sigma$ -Faktoren ergänzen das Core-Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ) der RNA-Polymerase (RNAP) zum Holoenzym ( $\sigma$ RNAP). Während das Core-Enzym die meisten der zur Transkription von DNA in RNA erforderlichen Reaktionen katalysiert, bedarf es des Holoenzym, um die Promotorsequenzen zu erkennen und die RNA-Synthese zu initiieren. Dazu bindet der  $\sigma$ RNAP-Komplex zunächst mit relativ geringer Affinität an unspezifische DNA-Abschnitte, wandert dann aber durch abwechselndes Binden und Lösen die DNA entlang, bis die richtige Promotorsequenz gefunden wird. Der festen Bindung an diese Sequenz folgt der Transkriptionsstart. Nach der Verknüpfung der ersten fünf bis zehn Ribonukleotide dissoziiert die  $\sigma$ -Untereinheit von dem Initiationskomplex ab und das Core-Enzym katalysiert die weitere Kettenverlängerung allein (35). Anschließend kann der  $\sigma$ -Faktor ein anderes Core-Enzym komplettieren und weitere RNA-Synthesen initiieren (277).

Sigmafaktoren klassifizieren sich in zwei strukturell nicht verwandte Familien: Die  $\sigma^{70}$  und die  $\sigma^{54}$ -Familie. Erstere schließt sowohl Primär-Sigmafaktoren als auch alternative Sigmafaktoren ein (194), wobei die Alternativen nochmals nach ihrer Kontrollfunktion kategorisiert werden (Tab. II-1).

Strukturell zeichnet sich die  $\sigma^{70}$ -Familie durch 4 Hauptregionen aus, von denen die Domänen 2 und 4 am höchsten konserviert sind. Dabei sind die Subregionen innerhalb der Domäne 2 für das Binden an die Promotorsequenz (Region 2.3) sowie das Erkennen der -10-Sequenz

(Region 2.4) verantwortlich. An der –35-Erkennung hingegen ist die Region 4.2 ist beteiligt (220).

Obwohl keine Sequenz-Homologien zwischen den Mitgliedern der  $\sigma^{54}$ - und  $\sigma^{70}$ - Familie nachgewiesen sind, binden beide Sigmafaktor-Typen die gleiche RNAP. Allerdings unterscheiden sich die resultierenden Holoenzyme in ihren Eigenschaften. So benötigen alle  $\sigma^{54}$ RNAP-Moleküle für den Bindevorgang an die DNA – vermittelt durch den C-Terminus (Region 3) von  $\sigma^{54}$ , zusätzlich ein Aktivatorprotein, um einen offenen Promotorkomplex formieren zu können (186). Sonst für die Initiation der Transkription verantwortlich, inhibiert der  $\sigma^{54}$ -N-Terminus ohne den geeigneten Aktivator diese Umwandlung (39). Außerdem unterscheiden sich die Promotorsequenzen der  $\sigma^{54}$ RNAPs von denen, die durch  $\sigma^{70}$  erkannt werden. Die  $\sigma^{54}$ -Promotoren sind hoch-konservierte, kurze Sequenzen, die zwischen –24 und –12 von der Transkriptions-Initiationsstelle lokalisiert sind. Dagegen liegen die  $\sigma^{70}$ - Promotorpositionen typischerweise zwischen –35 und –10.

**Tab. II-1: Alternative Sigmafaktoren** (modifiziert nach 141).

Familie	Klasse	Beispiel	Bakterium
$\sigma^{70}$	Stressantwort	$\sigma^B$	<i>B. anthracis, L. monocytogenes, S. aureus, S. epidermis, M. tuberculosis</i>
		$\sigma^S$	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>
		$\sigma^F$	<i>M. tuberculosis</i>
	ECF (extracytoplasmic function)	RpoE	<i>H. influenzae, V. cholerae</i>
AlgU		<i>P. aeruginosa</i>	
$\sigma^C$		<i>M. tuberculosis</i>	
$\sigma^D$		<i>M. tuberculosis</i>	
$\sigma^E$		<i>M. tuberculosis</i>	
	$\sigma^H$	<i>M. tuberculosis</i>	
	$\sigma^{28}$	FliA	<i>C. jejuni, H. pylori, V. cholerae</i>
$\sigma^{54}$		$\sigma^N$	<i>C. jejuni, H. pylori, V. cholerae, V. parahaemolyticus</i>

Die meisten Gene in *E. coli* unterstehen der Transkriptionskontrolle durch die  $\sigma^{70}$ -(RpoD) Familie. Diese vegetativen Sigmafaktoren bewirken unter üblichen Wachstumsbedingungen nicht nur die Expression notwendiger Haushaltsgene, sondern auch die Repression nicht benötigter Genprodukte. Die plötzliche Veränderung eines Umweltfaktors erfordert jedoch die schnelle Umstellung der Physiologie des Bakteriums. Um das Überleben unter den neuen Bedingungen zu sichern, muss die promotorerkennende Eigenschaft der RNAP verändert werden, so dass die erforderlichen, stress-spezifischen Gene transkribiert werden können. Diese Aufgabe wird von alternativen Sigmafaktoren übernommen, die als Antwort auf sich

verändernde Milieubedingungen aktiv werden und den vegetativen Sigmafaktor RpoD partiell verdrängen. Dabei werden komplexe und physiologisch weitreichende, zelluläre Reaktionen häufig durch einen einzelnen, sogenannten Masterregulator kontrolliert. Das Regulon dieses einzelnen Sigmafaktors kann mehrere hundert Gene umfassen, wodurch eine große Anzahl an prokaryotischen Genen simultan reguliert werden kann. Folglich wird eine schnelle Anpassung an die veränderte Umwelt begünstigt.

In einigen Fällen werden die Gene eines  $\sigma$ -Faktor-Regulons durch eine klar definierte Primärfunktion charakterisiert. So werden z. B. die verschiedenen Sporulationsphasen von *Bacillus subtilis* durch mehrere Sigmafaktoren kontrolliert (225). Andererseits können die umfassten Gene zu multiplen Funktionen beitragen. In diesem Zusammenhang ist u. a.  $\sigma^B$  als Regulator des Stationärphasen-Wachstums und der generellen Stressantwort in *Listeria monocytogenes* gut erforscht (142). Aktuelle Untersuchungen zu diesem Thema zentralisieren die Funktion alternativer Sigmafaktoren bei der Regulation der Expression von Virulenzgenen. Diese spielen nicht nur bei der Etablierung einer Infektion im Wirt eine entscheidende Rolle, sondern auch beim Überleben des Pathogens in der Umwelt. Das *ica*-Operon von *Staphylococcus aureus* beispielsweise, produziert zusätzlich ein Adhäsın, welches die Biofilmbildung auf Plastikoberflächen fördert (179).

## 4. Der Masterregulator RpoS

### 4.1 Das $\sigma^S$ -Regulon

RpoS, oder  $\sigma^S$ , ist ein alternativer Sigmafaktor der RNAP in *E. coli*, der unter diversen Stress-Bedingungen induziert wird. Aufgrund der zahlreichen Funktionen des  $\sigma^S$ -Regulons wurde das *rpoS*-Gen mehrmals unabhängig entdeckt und entsprechend zunächst unterschiedlich annotiert (167, 242, 275, 278). 1991 wurde ihm schließlich als *csi*-Gen („carbon-starvation-induced“) die Funktion des zentralen Regulators für Stationärphasen-induzierte Gene zugeordnet (156). Diese Publikation deckte ebenfalls auf, dass alle vorangegangenen Arbeiten Allele des gleichen Gens beschrieben hatten, dessen Genprodukt immer als Sigmafaktor aktiv ist (202). Seiner einflussreichen Rolle in der Stationärphase oder unter Stress-Bedingungen verdankt das Genprodukt letztendlich seinen Namen als  $\sigma^S$  oder RpoS.

Neben *E. coli* wurde das *rpoS*-Gen in weiteren Entero- und verwandten Bakterien gefunden. Dem aktuellen Kenntnisstand zufolge ist  $\sigma^S$  generell im  $\gamma$ -Zweig der Proteobacteria vertreten,

einschließlich einer Gruppe Gram-negativer Bakterien, welche aufgrund ihres pathogenen Potentials von besonderer Bedeutung für den Menschen sind (zusammengefasst 109).

Jüngere Studien belegen, dass RpoS-abhängige Gene nicht nur während des Stationärphasen-Wachstums induziert werden, sondern auch als Antwort auf vielfältige Stress-Situationen (108, 113, 160, 197, 199). Infolgedessen wird  $\sigma^S$  inzwischen als Masterregulator der generellen Stressantwort angesehen, welcher die bakterielle Zelle nicht nur dazu befähigt, den aktuellen Stress zu überleben, sondern darüber hinaus auch die Resistenz gegenüber anderen Stress-Situationen fördert (111). Damit steht RpoS der spezifischen Stressantwort gegenüber, die vorrangig der Eliminierung der Stressquelle dient und/oder die Reparatur der bis dahin verursachten Schäden vermittelt. Die Hauptfunktion der generellen Stressantwort hingegen liegt in der Prävention, was sich de facto in der  $\sigma^S$ -bedingten multiplen Stress-Resistenz widerspiegelt (113, 178). Soweit es bekannt ist, vermitteln  $\sigma^S$ -abhängige Gene demzufolge die Resistenz gegenüber oxidativem Stress, UV-Irradiation, Hitzeschock, Hyperosmolarität, saurem pH und Ethanol. Des Weiteren lassen sich Veränderungen der Zellhülle und der übergeordneten Morphologie auf RpoS-kontrollierte Genprodukte zurückführen. Bishop et al. (28) postulierten sogar die Beteiligung von  $\sigma^S$  am programmierten Zelltod in der Stationärphase. Schließlich wurden diverse Virulenzgene in pathogenen Enterobakterien mit RpoS-abhängigen Promotoren identifiziert.

Für die Kontrolle  $\sigma^S$ -abhängiger Gene werden aktuell zwei Regulations-Schemata unterschieden: Ein Großteil der Gene folgt dem zellulären Level des alternativen Sigmafaktors. Demnach werden sie aktiviert, sowie sich  $\sigma^S$  und damit die  $\sigma^S$ -spezifische RNAP ( $\sigma^S$ RNAP) in der Zelle akkumuliert. Andere Gene hingegen werden nur unter bestimmten Stress-Bedingungen exprimiert. Zur letzteren Kategorie *rpoS*-kontrollierter Gene zählt beispielsweise *csiD*, welches nur unter C-Mangelbedingungen induziert wird. Begründet wird diese Beobachtung über die Notwendigkeit des Aktivators CRP (cAMP-Rezeptorprotein), ohne den die  $\sigma^S$ RNAP am *csiD* Promotor nicht wirken könnte (91, 172, 187). Folglich ist es dem  $\sigma^S$ -komplettierten RNA-Polymerase Holoenzym möglich, mit zusätzlichen Regulationsfaktoren zu interagieren, so wie es ebenfalls für die vegetative  $\sigma^{70}$ -RNA-Polymerase beschrieben ist (291). Die Sigmafaktoren  $\sigma^S$  und  $\sigma^{70}$  sind nah verwandt, und Gene, die von  $\sigma^S$ RNAP *in vivo* aktiviert werden, können häufig auch *in vitro* durch die  $\sigma^{70}$ RNAP transkribiert werden und umgekehrt (291). Aktuell wird davon ausgegangen, dass die  $\sigma$ RNAP beider Sigmafaktoren sehr ähnliche Promotorsequenzen erkennen, aber

geringfügige Unterschiede, wie sie z. B. in der verlängerten -10 Region bestehen (Abb. II-5), die Präferenz für eines der beiden Holoenzyme erhöht (15).

	-35-Region		-10-Region	
$\sigma^7$	- TTGACA -	12 bp	- TGTG N	TATAAT - 5-8 bp
$\sigma^S$	- TTGACA -	10-14 bp	- TGTK C	TATACT TAA - 2-5 bp

**Abb. II-5: Konsensus-Sequenz der von  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^S$  bevorzugt erkannten Promotoren in *E. coli* (modifiziert nach 279).** Die verlängerte -10-Region ist durch fett markierte Basen angezeigt, rot unterlegte Basen repräsentieren Unterschiede in dieser Region. Die unterstrichenen Nukleotide bezeichnen ein konserviertes Merkmal  $\sigma^S$ -abhängiger Promotoren. K) T oder G; N) Beliebiges Nukleotid.

Aktuellen genomweiten Transkriptionsanalysen zufolge werden mindestens 10% aller *E. coli* Gene direkt oder indirekt durch  $\sigma^S$  reguliert. Dabei sind die  $\sigma^S$ -abhängigen Gene prinzipiell über das gesamte Genom von *E. coli* verteilt. Darunter befinden sich u. a. weitere regulatorische Gene, weshalb vermutet wird, dass das  $\sigma^S$ -Regulon einem großen, intern hierarchischem Regulationsnetzwerk vorsteht (291). Die Struktur dieses Netzwerkes stellt sich in der Theorie so dar, dass RpoS als übergeordnete Einheit dient, welche ankommende Informationen verarbeitet und auf dieser Basis die anstehenden zellulären Prozesse einleitet. Dies kann auf direktem Wege geschehen oder über die Aktivierung sekundärer Regulatoren, die ihrerseits subspezifische Module kontrollieren.

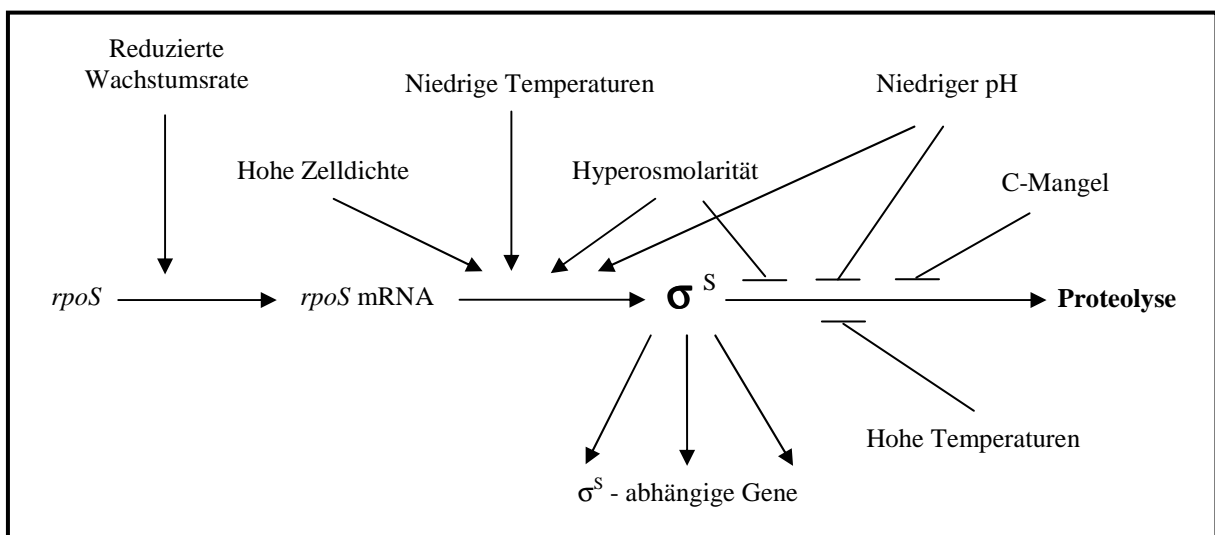
#### 4.2 Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration

Die Hypothese eines modulierten Netzwerkes unter der Kontrolle von RpoS erklärt die Funktion des Proteins als generellen Stressregulator. Als der entscheidende Parameter diesbezüglich wird die zelluläre Konzentration von  $\sigma^S$  eingestuft. Darauf aufbauende Untersuchungen ergaben, dass sich das RpoS-Level in der Stationärphase als Reaktion auf einen Mangel der C-, N-, P- oder AS-Quelle erhöht. Auf der anderen Seite wurde eine Induktion des alternativen Sigmafaktors ebenso bei partieller Wachstumsreduktion beobachtet (90, 127, 128, 156, 157, 214, 273). Als weitere induzierende Bedingungen werden in der Literatur Hyperosmolarität (199), atypisch hohe (197) oder niedere (260) Temperaturen, saurer pH (12, 165) und hohe Zelldichte, z. B. in der späten exponentiellen Phase, (157) benannt. Diese zahlreichen und v. a. sehr unterschiedlichen Signale bedeuten für die Regulation der  $\sigma^S$  Konzentration vorrangig eins: Sie muss auf jeder theoretisch möglichen Ebene stattfinden können (Abb. II-6). So konnte z. B. die *rpoS*-Transkription durch die



kontrollierte Reduktion der Wachstumsrate in einem Chemostat stimuliert werden (214, 273). Die Rate der *rpoS*-Translation wiederum konnte experimentell durch hohe Osmolarität um mehr als das 5fache gesteigert werden (199). Vergleichbare Effekte auf dieser Ebene der Regulation wurden während des Wachstums bei niedrigen Temperaturen (z. B. 20 °C, 260), hohen Zelldichten in Glucose-Minimalmedium ( $2 \times 10^8$  Zellen/ ml, 157) oder in Reaktion auf pH-Erniedrigung in einem Vollmedium (12) gleichermaßen beobachtet.

Neben der facettenreichen Regulation der  $\sigma^S$ -Synthese wurde die post-translationale Kontrolle durch Degradation intensiv charakterisiert. So liegt die Halbwertszeit des RpoS-Proteins in Zellen, die in Minimalmedium kultiviert wurden, zwischen 1 min und wenigen Minuten (157, 197, 198, 269). Unter Stress hingegen kann die Proteolyse bis zur vollständigen Inhibierung reduziert werden, was wiederum die rasche Akkumulation des Proteins zur Folge hat. Die Kinetik dieser Stabilisierung kann wie im Fall des hyperosmotischen Schocks sehr schnell sein (199) oder langsamer verlaufen, wie z. B. nach einem Hitzeschock (197).



**Abb. II-6: Die verschiedenen Stufen der  $\sigma^S$ -Synthese werden durch unterschiedliche Stress-Bedingungen beeinflusst** (modifiziert nach 111). Ein Anstieg der intrazellulären RpoS-Konzentration kann sowohl aus der Stimulation der *rpoS*-Transkription oder -Translation sowie aus dem gehemmten Abbau des RpoS-Proteins resultieren.

Mit dem Ziel, die molekularen Mechanismen der verschiedenen Regulationsebenen aufzuklären, wurden in den vergangenen Jahren erhebliche Fortschritte in der Identifizierung von (i) *cis*-abhängigen regulatorischen Regionen auf DNA, mRNA oder Proteinebene; (ii) *trans*-abhängigen Faktoren wie regulatorische RNAs oder Proteine; und (iii) Molekülen, welche die  $\sigma^S$ -Regulation auf allen Ebenen beeinflussen, erzielt. Dabei wurde erkannt, dass die einzelnen Pfade untereinander verknüpft sind, so dass ein einzelnes, spezifisches Signal die intrazelluläre Konzentration des alternativen Sigmafaktors durch mehrere Mechanismen beeinflussen kann. Darüber hinaus scheinen sich die einzelnen Komponenten der

Regulationspfade auch untereinander zu kontrollieren, wodurch letztendlich die Aufklärung der jeweiligen Mechanismen erheblich erschwert wird.

### 4.3 Regulation der $\sigma^S$ -Proteolyse – Das „ $\sigma^S$ - Turnover“

Die Transkription von *rpoS* sowie die Translation der entsprechenden mRNA wird unter verschiedenen Stress-Bedingungen vermehrt aktiviert (vgl. 4.2). Dennoch lässt sich auch in normal wachsenden Zellen eine gewisse  $\sigma^S$ -Syntheserate nachweisen. Allerdings wird hier das zelluläre Level des Proteins durch Degradation niedrig gehalten (157, 269). Diese post-translationale Kontrolle des alternativen Sigmafaktors ist Angriffspunkt vieler Stress-assoziiertes Systeme (u. a. für C-Mangel, Osmo-Stress, pH-Downshock), die in der Folge die Akkumulation des Proteins initiieren.

Die RpoS-Degradation wird *in vivo* durch die Protease ClpXP vermittelt (249). Entsprechende Strukturanalysen ergaben für ClpXP den Aufbau eines Proteasekomplexes, der sich aus zwei sechser Ringen des ATP-hydrolysierenden ClpX-Chaperons sowie zwei weiteren Ringen zu je sieben Untereinheiten der eigentlichen proteolytischen Komponente ClpP zusammensetzt. Dabei übernehmen die außen angeordneten ClpX-Ringe die Funktion der Substraterkennung. Gebundene Proteine werden durch diese ATPasen denaturiert und anschließend in das Innere des Komplexes weitergeleitet. Dort bilden die ClpP-Ringe eine Art proteolytische Kammer, in welcher letztendlich die ATP-abhängige Degradation des Substrates katalysiert wird (97, 144, 286). In diesem Zusammenhang wird ein Aufwand von ca. 4000 ATP-Molekülen pro Protein vermutet (pers. Mitteilung B. Sauer). Schon bevor das Substrat RpoS der ClpXP-Protease zugeordnet werden konnte, war bekannt, dass die entsprechenden Gene *clpP* und *clpX* ein Operon bilden (96, 176). Später konnte zudem gezeigt werden, dass unabhängige Mutationen der beiden Gene jeweils in der Stabilisierung des alternativen Sigmafaktors resultierten (249). Da bisher keine stabilen Degradationsprodukte nachgewiesen werden konnten, wird zudem von einer vollständigen RpoS-Proteolyse durch den ClpXP-Komplex ausgegangen (301).

Einige Proteasen sind bei der Bindung ihres Substrates auf zusätzliche Erkennungsfaktoren - auch „Targeting“-Faktoren genannt - angewiesen. Diese Kooperation bewirkt in einigen Fällen eine Erhöhung der Substratspezifität, in anderen Fällen wird die Erkennung erst ermöglicht. Im Gegensatz zu anderen ClpXP-Substraten ist für den Abbau von  $\sigma^S$  ebenfalls ein zusätzlicher Faktor nötig. Das RssB-Protein ist solch ein spezifischer Erkennungsfaktor, der RpoS bindet und es seiner Protease zuführt, ohne dabei selbst degradiert zu werden (14,

146, 198, 227, 301). Dabei geht aus der Literatur hervor, dass RssB keine Besonderheit des *E. coli*-Proteolysesystems ist. In anderen bakteriellen Spezies wurden mit SprE (227), MviA (*S. typhimurium*, 12) oder ExpM (*Erwinia carotovora*, 4) Allele des Erkennungsfaktors identifiziert.

RssB gehört zur Familie der Zwei-Komponenten-Response-Regulatoren, deren Aktivität über die Phosphorylierung eines konservierten Aspartyl-Restes (D58) in der N-terminalen Empfängerdomäne moduliert wird. RssB-Proteine, in denen diese Aminosäure durch eine andere ersetzt wurde, zeigten *in vitro* weder eine Phosphorylierung noch eine  $\sigma^S$ -Bindeaktivität (16). Aus *in vitro* Experimenten geht außerdem hervor, dass das phosphorylierte RssB direkt mit  $\sigma^S$  interagiert (14). Diesbezüglich wird über eine individuelle Erkennungsfunktion für das RpoS-Protein spekuliert, da der Abbau eines weiteren ClpXP-Substrates, das  $\lambda$ O-Protein, nicht durch RssB beeinflusst wird (300).

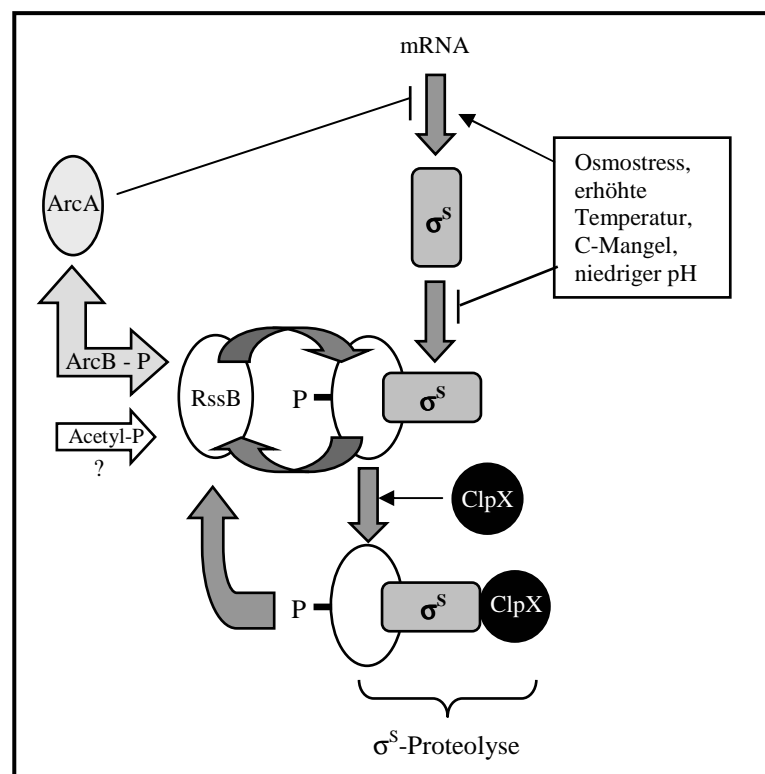
Über die Struktur des Targetingfaktors ist bekannt, dass er – für Response-Regulatoren typisch – aus mindestens zwei Domänen besteht; der N-terminalen Receiver- sowie der C-terminalen Output-Domäne. Letztere weist keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten, Funktionsassoziierten Proteinsequenzen auf, was die einzigartige Rolle von RssB in der  $\sigma^S$ -Proteolyse verdeutlicht. Der N-Terminus hingegen übernimmt die charakteristische Aufgabe einer Receiverdomäne, nach der Phosphorylierung die Output-Funktion des Response-Regulators zu aktivieren (146).

Aktuell wird davon ausgegangen, dass die RssB-Expression kontinuierlich der RpoS-Konzentration angepasst wird, um die Degradation des alternativen Sigmafaktors gegenüber kontrollierten oder spontanen Variationen der  $\sigma^S$ -Syntheserate aufrecht zu erhalten. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die *rssB*-Transkription von  $\sigma^S$  reguliert wird (240), was wiederum für ein negatives „Feedback“-Regulationssystem sprechen würde.

In der Eigenschaft als Response-Regulator ist die RssB-Aktivität zudem vom Status der Phosphorylierung abhängig. Diesbezüglich gilt RssB als alleinstehend; bisher konnte keine zugehörige Histidinkinase in einem Operon mit *rssB* aufgedeckt werden. In der Vergangenheit wurde bereits Acetyl-Phosphat als physiologisch relevanter Phosphordonor postuliert. Doch weiterführende Experimente mit einer Acetyl-Phosphat-freien, *pta-ackA* Mutante dokumentierten, wenn auch reduziert, die Degradation des  $\sigma^S$ -Faktors (36). 2005 schließlich präsentierten Mika und Hengge das ArcB-Protein als direkt agierende Sensor-Histidinkinase für RssB (188). Darüber hinaus tritt ArcA, ein ebenfalls durch ArcB bedienter

Response-Regulator, als direkter Repressor der *rpoS*-Transkription in Erscheinung (188). Somit skizziert sich ein verzweigtes „Drei-Komponentensystem“ aus ArcB/ArcA/RssB für die Koordination eines niedrigen RpoS-Niveaus in exponentiell wachsenden Zellen.

Nach der ArcB-bedingten Aktivierung des RssB-Proteins kann der Targetingfaktor mit seinem einzigen Substrat interagieren. Untypisch für Protease-Substrate, enthält das RpoS-Protein anstelle einer charakteristischen Erkennungssequenz ein „Turnover Element“ in der Mitte seiner Aminosäuresequenz, an die das phosphorylierte RssB bindet (14). Untersuchungen mit RpoS::LacZ-Hybriden unterschiedlicher Länge lokalisierten das verantwortliche Element in der Region 2.5 des alternativen Sigmafaktors (198, 249), welche eigentlich der Erkennung des -10-Promotorelementes dient. Da  $\sigma^S$  und  $\sigma^{70}$  bekanntermaßen den gleichen -10-Konsensus binden (15, 72), verwundert die hohe Ähnlichkeit der AS-Sequenzen im Bereich 2.5 nicht. Dennoch ist  $\sigma^S$  im Vergleich zu  $\sigma^{70}$  instabil, so dass auf der Grundlage der minimal bestehenden Unterschiede letztendlich die AS K173 neben E174 und V177 als Kern des „Turnover Elements“ ermittelt werden konnte (14).



**Abb. II-7: Postuliertes Modell der regulierten  $\sigma^S$ -Degradation in *E. coli*** (modifiziert nach 111, 188). Der Mechanismus ist detailliert im Text beschrieben.

Zusammenfassend ergibt sich für die Regulation der RpoS-Proteolyse folgendes Model (Abb. II-7): ArcB aktiviert den Proteolyse-Targetingfaktor RssB. Der phosphorylierte Response-

Regulator bindet den alternativen Sigmafaktor und führt diesen dem ClpXP-Proteasokomplex zu, welcher das Substrat unter Verbrauch von ATP vollständig degradiert. *In vitro* und *in vivo* Daten indizieren die anschließende Entlassung des RssB-Proteins aus dem Komplex (146, 301), woraufhin der Targetingfaktor den Abbau eines weiteren RpoS-Moleküls initiieren kann. Die Theorie dieses RssB-„Recyclings“ begründet sich darauf, dass der alternative Sigmafaktor im Vergleich zu dem Response-Regulator mit einem Überschuss von 20:1 in der Zelle vorliegt (16). Außerdem wurde bereits unter Wachstumsbedingungen in minimalem Glucosemedium beobachtet, dass die Degradation von mindestens sechs oder sieben RpoS-Molekülen pro Minute durch ein einziges RssB-Protein vermittelt werden kann (146).

## 5. RpoS in der *V. cholerae* Pathogenese

12 Stunden nach der Inokulation löst sich *V. cholerae* von der Oberfläche der Epithelzellen und tritt in das flüssigkeitsgefüllte Darmlumen über. Obwohl die molekularen Details der *V. cholerae* Pathogenese bereits das Objekt zahlreicher Untersuchungen waren, wurden diese finalen Schritte des Infektionsprozesses erst 2006 fokussiert (211). Demnach unterliegen diese letzten Stufen der Kontrolle eines genetischen Programms, welches das Ablösen der bakteriellen Zellen und die Aktivierung der Chemotaxis und Motilität nahezu synchron verursacht (211). Diese These lässt sich auf frühere mikroskopische Analysen und Gen-Expressionsstudien zurückführen, welche im Reiswasserstuhl von Cholera-Patienten eine große Anzahl aktiv schwimmender Organismen (17, 99) und die Expression von Chemotaxis- und Motilitätsgenen beschrieben (26). Zudem wiesen weitere Expressionsprofile von *V. cholerae* aus Reiswasserstuhlproben eine erhebliche Reduktion von TCP- und CT-Transkripten nach (158), wodurch die ursprüngliche Theorie von Nielsen et al. um die Einstellung der Virulenzgenexpression in der letzten Infektionsphase ergänzt wurde.

Über die Stimuli für das genetische Programm der pathogenen Endphase ist bisher nur wenig bekannt. Es wird jedoch spekuliert, dass die zunehmende Population der adhärenierten Zellen zunächst zu der Akkumulation von Quorum-Sensing-Signalen führt, infolgedessen die Expression des Transkriptionsregulators HapR intensiviert wird (191). HapR wiederum bedingt nicht nur nachweislich die Repression von Virulenzgenen und Biofilmbildung, sondern induziert auch die Hämagglutinin-Protease HapA (153, 302, 303). Die Beteiligung dieses proteolytischen Enzyms an der Ablösung von *V. cholerae* von kultivierten Epithelzellen konnte bereits gezeigt werden (80, 254). Darüber hinaus könnte desgleichen ein

Zusammenspiel aus Signalen wie Nährstoffmangel, die Produktion von toxischem Wasserstoffperoxid sowie die Sekretion von Defensinen durch das Komplementsystem des Wirtes für das Ablösen der Bakterien verantwortlich sein (211).

Vergleichbare Bedingungen resultieren in *E. coli* nachweislich in der Akkumulation des alternativen Sigmafaktors RpoS (111). Für das *V. cholerae* Homolog konnte gleichermaßen die Beteiligung an der Resistenz gegenüber verschiedenen Umweltsignalen, einschließlich Wasserstoffperoxid, bereits demonstriert werden (298). Darüber hinaus präsentierten Silva und Benitez 2004 RpoS als positiven Regulator der HA/Protease (252). Schließlich deckten Gen-Expressionsstudien mit *V. cholerae* Zellen aus dem Darmfluid die RpoS-abhängige Induktion vieler Chemotaxis- und Motilitätsgene auf (211). All diese Beobachtungen sprechen deutlich für den Einfluss von RpoS in der letzten Phase des Infektionszyklus, obwohl eine entsprechende Attenuierung von *rpoS*-Mutanten im Tiermodell noch nicht eindeutig belegt wurde.

## **6. Osmostress-Adaptation – Signalintegration für RpoS-kontrollierte Stress-Reaktionen?**

Das *rpoS*-Regulon umfasst eine große Anzahl funktional divergenter Gene. Um diese allumfassende Kontrolle durch einen einzigen Regulator begründen zu können, wurde recht schnell die Existenz von Gen-Subfamilien in Erwägung gezogen, die dementsprechend verschiedenen RpoS-Regulationsmechanismen unterliegen (113). Erste Hinweise auf solche Superfamilien gab eine Studie mit einer Gruppe *rpoS*-abhängiger Gene, die ursprünglich als osmotisch reguliert identifiziert wurden (112). Darunter befanden sich u. a. *otsA*, *otsB* und *treA*, deren Genprodukte in der Trehalosesynthese und -metabolismus, Thermotoleranz und Osmoprotektion involviert sind (112). Für *otsA* und *otsB* konnte überdies gezeigt werden, dass sowohl die Osmostress-bedingte als auch die Wachstumsphasen-abhängige Genexpression auf RpoS zurückgeht, was wiederum die Verwendung des gleichen Promotors in beiden Situationen indiziert. Die Transkription von *rpoS* selbst wird dahingegen durch hypertonische Bedingungen nicht aktiviert (112).

Die Bedeutung der Osmostress-Adaptation ergibt sich für viele Bakterien aus der Notwendigkeit, ihren Zellturgor entgegen plötzlicher Schwankungen ihrer Umweltbedingungen aufrecht zu erhalten. Dieser gilt als treibende Kraft für das Wachstum und die Teilung der Zelle (59). Für das aquatische Bakterium *V. cholerae* ist der Übertritt in

den Wirt nicht zuletzt in Hinblick auf die extrem veränderten osmotischen Verhältnisse im Magen-Darm-Trakt eine Belastung. Im Mittelpunkt der notwendigen Anpassung steht die Regulierung des Pools aller osmotischen Solute im Cytosol, wobei es die Reaktionen auf zwei verschiedene osmotische Stress-Bedingungen zu unterscheiden gilt: Ist die Zelle hypotonen Umweltbedingungen ausgesetzt, verursacht der damit verbundene passive Wassereinstrom einen gefährlichen Anstieg des Tugors. Um in der Folge nicht zu lysieren, exportiert die Zelle ihre Solute. Der Transport kann unspezifisch über spannungssensitive Kanäle oder Aquaporine erfolgen, wenn der osmotische „Downshock“ sehr plötzlich auftritt, oder in Abhängigkeit spezifischer Exportsysteme (42, 163, 267).

Müssen sich die Zellen dahingegen an hypertone Milieubedingungen adaptieren, wirken sie der Gefahr des Wasserausstroms entgegen. Die steigende Ionenkonzentration im Cytoplasma würde anderenfalls zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation oder Protein-Interaktionen und somit den gesamten Metabolismus gefährden. Die entsprechenden Gegenmaßnahmen unterliegen verschiedenen Mechanismen: Zunächst beginnt die Zelle unmittelbar nach dem osmotischen „Upshock“, anorganische Ionen wie  $K^+$  und  $Cl^-$  aufzunehmen (71). Diese Strategie ist v. a. unter den extrem halophilen Prokaryoten weit verbreitet (87, 280). Dieser schnellen Antwort schließt sich die zunehmende Aufnahme bzw. Synthese von osmoprotektiven Soluten an, infolgedessen die zuvor importierten anorganischen Ionen nach und nach ersetzt werden (38). Osmoprotektive Solute, zu denen beispielsweise Trehalose, Prolin, Karnithin, Glycin-Betain und Prolin-Betain zählen, sind organische und hochlösliche, kompatible Verbindungen, welche bei physiologischen pH-Werten keine Nettoladung aufweisen und auch in hohen Konzentrationen essentielle zelluläre Prozesse nicht beeinträchtigen (143, 239, 259). Für *V. cholerae* sind v. a. die kompatiblen Solute Betain und Ectoin relevant, da Betain über ein spezifisches Transportsystem aufgenommen und Ectoin durch Genprodukte des *ect*-Operons selbst synthetisiert werden kann.

Während die meisten biologischen Antworten auf der Erkennung bestimmter Signalmoleküle durch spezifische Rezeptoren beruhen, unterscheidet sich die Osmostress-Adaptation dadurch, dass ein physiologischer Parameter die Reaktion stimuliert. Über die eigentliche Erfassung des Signals ist wenig bekannt; wahrscheinlich spielen aber der interne hydrostatische Druck, sowie die Differenz zwischen interner und externer Osmolarität eine wichtige Rolle. Innerhalb dieser regulatorischen Prozesse kommt dem aus EnvZ und OmpR zusammengesetzten Zwei-Komponentensystem eine besondere Funktion zu. Neben der reziproken Transkriptionskontrolle für die Außenmembranporine OmpC und OmpF in *E. coli* (213), wurde dem EnvZ/OmpR-System in *Shigella flexneri* (21) und *S. typhimurium* (67)

auch die Regulation von Virulenzgenen nachgewiesen. Eine Suche nach vergleichbaren Osmostress-sensitiven Regulatoren in *V. cholerae* ergab auf der Basis von homologen Proteinsequenzen drei ähnliche Systeme: Der ebenfalls als *envZ* annotierte ORF VC2713, die putative Sensor-Histidinkinase des ORF VCA0257 und das putative Zwei-Komponentensystem der ORFs VCA0565 und VCA0566 (247). In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des VCA0565-Genproduktes tatsächlich ein Wachstumsdefizit unter hypertonen Bedingungen zu Folge hatte (247). Darüber hinaus lassen sich in der bekannten Literatur keine weiteren Hinweise über die Regulation der Osmostress-Adaptation in *V. cholerae* finden.

## 7. Zielstellung der Arbeit

Der Infektionszyklus des humanpathogenen Erregers *V. cholerae* erfordert die Anpassung des Bakteriums an völlig veränderte Milieubedingungen. In *E. coli* wird der alternative Sigmafaktor RpoS als Masterregulator der generellen Stressantwort beschrieben, der für die Umsetzung der entsprechenden Umweltsignale auf genetischer Ebene verantwortlich ist.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, ob dem *rpoS*-Homolog in *V. cholerae* eine analoge Funktion zukommt. Dementsprechend sollten Bedingungen bestimmt werden, unter denen  $\sigma^S$  in *V. cholerae* akkumuliert. Entsprechende Expressionsprofile und die phänotypische Analyse der *rpoS*-Deletionsmutante sollten ebenfalls zur Aufklärung der Funktion beitragen.

Als der entscheidende Parameter für die Funktion von RpoS wird in *E. coli* die intrazelluläre Konzentration des Proteins angegeben. Diesbezüglich ist die Degradation des Masterregulators ausführlich erforscht, so dass ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die  $\sigma^S$ -Proteolyse in *V. cholerae* thematisierte. Dabei war es zunächst von Interesse, die Stabilität des Proteins unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mittels Westernblot-Analysen zu vergleichen. Darüber hinaus sollten, in Anlehnung an die bekannten molekularen Details des *E. coli*-Systems, die beteiligten Faktoren identifiziert werden.

Obwohl die RpoS-Regulation in *V. cholerae* bislang kaum untersucht wurde, wird davon ausgegangen, dass sie den Kontrollmechanismen in *E. coli* ähnelt. Darum sollte in einem anderem Teilprojekt dieser Arbeit analysiert werden, ob das RpoS-Protein aus *V. cholerae* tatsächlich funktional in das *E. coli*-System integriert werden kann.

In weiteren Experimenten sollte anschließend die Bedeutung von RpoS für die Pathogenese von *V. cholerae* aufgedeckt werden. Diesbezüglich wurde bisher nur die Rolle des



alternativen Sigmafaktors beim Ablösen von den Darm-Epithelzellen angedeutet, wobei die molekularen Hintergründe jedoch noch ungeklärt sind.

Das letzte Projekt zentralisierte die Adaptation von *V. cholerae* an hyperosmolare Bedingungen, eine bekannte *rpoS*-kontrollierte Stress-Reaktion in *E. coli*. Um einen Überblick über die typischen zellulären Prozesse zu gewinnen, sollten die Transkriptome verschiedener Mutanten einander gegenübergestellt werden. Ferner konnten für *V. cholerae* bisher noch keine charakteristischen Osmostress-Regulationssysteme definiert werden. Aus diesem Grund sollte die Funktion eines putativ osmosensitiven Zwei-Komponentensystems mit Hilfe von Microarray-Analysen ermittelt werden. In weiterführenden Experimenten sollte abschließend eine mögliche Beteiligung des Osmosensors an der Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration untersucht werden.

### III MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide sind in den Tabellen III-1 bis III-3 zusammengefasst und kurz typisiert.

**Tab. III-1: Bakterienstämme.** Alle Zellen wurden als Glycerinkulturen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert: 1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur (ÜNK) wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Glycerin (70%) gemischt und eingefroren.

<i>E. coli</i>		
Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
AM106	MC4100 <i>rssB</i> ::Tn10, Sm <sup>r</sup>	R. Hengge
GB123	MC4100 $\Delta$ <i>ara</i> $\Delta$ <i>leu</i> <i>rpoS</i> ::Tn10, lac <sup>+</sup>	R. Hengge
MC4100	F- <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U139 <i>rpsL</i> 150 <i>relA1 flbB5301</i> <i>deoC1 ptsF25 rbsR</i> , Sm <sup>r</sup>	R. Hengge
MC4100 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i>	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup>	R Hengge
MC4100 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> pQE30	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
MC4100 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> E.c. <i>rpoS</i>	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> pQE30 <i>prpoS</i> <sup>E. coli</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
MC4100 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> V.c. <i>rpoS</i>	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10 <i>osmY</i> :: <i>lacZ</i> pQE30 <i>prpoS</i> <sup>V. cholerae</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
MC4100 V.c. <i>rpoS</i>	MC4100 pQE30 <i>prpoS</i> <sup>V. cholerae</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
RH90	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10, Sm <sup>r</sup>	R. Hengge
RH90 E.c. <i>rpoS</i> <i>placIQ</i>	RH90 pQE30 <i>prpoS</i> <sup>E. coli</sup> <i>placIQ</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
RH166	MC4100 $\Delta$ <i>ara</i> $\Delta$ <i>leu</i> , lac <sup>-</sup>	R. Hengge
SM10 $\lambda$ <i>pir</i>	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu $\lambda$ <i>pir</i> RK6, Km <sup>r</sup>	(192)
XL1-Blue	F <sup>r</sup> ::Tn10 <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacq</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M151 <i>recA1 end A1</i> <i>gyrA46 (Nalr) thi hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K+</sub>) supE44 relA1 lac</i>	New England BioLoabs
<i>V. cholerae</i>		
CO968	O1 El Tor, Ogawa, Indien 1994, Biofilm <sup>-</sup> , Hämolyse <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(281)
CO968 <i>cheA1</i>	CO968 <i>cheA1</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 <i>cheA3</i>	CO968 <i>cheA3</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 <i>clpX</i>	CO968 <i>clpX</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 <i>lon</i>	CO968 <i>lon</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 <i>rpoS</i>	CO968 <i>rpoS</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 <i>rssB</i>	CO968 <i>rSSB</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
CO968 $\Delta$ <i>cheA2</i>	CO968 pWM91 $\Delta$ <i>cheA2</i>	K. Lamprecht
MO10	O139, klinisches Isolat, Indien 1992, K139 lysogen, Sm <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(281)
M654	O1 El Tor, Indien 1991, Biofilm <sup>-</sup> , Hämolyse <sup>-</sup>	(137)

M654 <i>rpoS</i>	M654 <i>rpoS</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
O395	O1 klassisch. Ogawa, klinisches Isolat, Indien 1964, <i>tcpA<sup>+</sup> ctx<sup>+</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i> , Sm <sup>r</sup>	(183)
O395 <i>rpoS</i>	O395 <i>rpoS</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459	O1 Inaba, El Tor, klinisches Isolat, Bangladesh 1976	(221)
P27459-S	P27459, spontan Sm <sup>r</sup>	(208)
P27459 <i>cheA1</i>	P27459-S <i>cheA1</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	K. Lamprecht
P27459 <i>cheA3</i>	P27459-S <i>cheA3</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	K. Lamprecht
P27459 <i>clpA</i>	P 27459-S <i>clpA</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>clpP</i>	P27459-S <i>clpP</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	D. Berg
P27459 <i>clpX</i>	P27459-S <i>clpX</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	D. Berg
P27459 <i>clpX</i> E.c. <i>clpX</i>	P27459-S <i>clpX</i> ::pGP704 pBAD33 <i>clpX</i> <sup>E.coli</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>clpX</i> V.c. <i>clpX</i>	P27459-S <i>clpX</i> ::pGP704 pBAD18-Kan <i>clpX</i> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>flexB</i>	P27459-S <i>flexB</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P 27459 <i>ftsH</i>	P27459-S <i>ftsH</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>hslVU</i>	P27459-S <i>hslVU</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>lon</i>	P27459-S <i>lon</i> ::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 <i>osmK</i>	P27459-S VCA0565::pGP04, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	S. Schild
P27459 <i>osmR</i>	P27459-S VCA0566::pGP704, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	S. Schild
P27459 <i>osmR</i> pQE30	P27459-S pQE30pVCA0566, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 E.c. <i>rpoS</i> pQE30	P27459-S pQE30 <i>prpoS</i> <sup>E.coli</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459 V.c. <i>rpoS</i> pQE30	P27459-S pQE30 <i>prpoS</i> <sup>V.cholerae</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>cheA2</i>	P27459-SΔ <i>cheA2</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>ectC</i>	P27459-SΔ <i>ectC</i> , Sm <sup>r</sup>	J. Nesper
P27459Δ <i>hapR</i>	P27459-SΔ <i>hapR</i> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	K. E. Klose
P27459Δ <i>lon</i>	P27459-SΔ <i>lon</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> pQE30	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> pQE30 <i>placIq</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30 <i>placIq</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> E.c. <i>rpoS</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30 <i>prpoS</i> <sup>E.coli</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> E.c. <i>rpoS</i> <i>placIq</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30p <i>rpoS</i> <sup>E.coli</sup> <i>placIq</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> V.c. <i>rpoS</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30 <i>prpoS</i> <sup>V.cholerae</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rpoS</i> V.c. <i>rpoS</i> <i>placIq</i>	P27459-SΔ <i>rpoS</i> pQE30 <i>prpoS</i> <sup>V.cholerae</sup> <i>placIq</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rssB</i>	P27459-SΔ <i>rssB</i> , Sm <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rssB</i> E.c. <i>rssB</i>	P27459-SΔ <i>rssB</i> pBAD18 <i>prssB</i> <sup>E.coli</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rssB</i> V.c. <i>rssB</i>	P27459-SΔ <i>rssB</i> pQE30 <i>prssB</i> <sup>V.cholerae</sup> , Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P27459Δ <i>rssB lon</i>	P27459-SΔ <i>rssB lon</i> ::pGP, Sm <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
P25459Δ <i>toxR</i>	P25459-SΔ <i>toxR</i> , Sm <sup>r</sup>	K. E. Klose
V124	P27459-SΔ <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup>	K. E. Klose
V194	A2-2, Umweltisolat, nicht O1, nicht O139, Rio Grande Texas 2000, <i>tcpA<sup>-</sup> ctx<sup>-</sup> toxR<sup>+</sup> ompW<sup>+</sup></i>	K. E. Klose

Tab. III-2: Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBAD18	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Ap <sup>r</sup>	(100)
pBAD18-Kan	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	(100)
pCVD442	Sucrase Suizid Plasmid, <i>pir</i> -abhängiges R6K Replicon, <i>sacB</i> <sup>Bacillus subtilis</sup> , Ap <sup>r</sup>	(66)
pGP704	oriR6K <i>mobRP4</i> , Ap <sup>r</sup>	(192)
placIQ	pREP4-Plasmid, exprimiert konstitutiv <i>lac</i> Repressor, Km <sup>r</sup>	Qiagen
pQE30	Expressionsvektor mit N-terminalem His-Tag, IPTG-abhängig, Ap <sup>r</sup>	Qiagen
pBAD18-Kan <i>clpX</i>	<i>clpX</i> von P27459-S in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pBAD18-Kan <i>rssB</i>	<i>rssB</i> von <i>E. coli</i> in pBAD18-Kan, Km <sup>r</sup>	R. Hengge
pBAD33 <i>clpX</i>	<i>clpX</i> von <i>E. coli</i> in pBAD33, Cm <sup>r</sup>	R. Hengge
pCVDΔ <i>lon</i>	Δ <i>lon</i> von P27459-S in pCVD442, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCVDΔ <i>rpoS</i>	Δ <i>rpoS</i> von P27459-S in pCVD442, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pCVDΔ <i>rssB</i>	Δ <i>rssB</i> von P27459-S in pCVD442, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>cheA1</i>	VC1397 von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	K. Lamprecht
pGP <i>cheA3</i>	VCA1095 von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	K. Lamprecht
pGP <i>clpA</i>	<i>clpA</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>clpP</i>	<i>clpP</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>clpX</i>	<i>clpX</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>fexB</i>	<i>fexB</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>ftsH</i>	<i>ftsH</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>hslIVU</i>	<i>hslIVU</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>lon</i>	<i>lon</i> von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pGP <i>osmK</i>	VCA0565 von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	S. Schild
pGP <i>osmR</i>	VCA0566 von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	S. Schild
pGP <i>rssB</i>	VC1050 von P27459-S in pGP704, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30 <i>clpX</i>	Komplementationsplasmid mit <i>clpX</i> von P27459 in pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30 <i>osmR</i>	VCA0566 von P27459-S in pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30 <i>rpoS</i>	<i>rpoS</i> von P27459-S in pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pQE30 <i>rssB</i>	Komplementationsplasmid mit <i>rssB</i> von P27459 in pQE30, Ap <sup>r</sup>	diese Arbeit
pWM91Δ <i>cheA2</i>	VC2063 von P27459 in pWM91, Ap <sup>r</sup> in <i>E. coli</i> <i>dap</i> <sup>-</sup>	C.C. Häse

Tab. III-3: Oligonukleotide. Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon und SigmaGenosys synthetisiert. Hervorgehobene Nukleotide kennzeichnen eingefügte Restriktionsschnittstellen oder überlappende Sequenzen.

Konstruktion von pCVD442-Derivaten zur Erzeugung von Deletionsmutanten		
Plasmid	Oligonukleotid	Sequenz
pCVDΔ <i>lon</i>	lon-Start-SacI	5'-AATGAGCTCTGACGAATCTGTGATCAACGG-3'
	lon-Start-NcoI	5'-TATCCATGGATTTCAGCAACTGTAAGATGGT-3'
	lon-Ende-NcoI	5'-AAACCATGGAGCAACCGTATTGGTCAAGTG-3'
	lon-Ende-XbaI	5'-TTATCTAGAACCACGCAGAGTGATTT-3'

pCVD $\Delta$ <i>rpoS</i>	VCO533-intern-XbaI	5'-AATGGTACCTCTAGACGATCAAGGCAACAAAGGGA TAG-3'
	VCO533-Stopp-Überhang	5'- <u>CCCATCCACTATAAACTAACA</u> ATATGAGTTAAGGT AGCGT-3'
	rpoS-intern-Überhang	5'- <u>TGTTAGTTTATAGTGGATGGGTGCGTCTTAACGAACG</u> GATCAAGTAGC-3'
	rpoS-Stopp-SpHI	5'-ATTGCATGCTTAGTTGTCGTATTCGACGTTAAA-3'
pCVD $\Delta$ <i>rssB</i>	VC1050-Anfang-XbaI	5'-ATTCTAGATTGCGTGATGTCAACTTGTAAGAT-3'
	VC1050-Anfang-Überhang	5'- <u>TGTTAGTTTATAGTGGATGGGAAGCGCAGCGCTTTAG</u> CCACA-3'
	VC1050-Ende-Überhang	5'- <u>CCCATCCACTATAAACTAACACACT</u> ATTACCAGAA AAGGATTCTC-3'
	VC1050-Ende-SpHI	5'-AATGCATGCTTGATAGAGATCAAAGTAAACTG-3'
<b>Konstruktion von pGP704-Derivaten zur Erzeugung von Insertionsmutanten</b>		
pGP <i>cheA1</i>	cheA1-SacI	5'-AATGAGCTCTCAGCAGAGGCGGTA-3'
	cheA1-XbaI	5'-AAATCTAGACTGCATCACAACAGACTG-5'
pGP <i>cheA3</i>	cheA3-SacI	5'-ACCGAGCTCTTCAATGTTGCG-3'
	cheA3-XbaI	5'-AAATCTAGACTGCGTATCTTACGTGAG-3'
pGP <i>clpA</i>	clpA-SacI	5'-ATGAGCTCCATCTTCTGATCCAG-3'
	clpA-XbaI	5'-AATCTAGAGACGCCATCCTGTTTATC-3'
pGP <i>clpP</i>	clpP-SacI	5'-ATGAGCTCTGCCGACATGAAGTTATCACG-3'
	clpP-XbaI	5'-AATCTAGAGACGCACTCGTACCTATGGTG-3'
pGP <i>clpX</i>	clpX-SacI	5'-ATGAGCTCGAACTCTGGGATCAA-3'
	clpX-XbaI	5'-TATCTAGACTGGATGTGCCATTT-3'
pGP <i>fexB</i>	fexB-SacI	5'-TAAGAGCTCGTCTTCGACCATGAAAATATTCAG-3'
	fexB-XbaI	5'-ATATCTAGAGATGTTTATCGCAAAGAGA-3'
pGP <i>ftsH</i>	ftsH-SacI	5'-AAGAGCTCGCCTTGATTGCCTTCAAAACCATC-3'
	ftsH-XbaI	5'-AATCTAGACAGATTCAGGAAGCTCAATTCAAC-3'
pGP <i>hslVU</i>	hslVU-SpHI	5'-AAAGCATGCAAATCGAGCCCTGCGCTATC-3'
	hslVU-XbaI	5'-AATTCTAGACAGCGGTTCCACCAGCAAAG-3'
pGP <i>lon</i>	lon-SacI	5'-ATTGAGCTCCGATTTTCAGACTCCATCTGCCCCAT-3'
	lon-XbaI	5'-AATTCTAGACGATCCAGTGCCTAGAAGCG-3'
pGP <i>osmK</i>	osmK-SacI-intern	5'-TTTGAGCTCTTTGATTATAAATTCTGCGACGA-3'
	osmK-XbaI-intern	5'-TTTTCTAGATATCCCCTTTTCTTAACCATAA-3'
pGP <i>osmR</i>	osmR-SacI-intern	5'-AATGAGCTCGTTATCCTTGATCGCCAAC-3'
	osmR-XbaI-intern	5'-TTATCTAGAGCAGTAAATCAAACCTCGGT-3'
pGP <i>rssB</i>	rssB-SacI	5'-ATGAGCTCAGCTCGACACTAAAGTTACGC-3'
	rssB-XbaI	5'-AATCTAGACCAGACTTGATTCTGTGTGAT-3'
<b>Konstruktion von Expressionsplasmiden mit His-Tag</b>		
pQE30 <i>clpX</i>	His-KpnI-ClpX	5'-TAGGTACCATGACAGACAAAAGCAAAGAG-3'
	ClpX-KpnI	5'-TAGGTACCATTGAATACCTCCTCGTTATT-3'
pQE30 <i>rpoS</i>	rpoS-Start-KpnI	5'-ATAGGTACCATGAGTGTGTCAGCAATACCGTAA-3'
	rpoS-Stopp-KpnI	5'-ATTGGTACCTTAGTTGTCGTATTCGACGTTAA-3'
pQE30 <i>rssB</i>	His-KpnI-RssB	5'-TTGGTACCATGTATAAATCTCACATCCCG-3'
	RssB-KpnI	5'-TAGGTACCACACTCACACTTTAGGCGGAA-3'

Weitere Oligonukleotide		
Nachweis <i>osmK</i>	VCA0565-SacI-intern VCA0565-XbaI-intern	5'-TTTGAGCTCTTTGATTATAATTCTGCGACGA-3' 5'-TTTCTAGATATCCCCTTTTCTTAACCATAA-3'
Nachweis <i>osmR</i>	VCA0566-SacI-intern VCA0566-XbaI-intern	5'-AATGAGCTCGTTATCCTTGATCGCCTAACT-3' 5'-TTATCTAGAGCAGTAAATCAAACCTCGGT-3'

## 2. Geräte und Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die benötigten Enzyme wurden bei Invitrogen (Gibco), Hybaid oder New England Biolabs (NEB) bestellt.

Für die Präparation von Plasmid-DNA oder die Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarose-Gelen wurden die Systeme Nucleobond®-AX 100 (Macherey-Nagel), QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) sowie QIAquick® Gelextraction Kit (Qiagen) verwendet.

Um rekombinante Proteine mit einer HisTag-Fusion aufzureinigen, kam der Proteino®-Ni 1000 prepacked column Kit (Macherey-Nagel) zur Anwendung.

Der „ECL direct nucleic acid labelling Kit“, der „ECL detection Kit“, die ECL-Hyperfilme, die Nitrocellulosemembranen (Hybond C) sowie die Nylonmembranen (Nybond N<sup>+</sup>) wurden von Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

Die benutzten Geräte sind in Tabelle III-4 aufgelistet.

**Tab. III-4: Verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	Ohaus Navigator, Sartorius
Autoklav	MM Selectomat S2000, Fedegari
Automatikpipette	Gilson, Eppendorf
Brutschränke	Heraeus
DNA/RNA-Messung	Gene Quant pro RNA/DNA Calculator; Amersham Pharmacia Biotech
Elektroporationsgerät	EQUIBIO (Easyject prima), Gene Pulser und Pulse Controller, BioRad
ELISA-Reader	Titertek Multiscan MCC/340 F. S. Bartolomey Labortechnik
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	Sub-Cell GT, BioRad
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	Mini Protean III, BioRad
Elektrophoresekammer für 2D-Gele	Protean II Xi Cell, BioRad
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme	Curix 60, Agfa
Feinwaage	Chyo, Sartorius (Kern 770)
Gefrierschränke	Liebherr
Geldokumentationsanlage	UVT-28MP, Herolab
Geltrockner	BioRad

Gießkammer für 2D Gele	Protean II Multi-Gel Casting Chamber, BioRad
Heizblock	Liebisch
Hybridisierungsöfen	Biometra OV 5, Hybaid MWG Biotech
Inkubator	ThermiconT, Heraeus
Isoelektrische Fokussierung	Protean IEF Cell, BioRad
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifugen	Sorvall RC5B und RC5B plus, Beckman
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph
Microarray-Scanner	Scanarray MT, Perkin-Elmer
Mikrowelle	MWS 1820 Duo, Bauknecht
pH-Elektrode	Sen Tix61, WTW
pH-Meter	pH 530, WTW
Photometer	U-2000 Spectrophotometer, Hitachi
Pippet Boy	Accu-jet, Brand
Power Supply für 2D-Electrophorese	3000 Xi, BioRad
Semidry-Blotgerät	Trans Blot SD, BioRad
Schüttler	Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
Schwenker	Phero-Shaker, Biotec
Spannungsgeräte	Power Pac 300 und 2000; Power Supply Model Xi und 500/1000 (BioRad), Consort
Thermocycler	T3, Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge 15, Heraeus
UV-Stratalinker	Stratalinker 1800, Stratagene
Vakuumblotgerät	VacuGene XL, Pharmacia Biotech
Vortexer	REAX 2000, Heidolph
Wasserbadinkubator	Memmert
Wasserkühler für 2D-Electrophorese	Haake F3 Fisions, Colora Messtechnik GmbH
Wippe	Duomax 1030, Heidolph
Zellaufschluss	Thermo Savant FastPrep FP120, SLM Instruments/Thermo Spectronic

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien, Materialien und Geräte wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gibco, Greiner, MWG, Roth, Sigma-Aldrich und NEB bezogen.

### 3. Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen

Für die Herstellung der Medien und Lösungen wurde Ampuwa®-Wasser (Fresenius Kabi, Deutschland GmbH) oder dH<sub>2</sub>O verwendet. Die Zusammensetzung der Medien und Medienzusätze ist nachfolgend kurz beschrieben.

### 3.1 Medien

LB (Luria-Bertani) (189)	von Invitrogen	20 g
	NaCl	5 g
	ad 1 l Ampuwa®; autoklavieren	
LB-Agar (189)	von Invitrogen	32 g
	NaCl	5 g
	ad 1 l Ampuwa®; autoklavieren	
M9-Minimalmedium (190)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
	NaCl	0,5 g
	NH <sub>4</sub> Cl	1 g
	ad 1 l Ampuwa®; autoklavieren;	
	Zugabe von 1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
	0,01 M CaCl <sub>2</sub>	10 ml
20% Glucose	10 ml	
M9-Minimalagar (190)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
	NaCl	0,5 g
	NH <sub>4</sub> Cl	1 g
	Agar-Agar	16 g
	ad 1 l Ampuwa®; autoklavieren;	
	Zugabe von 1M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
0,01M CaCl <sub>2</sub>	10 ml	
20% Glucose	10 ml	
Suc-Agar	Yeast Extract	5 g
	Trypton	10 g
	Agar-Agar	16 g
	ad 700 ml dH <sub>2</sub> O; autoklavieren	
Nach dem Abkühlen der Agarlösung auf ca. 50 °C wurden 300 ml sterilfiltrierter Saccharoselösung (100 g/300 ml) zugesetzt.		



### 3.2 Medienzusätze:

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und erst dann den Medien zugegeben, nachdem diese auf <50 °C abgekühlt.

Ampicillin (Ap)	Stammlösung 100 mg/ml in dH <sub>2</sub> O; Lagerung -20 °C Endkonzentration 100 µg/ml oder in Kombination mit anderen Antibiotika 50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	Stammlösung 2 bzw. 30 mg/ml in dH <sub>2</sub> O; Lagerung 4 °C Endkonzentration 2 µg/ml ( <i>V. cholerae</i> ) bzw. 30 µg/ml ( <i>E. coli</i> )
Kanamycin (Km)	Stammlösung 50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O; Lagerung 4 °C Endkonzentration 50 µg/ml
Streptomycin (Sm)	Stammlösung 100 mg/ml in dH <sub>2</sub> O; Lagerung 4 °C Endkonzentration 100 µg/ml
Arabinose (Ara)	Stammlösung 1M in dH <sub>2</sub> O; Lagerung Raumtemperatur Endkonzentration 1 mM
Glucose (Glc)	Stammlösung 20% in dH <sub>2</sub> O; Lagerung Raumtemperatur Endkonzentration 0,2%
Saccharoselösung (Suc)	100 g in 300 ml dH <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	Stammlösung 0,01 M Endkonzentration 1 mM
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	Stammlösung 1 M Endkonzentration 1 mM
Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG)	Stammlösung 1 M in dH <sub>2</sub> O; Lagerung -20 °C Endkonzentration 1 mM
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz (X-Gal)	Stammlösung 40 mg/ml in DMSO; Lagerung -20 °C Endkonzentration 40 µg/ml

### 3.3 Wachstumsbedingungen

Sofern es an betreffender Stelle nicht anders vermerkt ist, wurden die Bakterien bei 37 °C kultiviert. Ein selektives Wachstum der Zellen wurde durch den Zusatz geeigneter Antibiotika unterstützt. Durch Schütteln (250 rpm) konnte zusätzlich eine ausreichende O<sub>2</sub>-Versorgung für Flüssigkulturen gewährleistet werden.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 Präparation chromosomaler DNA

#### Arbeitslösungen

TNE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0 10 mM NaCl 10 mM EDTA
TNEX-Puffer	TNE-Puffer 1% TritonX 100

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte in Anlehnung an die Methode von Grimberg et al. (98). Dabei wurden zunächst 2 ml einer ÜNK für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend in 1 ml TNE-Puffer gewaschen (10 min, 5000 rpm, RT) und dann in 270 µl TNEX-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung (5 mg/ml H<sub>2</sub>O) wurde der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden dem Lysat 15 µl Proteinase K (20 mg/ml H<sub>2</sub>O) zugesetzt und alles bei 65 °C für mindestens 2 h inkubiert. Im Anschluss wurde die nun klare Lösung mit einem Volumen Phenol (gesättigt in TE pH 8, Roth) versetzt, in 2 ml „Phase-lock Gel“-Gefäße (Eppendorf) überführt und durch Zentrifugation (5 min, 15.000 rpm, RT) extrahiert. Aus dem wässrigen Überstand (ca. 300 µl) konnte nun die chromosomale DNA über die Zugabe von 30 µl 5 M NaCl und 750 µl 100% Ethanol gefällt werden. Dazu wurde der Ansatz zunächst durch Invertieren gemischt, für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das DNA-Pellet anschließend in 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Der finale Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet (10 min, 37 °C). Das DNA-Präzipitat wurde zum Schluss in 75 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

## 4.2 Präparation von Plasmid-DNA

### Arbeitslösungen

S1-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8 10 mM EDTA, pH 8; autoklavieren 100 µg/ml RNaseA zugeben
S2-Puffer	200 mM NaOH 1% SDS
S3-Puffer	2,8 M KAc; auf pH 5,1 einstellen
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA, pH 8; autoklavieren

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde ein von Birnboim und Doly (27) beschriebenes Protokoll leicht modifiziert. 2 ml einer ÜNK wurden zunächst pelletiert (5 min, 5000 rpm, RT) und anschließend in 300 µl S1-Puffer resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 300 µl S2-Puffer zugegeben, die Mixtur durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 300 µl S3-Puffer versetzt, erneut durch Invertieren gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde der plasmidhaltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7x Volumen Isopropanol und Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm, RT) gefällt. Das Pellet wurde mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und zuletzt in 30 µl dH<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Gewinnung reiner oder größerer Mengen von Plasmid-DNA, wurde das Plasmidpräparations-Kit Nucleobond® AX 100 von Macherey-Nagel verwendet.

## 4.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung und Ligation

### **Restriktionsverdau**

Die Generierung spezifischer Mutanten und die Analyse präparierter DNA erforderte die Behandlung mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Die benötigten Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen (NEB) und Gibco bezogen und mit den von den jeweiligen Herstellern empfohlenen Puffern und Reaktionsbedingungen verwendet. Dabei

wurden für analytische Zwecke 5 µl DNA in einem Reaktionsvolumen von 30 µl 2h verdaut und die Enzyme im Anschluss über die Zugabe von 3 µl 10x Auftragspuffer inaktiviert. Im Rahmen einer Klonierung erfolgte die Behandlung von 15 µl DNA ÜN in einem Reaktionsvolumen von 100 µl.

### **Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Für Klonierungen wurde die entsprechende Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau zusätzlich mit einer alkalischen Phosphatase nach Standardvorschrift dephosphoryliert (CIP, NEB). Die finale Aufreinigung der DNA-Fragmente aus den jeweiligen Verdauungs-Ansätzen wurde mit dem QIAquick®-System (Qiagen) durchgeführt.

### **Ligation**

Die Ligation der geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente mit den Plasmid-Vektoren wurde mit dem T4-DNA-Ligase-System (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers ausgeführt (0,5 U/µg Vektor-DNA in NEB-Puffer 3, 60 min, 37 °C).

## **4.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese**

### Arbeitslösungen

50x TAE	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA, pH 8	100 ml
	ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren	
10x TBE	890 mM Tris	
	890 mM Borsäure	
	2 mM EDTA	
10x Auftragspuffer	0,5% Sarcosyl	
	50 mM EDTA, pH 8	
	20% Glycerin	
	0,05% Bromphenolblau	

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe und wurde als horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (243). Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden dabei Gele mit Konzentrationen von 0,7 – 1% Agarose (w/v) in 1x TAE-

Puffer bzw. 1x TBE verwendet. Dazu wurde die notwendige Menge Agarose in 1x TAE/ 1x TBE bis zum Lösen der Agarose aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurde das Gel für eine vollständige Polymerisierung in einen abgedichteten Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen. Im Anschluss wurden die Kämmen entfernt und das Gel in einer Laufkammer positioniert. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt und unter Verwendung von 1x TAE/ 1x TBE als Laufpuffer im Gel aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (NEB bzw. Gibco) oder die SmartLadder<sup>TM</sup> (Eurogentec) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 120 V (TAE-Gele) oder 140 V (TBE-Gele). Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (300 µl auf 1 l dH<sub>2</sub>O) gefärbt und die DNA-Banden danach unter UV-Licht detektiert.

#### 4.5 PCR und Aufkoch-PCR

##### PCR

Für die Amplifizierung von Genen als Standardanwendung wurde das Taq DNA-Polymerase System (NEB) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Für PCR-Produkte, die in Klonierungen eingesetzt werden sollten, erfolgte die Generierung mit dem 3'-5'-Exonuklease-aktiven Triple Master PCR System (Eppendorf). Die entsprechenden Ansätze wurden in Anlehnung an das Protokoll von Mullis und Fallono (201) wie folgt gemischt:

1x Mastermix ThermoPol-System (50 µl):

Ampuwa®-steril	37,5 µl
Template	4 µl
dNTP (100 pmol)	1 µl
Oligonukleotid 5' (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid 3' (10 µM)	1 µl
10x ThermoPol-Buffer	5 µl
Taq DNA Polymerase	0,5 µl

1x Mastermix Triple-Master-System (50 µl):

Ampuwa®-steril	39,5 µl
Template	2 µl
dNTP (100 pmol)	1 µl
Oligonukleotid 5' (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid 3' (10 µM)	1 µl

10x High Fidelity Buffer	5 $\mu$ l
Triple Master (2 U)	0,5 $\mu$ l

Die eigentliche PC-Reaktion wurde mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C sowie einer Polymerisationstemperatur von 72 °C durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer/DNA-Komplexe (2 °C für jedes AT-Paar und 4 °C für jedes GC-Paar) berechnet. Bei unterschiedlichen Primer-Schmelztemperaturen galt die niedrigere Temperatur als bestimmende Hybridisierungstemperatur. Die Polymerisationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes, wobei pro 1000 Nukleotide eine Minute veranschlagt wurde. Die PC-Reaktion wurde mit 30 Zyklen durchgeführt, denen ein 5-minütiger Denaturierungsschritt bei 95 °C voranging und die durch zusätzliche 5 min bei 72 °C abgeschlossen wurden.

#### **Aufkoch-PCR**

Diese Art der PCR kam für die schnelle Überprüfung putativ positiver Klone zur Anwendung. In diesem Fall wurde die DNA direkt aus den Zellen gewonnen und anschließend wie oben beschrieben amplifiziert. Zunächst wurden mit einem Zahnstocher geringe Mengen eines ÜN-Ausstriches der betreffenden Klone in 50  $\mu$ l steriles dH<sub>2</sub>O eingerieben. Um die Zellen aufzubrechen, wurde die Bakterien-Suspension 10 min bei 100 °C aufgekocht. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, RT) und 2  $\mu$ l des DNA-haltigen Überstandes als Template in der PCR eingesetzt.

#### **4.6 DNA-Sequenzierung**

Das für die Sequenzierung verwendete Protokoll basiert auf der von Sanger et al. beschriebenen Methode (244). Dabei wurde das zu analysierende Material als Plasmid-DNA vorbereitet (vgl 4.2). 2-4  $\mu$ l dieser DNA wurden dann mit 1  $\mu$ l des jeweiligen Sequenzierprimers (100  $\mu$ M) versetzt und der Ansatz mit sterilem dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8  $\mu$ l ergänzt. Die eigentliche Untersuchung dieser Proben wurde im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt. Dabei erfolgte die Sequenzier-Reaktion mit dem Big dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe des automatischen Sequenzierers AB1377 analysiert. Die endgültigen Sequenzen wurden als Computerdateien zur Verfügung gestellt.

#### 4.7 Southernblot

1975 entwickelte Edwin Southern ein Verfahren, das den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch ermöglicht (263). Die zu untersuchende DNA wird dabei fragmentiert und nach ihrer elektrophoretischen Trennung kovalent auf eine Membran fixiert. Auf dieser Membran wird dann mit einer zu der gesuchten Sequenz komplementären, einzelsträngigen Sonde die Zielsequenz detektiert.

##### Arbeitslösungen

Lösung A (Depurinierung)	250 mM HCl
Lösung B (Denaturierung)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Lösung C (Neutralisierung)	1,5 M NaCl 0,5 M Tris auf pH 7,5 einstellen; autoklavieren
20x SSC (Blotpuffer)	0,3 M NaCitrat 3 M NaCl auf pH 7 einstellen; autoklavieren
Hybridisierungspuffer	Lösungen aus ECL-Kit von Amersham (RPN 3001): 500 ml Goldpuffer 5% Blockingreagenz 0,5 M NaCl
Waschpuffer 1	6 M Harnstoff 0,4% SDS 0,5x SSC
Waschpuffer 2	2x SSC

##### **Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels**

Die Southernblot-Analysen wurden mit der chromosomalen DNA aus den zu überprüfenden Mutanten durchgeführt. Nach der Präparation dieser DNA (vgl. 4.1) wurden ~10 µg mit geeigneten Restriktionsenzymen ÜN in 50 µl Ansätzen verdaut (vgl. 4.3). Am nächsten Tag wurden die Proben über ein 1%-iges TBE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V aufgetrennt

(vgl. 4.4) bis die Bromphenol-Lauffront des Auftragpuffers ca. 2/3 der Laufstrecke erreicht hatte. Für die anschließende UV-Detektion der fragmentierten DNA wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad kurz gefärbt und nachfolgend zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, mit dessen Hilfe die DNA-Fragmente nach ihrem Transfer wieder zugeordnet werden konnten.

Um den Transfer vorzubereiten, wurde das Gel zunächst für maximal 15 min in Lösung A geschwenkt. Im Idealfall sollte dabei das Bromphenolblau nach gelb umschlagen. Diesem Depurinierungsschritt und einem kurzem Abspülen mit dH<sub>2</sub>O schloss sich eine 2x 15-minütige Behandlung in Lösung B an, um die DNA zu denaturieren. Nach erneutem Abspülen folgte die Neutralisierung des Gels für 30 min in Lösung C. Im Anschluss wurde das Gel wiederum kurz mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in 20x SSC inkubiert.

### **Transfer der DNA auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran**

Der eigentliche Transfer wurde als Kapillarblot ausgeführt (pers. Mitteilung G. Gerlach). Dabei findet die Übertragung der aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>) in Abhängigkeit von Kapillarkräften statt. Dazu wurde eine kleine Schale mit 20x SSC gefüllt. Darüber wurde eine Glasplatte gegeben, auf die ein der Länge des Gels entsprechendes Whatman-MM3-Papier gelegt wurde, dessen beide Enden in den Blotpuffer eintauchten. Auf diese „Brücke“ wurde das Gel gebettet und eine auf die Größe des Gels zugeschnittene, in 20x SSC eingeweichte Nylonmembran luftblasenfrei obenauf gelegt. Es folgten 7-10 Schichten Whatman-MM3-Papier, von denen die ersten 3 gleichermaßen in Blotpuffer geschwenkt worden waren. Darauf wurde ein ca. 5 cm hoher Stapel Papiertücher, ebenfalls in Gelgröße, gelegt. Der „Turm“ wurde mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Der Transfer erfolgte anschließend ÜN bei RT.

Am nächsten Tag wurden die Geltaschen auf der „DNA-Seite“ der Nylonmembran markiert und die Membran zur Entfernung von Agaroseresten kurz in 2x SSC gewaschen. Die DNA wurde nachfolgend durch Crosslinking mit UV-Strahlung (1x Auto Crosslink) kovalent an die Membran gebunden.

### **Vorhybridisieren, Markierung der Sonde und Hybridisierung**

Dem Transfer der DNA-Fragmente auf die Membran wurde diese zunächst vorhybridisiert. Dazu wurde der Blot mit der DNA-Seite nach innen gerollt und möglichst luftblasenfrei in ein Hybridisierungsgefäß überführt. Anschließend wurden ca. 20 ml, auf 42 °C vorgewärmter, Hybridisierungspuffer dazu gegeben und alles für mindestens 60 min bei 42 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert.



Die Sonde wurde gemäß der Anleitung des „Ecl direct nucleic acid labelling and detection Kit“ (Amersham) wie folgt durchgeführt: 100 ng DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt) oder 2 µl Plasmid-DNA wurden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10 µl ergänzt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde die Sonde kurz abzentrifugiert und anschließend mit 10 µl DNA-Labelling-Reagenz versetzt. Es folgte die Zugabe von 10 µl Glutaraldehyd, ein weiteres Mal Abzentrifugieren und 10 min Inkubation bei 37 °C. Die gelabelte Sonde wurde nun mit etwas Hybridisierungspuffer versetzt und der Vorhybridisierung zugeführt. Die Hybridisierung wurde bei 42 °C ÜN im Hybridisierungsöfen durchgeführt.

### **Waschen und Entwickeln der Membran**

Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 2x 20 min und 1x 10 min mit Waschpuffer 1 bei 42 °C behandelt. Es folgten 2x 5 min Waschen bei RT mit Waschpuffer 2. Die Detektion der mit der Sonde hybridisierten DNA-Fragmente wurde unter Verwendung des ECL-Kits durchgeführt. Hierbei wurden beide ECL-Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran damit für 1 min überschichtet. Mit Hilfe eines aufgelegten Röntgenfilms konnten daraufhin die Signale der gebundenen Sonde visualisiert werden. Die Expositionsdauer richtete sich dabei nach der Signalstärke.

### **„Strippen“ des Blots**

Für eine weitere Hybridisierung der gleichen Membran mit einer anderen Sonde wurde diese mit kochender 0,5% SDS-Lösung übergossen und auf einem Schüttler bis zur Abkühlung auf RT inkubiert. Nach kurzem Waschen in 2x SSC konnte die Prozedur, beginnend mit der Vorhybridisierung, wiederholt werden.

## **4.8 Plasmidkonstruktionen**

Allen Plasmidkonstruktionen lag das gleiche Schema zugrunde: Zunächst wurden aus 200 ml LB-ÜNK des plasmidtragenden *E. coli*-Stammes das jeweilige Ausgangsöasmid unter Verwendung des Plasmidpräparations-Kit Nucleobond® AX 100 von Macherey-Nagel gewonnen. Im Anschluss wurden 15 µl des Plasmids mit den gewünschten Restriktionsenzymen in einem Reaktionsvolumen von 100 µl ÜN verdaut (vgl. 4.3). Das geschnittene Plasmid wurde dann in einem 0,7% Agarosegel (TAE) elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend mit Hilfe des Qiaquick® Gel-Elution Kits aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde abschließend für 45 min mit einer alkalischen Phosphatase (CIP, NEB) nach

Herstellerangaben desphosphoryliert und erneut mit dem Qiaquick®-Kit aufgereinigt. In dieser Form wurden die Plasmide bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.8.1 Konstruktion von pGP704-Derivaten für Insertionsmutationen

Eine Übersicht aller erzeugten pGP-Derivate befindet sich in der Tabelle III-2. Mit Ausnahme des Plasmides pGP*hslVU* (Doppelverdau mit *SphI* und *XbaI* von Invitrogen) wurde für die Erzeugung aller Konstrukte das pGP-Plasmid mit *SstI* (Gibco; entspricht *SacI* von NEB) und *XbaI* (Gibco) doppelverdaut. Weiterhin wurde ein internes Fragment des jeweiligen Zielgens durch PCR amplifiziert. Dabei wurden unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (Tab. III-3) die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *XbaI* (bzw. *SphI* und *XbaI* für das Genfragment aus *hslVU*) in das zu klonierende Fragment eingebaut. Als Template diente grundsätzlich chromosomale DNA aus P27459-S. Nach der PC-Reaktion wurde das Produkt zunächst in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt und anschließend unter Verwendung des Qiaquick®-Kits aus dem Gel aufgereinigt. Das Eluat wurde dann mit den Restriktionsenzymen *SstI* (Gibco) und *XbaI* (Gibco) ÜN doppelverdaut (vgl. 4.3) und wiederum aufgereinigt.

Das so präparierte Fragment des Zielgens wurde nun mit dem geöffneten pGP-Plasmid über das T4-DNA-Ligase-System ligiert (ÜN,  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Das Ligationsprodukt wurde dann in kompetente SM10 $\lambda$ *pir* Zellen transformiert und Ap<sup>r</sup> Kolonien über Aufkoch-PCR und Restriktionsverdau der daraus präparierten Plasmide überprüft.

#### 4.8.2 Konstruktion von pCVD-Derivaten für Deletionsmutationen

Die Generierung von Deletionsmutanten basierte auf der homologen Rekombination zweier sequenziell nicht aufeinander folgender interner Fragmente des Zielgens ins Genom, so dass das ursprüngliche Gen um die zwischen diesen Fragmenten liegende Sequenz verkürzt wurde. In der Regel wurden für die Integration der hybridisierten Fragmente in das Genom Suizid-Vektoren verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 3 pCVD-Konstrukte mit zwei Methoden gefertigt. Für die Erzeugung der Plasmide pCVD $\Delta$ *rpoS* und pCVD $\Delta$ *rssB* wurde wie folgt vorgegangen: Zu Beginn wurde das Basis-Plasmid mit *SstI* und *XbaI* (Gibco) geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Desweiteren wurden in einer PC-Reaktion zwei ca. 500 bp große Fragmente jeweils upstream (F<sub>5'</sub>) und downstream (F<sub>3'</sub>) von der zu deletierenden Sequenz amplifiziert. Dabei wurden durch die verwendeten Oligonukleotide (vgl. Tab. III-3) den Fragmenten an ihrer der Deletionssequenz zugewandten Seite Nukleotide eingefügt, die aufgrund ihrer Sequenz komplementär hybridisieren konnten. Chromosomale DNA aus

P27459-S diene für jede Konstruktion als Template. Beide Fragmente wurden anschließend über ein 0,7% TAE-Agarosegel aufgereinigt. Die sauberen PCR-Produkte wurden nun als Template in einer weiteren PCR verwendet: In 100 µl Reaktionsvolumen wurden je 2 µl des jeweiligen F<sub>5</sub> und F<sub>3</sub>, zunächst für 5 Zyklen ohne Primer amplifiziert. In diesem Schritt sollten die beiden Fragmente aufgrund der eingefügten, sich überlappenden Bereiche hybridisieren. In weiteren 25 Zyklen mit spezifischen Primern sollten dann dem hybridisierten Fragment die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *XbaI* zugefügt werden. Das resultierende PCR-Produkt wurde über ein TAE-Agarosegel aufgereinigt und entsprechend doppel-verdaut. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt wurde das hybridisierte DNA-Fragment mit dem entsprechend vorbereiteten pCVD-Plasmid ligiert und dieser Ansatz in kompetente SM10λ*pir* Zellen transformiert. Ap<sup>r</sup>-Klone wurden mittels Aufkoch-PCR und Restriktionsverdau der präparierten Plasmid-DNA überprüft.

Das Plasmid pCVDΔ*lon* wurde in Anlehnung an dieses Protokoll konstruiert. Prinzipiell wurden die gleichen Schritte durchgeführt, allerdings mit dem Unterschied, dass die beiden Fragmente F<sub>5</sub> und F<sub>3</sub>, anstatt der sich überlappenden Nukleotide mit einer Restriktionsschnittstelle für *NcoI* (NEB) in Richtung Deletionssequenz generiert wurden. Nach der Elution dieser Fragmente aus einem 0,7% TAE-Gel schloss sich eine ÜN-Behandlung mit *NcoI* an. Die aus dem Verdau gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend wie oben beschrieben in einer zusätzlichen PCR eingesetzt, um an das hybridisierte Fragment über die spezifischen Oligonukleotide VC1050-Anfang-*XbaI* und VC1050-Ende-*SphI* die Sequenzen für *SphI* und *XbaI* anzuhängen. Das resultierende Produkt wurde wie bereits dargestellt über ein TAE-Gel gereinigt und nachfolgend ÜN verdaut. Die sich anschließende Ligation wurde mit einem analog verdauten und dephosphorylierten pCVD-Plasmid durchgeführt. Alle weiteren Schritte sind identisch zu dem Konstruktionsprotokoll für die anderen pCVD-Derivate.

#### **4.8.3 Expressionsplasmide - pQE30-Derivate**

Für die kontrollierte Expression der *rpoS*-, *rssB*- und *clpX*-Genprodukte war die Klonierung in ein Expressionsplasmid erforderlich. Mit der Wahl des pQE30-Systems von Qiagen bot sich die Möglichkeit, die Proteine rekombinant mit N-terminalem His-Tag zu fusionieren. Zunächst wurden die Zielgene durch PCR mit den Oligonukleotid-Paaren „*rpoS*-Start-KpnI“ und „*rpoS*-Stopp-KpnI“, „His-KpnI-RssB“ und „RssB-KpnI“ bzw. „His-KpnI-ClpX“ und „ClpX-KpnI“ und unter Verwendung chromosomaler DNA aus P27459 als Template amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde nach der elektrophoretischen

Auftrennung in einem 0,7% TAE-Agarosegel als Gelelektion durchgeführt. Dem schloss sich ein ÜN-Verdau mit *KpnI* (vgl. 4.3) und ein weiterer Aufreinigungsschritt an. Danach wurden die PCR-Produkte mit dem pQE30-Plasmid, welches zuvor ebenfalls mit *KpnI* behandelt und dephosphoryliert worden war, ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente XL1-Blue Zellen, die das *placIq*-Plasmid enthielten, transformiert. Die Transformanten wurden nach  $Ap^r$ - und  $Km^r$ -Kolonien selektioniert und putativ positive Klone durch Sequenzierung kontrolliert.

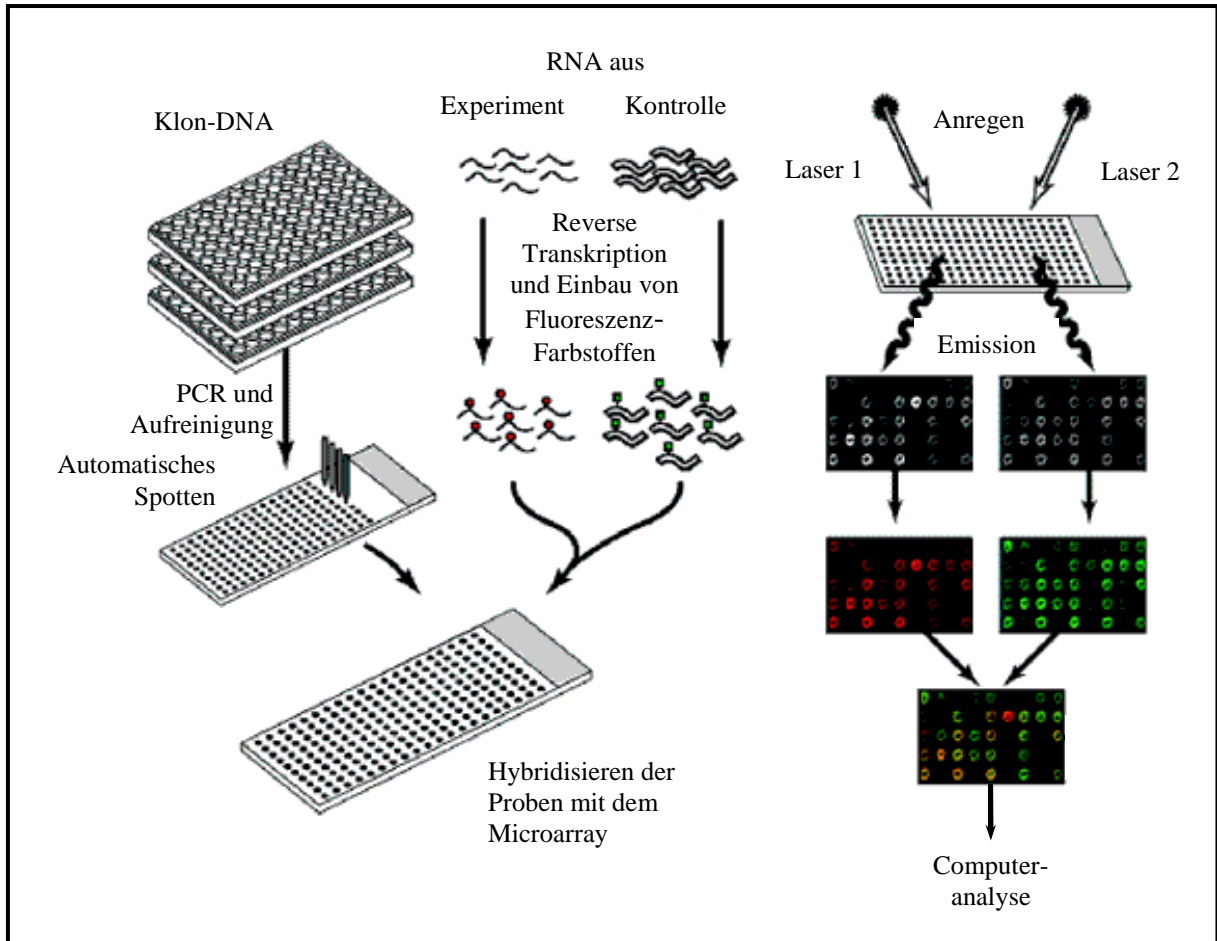
#### 4.8.4 Konstruktion des Komplementationsplasmids pBAD18-Kan*clpX*

Das  $Km^r$  Expressionsplasmid pBAD18-Kan*clpX* wurde generiert, um die  $Ap^r$  *clpX*-Knockout-Mutante des Wildtyps P27459-S komplementieren zu können. Die Konstruktion erfolgte in zwei Stufen: Zunächst wurde das Hilfsplasmid pQE30*clpX* erzeugt (vgl. 4.8.3), wodurch die Synthese des *V. cholerae* ClpX-Proteins als rekombinantes Protein mit N-terminalem HisTag ermöglicht wurde. Die plasmidvermittelte Expression von ClpX wurde anschließend in exponentiell wachsenden XL1-Blue Zellen nach der Induktion mit 1mM IPTG überprüft. Dazu wurde der Gesamtzellextrakt präpariert (vgl. 6.4) und die Proteinsynthese in Westernblot-Analysen mit Anti-HisTag-Antikörpern kontrolliert (vgl. 6.7). Aus den positiven *E. coli* Zellen wurde daraufhin das funktionsfähige pQE30*clpX*-Plasmid durch Präparation der Plasmid-DNA re-isoliert (vgl. 4.2). Es folgte ein ÜN-Verdau mit *KpnI*, um die DNA-Sequenz für die Expression des HisTag-fusionierten ClpX aus dem Plasmid zu gewinnen. Der Aufreinigung des entsprechenden Fragmentes schloss sich die Ligation in das ebenfalls *KpnI*-verdaute und dephosphorylierte pBAD18-Kan-Plasmid an. Das Ligationsprodukt wurde direkt in kompetente Zellen der *clpX*-Knockout-Mutante transformiert und die Synthese des rekombinanten ClpX-Proteins über Arabinose (Endkonzentration 1 mM) induziert.

#### 4.9 DNA-Microarray

Die in den 1990er Jahren entwickelte Technologie des DNA-Microarray (246) erlaubt die parallele Analyse der Expression von 10.000en Genen in einem einzigen Experiment. Prinzipiell werden dazu Gen-spezifische DNA-Fragmente zunächst auf einer Matrix (Objektträger) fixiert. Diese Matrix wird dann simultan mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierter cDNA von Test- und Referenz-Zellen hybridisiert. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erlaubt schließlich eine Bestimmung der relativen Menge von RNA-Transkript in den Test- bzw. Referenzzellen (Abb. III-1). DNA-Microarray-Analysen

ermöglichen somit u. a. den Vergleich von z. B. Tumorgewebe mit Normalgewebe oder die Untersuchung von Zellkulturen, die unterschiedlichen Bedingungen (Stressfaktoren, Antibiotika) ausgesetzt wurden.



**Abb. III-1: Schema eines DNA-Microarray-Experimentes (68).** Zunächst wird aus den zu vergleichenden Zellen RNA extrahiert. Diese wird anschließend in cDNA umgeschrieben und dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es folgt die Hybridisierung der markierten cDNA mit einer Matrix von zellspezifischen, amplifizierten DNA-Fragmenten. Anschließend wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarray nach der spezifischen Anregung des jeweiligen Fluoreszenz-Farbstoffes gemessen und ausgewertet.

In der Anwendung werden zwei Arten von Microarray unterschieden: Für sogenannte cDNA-Arrays werden meist PCR-amplifizierte cDNA-Fragmente mit einer Länge von 0,6-2,4 kb gespottet. Solche cDNA-Arrays sind aufgrund der relativ langen gespotteten Fragmente hochspezifisch. Arrays mit gespotteten synthetischen Oligonukleotiden (Oligos) stellen eine Alternative zu den cDNA-Arrays dar. Lange Oligos (50-120 Nukleotide) liefern gute Hybridisierungssignale und sind recht spezifisch. Bei der Verwendung kurzer Oligos (12-25 Nukleotide) steigt dahingegen die Gefahr von Fehlhybridisierungen erheblich. Deshalb werden für jedes Gen ca. 2-3 spezifische Oligos mit einer Länge bis zu 60mer synthetisiert. Die Synthese dieser Oligos erfolgt meist direkt auf dem Trägermaterial.

### **4.9.1 Präparation von RNA aus Flüssigkultur**

#### Arbeitslösungen

Die Gesamt-RNA wurde aus logarithmisch wachsenden Zellen unter Verwendung des RNeasy-Midi-Kit (Qiagen) isoliert. In Vorbereitung der Präparation wurde das benötigte Volumen an RLT-Puffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT ergänzt.

#### **Anzucht der Zellen**

100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml ÜNK beimpft und die Zellen bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,8-1 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur halbiert. Aus 50 ml wurde unmittelbar die RNA geerntet und später als Referenz verwendet. Die zweite Hälfte der Kultur wurde zunächst dem gewünschten Stress (vgl. III-7) ausgesetzt, bevor anschließend die RNA präpariert wurde.

#### **Präparation der RNA**

Die Zellen wurden zunächst in 50 ml Flüssigmedium bis zum Erreichen ihrer logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub>~1) kultiviert und durch Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und verbleibendes Medium sorgfältig entfernt. Für den nachfolgenden Aufschluss der Zellen wurde das Pellet in 1 ml RLT-β-Mercaptoethanol resuspendiert und die Zellsuspension in Fast RNA-Blue-Röhrchen überführt. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte über die in den Röhrchen enthaltene Silica/Ceramid-Matrix für 45 s bei einer Geschwindigkeit von 6,5 in einem FastPrep Schüttler (FP120). Anschließend wurde das überschüssige Zellmaterial abzentrifugiert (3 min, 13.000 rpm, RT). Der Überstand wurde dann in ein bereits vorgelegtes Gemisch aus 4 ml RLT-β-Mercaptoethanol und 2,8 ml absoluten Ethanol (RNase-frei) überführt. Die so vorbereitete Probe wurde auf RNeasy-Midi-Säulen gegeben, die wiederum in 15 ml Greiner Röhrchen platziert waren. Durch Zentrifugation (3 min, 4000 rpm, RT) wurde die RNA an die Membran der Säule gebunden. Dabei durfte ein maximales Beladungsvolumen von 4 ml nicht überschritten werden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule nachfolgend mit 4 ml RW1-Puffer erneut zentrifugiert (3 min, 4000 rpm, RT). Das nicht gebundene Material wurde abermals verworfen und die Säule 2x mit je 2,5 ml RPE-Puffer gewaschen (je 3 min, 4000 rpm, RT). Dem schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 4000 rpm an, um die Säulenmembran zu trocknen. Für die anschließende Elution wurde die Säule in ein neues RNase freies Röhrchen (im Kit enthalten) überführt und 250 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben. Nach einer 3 min Einwirkzeit wurde die Säule für 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit weiteren 250 µl RNase-freien

Wasser wiederholt, so dass am Ende ca. 450  $\mu$ l RNA-haltige Lösung gewonnen werden konnte. Die Ausbeute der Präparation wurde über ein Agarose-MOPS-Gel kontrolliert.

#### 4.9.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

##### Arbeitslösungen

0,1% DEPC-Wasser	1 l Ampuwa® 1 ml DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) bei 37 °C ÜN inkubieren; 2x autoklavieren
10x MOPS-Puffer	0,4 M MOPS („Morpholinopropane sulfonic acid”) 0,1 M Na-Acetat wasserfrei 10 mM EDTA pH 8 ad 1 l DEPC-H <sub>2</sub> O auf pH 7 einstellen; lichtgeschützt und RNase-frei lagern
2x Auftragspuffer	50% Glycerin 49,75% Formaldehyd 0,25% Bromphenolblau

Einzelsträngige RNA kann infolge von intramolekularen Basenpaarungen Sekundärstrukturen bilden und sollte daher unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Die Zugabe von Guanidinthiocyanat in das Gel garantiert die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen und ermöglicht so einheitliche Laufbedingungen.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden MOPS-Agarosegele (1%) gefertigt. Dazu wurde 1 g Agarose mit 5 ml 10x MOPS-Puffer und 72 ml DEPC-H<sub>2</sub>O versetzt und anschließend bis zum Lösen der Agarose aufgeköcht. Nachdem das Gemisch auf handwarm abgekühlt war, wurden 40  $\mu$ l Guanidinthiocyanat, 18,7 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 7,5  $\mu$ l Ethidiumbromid zugeben und das Gel in einen entsprechenden Gelschlitten mit Kämmen gegossen. In weiterer Vorbereitung wurden 10  $\mu$ l der RNA-Probe mit 1 Volumen des 2x Auftragspuffers gemischt und unmittelbar vor dem Auftragen für 3 min bei 65 °C erhitzt und nachfolgend sofort auf Eis gestellt. Nach der vollständigen Polymersierung des Gels konnten die RNA-Proben dann mit 1x MOPS als Laufpuffer aufgetrennt werden.

### 4.9.3 Verdau der RNA mit DNase

#### Arbeitslösungen

0,05 M MgSO<sub>4</sub> (DEPC-behandelt)

1 M Na-Acetat (DEPC-behandelt)

DNase I, RNase frei (Roche)

Um eine qualitativ hochwertige RNA zu erhalten, wurden mögliche DNA-Spuren durch eine Behandlung mit DNase entfernt. Dafür wurde das Volumen der RNA-Probe bestimmt und dementsprechend pro 39 µl RNA jeweils 5 µl 0,05 M MgSO<sub>4</sub>, 5 µl 1 M Na-Acetat und 1 µl DNase (10 U/µl) zugesetzt.

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Aufreinigung der RNA mittels RNeasy-Midi-Kit (Qiagen) wie bereits beschrieben (vgl. 4.9.1), beginnend mit der Zugabe des Verdauers in das Gemisch aus 4 ml RLT-β-Mercaptoethanol und 2,8 ml Ethanol. Die Qualität der eluierten RNA wurde erneut durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (vgl. 4.9.2).

Der vollständige Abbau unerwünschter DNA wurde außerdem über PCR mit Oligonukleotiden für Haushaltsgene (566-SacI-intern und 566-XbaI-intern) überprüft. Die abschließende Quantifizierung und Qualifizierung der RNA erfolgte photometrisch.

### 4.9.4 Reverse Transkription - Synthese von cDNA mit Cy-Labeling

Auf der Basis von mRNA können vergleichende Gen-Expressionsanalysen verschieden gestresster Bakterien-Zellen mittels Microarray durchgeführt werden. Dazu ist es aber nötig, die RNA der Test- und Referenz-Zellen in unterschiedlich fluoreszenzmarkierte cDNA umzuwandeln. Unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase kann diese komplementäre DNA generiert werden. Für die parallele Fluoreszenzmarkierung der Test- und Referenz-RNA werden meist Nukleotide verwendet, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Die Standardkombination ist hierbei Cy3 (Cyanin3) und Cy5 (Cyanin 5) und erfolgte in dieser Arbeit über den Einbau markierter dCTPs.

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde mRNA als Matrize verwendet. Dazu wurde die Gesamt-RNA wie unter 4.9.1 beschrieben isoliert und nach dem Protokoll 4.9.3 vorbereitet. Für jeden Umschrieb wurden 20 µg RNA verwendet, wobei das Volumen mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf jeweils 17,1 µl eingestellt wurde. In Abhängigkeit von der Probenanzahl wurde der Mastermix für die reverse Transkription entsprechend den Angaben in Tabelle III-5 zusammengestellt.



**Tab. III-5: Protokoll für die reverse Transkription mit Cy-Labeling.** Das Mischen der einzelnen Komponenten wurde auf Eis ausgeführt. Die Enzyme RNase Out und Superscript II wurden von Invitrogen bezogen. DTT im Mix stabilisiert die Reverse Transcriptase.

<b>Ansatz für folgende Probenzahl:</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>10 mM dCTP</b>	2 µl	4 µl	5,6 µl	7,2 µl	200 µM
<b>20 mM dATP</b>	2,5 µl	5 µl	7 µl	9 µl	500 µM
<b>20 mM dGTP</b>	2,5 µl	5 µl	7 µl	9 µl	500 µM
<b>20 mM dTTP</b>	2,5 µl	5 µl	7 µl	9 µl	500 µM
<b>0,1 M DDT</b>	1 µl	2 µl	2,8 µl	3,6 µl	1 mM
<b>5x First Strand Buffer</b>	20 µl	40 µl	56 µl	72 µl	1x
<b>Ampuwa</b>	14,5 µl	29 µl	40,6 µl	52,2 µl	
<b>Rnase-Out</b>	2,5 µl	5 µl	7 µl	9 µl	40 U/Ansatz
<b>Reverse Transkriptase</b>					200 U/ Ansatz
<b>Superscript II</b>	2,5 µl	5 µl	7 µl	9 µl	
<b>Volumen</b>	50 µl	100 µl	140 µl	180 µl	

Anschließend erfolgte die Zugabe der Farbstoffe Cy3 und Cy5. Dazu wurde der Mastermix halbiert und jede Hälfte mit jeweils 1/10 Volumen Farbstofflösung gemischt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Cy-Farbstoffe wurden alle weiteren Schritte möglichst im Dunkeln durchgeführt. Der eigentliche Umschrieb wurde dadurch eingeleitet, dass die 17,1 µl RNA mit 0,9 µl Nona Random Primer (5 µg/µl) für 5 min bei 70 °C inkubiert wurden. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und nach dem Abkühlen mit 22 µl des Cy3- oder Cy5-Mix versetzt. Es folgten 10 min Inkubation bei RT (Anlagerung der Primer), denen sich der eigentliche Umschrieb der RNA für 2 h bei 42 °C anschloss. Daran anknüpfend wurden die Enzyme durch weiteres Inkubieren des Ansatzes für 15 min bei 70 °C inaktiviert. Der auf RT abgekühlte Umschrieb wurde dann mit 2 µl RNase, DNase free (Roche) versetzt und für 45 min bei 37 °C verdaut. Abschließend wurde die cDNA über G50-Säulchen (Amersham Pharmacia) aufgereinigt und die zu vergleichenden Proben vereint.

#### 4.9.5 DNA-Microarray

Die Microarray-Analysen wurden mit PCR-Slides durchgeführt, die im Zuge einer Kooperation mit Michellé Dziejman (Arbeitsgruppe J. J. Mekalanos) zur Verfügung gestellt wurden.

#### Array-Crosslinken

Vor der Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten cDNA wurde jeder Objektträger mit den gespotteten PCR-Fragmenten wie folgt vorbehandelt: Zunächst wurde der Slide in den

Dampf von kochendem Wasser gehalten, bis sich an der Unterseite des Objektträgers Kondensationstropfen bildeten. Danach wurde die DNA über Crosslinken in einem Stratalinker mit 1000  $\mu$ Joules 1x fixiert. Darauffolgend wurde der Slide in eine spezielle Glaswanne („Coplín Jar“) gelegt und für 30 s mit 0,1% SDS gewaschen. Es folgten zwei Waschschrítte in dH<sub>2</sub>O. Im Anschluss daran wurde der Slide für 3 min in ein kochendes dH<sub>2</sub>O-Bad überföhrt und unmittelbar danach mit eiskaltem Ethanol (96%), ebenfalls in eine Glaswanne gefüllt, abgeköhlt. Abschließend wurde der Slide durch Zentrifugation (3 min, 500 rpm, RT) getrocknet.

### Prähybridisieren

Puffer	20x SSC	62,5 ml
	10% SDS	2,5 ml
	BSA	2,5 g
	ad 250 ml dH <sub>2</sub> O	

Der Prähybridisierungspuffer wurde in eine Glaswanne gefüllt und für ca. 15 min bei 42 °C vorgewärmt. Anschließend wurde der Slide in die Wanne überföhrt und für mindestens 1 h bei 42 °C prähybridisiert. Danach wurde der Slide in entsprechend befüllten Wannen 2x mit dH<sub>2</sub>O und 2x mit 96%-igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde der Objektträger wie oben beschrieben über Zentrifugation getrocknet.

### Hybridisieren

Puffer	dH <sub>2</sub> O	0,225 ml
	Formamid, deionisiert	2,5 ml
	20x SSC	1,5 ml
	10% SDS	0,25 ml
	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 $\mu$ l
	50x Denhardt's Lösung	0,5 ml

Die Komponenten wurden zunächst mit Ausnahme der Denhardt's Lösung gemischt und sterilfiltriert. Danach erfolgte die Zugabe der Denhardt's Lösung.

Für die Hybridisierung der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA (vgl 4.9.4) wurden die vereinten Proben im Rotationsverdampfer komplett eingedampft und in 30  $\mu$ l Hybridisierungspuffer resuspendiert. Im Falle eines erfolgreichen Umschriebs sollte dies in einer kräftig violetten Lösung resultieren. Diese wurde dann unmittelbar vor dem Auftragen auf den Slide für 5 min bei 100 °C aufgeköcht, auf Eis abgeköhlt und anschließend kurz

abzentrifugiert. Die gesamte Lösung wurde auf den Slide getropft und luftblasenfrei mit einem 60 mm Deckgläschen abgedeckt. Das Binden der markierten cDNA an die PCR-Fragmente des Slides erfolgte dann in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 42 °C ÜN.

### **Waschen**

Waschpuffer I	2x SSC, 0,1% SDS, auf 55 °C vorwärmen
Waschpuffer II	0,2x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer III	0,2x SSC

Für jeden Waschschrte wurde der entsprechende Puffer in Glaswannen vorgelegt. Nach jeweils 10 min in der Waschlösung wurde der Slide in die nächste Wanne überführt. Alle Waschungen (1x I, 1x II, 2x III) wurden auf einem Magnetrührer durchgeführt.

Zum Schluss wurde der Slide durch Zentrifugation (3 min, 500 rpm, RT) getrocknet. Erschien der Objektträger daraufhin nicht klar, wurde der Slide nochmals mit Waschpuffer III behandelt und anschließend trocken zentrifugiert.

### **Scannen und Auswerten**

Die für die Auswertung des Microarray benötigten „tif“-Dateien wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners erstellt. Die Signalintensität der Spots und der jeweiligen lokalen Hintergründe wurden anschließend mit der ImaGene Software (Bio Discovery Inc.) sowohl für den Farbkanal Cy3 als auch für Cy5 ermittelt und normalisiert. Der so ermittelte Quotient aus den normalisierten Cy3/Cy5-Fluoreszenzverhältnissen gab Aufschluss über das Maß der Deregulierung der betrachteten Gene und wurde über Microsoft Excel ausgewertet.

## **5. Mikrobiologische und genetische Methoden**

### **5.1 Konjugation**

Die Option, genetisches Material durch Konjugation übertragen zu können, wurde genutzt, um chromosomale Insertions- und Deletionsmutanten zu generieren. Für die gezielte Manipulation des *V. cholerae*-Genom, wurde die zu rekombinierende DNA zunächst in geeignete Vektoren (pGP704- und pCVD-Derivate, vgl. 4.8.1 und 4.8.2) übertragen. Diese *pir*-abhängigen Suizidplasmide wurden anschließend über Transformation in SM10 $\lambda$ *pir*-Zellen eingebracht. In der Konjugation dienten diese *E. coli*-Zellen als Donoren.

### **Plattenkonjugation**

Für die Konjugation wurde zunächst der Rezeptorstamm (P27459-S oder eine entsprechende Mutante) flächig auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Darüber wurde der Donorstamm in einem Winkel von 90° (SM10 $\lambda$ pir mit dem entsprechenden Suizidvektor-Derivat) ebenfalls flächig gestrichen. Nach 7 h bei 37 °C wurden von verschiedenen Punkten der Konjugationsplatte Abstriche entnommen und diese auf einer LB<sup>Sm100Ap50</sup>-Agarplatte auf Einzelkolonien ausgestrichen. Gewachsene Kolonien wurden nochmals über LB<sup>Sm100Ap50</sup>-Agar gesäubert und anschließend über Aufkoch-PCR (vgl. 4.5) und Southernblot-Analysen (vgl. 4.7) kontrolliert.

### **Flüssigkonjugation**

Alternativ zu der Plattenkonjugation konnten die gewünschten Rekombinanten über Flüssigkonjugation gewonnen werden. Dazu wurden jeweils 250  $\mu$ l ÜNK des Donor- und Rezipientenstammes miteinander gemischt, zentral auf eine LB-Agarplatte getropft und anschließend ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Konjugationsplatte mit 1 ml LB-Medium ab gespült. Von dieser Zellsuspension wurden dann Verdünnungsstufen bis 10<sup>-6</sup> auf LB<sup>Sm100Ap50</sup>-Agar ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag nochmals über LB<sup>Sm100Ap50</sup>-Agarplatten gereinigt und wie bereits für die Plattenkonjugation beschrieben kontrolliert.

## **5.2 Transformation**

Die Transformation von Ligationsansätzen oder Plasmide in *E. coli* K12-Stämme wurde in Anlehnung an das Protokoll von Calvin und Hanawalt (43) als Elektrotransformation durchgeführt. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Übertragungseffizienz von bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten/ $\mu$ g intakte Plasmid-DNA aus.

### **Erzeugung kompetenter Zellen**

Die für die Elektroporation benötigten kompetenten Zellen wurden wie folgt erzeugt: 400 ml LB-Medium wurden mit 5 ml ÜNK des jeweiligen Stammes beimpft und dieser bei 37 °C und unter Schütteln bis zu einer optische Dichte von OD<sub>600</sub> ~ 0,8-1 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5000 rpm, 4 °C) geerntet und mit zunächst 400 ml, dann 200 ml und schließlich mit 100 ml eiskaltem Ampuwa® gewaschen (5 min, 5000 rpm, 4 °C). Es folgte ein weiterer Waschschrift in 25 ml 15% Glycerin. Das resultierende Pellet wurde nochmals mit 10 ml 15% Glycerin gewaschen und abschließend in

einem kleinem Volumen 15% Glycerin (ca. 1 ml) aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden zu 80-100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung kompetenter *V. cholerae* Zellen wurden alle Lösungen mit 2 mM CaCl<sub>2</sub> ergänzt (pers. Mitteilung K. E. Klose).

### **Elektrotransformation**

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurden die Zellen mit 1-3 µl Plasmid-DNA bzw. 4 µl Ligationsansatz versetzt und in eine Elektroporationsküvette (2 mm, EQUIBIO) überführt. Nach einer kurzen Inkubation (maximal 5 min) auf Eis wurde die Transformation mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 400 Ω sowie einer Kapazität von 25 µF in einem Elektroporationsgefäß durchgeführt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Abschließend wurden jeweils 10 µl, 100 µl und der Rest auf entsprechende Selektionsplatten (LB-Agar mit Antibiotikum) ausplattiert.

Das Einbringen von Expressionsplasmiden in kompetente *V. cholerae* Zellen erfolgte ebenfalls über Elektrotransformation. Dazu wurde das gleiche Protokoll wie für die *E. coli* Zellen bis auf die Modifikation angewandt, dass mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert wurde (pers. Mitteilung K. E. Klose).

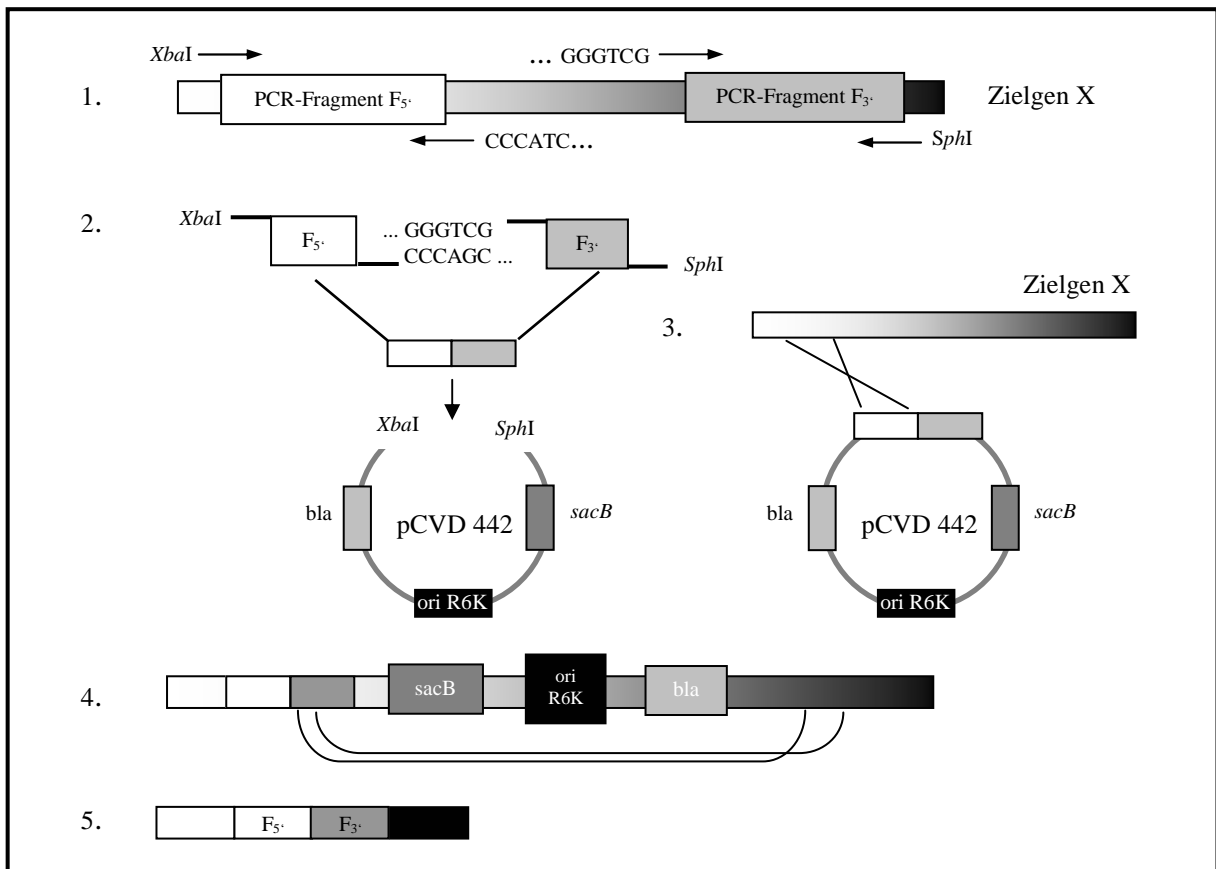
## **5.3 Stammkonstruktionen**

### **5.3.1 Inaktivierung eines Gens durch Insertion**

Für Insertionsmutationen wurde zunächst ein pGP704-Derivat (Übersicht in Tabelle III-2) mit einem internen Fragment des zu inaktivierenden Gens konstruiert (vgl. 4.8.1). Nach der Übertragung des Vektors aus den *E. coli* Zellen in *V. cholerae* infolge Konjugation wurde nach Sm<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup> Konjuganten selektioniert.

Die neu erworbene Ap<sup>r</sup> der *V. cholerae* Zellen war ein Indiz dafür, dass das pGP704-Derivat über homologe Rekombination des internen Fragmentes erfolgreich ins Genom integriert wurde. Die *pir*-Abhängigkeit des Suizidplasmides würde anderenfalls zum Abbau des Vektors führen, da dieser aufgrund seines oriR6K in *V. cholerae* nicht replizieren kann. Die korrekte Insertion des Plasmides in das Zielgen wurde durch Southernblot (vgl. 4.7) und Aufkoch-PCR (vgl. 4.5) überprüft.

### 5.3.2 Inaktivierung eines Gens durch Deletion – Sucrose-Selektion



**Abb. III-2: Schematische Darstellung einer Deletionsmutagenese.** 1) Amplifikation von Fragmenten aus dem 5'- und 3'-Bereich des Zielgens. Durch spezifische Primer werden Restriktionschnittstellen (z.B. *XbaI* und *SphI*) und überlappende Sequenzen in die Fragmente eingebaut. 2) Hybridisieren der Fragmente mittels der überlappenden Sequenzen in einer PCR, sowie Klonierung der ligierten Fragmente in den *XbaI/SphI* geöffneten Suizidvektor pCVD442. 3) Integration des Vektors in *V. cholerae* Zellen durch homologe Rekombination infolge Konjugation. 4) Selektion auf zweite Rekombination nach Sucrosestress. 5) Endprodukt mit verkürzter Sequenz.

Die Methode zur Erzeugung von Deletionsmutanten geht auf ein Protokoll von Donnenberg und Kaper (66) zurück und macht sich folgendes Prinzip zunutze: Die Basis bildet ein *pir*-abhängiges Suizidplasmid, welches zusätzlich zu dem Selektionsmarker  $Ap^r$  (*bla*) für eine Levansucrase (*sacB*) codiert. Für die Mutagenese werden zunächst Derivate des Suizidplasmids durch Konjugation in das Genom integriert. Obwohl das Plasmid zwei verschiedene interne Fragmente des Zielgens enthält, ist dafür nur eines der beiden möglichen Rekombinationsereignisse notwendig, dessen Erfolg über den Erwerb der Ampicillin-Resistenz angezeigt wird. Für die eigentliche Deletion muß das integrierte Plasmid über die zweite Rekombination jedoch wieder ausgeschnitten werden. Dieser Verlust des Plasmids wird dadurch gefördert, dass  $Ap^r$ -Konjuganten Sucrosestress ausgesetzt werden. Durch die ebenfalls auf dem Vektor codierende Levansucrase wird dabei die Sucrose im Periplasma in Levan umgesetzt, infolgedessen Wasser in die Zellen gezogen wird, was wiederum zur Lyse

der Zellen führt. Dem kann die Zelle nur entgehen, indem sie das integrierte Sucrasegen wieder aus dem Genom entfernt. Allerdings besteht dabei die Möglichkeit, anstelle der erwünschten Deletion wieder den ursprünglich wildtypischen Zustand zu erreichen (zusammengefasst in Abb. III-2).

Die für die Deletionsmutagenese konstruierten pCVD442-Derivate (Tab. III-2, vgl. 4.8.2) wurden zunächst durch Konjugation in die *V. cholerae* Zellen übertragen. Danach wurde eine Kolonie Ap<sup>r</sup> *V. cholerae*-Zellen in 1 ml LB<sup>Sm</sup>-Medium überimpft und 9 h bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen 1:10 in 1 ml LB<sup>Sm</sup>-Medium überführt und ÜN bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension mit LB-Medium verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-4</sup> auf Suc<sup>Sm</sup>-Agar ausplattiert. Nach 2-tägiger Inkubation bei RT wurden mehrere Kolonien parallel auf Suc<sup>Sm</sup>-Agar und LB<sup>Ap</sup>-Agar gestrichen. Der angestrebte Verlust des integrierten Suizidplasmides wurde durch den Verlust der Ampicillin-Resistenz angezeigt. Dementsprechend wurden Ap<sup>s</sup> Klone auf eine putative Deletion durch Aufkoch-PCR (vgl. 4.5) und Southernblot (vgl. 4.7) getestet.

## 6. Biochemische Methoden

### 6.1 Expression des *V. cholerae* RpoS als rekombinantes Protein mit N-terminaler HisTag-Fusion

#### Arbeitslösung

8x LEW	400 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,4 M NaCl
	auf pH 8 einstellen; sterilfiltrieren

Um das native RpoS-Protein aus *V. cholerae* isolieren zu können, wurde das *rpoS*-Gen (VCA0534) in das pQE30-System von Qiagen kloniert (vgl. 4.8.3). Der Vorteil dieses System besteht darin, das Genprodukt nicht nur gezielt exprimieren, sondern es auch affinitätsabhängig aufzureinigen zu können. Das entsprechende pQE30-Derivat (pQE30 *rpoS*) wurde in XL-1 kompetente Zellen mit dem placIQ Plasmid transformiert.

Für die Expression wurden 750 ml LB-Medium 1:50 mit der ÜNK (LB<sup>Ap100, 0,2% Glc</sup>) eines positiven Ap<sup>r</sup>-Km<sup>r</sup>-Transformanten beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,8-1 angezüchtet. Daraufhin wurde die Expression des Proteins über die

Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach einer Inkubation von 2 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde anschließend mit 20 ml 1x LEW gewaschen und am Ende in 4 ml 1x LEW mit 8 M Harnstoff aufgenommen. Der Proteinextrakt wurde dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

## 6.2 Aufreinigung HisTag-fusionierter Proteine

### Arbeitslösungen

25x Proteaseinhibitormix	Complete EDTA-free (Boehringer-Ingelheim); 1 Tablette in 2 ml 1x LEW auflösen
8x LEW	400 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 M NaCl auf pH 8 einstellen; sterilfiltrieren
4x EB	200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 M NaCl 1 M Imidazol auf pH 8 einstellen; sterilfiltrieren

Für die Abtrennung der HisTag-fusionierten Proteine aus einem Gesamtproteinextrakt (vgl. 6.1) wurde dieser zunächst auf Eis langsam aufgetaut und mit Proteaseinhibitormix (Endkonzentration 1x) versetzt. Nach der Überführung in FastPrep Blue Röhrchen, folgte der mechanische Aufschluss der Zellen in einem FastPrep Schüttler (FP120) bei maximaler Geschwindigkeit für 2x 45s. Intakte Zellen, größere Zellfragmente sowie das Aufschlussmaterial der FastPrep Blue Röhrchen wurden anschließend durch Zentrifugation (3 min, 10.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und nochmals zentrifugiert (30 min, 13.000 rpm, 4 °C), um die restlichen Zellrümpfer abzutrennen. Für die nachfolgende Isolierung der His-getaggten Proteine aus der überstehenden Lösung, wurden die Protino®-Ni 1000 prepacked columns (Machery Nagel) nach Anleitung des Herstellers verwendet, mit dem Unterschied, dass alle Arbeiten durchgehend auf Eis durchgeführt wurden. Von jedem Aufreinigungsschritt wurden 50 µl Probe entnommen, mit 12 µl 5x Lämmli versetzt und über SDS-PAGE (vgl. 6.5) mit anschließender Coomassiefärbung auf ihren Reinheitsgrad hin analysiert.



Fraktionen, die noch ungebundene HisTag-Proteine enthielten, wurden daraufhin nochmals über die gleiche Säule aufgereinigt. Die Ausbeute der jeweiligen Elutionsschritte wurde vereint und zur Entfernung des Imidazols gegen 1x PBS ÜN bei 4 °C dialysiert (Ausschlussgröße <14 kDa, VISKING, Roth).

### Säulenregenerierung

In Abhängigkeit der aufzureinigenden Probe, kann eine Protino®-Säule bis zu 5x benutzt werden. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, empfiehlt der Hersteller, die Wiederverwendung aber nur mit identischen HisTag-Proteinen auszuführen.

Nach dem Gebrauch wurde die entsprechende Säule mit 5 ml dH<sub>2</sub>O und nachfolgend mit 2 ml Ethanol (20%) gewaschen und anschließend in einem kleinem Volumen 20%-igen Ethanols bei 4 °C gelagert. Vor der erneuten Verwendung wurde die Säule wie in Tabelle III-6 beschrieben regeneriert.

**Tab. III-6: Regenerationsprotokoll für Protino® Ni 1000 Säulen.** Die gesamte Prozedur wurde bei RT durchgeführt, wobei jede neue Lösung erst nach dem Durchtropfen der Vorangegangenen appliziert wurde.

<b>Lösung</b>	<b>[ml] pro Säule</b>
6 M Guanidin HCl, 0,2 M Essigsäure	1
dH <sub>2</sub> O	2,5
2% SDS	1,5
dH <sub>2</sub> O	2,5
100% EtOH	2,5
dH <sub>2</sub> O	2,5
100 mM EDTA, pH 8	2,5
dH <sub>2</sub> O	2,5
100 mM NiSO <sub>4</sub>	2,5
dH <sub>2</sub> O	5

### 6.3 Ultrafiltration

Das Prinzip der Ultrafiltration wurde angewandt, um die aufgereinigten und dialysierten HisTag-Proteine weiterführend zu entsalzen und aufzukonzentrieren. Die Ultrafiltration wurde mit einer anisotropischen Cellulosemembran durchgeführt, die infolge von Zentrifugation niedermolekulare Lösungsbestandteile aus der Proteinprobe abtrennte. Hierfür wurden Centricon YM-3 Membranen (Ausschlussgröße 3 kDa) des Centricon®-Systems (Millipore) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

## 6.4 Präparation von Gesamtzellextrakten

### Arbeitslösung

10x PBS	8% NaCl
	0,2% KCl
	1,8% Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O
	0,24% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	auf pH 7,4 einstellen; autoklavieren

Die Bedingungen, unter denen die Zellen kultiviert wurden, werden nachfolgend im Punkt „Phänotypische Tests“ (vgl. III-7) detaillierter beschrieben.

Um annähernd gleiche Proteinmengen präparieren zu können, wurden alle Zelle auf die gleiche OD eingestellt. Zu diesem Zweck wurde der jeweiligen Zellkultur ein Volumen, welches einer OD<sub>600</sub> = 1 in 1 ml entspricht, entnommen und für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen 1x PBS gewaschen. Das daraus resultierende Pellet wurde wiederum in 50 µl 5x Lämmli-puffer (vgl. 6.5) aufgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## 6.5 SDS-PAGE

### Arbeitslösungen

Lösung B	1 M Tris/HCl, pH 6,8	50 ml
	10% SDS	4 ml
	dH <sub>2</sub> O	46 ml
Lösung C	2 M Tris/HCl, pH 8,8	75 ml
	10% SDS	4 ml
	dH <sub>2</sub> O	21 ml
Rotiphorese® Gel 30 (Roth)	Acrylamid:Bisacrylamid	37,5:1
Ammoniumpersulfat (APS)	10%	
10x SDS-Laufpuffer	Tris	30,2 g
	Glycin	188 g
	ad 900 ml H <sub>2</sub> O; lösen	
	10% SDS	100 ml
	pH 8,3 überprüfen, nicht einstellen	

5x Lämmli

**Lösung 1**

SDS	1,1 g
EDTA	0,42 g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,17 g
β-Mercaptoethanol	1,1 ml
auf pH 7,2 einstellen	
ad 10 ml dH <sub>2</sub> O	

**Lösung 2**

Bromphenolblau	20 mg
50% Glycerin	10 ml

Lösung 1 und 2 in gleichen Teilen miteinander mischen

Die Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse erfolgte in Anlehnung an die von Lämmli beschriebene Methode (155). Die für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benötigten Lösungen wurden entsprechend den Angaben des Laborhandbuches (243) hergestellt. Eine detaillierte Zusammensetzung der gefertigten Gele ist der Tabelle III-7 zu entnehmen.

**Tab. III-7: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE-Gele.** Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 2 Gelen (7cm x 10cm).

<b>Trenngel 12%</b>		<b>Sammelgel 5%</b>	
<b>Lösung C</b>	2,5 ml	<b>Lösung B</b>	1,25 ml
<b>Gel 30</b>	4 ml	<b>Gel 30</b>	650 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,45 ml	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,07 µl
<b>APS</b>	50 µl	<b>APS</b>	25 µl
<b>TEMED</b>	15 µl	<b>TEMED</b>	15 µl

Für die SDS-PAGE wurde weiterhin das eindimensionale System der Firma BioRad (Mini Protean III) verwendet. In Vorbereitung für die Auftrennung wurden die Proteinproben mit 1/5 Volumen an 5x Lämmli-puffer versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben anschließend auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden die Proteine zunächst mit 60 V in das Sammelgel eingebracht und nach dem Erreichen des Trenngels mit 100 V weiter aufgetrennt. Der Lauf wurde beendet, nachdem die blaue Probenpufferfront das Ende des Trenngels erreicht hatte. Die nachträgliche Größenordnung der Proteinbanden wurde durch das Mitführen eines Markers (Prestained Marker, 6-175 kDa, NEB) ermöglicht.

## 6.6 Coomassiefärbung

### Arbeitslösungen

Coomassielösung	0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva) 40% Methanol 10% Eisessig
Entfärbelösung	40% Methanol 10% Eisessig

Um die Proteine nach ihrer Auftrennung zunächst visualisieren zu können, wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt (210). Dabei lagert sich der Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an, so dass die Proteine unspezifisch gefärbt werden. Für den Färbevorgang wurden die Gele für mindestens 2 h bis ÜN unter leichtem Schütteln in der Coomassielösung inkubiert. Das Gel wurde anschließend für 3x 20 min mit Entfärber behandelt.

## 6.7 Immunoblot-Analysen

In der Tabelle III-8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

**Tab. III-8 : Verwendete Antiseren.**

Westernblot	Antiserum	
	Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper
Anti-HisTag	Anti-Penta-His-Antikörper, monoklonal, Herkunft: Maus (Qiagen)	Anti-Maus-Antikörper, Meerettich-Peroxidase gekoppelt, Herkunft: Ziege (Dianova)
Anti-RpoS <sup>V. cholerae</sup>	Anti-RpoS <sup>V. cholerae</sup> Herkunft: Kaninchen (imunoGlobe Antikörpertechnik GmbH Himmelstadt)	Anti-Kaninchen-Antikörper, Meerettich-Peroxidase gekoppelt, Herkunft: Ziege (Dianova)

Das Westernblot-Verfahren nach Towbin et al. (276) wird angewandt, um Proteine in einem Proteingemisch spezifisch nachweisen zu können. Dazu werden die Proteine zunächst auf eine Trägermembran transferiert und dort über verschiedene Reaktionen, u. a. Farbstoffanlagerungen, radioaktive Markierungen oder Immundetektion, identifiziert. Die vorrangig verwendete Methode der Immundetektion ist ein zweistufiges Nachweisverfahren auf der Basis von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Zunächst bindet ein Primär-Antikörper an spezifische Epitope des gesuchten Proteins. Der Nachweis des Proteins erfolgt dann über einen gegen den ersten Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper, welcher an ein Enzym

gekoppelt ist. In Abhängigkeit der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion können die Proteine abschließend visualisiert werden.

### **6.7.1 Das Semidry-Transfer-Verfahren**

#### Arbeitslösung

Semidry-Transfer-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3
	192 mM Glycin
	20% Methanol

Nach der Präparation der Gesamtzellextrakte (vgl. 6.4) wurde das zu analysierende Proteingemisch mittels SDS-PAGE (vgl. 6.5) in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Der anschließende Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mit dem Semidry-Blot-System. Dafür wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese zunächst für 5-10 min in Semidry-Transfer-Puffer geschwenkt. In weiterer Vorbereitung wurden 12 auf die Größe des Gels zugeschnittene Whatman-MM3-Papiere, sowie ein ebenfalls den Maßen des Gels entsprechender Nitrocellulose-Membranzuschnitt mit Semidry-Transfer-Puffer getränkt. Für den eigentlichen Transfer wurden anschließend 6 der Whatman-MM3-Papiere in das Blotgerät übereinander gelegt. Darauf wurde die Membran, dann das Gel und zuoberst weitere 6 Whatman-Papiere geschichtet. Die Proteine wurden nachfolgend durch eine angelegte Spannung von 20 V für 30 min auf die Membran übertragen.

### **6.7.2 Immundetektion mit Anti-HisTag-Antikörpern**

#### Arbeitslösungen

TBS	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
TBS/Tween-Triton	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	500 mM NaCl
	0,05% Tween 20
	0,2% Triton X-100

Mit diesem Verfahren wurde die Expression rekombinanter Proteine mit N-terminaler HisTag Fusion nachgewiesen.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zunächst 2x 10 min in TBS/Tween-Triton und 1x 10 min mit TBS gewaschen. Danach wurden freie Bindungsstellen

auf der Membran durch Inkubation in 3% BSA (gelöst in TBS) für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C abgesättigt. Die Blocklösung wurde verworfen und die Membran anschließend für 1 h in der ersten Antikörperlösung (1:3000 in 3% BSA gelöst in TBS) geschwenkt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden nachfolgend durch Waschen der Membran für 2x 10 min in TBS/Tween-Triton und 1x 10 min in TBS entfernt. Dann wurde die Sekundär-Antikörperlösung (1:5000 in 10% Magermilch gelöst in TBS) auf die Membran gegeben und für 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte zu je 10 min in TBS/Tween-Triton. Der Nachweis des zweiten Antikörpers wurde anschließend mit dem ECL-Kit (Pierce) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei das ECL-Gemisch durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase enzymatisch zu einem lumineszierenden Produkt umgesetzt wird. Für die Visualisierung der Peroxidase-Reaktion und damit des gesuchten Proteins wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und zeitabhängig exponiert.

### **6.7.3 Immundetektion mit Anti-RpoS<sup>V. cholerae</sup>-Antiserum**

Der Nachweis des *V. cholerae* RpoS-Proteins wurde in Anlehnung an das Protokoll für die Immundetektion mit Anti-HisTag-Antikörpern durchgeführt. Die Methode wurde dafür wie folgt modifiziert: Die Membran wurde für mindestens 2 h in 10% Magermilch (gelöst in TBS) geblockt. Des Weiteren erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:10.000 in 10% Magermilch gelöst in TBS) ÜN bei 4 °C. Außerdem wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet.

## **6.8 Zwei-dimensionale Gelelektrophorese**

Vergleichende Genomanalysen auf der Basis von mRNA erlauben die Bestimmung der relativen Mengen an RNA-Transkript in den Test- bzw. Referenzzellen. Allerdings besteht aufgrund der Option posttranslationaler Modifizierungen nur eine geringe Korrelation zwischen der Menge an mRNA und den tatsächlich exprimierten Genprodukten. Die Proteomanalyse ist demzufolge eine wichtige Ergänzung zur Genomanalyse, um vollständige Aussagen über den Expressionsgrad von Proteinen treffen zu können. Die Methode der 2-D Gelelektrophorese nach O' Farrell nutzt für die Trennung von Proteinen zwei voneinander unabhängige Kriterien, Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt (216). Somit ergibt sich die Möglichkeit, mehrere 100 Genprodukte aus Gesamtzellextrakten simultan auf einem Gel zu untersuchen.

### 6.8.1 Probenvorbereitung - Isolierung von Gesamtzellprotein

Aktuell existiert kein Protokoll, das für die Probenvorbereitung universelle Gültigkeit besitzt. Die hier verwendete Methode wurde nach den Vorgaben für *Staphylococcus* sp. (pers. Mitteilung D. Schäfer) adaptiert.

#### Arbeitslösungen

10x PBS	8% NaCl 0,2% KCl 1,8% Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x*H <sub>2</sub> O 0,24% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen; autoklavieren
Tris-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,2 5 mM MgCl <sub>2</sub>
25x Proteaseinhibitormix	Complete EDTA-free (Boehringer-Ingelheim); 1 Tablette in 2 ml 1x PBS auflösen
DNase/RNase-Mix	1 mg/ml DNase 0,25 mg/ml RNase 50 mM MgCl <sub>2</sub>
TCA (Trichloressigsäure)	30%
Harnstoffpuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 70 mM DDT
CHAPS	Stammlösung 400 mg/ml in dH <sub>2</sub> O Endkonzentration 40 mg/ml

#### **Anzucht der Zellen**

100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml ÜNK der zu testenden Zellen beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> ~1,5 angezchtet. Danach wurde die Kultur halbiert. Aus 50 ml wurde unmittelbar das Gesamtzellprotein isoliert und später als Referenz verwendet. Die zweite Hälfte der Kultur wurde zunächst dem gewünschten Stress ausgesetzt (vgl. III-7), bevor daraus die Proteine präpariert wurden.

### **Probenvorbereitung**

Zu Beginn der Isolierung wurde jede weitere Protein-Neusynthese über die Zugabe von Chloramphenicol (Endkonzentration 20 µg/ml) inhibiert. Nach 5 min Inkubation wurden die Zellen aus 40 ml Kultur durch Zentrifugation (15 min, 4000 rpm, 4 °C) geerntet. Anschließend wurde das Pellet 2x mit 1x PBS, versetzt mit 20 µg/ml Cm, gewaschen (5 min, 4000 rpm, 4 °C). Das finale Pellet wurde in 800 µl Tris-Puffer aufgenommen, mit 50 µl Proteaseinhibitormix versetzt und in FastPrep Blue Röhrchen überführt. Es folgte der mechanische Aufschluss der Zellen in einem FastPrep Schüttler (FP120) bei maximaler Geschwindigkeit für 6x 30 s, wobei die Zellen zwischen den einzelnen Behandlungen für 1 min auf Eis gestellt wurden. Nach dem Aufschluss wurde der Zellsuspension 1/10 Volumen DNase/RNase-Mix (ca. 90 µl) zugesetzt und alles für 10 min bei RT inkubiert.

Nachfolgend wurden intakte Zellen, größere Zellfragmente sowie das Aufschlussmaterial der FastPrep Blue Röhrchen durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Anschließend wurden 650 µl des Überstandes in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in denen bereits 340 mg Harnstoff und 122 mg Thioharnstoff vorgelegt waren. Um die Harnstoffe zu lösen, wurden die Eppendorf-Gefäße für 30 min auf eine Wippe gelegt. Danach wurden die Proteine mit 12% TCA im Kühlschrank ÜN gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine zunächst durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4 °C) geerntet und weiterführend 3x mit 100 µl eiskaltem Aceton gewaschen (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). Im Anschluss wurde das Pellet für 5 min bei 30 °C im Heizblock getrocknet. Abschließend wurden die Proteine durch die Zugabe von 90 µl Harnstoffpuffer und 10 µl CHAPS ÜN im Kühlschrank gelöst. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proteinproben bei -20 °C gelagert.

### **6.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### Arbeitslösungen

Roti®-Nanoquant (Roth)	5x
BSA-Stammlösung	200 µg/ml dH <sub>2</sub> O

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Roti-Nanoquant durchgeführt, eine Variante des Bradford-Assays, mit der Proteinmengen ab 200 ng bestimmt werden können. Im Unterschied zum Bradford-Assay (37) werden die Proteinproben bei zwei Wellenlängen vermessen: Die Extinktion bei 590 nm zeigt die Konzentration des Protein-Farbstoff-Komplexes, während über die Absorptionsänderung bei 450 nm die Abnahme der freien Farbstoffmoleküle verfolgt wird. Der Quotient aus den Extinktionen bei 590 nm und 450 nm



ist linear zu der Proteinkonzentration der Probe (304). Hierin begründet sich der Vorteil gegenüber der klassischen Bradford-Methode, bei der es durch den ungebundenen, nicht detektierten Farbstoff zu einem unerwünschten Hintergrundsignal kommt.

Zunächst wurden aus der BSA-Stammlösung für die Erstellung einer Eichkurve verschiedene Verdünnungen mit dH<sub>2</sub>O (100 µg/ml bis 20 µg/ml) hergestellt. Anschließend wurden jeweils 50 µl dieser „Standards“ und der zu quantifizierenden Proben mit 200 µl 1x Roti-Nanoquant versetzt. Diese Reaktion wurde in Mikrotiterplatten (PS-Microplatte 96 Well, GreinerBioOne) ausgeführt. Nach einer kurzen Inkubation von 5 min bei RT wurde die Adsorption bei 570 nm und 450 nm mit Hilfe eines Elisa-Readers bestimmt. Die anschließende Berechnung und Auswertung der Quotienten erfolgte mit dem Microsoft Excel-Programm. Dabei konnten aus der sich ergebenden Eichgeraden (Adsorptionsquotient über Konzentration) die Proteinkonzentrationen der Proben abgeleitet werden. Von jedem Standard und jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Blindwert wurden 250 µl dH<sub>2</sub>O verwendet.

### 6.8.3 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten – 1. Dimension

#### Arbeitslösung

Rehydrierungspuffer	Harnstoff	24 g
	CHAPS	500 mg
	0,001% Bromphenolblau	
	ad 50 ml dH <sub>2</sub> O,	
	Lagerung als 2 ml Aliquots bei –20 °C,	
	kurz vor der Verwendung pro Aliquot 4 mg DDT und	
	12,5 µl Biolyte zusetzen	

Die Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihres isoelektrischen Punktes wurde in Anlehnung an die Methode von Görg et al. (94) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden für die isoelektrische Fokussierung IPG-Streifen (17 cm Ready Strip IPG Strips, Bio-Rad) mit einem pH-Gradienten von pH 4-7 mit Hilfe der PROTEAN® IEF CELL von Bio-Rad prozessiert.

#### **Rehydrieren**

Vor der eigentlichen Fokussierung mussten die getrockneten IPG-Streifen mit der Proteinlösung rehydriert werden. In Vorbereitung dessen wurde ein 400 µg Protein

entsprechendes Volumen mit Rehydrierungspuffer auf 300 µl ergänzt. Diese Probe wurde dann vollständig in eine Kammer der IEF-Cell appliziert. Darauf wurde ein IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei so aufgelegt, dass die Proteinprobe gleichmäßig unter dem Streifen verteilt war. Daraufhin wurde das Programm „Passives Rehydrieren“ gestartet. Nach 30 min wurden die Streifen mit Mineralöl überschichtet und die Rehydrierung ÜN durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Streifen weiter prozessiert.

### **Isoelektrisches Fokussieren**

Die sich der Rehydratisierung anschließenden Schritte wurden ebenfalls in der IEF-Cell ausgeführt. Einleitend wurden 0,5 x 1 cm große Filterpapier-Stücke mit dH<sub>2</sub>O getränkt und über beide Elektroden einer Vertiefung der Fokussierungskammer gelegt. Obenauf wurde dann der mit der Proteinlösung gesättigte IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten gelegt. Um den Streifen vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffes zu schützen, wurde dieser mit 2 ml Mineralöl überschichtet. Nach dem Schließen der Kammer wurde die Fokussierung mit folgenden Parametern bei konstanten 20 °C durchgeführt:

200 V, 30 min halten, Filterpapier wechseln;  
 500 V, 30 min halten, Filterpapier wechseln;  
 500 V – 10.000 V, ÜN halten

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die IPG-Streifen in Alufolie eingeschlagen und bis zur weiteren Verwendung in der SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

### **6.8.4 SDS-PAGE – 2. Dimension**

#### Arbeitslösungen

Äquibrierungslösung	50 mM Tris/HCl, pH 8,8 6 M Harnstoff 30% Glycerin 2% SDS Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
10x Elektrodenpuffer (pH 8,3)	Tris                      30,3 g Glycin                    144 g SDS                        10 g ad 1 l dH <sub>2</sub> O

## Äquilibrieren

Unmittelbar vor der elektrophoretischen Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine wurden die IPG-Streifen 2x 15 min mit Äquilibrierungslösung in speziellen Kammern behandelt. Die Lösung des ersten Schrittes wurde dabei um 2% w/v DDT (0,5 g in 25 ml) ergänzt, während in der Äquilibrierungslösung für den zweiten Schritt 260 mM Jodacetamid (0,625g in 25 ml) enthalten waren.

## SDS-PAGE

Für die Durchführung der zweiten Dimension wurde die große Protean® II-Zelle von Bio-Rad verwendet. Die 12%-igen Gele wurden mit dem Puffersystem von Lämmli (155) ohne Sammelgel wie in Tabelle III-9 zusammengefasst hergestellt.

**Tab. III-9: Zusammensetzung der SDS-Gele für die 2D-Gelelektrophorese.**

<b>Trenngel 12%</b>	<b>Anzahl der Gele</b>			
	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1)	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	62,5 ml	93,75 ml	125 ml	156,25 ml
dest. Wasser	85 ml	127,5 ml	170 ml	212,5 ml
10% SDS-Lösung	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml
<b>Endvolumen</b>	<b>250 ml</b>	<b>375 ml</b>	<b>500 ml</b>	<b>625 ml</b>
TEMED	125 µl	187,5 µl	250 µl	312,5 µl
40% APS	375 µl	562,5 µl	750 µl	937,5 µl

Damit die fokussierten IPG-Streifen später auf die SDS-Gele für die Auftrennung aufgesetzt werden konnten, wurde die Gießkassette nur bis ca. 2 cm unter den Rand befüllt. Nach dem Gießen wurden die Gele mit 1 ml wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet, um die Entstehung einer glatten Gelkante zu unterstützen. Kurz vor der Verwendung wurde das Butanol entfernt und die Gele mit 1x Elektrodenpuffer überschichtet.

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden ebenfalls kurz in 1x Elektrodenpuffer geschwenkt und dann luftblasenfrei auf die vertikalen Gele gelegt. Anschließend wurde der überschüssige Elektrodenpuffer abgenommen, ein mit 15 µl Marker getränktes Filterpapier (Prestained Marker, 6-175 kDa, NEB) neben dem Streifen platziert und alles mit heißer Agarose (0,5% (w/v) in 1x Elektrodenpuffer) fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das SDS-Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und die Auftrennung mit 16 mA pro Gel gestartet. Nach 30 min wurde die Stromstärke auf 24 mA pro Gel erhöht und die Auftrennung solange fortgesetzt, bis die Bromphenol-Lauffront das Gelende erreicht hatte. Die Gießkassette wurde

daraufhin vorsichtig mit einem Spatel geöffnet und das Gel für den Proteinnachweis entnommen.

### 6.8.5 Proteinnachweis mittels kolloidaler Coomassiefärbung

#### Arbeitslösung

Farblösung                      10% Ammoniumsulfat  
    10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%-ig)  
    0,12% Coomassie B1131 Brilliant Blue G250 (Sigma)  
    ad 250 ml dH<sub>2</sub>O, 1 h lösen,  
    20% Ethanol, ad 1 l dH<sub>2</sub>O

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie visualisiert. Dafür wurden die SDS-Gele für 3 Tage in der Farblösung geschwenkt und anschließend mit dH<sub>2</sub>O so lange entfärbt, bis der Gelhintergrund klar erschien. Das Wasser wurde dabei mehrmals gewechselt.

### 6.8.6 Auswertung

Die Auswertung der 2-D SDS-Gele wurde computerunterstützt mit Hilfe des Bildauswertungsprogrammes PDQuest (BioRad, Hercules, USA) vorgenommen. Die wesentlichen Schritte dieser Analyse sind das Digitalisieren der Gele, Spoterkennung und –quantifizierung, Gelvergleich und Datenanalyse. Für die Digitalisierung der Gele wurden diese unter Verwendung des BioRad Densitometer GS-710 gescannt.

### 6.9 Bestimmung der $\beta$ -Galactosidaseaktivität

#### Arbeitslösungen

Z-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	16,1 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	5,5 g
	KCl	0,75 g
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,246 g
	ad 1 l dH <sub>2</sub> O	
	auf pH 7 einstellen; autoklavieren	
oNPG (Substrat)	0,4% 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid in Z-Puffer	
	Lagerung bei –20 °C	

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Manoil (171). Diese Methode basiert auf dem Umsatz von 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid zu 2-Nitrophenol und D-Galactopyranosid durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Die Zunahme an 2-Nitrophenol kann dabei photometrisch verfolgt werden und gilt als Maß für Enzymaktivität.

Zunächst wurden 2 ml ÜNK der zu testenden Klone abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, RT) und das Pellet anschließend in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit Z-Puffer 1:10 verdünnt und nachfolgend die  $OD_{600}$  bestimmt. Weitere 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, in denen bereits 900  $\mu$ l Z-Puffer vorgelegt waren, überführt. Dazu wurden zuerst 25  $\mu$ l Chloroform und dann 25  $\mu$ l 0,1% SDS gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die enzymatische Reaktion über die Zugabe von 100  $\mu$ l des Substrates gestartet. Der beginnende Umsatz des Substrates zu 2-Nitrophenol zeigte sich in einer Gelbfärbung des Gemisches und wurde durch die Zugabe von 500  $\mu$ l 1M  $Na_2CO_3$  beendet. Als Negativkontrolle wurden 100  $\mu$ l Z-Pufferk, wie eine Probe behandelt, mitgeführt. Die Zeit von der Zugabe des Substrates bis zum Abstoppen der Reaktion (maximal 30 min) wurde als Reaktionszeit notiert. Es folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt (1 min, 13.000 rpm, RT), um das Chloroform abzutrennen. Danach wurde die OD bei 405 nm gemessen und die Enzymaktivität als  $\mu$ mol umgesetztes Produkt pro Minute und Probevolumen wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität } [\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}] = \frac{\Delta E_{405} \times V_A}{t \times \epsilon \times V_P \times d \times OD_{600}}$$

$\Delta E_{405}$ : Extinktion von 2-Nitrophenol bei 405 nm

t: Reaktionszeit [min]

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient von 2-Nitrophenol ( $4860 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

$V_A$ : Endvolumen des Ansatzes (1 ml)

$V_P$ : Probevolumen (100  $\mu$ l)

## 7. Phänotypische Tests

### 7.1 Wachstum unter verschiedenen Stress-Bedingungen

Für die phänotypische Charakterisierung verschiedener *V. cholerae* Stämme wurden die Zellen diversen atypischen Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Dazu wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit 1 ml ÜNK der zu testenden Stämme beimpft, wobei der ÜNK ein entsprechendes Selektions-Antibiotikum zugesetzt worden war. Dann wurden die Zellen bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} \sim 1$ ) kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen dem gewünschten Stress ausgesetzt.

#### Wachsen unter Salzstress – „Osmokurve“

Das Verhalten von *V. cholerae* Stämmen unter Salzstress wurde in einer Wachstumskurve („Osmokurve“) ermittelt. Um den Einfluss von Medienbestandteilen auf das Wachstum zu minimieren, wurden die Testreihen in definiertem M9-Minimalmedium mit 0,2% Glucose durchgeführt. Dazu wurden 100 µl einer in M9 angezogenen ÜNK der betreffenden Stämme in 5 ml Testmedium überimpft. Dieses Testmedium setzte sich ebenfalls aus den M9-Salzen zusammen, wurde aber zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von NaCl (500 mM – 1000 mM) angereichert. Die Kulturen wurden dann bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 24, 48 und 72 h wurde das Wachstum durch Messung der  $OD_{600}$  bestimmt.

#### Hyperosmolarität

Hyperosmolare Bedingungen wurden in minimalen M9-Glucosemedium erzeugt. Dazu wurden die Zellen zunächst in M9-Glucosemedium bis zum Erreichen einer  $OD_{600} \sim 1$  angezüchtet. Anschließend erfolgte die Zugabe von M9 mit 4,8 M NaCl auf eine Endkonzentration von 800 mM NaCl in die Kultur.

#### pH-Stress

Die Erzeugung artifizierlicher pH-Stress-Situationen erfolgte über die Zugabe von 850 mM MES-Puffer (gelöst in LB-Medium, Endkonzentration 170 mM) in das Wachstumsmedium, infolgedessen der pH-Wert des Mediums auf ca. 5 gesenkt wurde.

#### Oxidativer Stress

Nach dem Erreichen einer  $OD_{600} \sim 1$  wurde die Kultur mit 30%  $H_2O_2$ -Lösung auf die gewünschte Endkonzentration hin versetzt.

### **Membran-Stress**

Die Auswirkungen von Membran-Stress auf die Zellen wurden durch die Zugabe von 18% Ethanol (v/v) zu exponentiell wachsenden Zellen getestet.

### **Hitzeschock**

Die Situation eines Hitzeschocks wurde dadurch simuliert, dass die Zellen 10 min bei 47 °C in einem Wasserbad geschwenkt wurden.

## **7.2 Überlebens-Assays**

In diesen Experimenten wurde der *V. cholerae* O1 El Tor Wildtyp P27459-S der korrespondierenden *rpoS*-Deletionsmutante gegenübergestellt, um die jeweilige Überlebensfähigkeit in verschiedenen Stress-Situationen zu testen. Dazu wurden beide Stämme wie unter 7.1 beschrieben diversen Stress-Bedingungen ausgesetzt. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsstufen auf Selektions-Agar (LB mit Antibiotikum) die Lebendzellzahl bestimmt.

### **Kompetitiver Langzeit-Assay**

In dieser Versuchsreihe wurde das Überleben des Wildtyps und der *rpoS*-Mutante unter C-Mangelbedingungen getestet. Um den C-Stress anzulegen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen co-kultiviert. Dazu wurden 50 ml LB-Medium mit den ÜNK beider Stämme auf jeweils eine  $OD_{600} = 0,1$  beimpft. Die Anzahl der tatsächlich in den Assay eingesetzten Zellen wurde dabei als Lebendzellzahl der ÜNK überprüft. Nachfolgend wurde im Abstand von je 24 h eine Probe entnommen und entsprechende Verdünnungsstufen ausplattiert, um die Überlebensrate zu bestimmen. Die aufgrund der Co-Kultivierung notwendige Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante, wurde durch die Selektion auf Agarplatten, denen X-Gal (Endkonzentration 40 µg/ml) zugesetzt war, ermöglicht. Dabei erschien die Mutante in blauen Kolonien, während sich der Wildtyp (V124) weiß darstellte. Um diesen Assay zu etablieren, wurden die *E. coli* Stämme GB123 (*lacZ*<sup>+</sup>) und RH166 (*lacZ*) verwendet.

## **7.3 RpoS-Akkumulation unter Stress**

Die putative Akkumulation des alternativen Sigmafaktors RpoS sollte in einer Gegenüberstellung des Wildtypes P27459-S mit dem gestressten Wildtyp untersucht werden. Hierzu wurden zunächst 50 ml LB-Bouillon mit 1 ml ÜNK des Wildtyps beimpft und bis zu

einer  $OD_{600} \sim 1$  bei 37 °C und 250 rpm angezüchtet. Anschließend wurde die Kultur halbiert. Während die eine Hälfte der Kultur dem zu testenden Stress ausgesetzt wurde (vgl. 7.1), wurde die zweite als Referenz mitgeführt. Nach dem Setzen des Stresses wurden zu definierten Zeitpunkten von beiden Kulturen Proben entnommen, die Gesamtzellextrakte präpariert (vgl. 6.4) und die Menge an exprimiertem RpoS-Protein über Westernblot-Analysen mit RpoS-spezifischen Antikörpern detektiert (vgl. 6.7.3).

#### 7.4 Proteolyse-Assay

Um den Verlauf der RpoS-Degradation unter verschiedenen Bedingungen verfolgen zu können, wurden Zellen der zu testenden Mutanten in 50 ml LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase angezüchtet und anschließend zweigeteilt. Ein Teil der Zellen wurde unbehandelt weiterkultiviert, während der zweiten Hälfte der Kultur Chloramphenicol (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt wurde, um die weitere Neusynthese von Proteinen vollständig zu inhibieren. Nach 5 min Inkubation wurde der Cm-geschockten Kultur zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Daraus wurden die Gesamtzellextrakte (vgl. 6.3) präpariert und in einem Westernblot die RpoS-Proteolyse mittels RpoS-spezifischer Antikörper nachgewiesen (vgl. 6.6).

Um die RpoS-Proteolyse in Abhängigkeit von Stress zu analysieren, wurden die Zellen zuerst dem Stress ausgesetzt (vgl. 7.1) und erst dann die Detektion der Proteolyse über die Zugabe von Cm, wie oben beschrieben, gestartet.

#### 7.5 Protease-Assay

##### Arbeitslösung

LB-Agar mit 1% Magermilch	LB-Agar (Invitrogen)	16 g
	NaCl	2,5 g
	Magermilchpulver	5 g
	ad 500 ml Ampuwa; 20 min bei 100 °C kochen	

Um die Aktivität proteolytisch aktiver Enzyme zu detektieren, wurden LB-Agarplatten unter Zugabe von 1% Magermilch hergestellt. Auf diese Proteaseplatten wurden 20 µl ÜNK der zu testenden Stämme aufgetropft und ÜN bei 37 °C bebrütet. Die Entstehung eines klaren Hofes um die Auftropfstelle wurde als Maß für die Aktivität extrazellulärer Proteasen genutzt.



## 7.6 Katalasetest

Das Enzym Katalase vermittelt die Resistenz von Bakterien gegenüber  $H_2O_2$ . Die Produktion einer aktiven Katalase wurde anhand des Umsatzs von aufgetropftem 30%igen Wasserstoffperoxid auf ÜN-gewachsene Plattenkulturen zu  $H_2O$  und  $O_2$  bewertet. Die Entstehung des  $O_2$  konnte dabei über Bläschenbildung visuell verfolgt werden und galt als Maß für die Aktivität der Katalase.

## 7.7 Glycogensynthese

Die Fähigkeit, das Speicherpolysaccharid Glycogen aus einer überschüssigen C-Quelle zu synthetisieren, wurde unter der Verwendung von Agarplatten getestet, denen 0,2% Glucose zugesetzt wurde. Auf diese Platten wurden Teststämme ausgestrichen und nach einer Inkubation ÜN bei 37 °C auf die Synthese von Glycogen getestet. Dazu wurden die Kulturen Iod-Dampf ausgesetzt und die Farbänderung der Kulturen beobachtet. Die Menge des vorhandenen Glycogens wurde über eine zunehmende Rot-Färbung der Zellen angezeigt.

## 7.8 Motilitätstests

### Arbeitslösungen

LB-Agar mit 0,3% Agar	LB-Bouillon (Invitrogen)	20 g
	Agar-Agar (Difco)	3 g
	ad 1 l dH <sub>2</sub> O; autoklavieren	
M9-Medium mit 0,3% Agar	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
	NaCl	0,5 g
	NH <sub>4</sub> Cl	1 g
	Agar-Agar	3 g
	ad 1 l H <sub>2</sub> O; autoklavieren;	
	Zugabe von 1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
0,01 M CaCl <sub>2</sub>	10 ml	
20% C-Quelle	10 ml	

Die Motilitätsfähigkeit wurde unter Verwendung von Motilitätsagar nach Nielsen et al. (211) getestet. Dieser weist im Vergleich zu normalem Agarmedium mit einem Anteil von 1,6% Agar einen deutlich verringerten Anteil von 0,3% Agar auf, so dass den Bakterien das

Schwärmen erleichtert wird. Für den Test wurden die gewünschten Stämme einer ÜN-gewachsenen Agarkultur entnommen und in das Motilitätsmedium eingestochen. Die Ausprägung der Motilität wurde bei 37 °C anhand des Wachstums um die Einstichstelle verfolgt.

## 8. Computeranalysen

Im Rahmen des *V. cholerae* Genomprojektes wurde im August 2000 die komplette DNA-Sequenz des Stammes O1 El Tor N16961 vorgestellt (106) und zusammen mit den annotierten ORFs unter <http://www.tigr.org/tdb/> öffentlich zugänglich gemacht.

Gentische Informationen über die verwendeten *E. coli* K12-Stämmen wurden der Colibri-Datenbank: <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/> entnommen.

Weitere bioinformatische Analysen wurden mit folgenden Programmen durchgeführt:

Bestimmung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen u. a. Bearbeitungen:

DNA-Strider

Überprüfung von Primern:

Oligo 4.0s

Suche nach Protein- und DNA-Homologie:

<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://Expasy.org/cgi-bin/blast/pl>

## IV ERGEBNISSE

### 1. Das RpoS-Protein aus *V. cholerae*

1991 wurde in *E. coli* ein Protein charakterisiert, welchem die Rolle des zentralen Regulators für das frühe Stationärphasen-Wachstum zugesprochen wurde (156). Demnach wird das als „ $\sigma^S$ “ oder „RpoS“ bezeichnete Protein während des Wachstumsphasen-Übergangs induziert. Weiterführende Arbeiten präsentierten RpoS zudem als „Masterregulator“ der generellen Stressantwort von *E. coli*, der die Genexpression von mindestens 10% aller codierten Gene kontrolliert (291). Die korrespondierenden Genprodukte sind u. a. an der Adaptation gegenüber C-Mangel in der stationären Phase, Hyperosmolarität und pH-Stress beteiligt. Die Regulation dieses RpoS-Netzwerkes unterliegt zum Teil dem Protein selbst (Transkriptionsaktivierung, post-transkriptionale Modifizierung), wird aber ebenso durch den Proteolysefaktor RssB vermittelt (198).

Zunächst wurde mit der DNA-Sequenz des *rpoS*-Gens aus *E. coli* (Referenz Colibri-Datenbank) auf der Basis von Alignment-Analysen das RpoS-Protein in *V. cholerae* mit 71% Identität als Genprodukt des Locus VC0534 identifiziert. Des Weiteren wurde mittels Blast-Suche (3) das *E. coli* RssB Homolog mit 28% Identität und 41% Ähnlichkeit dem ORF VC1050 von *V. cholerae* zugeordnet. Beide Gene wurden in dem Vibrio-Stamm P27459-S über eine Deletionsmutation inaktiviert (vgl. III-5.3.2). Die Deletion wurde im Anschluss mit Hilfe der Southernblot-Methode (vgl. III-4.7) kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

#### 1.1 Bioinformatische Analyse des RpoS-Proteins

Das *rpoS*-Gen aus *V. cholerae* ist 1008 bp lang und umfasst somit 335 AS. Es codiert für ein 38,5 kDa großes Protein, dessen theoretischer pI-Wert bei 4,36 liegt. Das Genprodukt ist wie in *E. coli* als RNA-Polymerase Sigmafaktor annotiert und übernimmt hypothetisch eine Funktion bei der Anpassung des Bakteriums an atypische Umweltbedingungen. Die weitere Analyse des RpoS-Proteins mit Hilfe der TIGR-Datenbank ergab für die AS 119-132 dementsprechend eine potentielle Polymerase-Core-Bindedomäne. Weiterhin konnte den AS 289-308 ein H-T-H Motiv als DNA-Bindedomäne zugeordnet werden.

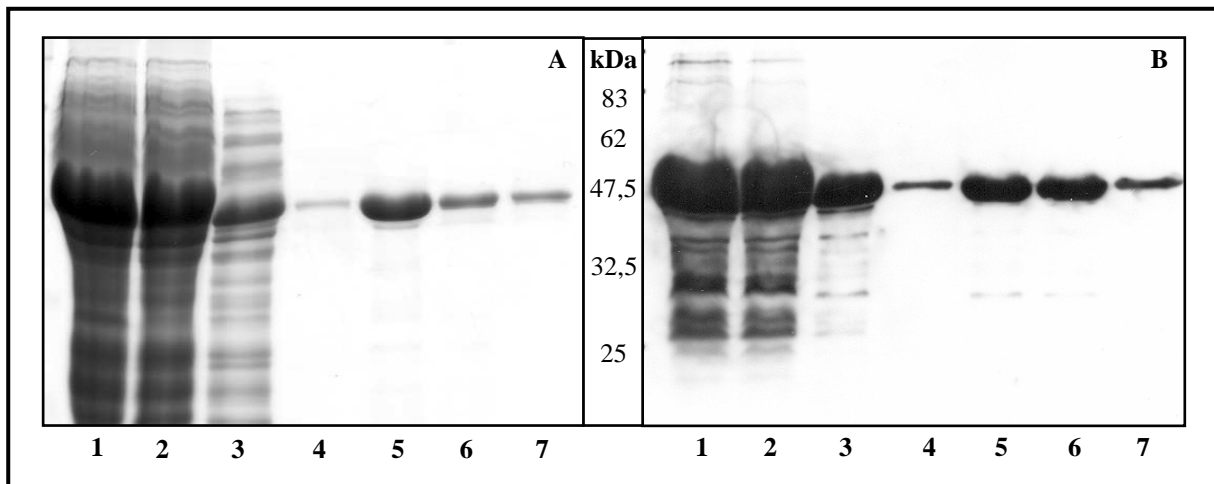
Unter Verwendung der ExPASy-Datenbank wurde ferner eine Blast-Analyse durchgeführt, welche die Homologie des *V. cholerae* RpoS zu zahlreichen  $\sigma^S$ -Faktoren aus anderen *Vibrio*-

Spezies aufdeckte, u. a. *V. anguillarum* (86% Identität), *V. alginolyticus* (83% Identität), *V. harveyi* (83% Identität), *V. vulnificus* (81% Identität zu VV2808), *V. parahaemolyticus* (80% Identität zu VP2553). Der hohe Grad der Identität spricht für eine weit verbreitete Konservierung des RpoS-Proteins innerhalb der Gattung *Vibrio*. Daneben zeigten sich auch Homologien zu RNA-Polymerase-Sigmafaktoren anderer Bakterien-Spezies, z. B. 73% Identität zu PBPRA3071 (*Photobacterium profundum*) und GKOPRF\_B2434 (*Klebsiella pneumoniae*) sowie 71% Identität zu SDY\_2940 (*Shigella dysenteriae*). Aus diesen Ergebnissen wird die weite Verbreitung und damit die Relevanz eines generellen Stressregulators in vielen Bakterien ersichtlich.

## 1.2 Aufreinigung des *V. cholerae* RpoS als rekombinantes Protein mit N-terminalem HisTag

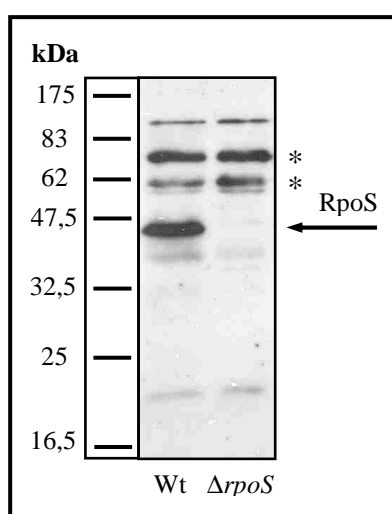
In Vorbereitung für die geplanten Analysen wurden zunächst spezifische Antikörper gegen das RpoS-Protein aus *V. cholerae* produziert. Zu diesem Zweck wurde das Expressionsplasmid pQE30 *rpoS* generiert (vgl. III-4.8.3). Die Expression des His-getaggten RpoS-Proteins wurde anschließend in XL1-Zellen mit dem placIQ-Repressorplasmid über IPTG induziert (vgl. III-6.1). Um das *V. cholerae* RpoS aus dem Gesamtproteinextrakt der *E. coli* Zellen abtrennen zu können, wurde dieser über Protino®-Ni 1000 Säulen aufgereinigt (vgl. III-6.2). Jeder Aufreinigungsschritt wurde dabei in Bezug auf seinen Reinheitsgrad in einer Coomassie-SDS-PAGE (vgl. III-6.5) sowie im Westernblotverfahren mit Anti-HisTag-Antikörpern (vgl. III-6.7) analysiert (Abb. IV-1).

Die Westernblot-Analyse der Aufreinigung zeigte, dass die apparente molekulare Masse des RpoS-Proteins von *V. cholerae* infolge der Fusion mit einem N-terminalen HisTag auf ca. 47,5 kDa (theoretisch 38,5 kDa) erhöht wurde. Außerdem stellte sich heraus, dass ein Großteil des aufgetragenen Proteins nicht an die Säule gebunden hatte (Abb. IV-1, Bahn 2). Diese Fraktion wurde nachfolgend erneut über die gleiche Säule gereinigt. Über die verbliebene, einzelne Bande der jeweiligen Elutionsschritte (Abb. IV-1, Bahn 5, 6, 7) konnte der Erfolg der Aufreinigung nachgewiesen werden. Nach der Aufreinigung wurde das HisTag RpoS-Protein entsalzt und konzentriert (vgl. III-6.3). 3x 1 mg des gesäuberten Proteins in einem Volumen von jeweils 500 µl wurden verwendet, um ein Kaninchen stufenweise zu immunisieren. Die Immunisierung wurde von der Firma ImunoGlobe (Himmelstadt) übernommen. Das resultierende Antikörper-haltige Serum wurde dann für die Detektion des *V. cholerae* RpoS verwendet.



**Abb. IV-1: HisTag-Affinitäts-Aufreinigung des *V. cholerae* RpoS aus dem Gesamtproteinextrakt von *E. coli* XL1-Blue Zellen.** Von jedem Aufreinigungsschritt wurden jeweils 10  $\mu$ l Probe in einem 15%-igem SDS-Gel aufgetrennt und das *V. cholerae* RpoS anschließend mit A) Coomassie bzw. B) Anti-HisTag-Antikörpern visualisiert. 1) Probe nach dem Zellaufschluss; 2) Säulendurchfluss nach dem Binden des Proteins; 3) Waschschrift 1; 4) Waschschrift 2; 5) Elutionsschritt 1; 6) Elutionsschritt 2; 7) Elutionsschritt 3.

Um die Qualität der produzierten RpoS-Antikörper zu überprüfen, wurde das Serum im Westernblotverfahren (vgl. III-6.7.3) mit den Gesamtzellextrakten des Wildtyps P27459-S und der korrespondierenden *rpoS*-Deletionsmutante getestet. Die Kontrolle ergab neben der erwarteten 47,5 kDa großen  $\sigma^S$ -spezifischen Bande im Wildtypextrakt weitere Banden, die in beiden verwendeten Gesamtzellextrakten auftraten. Vermutlich handelt es sich dabei um unspezifische Nebenbanden, die auf unerwünschte Kreuzreaktionen mit dem Serum zurückzuführen sind (Abb. IV-2). In den nachfolgenden Westernblot-Analysen wurden diese Banden als interne Referenzen für die aufgetragenen Proteinquantitäten verwendet.



**Abb. IV-2: Qualitätskontrolle des RpoS-Antiserums unter Verwendung verschiedener Gesamtzellextrakte.** Der Pfeil kennzeichnet die  $\sigma^S$ -spezifische Bande. \*Unspezifische Nebenbanden.

## 2. Akkumulation von RpoS in verschiedenen Stresssituationen

Entsprechenden Untersuchungen zufolge akkumuliert RpoS in *E. coli* Zellen, wenn diese spezifischem Stress ausgesetzt werden (111). Um die potentielle Anreicherung von RpoS in unterschiedlichen Stress-Situationen für *V. cholerae* zu untersuchen, wurden der Wildtyp und die korrespondierende *rssB*-Deletionsmutante im Hinblick auf die jeweilige RpoS-Expression analysiert. Als Grundlage für die *V. cholerae* Ergebnisse wurden parallel Testreihen mit der homologen *E. coli* Mutante verwendet.

### 2.1 Stationärphasen-induzierte C-Mangel-Bedingungen

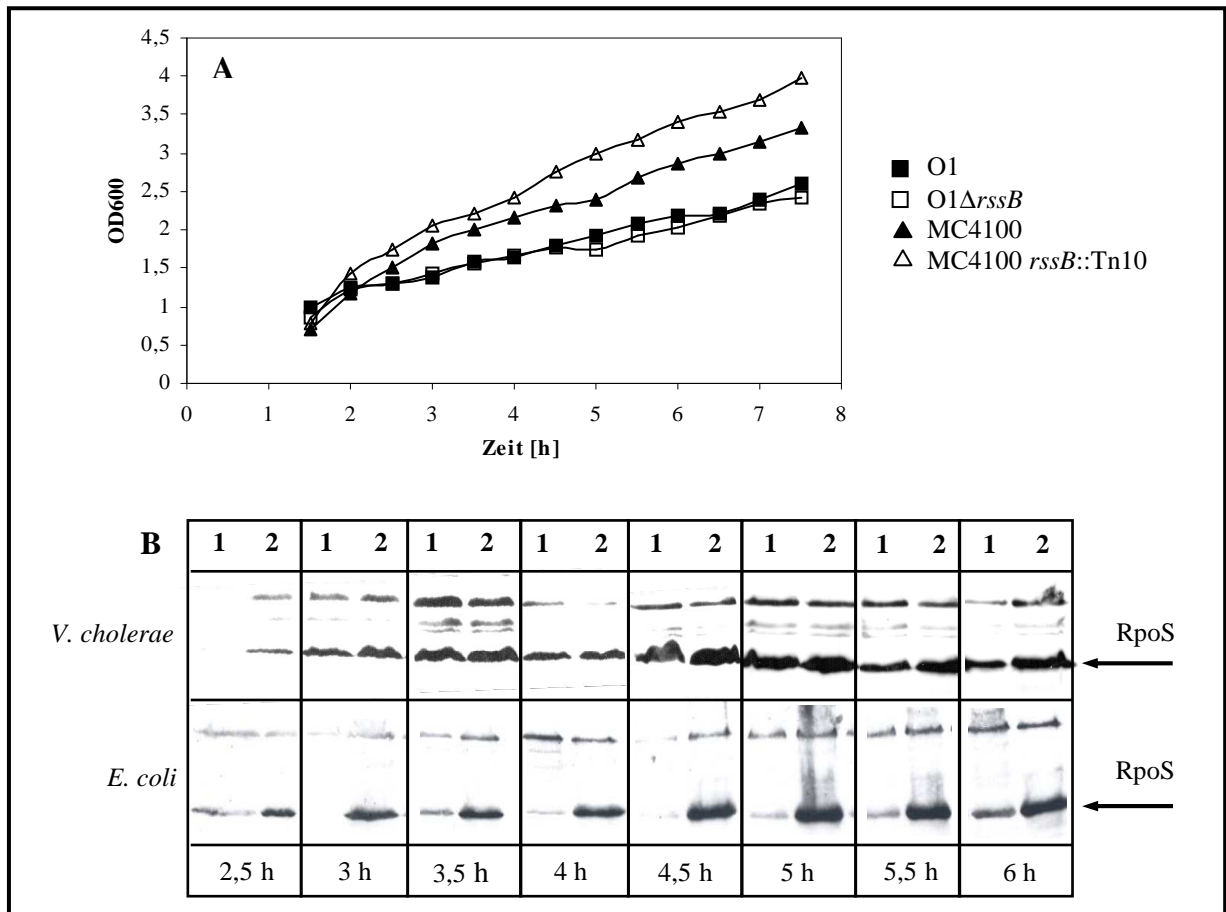
Exponentielles Zellwachstum bedingt u. a. die zunehmende Konkurrenz der Bakterien um die vorhandenen Nährstoffe, wodurch in Abhängigkeit der Zellzahl der Eintritt in die stationäre Phase gefördert wird. In *E. coli* wurde RpoS als Stationärphasen-induzierter Stressregulator beschrieben (156), der in diesem Zusammenhang die Synthese von mindestens 16 Proteinen aktiviert. Dementsprechend wurde zunächst getestet, ob die Expression des *V. cholerae* RpoS-Proteins ebenfalls Stationärphasen-abhängig ist. Dazu wurden entlang einer Wachstumskurve für den Wildtyp in LB-Medium nach dem Erreichen einer  $OD_{600} \sim 0,5$  in Abständen von jeweils 30 min Proben entnommen. Daraus wurde der Gesamtzellextrakt präpariert (vgl. III-6.4) und die Akkumulation von RpoS unter Verwendung der Westernblot-Methode (vgl. III-6.7.3) analysiert.

Dabei zeigte sich, dass das RpoS-Protein bereits in exponentiell wachsenden *V. cholerae* Zellen ab einer  $OD_{600} \sim 1$ , also in der frühen log-Phase, nachgewiesen werden konnte (Abb. IV-3). Bis zum Zeitpunkt 4,5 h ( $OD_{600} \sim 2$ ) wurde mit zunehmendem Zellwachstum auch ein Anstieg des RpoS-Levels nachgewiesen. Danach wurde trotz der weiter ansteigenden OD-Werte keine Zunahme der RpoS-Menge bis zum Abbruch der Wachstumskurve nach 8 h ( $OD_{600} \sim 4$ ) beobachtet.

Dahingegen konnte das RpoS-Protein in den ebenfalls getesteten *E. coli* Zellen erst beim Übergang zur Stationärphase ( $OD_{600} \sim 2,5$ ) detektiert werden (Abb. IV-3B). Danach wurde bis zum Abbruch der Wachstumskurve ( $OD_{600} \sim 3,5$ ) eine stetig zunehmende Konzentration des alternativen Sigmafaktors nachgewiesen.

Über den gleichen experimentellen Ansatz wurde des Weiteren getestet, ob der putative Proteolyse-Targetingfaktor RssB aus *V. cholerae* einen zu *E. coli* analogen Einfluss auf die Stabilität des RpoS-Proteins hat (siehe auch IV-3.2.1). Infolgedessen wurden die jeweiligen

*rssB*-Mutanten ebenfalls bezüglich ihres RpoS-Levels analysiert. Wie für die *E. coli rssB*-Mutante erwartet (198), zeigte sich in den kritischen Phasen eine zunehmende Akkumulation des RpoS-Proteins (Abb. IV-3B). Im Gegensatz dazu ließen sich für die *V. cholerae* Zellen vergleichbare Mengen an RpoS für Wildtyp und Mutante entlang der Wachstumskurve nachweisen.

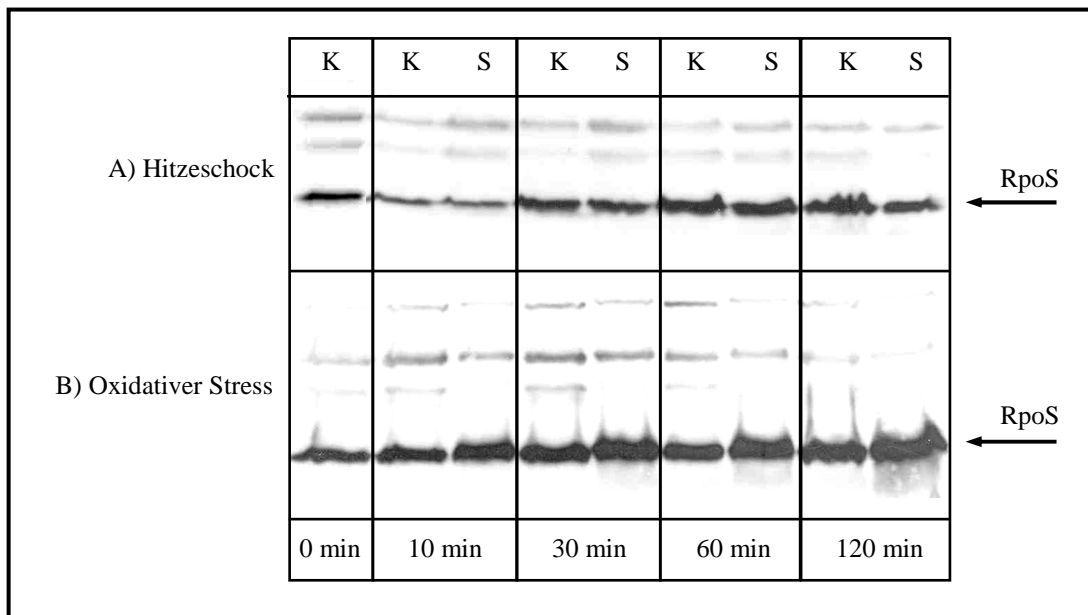


**Abb. IV-3: Expression von RpoS in *V. cholerae* und *E. coli* in verschiedenen Wachstumsphasen.** A) Wachstumskurven für Wildtyp und entsprechende *rssB*-Mutante (Quadrate: *V. cholerae*; Dreiecke: *E. coli*), B) Westernblotanalyse von GZE entlang der Wachstumskurve mit stammspezifischen RpoS-Antikörpern. Es wurden jeweils 7,5 µl jeder Probe in 15% SDS Gelen aufgetrennt. 1) Wildtyp; 2) *rssB*-Mutante.

## 2.2 Weitere Stress-Bedingungen

Neben C-Mangel-Bedingungen wurden die Auswirkungen von Hyperosmolarität, pH-Stress, oxidativen Stress, Hitzeschock und Membranstress auf das Protein-Level des Sigmafaktors getestet. Dazu wurden die Zellen wie unter III-7.1 beschrieben zunächst der jeweiligen Stress-Situation ausgesetzt. Nach definierten Zeitpunkten wurde der Gesamtzellextrakt präpariert und anschließend die Menge an RpoS mit *V. cholerae* RpoS-spezifischen Antikörpern in Westernblot-Analysen bestimmt.

Für jede der getesteten Stress-Situationen repräsentierte sich ein nahezu vergleichbares Akkumulationsverhalten für  $\sigma^S$ : Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnte keine signifikante Erhöhung der intrazellulären RpoS-Konzentration in den gestressten Zellen nachgewiesen werden (Abb. IV-4). Auf der anderen Seite ließ sich aber auch keine Abnahme der Bandenintensität während des dokumentierten Zeitraums detektieren. Diese Beobachtung indiziert die Stabilität des Sigmafaktors unter Stress.

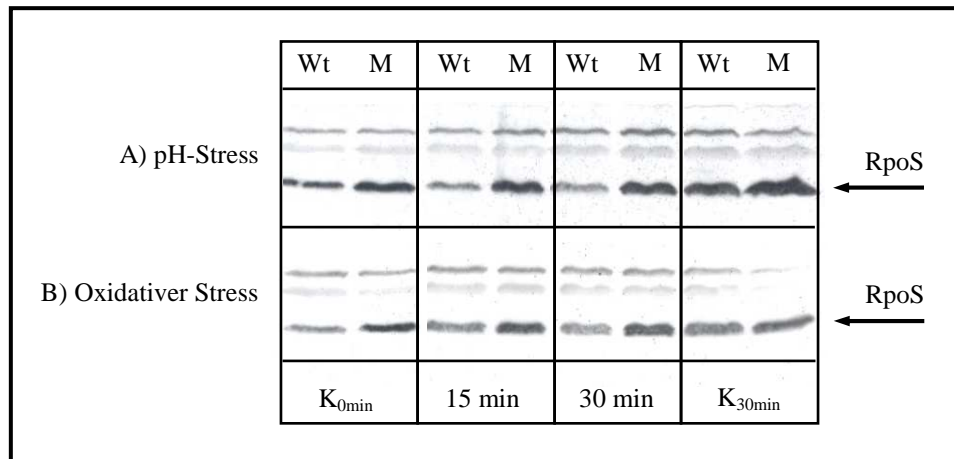


**Abb. IV-4: Zeitabhängige RpoS-Akkumulation im O1 El Tor Wildtyp P27459-S unter verschiedenen Stress-Bedingungen.** A) Der oxidative Stress wurde über die Zugabe von 88 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu exponentiell wachsenden Zellen simuliert. B) Die Hitzeschock-Experimente wurden bei 47 °C für 10 min durchgeführt. Nach der Stress-Induktion wurden die GZE zu definierten Zeitpunkten präpariert und die RpoS-Akkumulation in Westernblot-Analysen unter Verwendung RpoS-spezifischer Antikörper nachgewiesen. K) Kontrolle; S) Gestresster Wildtyp.

Um die Beteiligung des putativen Proteolysefaktors RssB an der beobachteten Stabilität zu testen, wurde die *rssB*-Deletionsmutante ebenfalls hinsichtlich der RpoS-Akkumulation untersucht. Doch im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten divergierte die Wildtyp-Situation von den Ergebnissen, die für die *rssB*-Mutante erzielt wurden: In der Gegenüberstellung mit dem Wildtyp wurde hier unter den getesteten Stress-Bedingungen ein Anstieg in der RpoS-Konzentration detektiert (Abb. IV-5).

Insgesamt betrachtet scheint das RpoS-Protein aus *V. cholerae* nicht in dem Maße an den Stress-Adaptationsvorgängen beteiligt zu sein, wie es für *E. coli* beschrieben wird (111). Dessen ungeachtet verweisen die Ergebnisse auf die definitive Beteiligung des putativen Proteolysefaktors RssB in der Regulation der intrazellulären RpoS-Konzentration.





**Abb. IV-5: Westernblot-Analyse des RpoS-Niveaus in Wildtyp (Wt) und *rssB*-Mutante (M) des *V. cholerae* O1 El Tor Stammes P27459-S in verschiedenen Stress-Situationen.** A) Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 170 mM MES-Puffer in das Wachstumsmedium auf ~ 5 gesenkt. B) Der Einfluss von oxidativem Stress auf das RpoS-Niveau wurde durch die Anwesenheit von 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Wachstumsmedium getestet. Dargestellt sind Gesamtzellextrakte, die zu definierten Zeitpunkten nach dem Induzieren des Stress präpariert wurden. Für den Immunoblot wurden jeweils 7,5 µl der GZE in 15% SDS-Gelen aufgetrennt. K) Unbehandelte Probe zu verschiedenen Zeitpunkten.

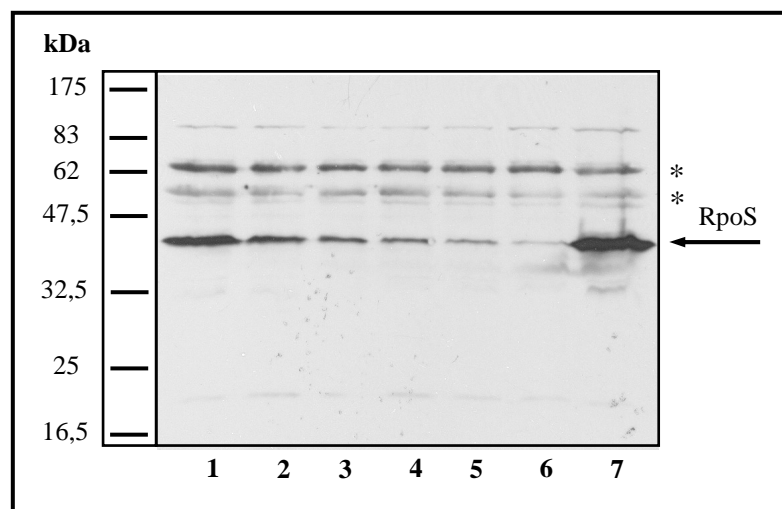
Aus diesem Grund stand die Aufklärung des Regulationsmechanismus für die *V. cholerae* RpoS-Proteolyse im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen.

### 3. Post-translationale Kontrolle des RpoS-Proteins in *V. cholerae*

Die Expression des alternativen Sigmafaktors RpoS wird in *E. coli* nachweislich beim Eintritt der bakteriellen Zellen in die Stationärphase oder unter diversen, stress-assoziierten Wachstumsbedingungen induziert (107). Die Aktivität der RpoS-abhängigen Promotoren wird dabei hauptsächlich über die zelluläre Konzentration des Proteins kontrolliert. Die Regulation der RpoS-Expression kann dabei auf jeder theoretisch möglichen Ebene der Proteinsynthese stattfinden (Abb. II-5, 111). Besonders effektiv wird die intrazelluläre Konzentration des Proteins dabei durch regulierte Proteolyse beeinflusst: Unter normalen Bedingungen ist der alternative Sigmafaktor mit einer Halbwertszeit unter 2 min sehr instabil. Dahingegen verlängert sich die Lebensdauer des Proteins auf 30 min, wenn die Zellen Stress ausgesetzt werden. Die Verantwortung für den rapiden *in vivo*-Abbau wurde der ClpXP-Protease zugesprochen (249). Des Weiteren wurde ein Faktor identifiziert, der  $\sigma^S$  der Protease zuführt. Nullmutationen im Gen des als „RssB“ bzw. „SprE“ bezeichneten Faktors führten demnach zu einer Stabilisierung des RpoS-Proteins. Andererseits resultierte die Überproduktion von RssB in einem beschleunigten RpoS-Abbau, selbst in der Stationärphase (198, 227).

### 3.1 RpoS-Proteolyse in *V. cholerae* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Aus den vorangegangenen Experimenten, welche das Akkumulationsverhalten von  $\sigma^S$  in *V. cholerae* beinhalteten, geht hervor, dass die intrazelluläre Konzentration des Proteins reguliert wird. Um zunächst einen Einblick in die post-translationalen Kontrollmechanismen zu gewinnen, wurde ein Proteolyse-Assay etabliert. Dazu wurde der O1 El Tor *Vibrio*-Stamm P27459-S bis in seine mittlere logarithmische Wachstumsphase ( $OD_{600} \sim 1$ ) in LB-Medium kultiviert. Die Synthese des alternativen Sigmafaktors in diesem frühen Wachstumsstadium konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden (vgl. IV-2.1). Die putative Degradation sollte anschließend durch der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Chloramphenicol (Cm, Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ) aufgedeckt werden. Um den Verlauf der RpoS-Proteolyse anschließend verfolgen zu können, wurden Proben direkt vor der Induktion sowie zu definierten Zeitpunkten nach der Cm-Zugabe entnommen. Die Gesamtzellextrakte wurden anschließend mittels Westernblot-Verfahren (vgl. III-6.7.3) in Hinblick auf ihre RpoS-Menge verglichen.

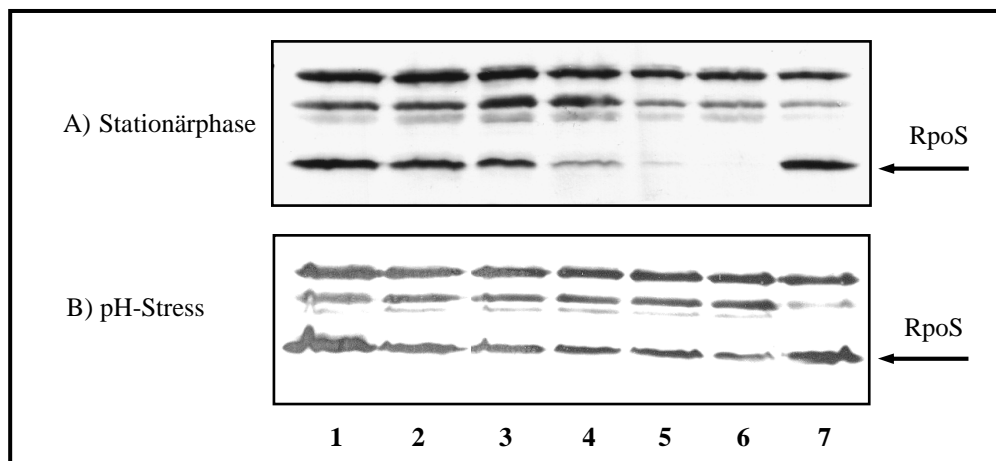


**Abb. IV-6: Die RpoS-Proteolyse in *V. cholerae*.** Dargestellt sind Gesamtzellextrakte des Wildtyps P27549-S, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cm zu exponentiell wachsenden Zellen präpariert wurden. Anschließend wurde die Menge des RpoS-Proteins in einem Immunoblot mit *V. cholerae* RpoS-spezifischen Antikörpern detektiert. 1) Kontrolle  $t_{0\text{min}}$ ; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60\text{min}}$ ; \* Unspezifische Nebenbanden aufgrund von Kreuzreaktionen mit dem RpoS-Serum (siehe auch Abb. IV-2).

Die vermutete Degradation sollte sich in der allmählich verschwindenden  $\sigma^S$ -spezifischen Bande widerspiegeln. Wie dementsprechend zu erwarten war, nahm die Menge an nachweisbarem RpoS nach der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors im Laufe der erfassten Zeit ab (Abb. IV-6). Dahingegen wurde in der unbehandelten Kontrolle nach 60 min eine deutlich erhöhte RpoS-Konzentration detektiert. Um den beobachteten Effekt tatsächlich auf

die Degradation zurückführen zu können, wurde die Auftrennung annähernd gleicher Proteinmengen anhand der unspezifischen, aber typischen Hintergrundbanden (vgl. Abb. IV-2) überprüft. Diese interne Referenz findet ebenfalls in den folgenden Abbildungen Anwendung, wird jedoch nicht mehr explizit erwähnt.

In diesem Zusammenhang wurde außerdem untersucht, ob der Abbau des RpoS-Proteins von der Wachstumsphase beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-Zellen der späten Stationärphase ( $OD_{600} \sim 3$ ) ebenfalls mit Cm behandelt und anschließend die Proteolyse des alternativen Sigmafaktors wie bereits beschrieben dargestellt. Der resultierende Westernblot zeigte einen ähnlich zeitabhängigen Verlauf der  $\sigma^S$ -Proteolyse wie für die Zellen der logarithmischen Wachstumsphase (Abb. IV-7A). Obwohl der Einfluss der Wachstumsphase auf die RpoS-Proteolyse nicht nachgewiesen werden konnte, ergab sich auf der Basis einer visuellen Beurteilung der Abbau-Sequenzen in beiden Experimenten eine Halbwertszeit von ca. 5 min für den alternativen Sigmafaktor.



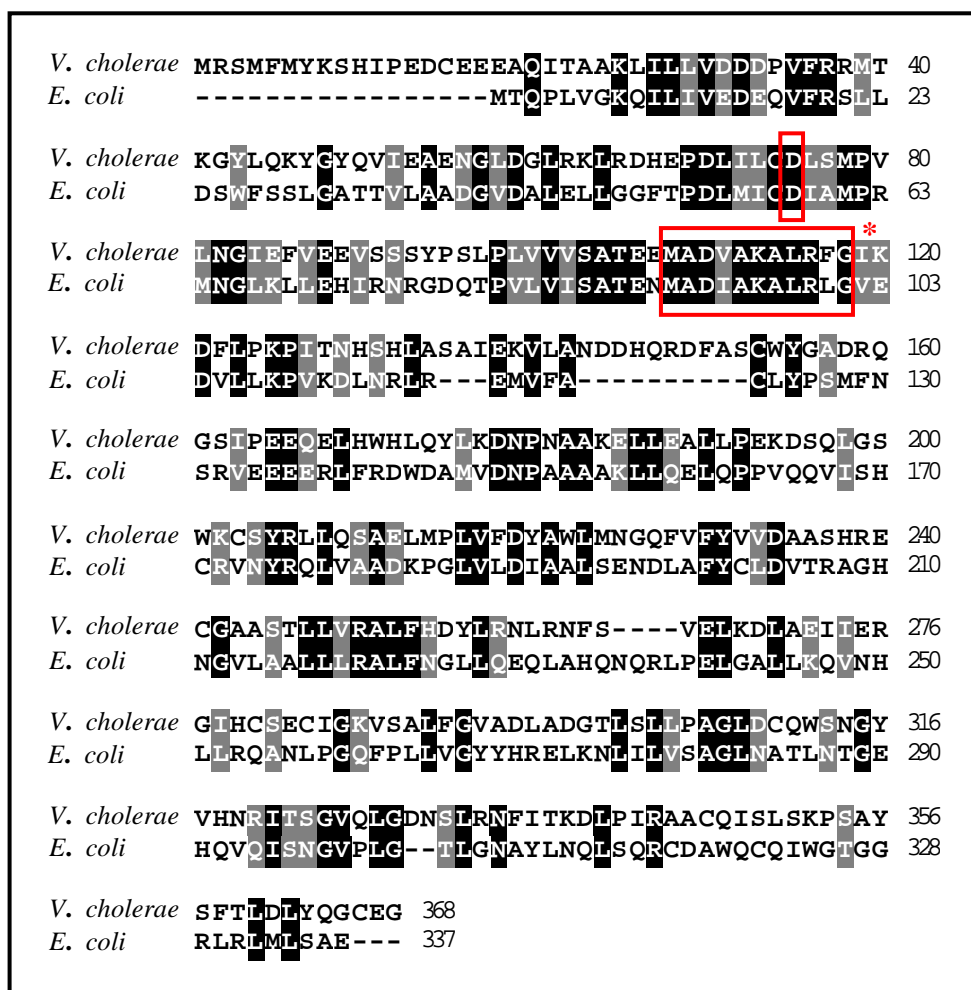
**Abb. IV-7: Die RpoS-Proteolyse im *V. cholerae*-Stamm P27459-S unter verschiedenen Bedingungen.** A) Die Zellen wurden bis in ihre späte Stationärphase (ca. 16h) kultiviert, bevor die Proteolyse induziert wurde. B) Für exponentiell wachsende P27459-S -Zellen ( $OD_{600} \sim 1$ ) wurde der pH-Wert des Wachstumsmediums LB durch die Zugabe von 170 mM MES-Puffer auf  $\sim 5$  erniedrigt. 30 min nach der Stress-Induktion wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Cm behandelt und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Jeweils 12  $\mu\text{l}$  der GZE wurden in 12% SDS-Gelen aufgetrennt und die Menge an RpoS-Protein mittels Westernblot detektiert; 1) Kontrolle  $t_{0\text{min}}$ ; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60\text{min}}$ .

Über den gleichen experimentellen Ansatz wurde der Verlauf der  $\sigma^S$ -Proteolyse unter weiteren atypischen Wachstumsbedingungen analysiert. Dabei wurde für jede der getesteten Stress-Situationen (oxidativer Stress, Hitzeschock, pH-Stress, Membranstress; vgl. III-7.2) das gleiche Ergebnis erzielt: Unabhängig davon, welchem Stress die Zellen ausgesetzt wurden, blieb die intrazelluläre Konzentration des RpoS-Proteins über den dokumentierten Zeitraum hinweg stabil (Abb. IV-7B).

### 3.2 Komponenten der regulierten RpoS-Degradation in *V. cholerae*

#### 3.2.1 Der Proteolyse-, Targeting“-Faktor RssB

Die Beteiligung des RssB-Proteins am Abbau der  $\sigma^S$ -Faktors wurde bereits für einige Bakterien beschrieben (4, 12, 198, 227). Demnach benötigt die ClpXP-abhängige RpoS-Degradation diesen spezifischen Faktor, welcher das Substrat  $\sigma^S$  erkennt, bindet und schließlich der Protease zuführt (301, 198). Deshalb ist die zelluläre Konzentration von RssB einer der limitierenden Faktoren für die  $\sigma^S$ -Proteolyse *in vivo* (230).

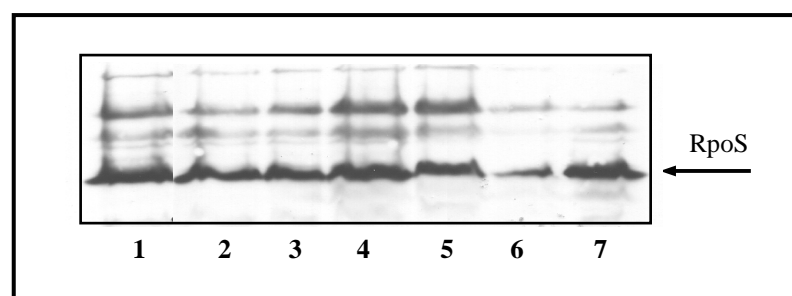


**Abb. IV-8: Vergleich der RssB-Proteine aus *V. cholerae* und *E. coli*.** Das Alignment wurde mit der Matrix Blossum 62 des „Bio Edit Sequence Alignment Editor“ erstellt. Schwarz hervorgehobene AS sind in beiden Proteinen identisch, grau unterlegte AS geben eine Ähnlichkeit von mindestens 60% an. Rot gekennzeichnete AS repräsentieren wichtige Funktionen des Response-Regulators: D58 – Phosphorylierung, \* Helix 4 der Empfängerdomäne.

Die Gegenüberstellung der jeweiligen Proteinsequenzen ergab für das *V. cholerae* RpoS das für die RssB-Erkennung notwendige „Turnover Element“ an der gleichen Position (siehe Anhang Abb. VII-1). Davon ausgehend wurde das *E. coli* RssB-Homolog in *V. cholerae* näher charakterisiert: Das 1107 bp umfassende Genprodukt des Locus VC1050 codiert für ein

41,3 kDa großes Protein mit einem theoretischen pI von 4,8. Das Leseraster ist als Response-Regulator annotiert (106) und weist Homologien auf Proteinebene zu Zwei-Komponenten Response-Regulatoren anderer *Vibrio* Spezies auf, darunter VP2183 aus *V. parahaemolyticus* (54% Identität) oder VV1\_1999 aus *V. vulnificus* (52% Identität). Dahingegen besteht eine Homologie zu dem RssB-Protein aus *E. coli* nur mit 28% Identität. Dennoch zeigte ein Vergleich dieser beiden Proteinsequenzen (Abb. IV-8), dass die Empfänger-Domäne des *V. cholerae* Homologs in der Helix 4 eine hohe Identität zu der Sequenz des *E. coli* RssB aufweist. Damit besitzt das RssB aus *V. cholerae* eine zu *E. coli* vergleichbare Input-Domäne, was wiederum für eine Bindefähigkeit zu RpoS spricht. Dahingegen unterscheiden sich die C-Termini der beiden RssB-Proteine voneinander. Dieser Bereich ist in *E. coli* jedoch für die eigentliche Degradation des  $\sigma^S$ -Faktors nach der Bildung des RssB-RpoS-ClpXP-Komplexes von Bedeutung (pers. Mitteilung E. Klauck).

In den vorangegangenen Experimenten deutete sich bereits der Einfluss des putativen Targetingfaktors auf die Stabilität des alternativen Sigmafaktors in *V. cholerae* an (vgl. IV-2). Um nun die definitive Beteiligung an der RpoS-Degradation nachweisen zu können, wurde der bereits für den Wildtyp angewandte Proteolyse-Assay (vgl. III-7.4) für die korrespondierende *rssB*-Deletionsmutante durchgeführt. Der Verlauf der RpoS-Degradation wurde anschließend unter Verwendung der Westernblot-Methode dargestellt (Abb. IV-9). Dabei wurde für jede zeitabhängige Probe annähernd die gleiche Menge an RpoS detektiert. Da diese Stabilität des Sigmafaktors im Wildtyp unter den gleichen Bedingungen nicht beobachtet wurde (vgl. Abb. IV-6), ist davon auszugehen, dass das *rssB*-Genprodukt de facto an der RpoS-Proteolyse beteiligt ist.



**Abb. IV-9: RpoS-Proteolyse in der  $\Delta$ *rssB*-Mutante des *Vibrio cholerae* Stamms P27459-S.** Nach der Induktion der Proteolyse durch die Zugabe von Cm wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Jeweils 12  $\mu$ l der GZE wurden in 12% SDS-Gelen aufgetrennt und das RpoS-Protein mittels Westernblot nachgewiesen 1)  $K_{0\text{min}}$ ; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60\text{min}}$ .

### 3.2.2 Identifizierung der RpoS-degradierenden Protease

In *E. coli* wird die Degradation des alternativen  $\sigma^S$ -Faktors durch die ATP-abhängige ClpXP-Protease katalysiert (301). Dieser Protease-Komplex besteht aus der ATP-hydrolysierenden Untereinheit ClpX sowie der proteolytischen ClpP-Komponenten. Schweder et al. konnten 1996 zeigen (249), dass unabhängige Mutationen der beiden Gene jeweils in der Stabilisierung des alternativen Sigmafaktors resultieren. Darüber hinaus kann die ClpP-Peptidase neben ClpX auch mit der ATPase ClpA assoziieren (251). Bisher wurde jedoch noch kein Zusammenhang zwischen dem ClpAP-Komplex und der RpoS-Proteolyse beschrieben.

Über die Initiation der RpoS-Proteolyse in *E. coli* ist bekannt, dass eine Konformationsänderung des  $\sigma^S$ -Faktors nach dem Binden des Targetingfaktors RssB den Angriff des ClpXP-Protease-Komplexes ermöglicht (265). Obwohl der Einfluss des *V. cholerae* RssB auf die Stabilität von RpoS eindeutig nachgewiesen werden konnte (vgl. IV-3.2.1), unterscheidet sich der Targetingfaktor in dem Bereich von seinem *E. coli* Homolog, der für die Konformationsänderung bedeutend ist (siehe Abb. IV-8, pers. Mitteilung E. Klauk). Demnach wäre es möglich, dass der *V. cholerae* ClpXP-Komplex nicht als Protease für RpoS agiert.

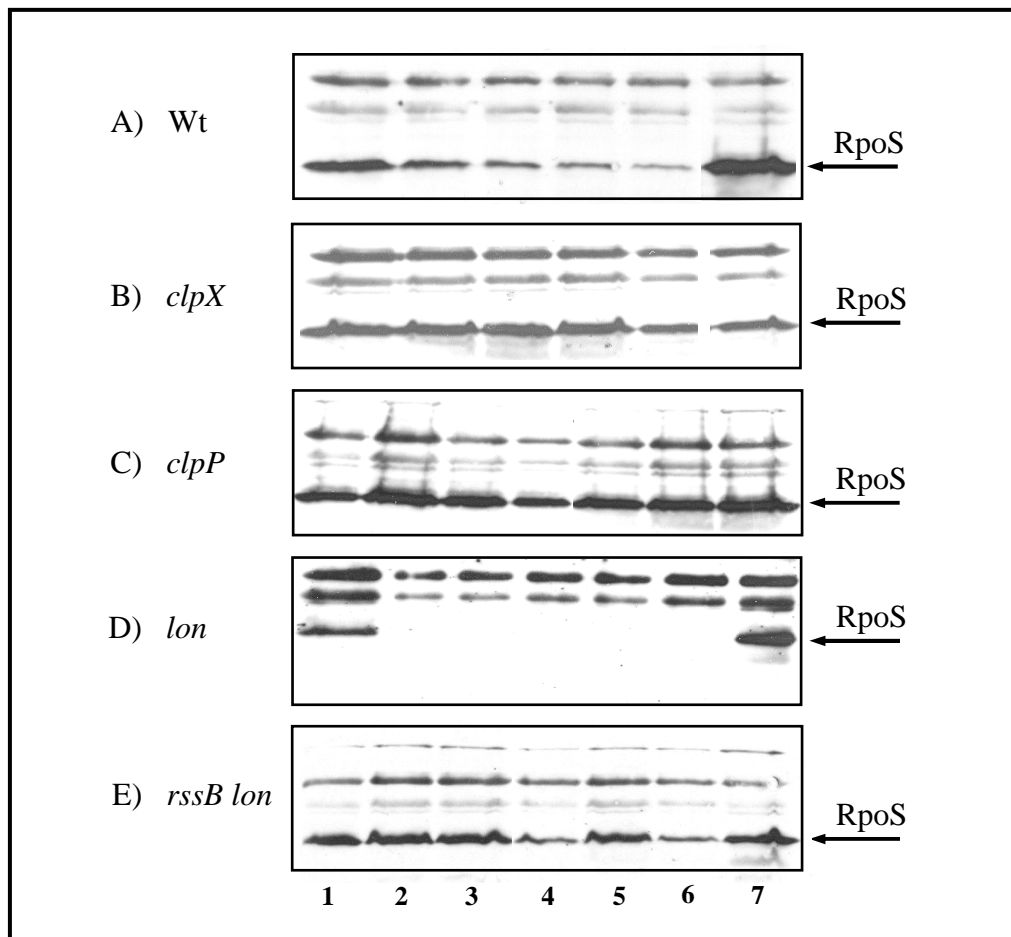
Die den ClpP (VC1922) und ClpX (VC1921) zugehörigen *V. cholerae* Gen-Loci bilden wie in *E. coli* ein Operon. Neben ClpXP und ClpAP werden in *V. cholerae* als weitere ATP-abhängige Proteasen die Genprodukte der Loci VC1920, VC2675 und VC0637 beschrieben (106). Die als Lon, HslVU und FtsH annotierten Proteasen wurden ebenfalls bezüglich ihres putativen Einflusses auf die intrazelluläre RpoS-Konzentration getestet.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Inaktivierung der einzelnen Protease-Gene auf die Stabilität von RpoS auswirkt. Dazu wurden die entsprechenden Protease-Gene zunächst über eine Insertionsmutation (vgl. III-5.3.1) inaktiviert und die resultierenden Knockout-Mutanten anschließend im Proteolyse-Assay (vgl. III-7.4) getestet.

Die Auswertung der jeweiligen Westernblot-Analysen ergab eine wildtypische RpoS-Proteolyse (vgl. Abb. IV-6) für die Mutanten der HslVU- und FtsH-Protease, sowie für die ATPase Untereinheit ClpA des Clp-Komplexes (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eine Beteiligung dieser Faktoren an der RpoS-Regulation über Degradation, so wie sie hier getestet wurde, ausgeschlossen werden.

Dahingegen präsentierte sich für die einzelnen Mutanten des ClpXP-Komplexes sowie für die Lon-Protease folgendes Ergebnis: Sowohl in der *clpP*- als auch in der *clpX*-Mutante wurde nach der Induktion des Proteolyse-Assays die Stabilität des alternativen Sigmafaktors über

den getesteten Zeitraum hinweg nachgewiesen (Abb. IV-10); die jeweilige Inaktivierung von ClpP und ClpX verlängerte die Lebensdauer von RpoS im Vergleich zum Wildtyp maßgeblich. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das *V. cholerae* RpoS ein Substrat der ClpXP-Protease ist.



**Abb. IV-10: Proteolyse-Assay verschiedener Protease-Insertionsmutanten.** Dargestellt sind die Westernblot-Analysen zum Nachweis der RpoS-Menge von GZE, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cm zu exponentiell wachsenden Zellen der Mutanten A) Wildtyp P27459-S; B) P27459-S *clpX*::pGP; C) P27459-S *clpP*::pGP; D) P27459-S *lon*::pGP; E) P27459-S  $\Delta$ *rssB lon*::pGP präpariert wurden. 1)  $K_{0min}$ ; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60 min}$ .

Besonders interessant erscheint der Effekt der *lon*-Mutation auf die RpoS-Proteolyse. Hier konnte bereits 1 min nach der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Chloramphenicol kein RpoS mehr detektiert werden (Abb. IV-10D). Daraufhin wurde das Experiment mit der Deletionsmutante des *lon*-Gens wiederholt. Dabei wurde das vormals beobachtete Ergebnis erneut erzielt. Es scheint, dass die Lon-Protease in der post-translationalen Kontrolle des RpoS-Proteins involviert ist, obwohl sie den Sigmafaktor nicht direkt angreift. Vielmehr ist der beschleunigten RpoS-Degradation im *lon*<sup>-</sup>-Hintergrund zu entnehmen, dass die Protease einen noch unbekanntem Faktor reguliert, welcher wiederum die Proteolyse direkt beeinflusst.

Die ClpXP-vermittelte  $\sigma^S$ -Proteolyse ist auf die Beteiligung des Targetingfaktors RssB angewiesen. (vgl. IV-3.2.1). Um einen möglichen Einfluss von RssB ebenso auf die Lon-bedingte RpoS-Regulation zu untersuchen, wurde die Doppelmutante O1 $\Delta$ rssB lon::pGP generiert und im Proteolyse-Assay getestet. Die Auswertung ergab keine erkennbare  $\sigma^S$ -Degradation (Abb. IV-10E). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Lon-bedingte RpoS-Regulation dem RssB-kontrollierten Abbau untergeordnet ist.

Zusammenfassend konnte den Ergebnissen der Proteolyse-Assays in Bezug auf Lon entnommen werden, dass das bisher noch unbekannte Substrat der Protease die RpoS-Degradation verstärkt, für diese Funktion aber RssB benötigt wird.

### 3.2.3 Die Sensor-Histidinkinase FexB

Der N-Terminus des Targetingfaktors RssB weist Homologien zur Familie der Response-Regulatoren auf. Deshalb wird davon ausgegangen, dass RssB durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. In diesem Zusammenhang wurde in *E. coli* als RssB-phosphorylierender Interaktionspartner die Sensor Histidin Kinase ArcB charakterisiert (188). Demnach akkumuliert das RpoS-Protein in der entsprechende Knockout-Mutante in größeren Mengen, als unter den gleichen Bedingungen für den Wildtyp beobachtet werden konnte.

In *V. cholerae* wurde als *arcB*-Homolog der als FexB annotierte ORF VC2369 identifiziert (106). Das 446 Aminosäuren umfassende Protein zeigt 56% Identität und 73% Ähnlichkeit zu der Sensor-Histidinkinase ArcB aus *E. coli*. Um die putative Beteiligung von FexB an der RpoS-Proteolyse zu untersuchen, wurde eine Insertionsmutante für das Gen generiert und diese in dem etablierten Proteolyse-Assay getestet (vgl. III-7.4). Dabei wurde eine dem Wildtyp vergleichbare RpoS-Degradation beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da die Inaktivierung von FexB nicht zu der erwarteten Stabilisierung des RpoS-Proteins führte, ist die Beteiligung dieser Kinase an der Regulation des Sigmafaktors unter den getesteten Bedingungen auszuschließen.

### 3.2.4 Komplementationsstudien mit ClpX<sup>*E. coli*</sup> und RssB<sup>*E. coli*</sup>

Die bisherigen Ergebnisse deuten an, dass für die post-translationale Kontrolle des RpoS-Proteins durch Degradation in *V. cholerae* im wesentlichen die gleichen Prozesse ablaufen, wie sie auch für *E. coli* postuliert werden (301): Der Proteolyse-Targetingfaktor RssB erkennt  $\sigma^S$  und führt es der degradierenden Protease ClpXP zu. Die Gegenüberstellung der einzelnen Interaktionspartner ergab dabei bemerkenswerte Übereinstimmungen zwischen *V. cholerae* und *E. coli* und wird im Folgenden nochmals kurz zusammengefasst: Im RpoS-Protein beider



Spezies ist das für die Bindung des RssB-Faktors notwendige Turnover-Element an der gleichen Position (K173) vertreten. Außerdem sind beide RssB-Proteine in dem Bereich, der für die Bindung des RpoS verantwortlich ist, nahezu identisch. Allerdings unterscheiden sie sich in der Aminosäure-Sequenz, der eine Funktion in Bezug auf den ClpXP-bedingten Abbau zugeordnet wird. Die Reihe der Übereinstimmungen wird durch den ausgeprägten Homologiegrad für die Komponenten der ClpXP-Protease mit 84% Identität für ClpX bzw. 79% Identität für ClpP vervollständigt.

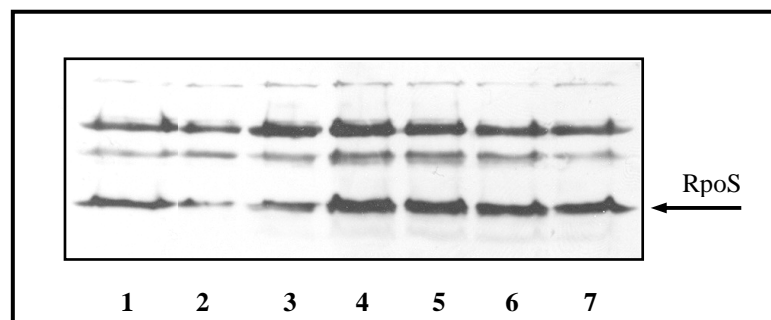
Auf der Basis dieser Konsense entwickelte sich die Frage, ob das RpoS-Protein aus *V. cholerae* durch Komponenten des *E. coli* Systems gleichermaßen degradiert werden kann. Aus diesem Grund wurden in die Knockout-Mutanten des *V. cholerae* RssB- bzw. ClpX-Faktors die korrespondierenden *E. coli* Proteine mit Hilfe der Expressionsplasmide pBAD18-Kan<sup>r</sup>ssB bzw. pBAD33clpX unter der Kontrolle eines Arabinose-abhängigen Promotors exprimiert (vgl. III-5.2). Die resultierenden Kan<sup>r</sup>- (P27459Δ*rssB* E.c. *rssB*) bzw. Cm<sup>r</sup>- (P27459clpX::pGP E.c. *clpX*) Transformanten wurden anschließend auf die Expression des jeweils speziesfremden Proteins getestet. Die Synthese des *E. coli* RssB in der *V. cholerae* Mutante P27459Δ*rssB* wurde dabei über RssB-spezifische Antikörper und die Produktion von ClpX<sup>*E. coli*</sup> in der Mutante P27459 *clpX* mit Hilfe von Anti-HisTag-Antikörpern kontrolliert. In beiden Fällen konnte die Expression der *E. coli* Proteine in der entsprechenden *V. cholerae* Mutante nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Synthese der jeweils speziesfremden Proteine in *V. cholerae* bestätigt werden konnte, wurde überprüft, ob das *E. coli* RssB in der Lage ist, die RpoS-Degradation in *V. cholerae* zu initiieren. Dazu wurde die Proteolyse in der Anwesenheit von Arabinose (Endkonzentration 0,1 mM) in exponentiellen Zellen der Mutante P27459Δ*rssB* E.c. *rssB* induziert (vgl. III-7.4) und die Konzentration des *V. cholerae* RpoS zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert. Gleichermäßen wurde die putative Funktion der *E. coli* ClpX-Protease auf den *V. cholerae* Sigmafaktor in der Mutante P27459 *clpX* E.c. *clpX* getestet.

In beiden Fällen wurde nach der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Chloramphenicol für jeden der getesteten Zeitpunkte eine unveränderte RpoS-Menge detektiert (Abb. IV-11), was darauf hindeutet, dass das Protein keiner nachweislichen Degradation ausgesetzt war. Die beobachtete Stabilität des  $\sigma^S$ -Faktors geht, wie bereits gezeigt werden konnte (vgl. IV-3.2.1, 3.2.2), auf die Inaktivierung der eindeutig am Abbau beteiligten Komponenten RssB und ClpX zurück. Deshalb ist davon auszugehen, dass weder der RssB-Faktor noch die ClpX-

Protease aus *E. coli* in der Lage waren, die Knockout-Mutationen von *rssB* und *clpX* in *V. cholerae* zu komplementieren.

Da der alternative Sigmafaktor aus *V. cholerae* durch die einzelnen Bestandteile des *E. coli* Proteolyse-Regulationsystems *in vivo* nicht umgesetzt werden konnte, wurde weiterführend getestet, ob das *V. cholerae* RpoS *in vitro* durch das *E. coli* RssB gebunden werden kann. Der entsprechende Assay wurde im Zuge einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. R. Hengge von E. Klauck durchgeführt. Die Ergebnisse belegten, dass *in vitro* eine Affinität des *E. coli* RssB-Faktors für das *V. cholerae* RpoS vorliegt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. IV-11: Westernblot des Proteolyse-Assays der *V. cholerae*-Komplementante P27459 $\Delta$ *rssB* E. c. *rssB*.** Dargestellt sind Gesamtzellextrakte, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cm zu exponentiell wachsenden Zellen präpariert wurden. Anschließend wurde die Menge des RpoS-Proteins in einem Immunoblot mit *V. cholerae* RpoS-spezifischen Antikörpern detektiert. 1) vor der Induktion; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60 \text{ min}}$ .

Im Gegensatz zu den Komplementationsexperimenten mit den *E. coli* Proteinen konnten die Mutanten P27459 $\Delta$ *rssB* und P27459 $\Delta$ *clpX* durch das Einbringen der Expressionsplasmide pQE30*rssB* und pBAD18Kan*clpX* in die entsprechende Mutante erfolgreich komplementiert werden. Die kontrollierte Synthese der auf den Plasmiden codierten *V. cholerae* Proteine RssB bzw. ClpX führte im Hintergrund der ursprünglichen Inaktivierungs-Mutation zum graduellen Abbau des RpoS-Proteins, wie sie für den Wildtyp in einem entsprechenden Proteolyse-Assay beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

#### 4. Phänotypische Charakterisierung der P27459 $\Delta$ *rpoS*-Mutante

Früheren Arbeiten zufolge verfügt das aquatische Bakterium *V. cholerae* über die Fähigkeit, seine Morphologie und Physiologie den vorherrschenden Umweltbedingungen anzupassen (255, 256). Extreme Schwankungen in der Salinität, der Temperatur oder dem Nährstoffangebot, wie sie u. a. beim Übertritt in den Wirtsorganismus vorkommen, können

z.B. zu einer starken Reduktion des Zellvolumens führen, wodurch das eigentlich kommaförmige Bakterium eine kokkoide Form annimmt (7). Vergleichbare Adaptationserscheinungen wurden ebenso für *E. coli* unter induzierten C-Mangelbedingungen beobachtet (126, 175, 178). Infolge dieser Arbeiten bedingt die Nährstoffmangel-Situation nicht nur eine strukturelle Anpassung, sondern auch die erhöhte Resistenz des Bakteriums gegenüber anderem Stress, z. B. Hitzeschock, oxidativen Stress, Hyperosmolarität. Diese Art der generellen Stressantwort steht unter der Kontrolle von *rpoS* (156), dessen Genprodukt, der alternative Sigmafaktor  $\sigma^S$ , unter C-Mangel oder Stationärphasen-Wachstum exprimiert wird. Die nachgewiesenen morphologischen und physiologischen Veränderungen werden auf die Funktion dieses RpoS-Proteins zurückgeführt. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass das *rpoS*-Homolog in *V. cholerae*, der Locus VC0534, ebenfalls für das Überleben des Bakteriums unter atypischen Wachstumsbedingungen benötigt wird.

Diese postulierte Funktion des  $\sigma^S$ -Faktors in *V. cholerae* wurde im Folgenden über die phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante untersucht.

#### 4.1 Überleben in verschiedenen Stress-Situationen

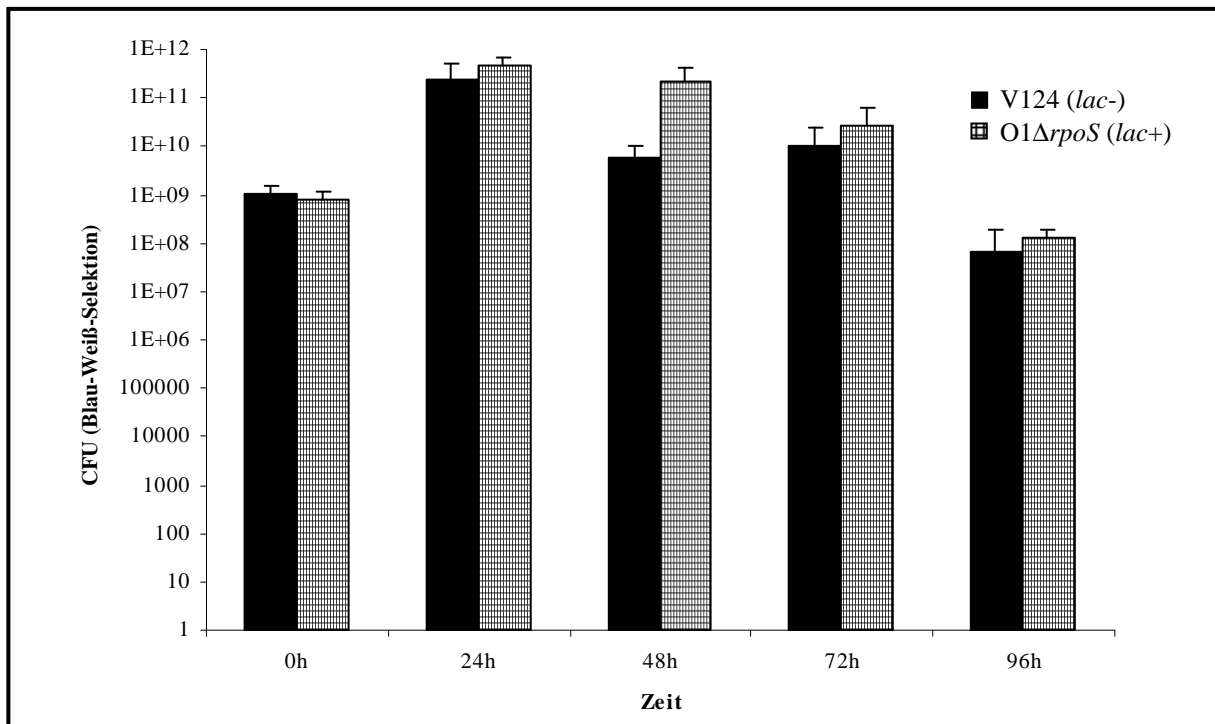
In Anlehnung an die Charakterisierung des *rpoS*-Phänotypen verschiedener Bakterien-Spezies, wurden die Überlebensfähigkeit des *V. cholerae* O1 El Tor Wildtyps P27459-S und der korrespondierenden *rpoS*-Deletionsmutante P27459-S $\Delta$ *rpoS* unter verschiedenen Stress-Bedingungen getestet.

##### 4.1.1 Langzeit-Nährstoffmangel

Die Folgen anhaltender Hungerperioden auf die Überlebensfähigkeit der *rpoS*-Deletionsmutante, wurde in einem kompetitiven Langzeit-Assay (vgl. III-7.2) untersucht. Für diesen Versuch wurde eine *lac*-Mutante des Wildtyps O1 El Tor (Stamm V124) zusammen mit der *lac*<sup>+</sup>-*rpoS*-Mutante über einen Zeitraum von 4 Tagen co-kultiviert. Der Stamm, der sich bei der stetig zunehmenden Konkurrenz um die schwindenden Nährstoffe durchsetzt, wurde in 24 h Abständen durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit X-Gal ermittelt. Für die Etablierung des experimentellen Ansatzes wurden vergleichbare *E. coli* Stämme mitgeführt.

Überraschenderweise ließen sich bei der Gegenüberstellung der Lebendzellzahlen des Wildtyps mit den CFU der *rpoS*-Mutante für keinen der getesteten Zeitpunkte signifikante

Unterschiede aufdecken. Im Gegenteil: Es wurde eine leicht erhöhte CFU für die jeweiligen *rpoS*-Mutanten beobachtet (Abb. IV-12). Diesem Ergebnis ist zu entnehmen, dass sich diese in der Konkurrenz um die Nährstoffe unerwartet gut durchsetzen konnten. Besonders interessant ist, dass generell kein Absterben zu verzeichnen war, obwohl in früheren Experimenten mit *E. coli* die unter C-Mangel eingeschränkte Überlebensfähigkeit der *rpoS*-Mutante bereits beschrieben wurde (156).



**Abb. IV-12: Einfluss von C-Mangel auf das Überleben verschiedener *V. cholerae*-Stämme.** Dargestellt sind die Lebendzellzahlen (CFU) zu definierten Zeitpunkten einer Co-Kultivierung von Wildtyp (schwarze Balken) und *rpoS*-Mutante (karierte Balken) in LB-Medium. Die Bestimmung der CFU wurde als Blau-Weiß-Selektion durchgeführt, wobei der  $\beta$ -Galaktosidase-negative Wildtyp weiße Kolonien bildete, während die Mutante blau erschien.

In weiterführenden Experimenten wurde das Überleben des Wildtyps und der Mutante als Co-kultur in M9-Minimalmedium verglichen. Sowohl 0,2% als auch 0,1% Glucose als C-Quelle führten zu dem gleichen Ergebnis, wie es vorher für das LB-Medium beobachtet wurde: Wildtyp und *rpoS*-Mutante zeigten für jeden dokumentierten Zeitpunkt vergleichbare Lebendzellzahlen. Die getrennte Kultivierung förderte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Überlebensfähigkeit unter anhaltenden Nährstoff-Mangelbedingungen.

#### 4.1.2 Überleben in weiteren Stress-Situationen

Für die *V. cholerae* Mutante P27459 $\Delta$ *rpoS* wurden neben C-Mangel (vgl. IV-4.1.1) auch die Resistenz gegenüber pH-Stress (pH ~ 5), oxidativen Stress (15, 30, 88 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hyperosmolarität (800 mM NaCl) und Hitzeschock (47 °C) analysiert. Die jeweilige Stress-Situation wurde wie unter III-7.2 beschrieben simuliert und die Lebendzellzahl der Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach 10, 20, 30, 40, 60 und 120 min determiniert.

Für keine der getesteten Stress-Bedingungen konnten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante in Bezug auf ihre Überlebensfähigkeit ermitteln werden (Daten nicht gezeigt). Diesen Ergebnissen zufolge spielt der alternative Sigmafaktor RpoS für das Überleben von *V. cholerae* unter den getesteten atypischen Wachstumsbedingungen keine Rolle.

#### 4.2 Die HA/Protease (Hap) steht unter der Kontrolle eines RpoS-induzierten Promotors

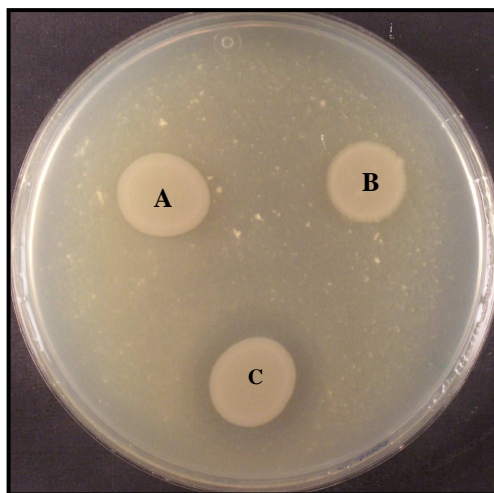
*V. cholerae* sekretiert eine Zn-abhängige Metalloprotease, Hämagglutinin/Protease oder HA/Protease genannt, welche durch *hapA* codiert wird (33, 78) und sich durch eine Vielzahl potentiell pathogener Aktivitäten auszeichnet. So wird der HA/Protease u. a. die proteolytische Aktivierung der CT Untereinheit A (34) und des El Tor Cytolysin/Hämolysin zugeschrieben (205). Neben der Hydrolyse physiologisch wichtiger Proteine wie Mukin, Fibronectin und Laktoferrin (79) ist HapA beim Ablösen der *Vibrio*-Zellen von Monolayern und Mukin von Bedeutung (18, 80).

Die HapA-Expression benötigt die transkriptionale Aktivierung durch HapR (129), ein Homolog des Quorum-Sensing-Regulators LuxR aus *V. harveyi*. Zudem wird postuliert, dass die *hapA*-Transkription Wachstumsphasen-abhängig ist und vorwiegend in der Stationärphase aktiviert wird (252). In diesem Zusammenhang wurde der positive Einfluss des Sigmafaktors  $\sigma^S$  auf die HapA-Expression in *V. cholerae* belegt (252). Demnach wird *hapA* infolge der zusammenwirkenden Stimuli von Quorum-Sensing (HapR) und Stationärphase (RpoS) transkribiert. Überraschenderweise wurde kürzlich aufgedeckt, dass HapR wiederum an der Transkriptionskontrolle von *rpoS* beteiligt ist (130). Demnach steht der alternative Sigmafaktor ebenfalls unter Quorum-Sensing-Einfluss.

Dementsprechend sollte eine *rpoS*-Mutante nicht mehr in der Lage sein, die HA/Protease zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurde im Laufe der Arbeit ein Protease-Assay auf Basis der

Hap-Sekretion etabliert (vgl. III-7.5). Dabei wurden Übernachtkulturen (ÜNK) der zu testenden Stämme auf LB-Agarplatten mit Magermilchpulver getropft und der Umsatz des zugesetzten Milchpulvers durch die sekretierte Protease verfolgt.

Erwartungsgemäß wurde für den Wildtyp die Abgabe der funktionsfähigen HA/Protease in das Milch-Agarmedium anhand des deutlich klaren Hofes um die Auftropfstelle angezeigt (Abb. IV-13C). Eine mitgeführte *hapR*-Mutante (P27459 $\Delta$ *hapR*) diente als Negativkontrolle. Hier war nach dem Auftropfen auf den Milch-Agar kein Hof sichtbar (Abb. IV-13A). Gleiches wurde für die zu testende *rpoS*-Mutante des O1 El Tor Wildtyps P27459 beobachtet. Der fehlende Umsatz des Milchpulvers nach der Beimpfung des Agars (Abb. IV-13B) bestätigte den aktivierenden Einfluss von RpoS auf die Hap-Produktion.



**Abb. IV-13: Der HA/Protease (Hap)-Phänotyp verschiedener *V. cholerae* P27459-S Stämme.** Je 20  $\mu$ l ÜN gewachsener Kulturen wurden auf eine LB-Agarplatten mit 1% Magermilchpulver aufgetropft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Sekretion aktiver Proteasen wurde über die Entstehung eines Hofes um die Auftropfstelle nachgewiesen. A) Negativkontrolle P27459 $\Delta$ *hapR*; B) P27459 $\Delta$ *rpoS*; C) Wildtyp P27459.

### 4.3 Katalasetest und Glycogensynthese

Beim Übergang in ihre Stationärphase produzieren Bakterien den Speicherstoff Glycogen (218). Außerdem entwickeln die Zellen eine erhebliche Resistenz gegenüber Hitzeschock und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (126). In diesem Zusammenhang wurden bereits Stationärphasen-induzierte Proteine beschrieben, auf welche diese physiologischen Veränderungen zurückgeführt werden. So wurde u. a. das Gen *katF* identifiziert, für dessen Genprodukt die Regulation der Katalase HP<sub>II</sub> und der Exonuklease III postuliert wurde (202). Später wurde der Locus des *katF*-Gens in *E. coli* als Allel von *rpoS* aufgedeckt (156). Für die entsprechende *katF*-Mutante ließen sich weder die Produktion von Glycogen noch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz nachweisen.

In Anlehnung an diese Experimente in *E. coli* wurde die *V. cholerae* *rpoS*-Mutante P27459 $\Delta$ *rpoS* in Bezug auf ihre Fähigkeiten, Glycogen zu synthetisieren oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umsetzen zu können, getestet.

### Katalasetest

Die Resistenz gegenüber  $H_2O_2$  wurde an dem Umsatz von aufgetropftem 30%-igen Wasserstoffperoxid auf ÜN-gewachsene Plattenkulturen zu  $H_2O$  und  $O_2$  bewertet (vgl. III-7.6). Im Vergleich zum O1 El Tor Wildtyp P27459 trat die Gasbildung in der korrespondierenden *rpoS*-Mutante deutlich verzögert ein. Demnach produziert die *V. cholerae* *rpoS*-Mutante weniger Katalase-Enzyme und ist dadurch in ihrer Resistenz gegenüber  $H_2O_2$  eingeschränkt, so wie es für die *E. coli* *rpoS*-Mutante beschrieben wurde (156).

### Glycogensynthese

Um die Zellen auf die Synthese von Glycogen zu testen, wurden die *rpoS*-Mutante und der Wildtyp auf LB-Agarplatten mit Glucose ausgestrichen, ÜN bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Iod bedampft (vgl. III-7.7). Die Menge des synthetisierten Glycogens wurde durch eine zunehmende Rot-Färbung der Zellen angezeigt. Für die schwach gefärbten Zellen der *rpoS*-Mutante wurde somit eine deutlich eingeschränkte Glycogenproduktion im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Abb. IV-14).

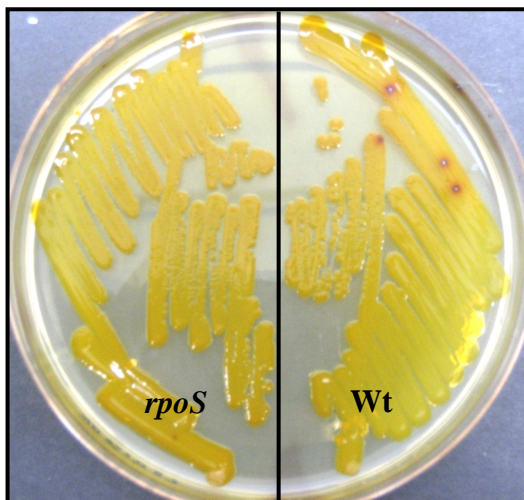


Abb. IV-14: Nachweis der Glycogensynthese im *V. cholerae* O1 El Tor Wildtyp P27459-S (Wt) und der korrespondierenden *rpoS*-Mutante (*rpoS*). ÜN-gewachsene Agarkulturen wurden für 10 min mit Iod bedampft. Eine Rot-Färbung der Zellen indizierte synthetisiertes Glycogen.

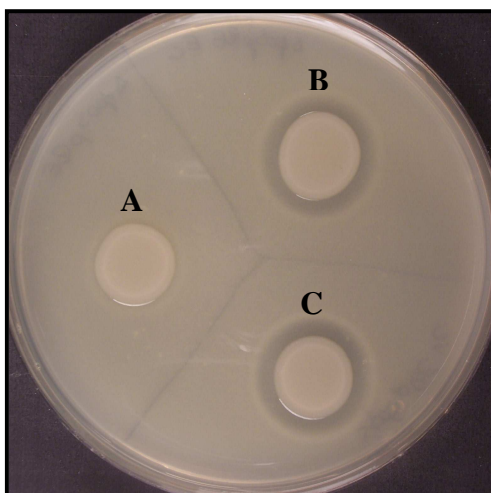
## 4.4 Komplementation von *rpoS*-Phänotypen

In den vorangegangenen Experimenten stand die Funktionsanalyse des alternativen Sigmafaktors  $\sigma^S$  aus *V. cholerae* im Vergleich zum *E. coli* RpoS im Mittelpunkt des Interesses. Den aktuellen Ergebnissen zufolge, spielt das *V. cholerae* *rpoS* jedoch nicht die gleiche Rolle für das Überleben des Bakteriums in Stress-Situationen. Allerdings ließ sich für die Regulation der intrazellulären RpoS-Konzentration eine vergleichbare Proteolyse-Kaskade ableiten. Umso interessanter erschien in der Folge die Frage, ob die aufgedeckten

Homologien der RpoS-Proteine beider Spezies ausreichen, um nachweislich *rpoS*-abhängige Promotoren aus *V. cholerae* durch das *E. coli* RpoS zu induzieren und umgekehrt.

Als durch das *V. cholerae* RpoS kontrollierte Funktion wurde in dieser Arbeit der bereits beobachtete HA/Protease-Phänotyp verwendet (vgl. IV-4.2, 298). Für die Komplementationsstudie wurde das vollständige *E. coli rpoS*-Gen unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors in die *V. cholerae* Mutante P27459 $\Delta$ *rpoS* eingebracht. Dazu wurde das von der Arbeitsgruppe um Prof. R. Hengge (Berlin) bereitgestellte Expressionsplasmid pQE30 *E.c. rpoS* in die kompetenten *Vibrio*-Mutante transformiert. Parallel dazu wurde die Komplementation des Stammes P27459 $\Delta$ *rpoS* mit dem *V. cholerae rpoS*-Gen über das Einbringen des Vektors pQE30*rpoS* durchgeführt. Als Negativkontrolle für den nachfolgenden HA/Protease-Test diente eine *rpoS*-Transformante mit dem leeren pQE30-Vektor. Die Fähigkeit dieser Transformanten, den *rpoS*<sup>*V. cholerae*</sup> *hap*-Phänotypen zu komplementieren, wurde anschließend durch das Auftropfen der entsprechenden ÜNK auf Milch-Agar mit 1 mM IPTG analysiert.

Nach der Inkubation der Agarplatten ÜN bei 37 °C konnte für beide Komplementanten die Bildung eines klaren Hofes beobachtet werden (Abb. IV-15). Der sichtbare Umsatz des Milchpulvers deutete in beiden Fällen auf die Sekretion einer funktionsfähigen Protease und damit auf eine wirksame Komplementation des *hap*-Phänotypen hin. Dieses positive Ergebnis spricht für die Befähigung des *E. coli rpoS*, die hier getestete Funktion seines *V. cholerae* Homologs übernehmen zu können.



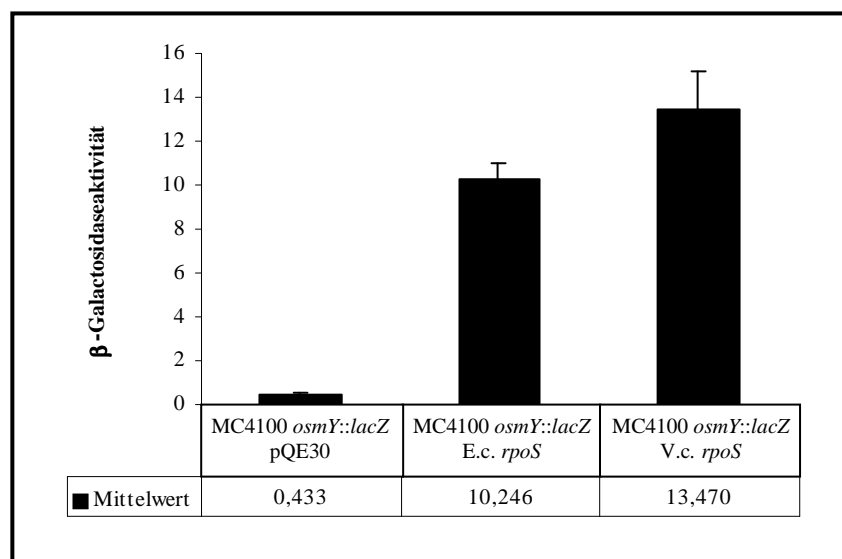
**Abb. IV-15. Komplementation des *hap*-Phänotypen der *V. cholerae rpoS*-Mutante.** Die Komplementation wurde durch Auftropfen von ÜN-gewachsenen Kulturen der zu testenden Stämme auf Agarplatten mit 1% Magermilchpulver überprüft. A) P27459 $\Delta$ *rpoS* pQE30; B) P27459 $\Delta$ *rpoS* pQE30 *E.c. rpoS*; C) P27459 $\Delta$ *rpoS* pQE30*rpoS*.

Daraufhin wurde vice versa die Induzierbarkeit  $\sigma^S$ -abhängiger *E. coli* Gene durch das *V. cholerae* RpoS getestet. Für diese Komplementationsstudien wurde eine *E. coli rpoS*-Transposonmutante verwendet, die von der Arbeitsgruppe um Prof. R. Hengge zur Verfügung



gestellt wurde und zusätzlich eine *lacZ*-Fusion für ein definiert *rpoS*-abhängiges Gen enthielt. Diese *E. coli*-Zellen wurden ebenfalls mit den Expressionsplasmiden pQE30 *E.c. rpoS* und pQE30*rpoS* transformiert. Mit Hilfe der eingebrachten Vektoren konnte anschließend die Synthese der codierten Proteine in den *E. coli*-Transformanten über die Zugabe von IPTG in das Wachstumsmedium (Endkonzentration 1 mM) induziert werden. Die Fähigkeit des exprimierten *V. cholerae* RpoS, die Transkription des *rpoS*-abhängigen Gens in *E. coli* zu induzieren, wurde im Anschluss über die Messung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (vgl. III-6.9) ermittelt. Als Positivkontrolle für die Transkriptionsaktivierung wurde eine Komplementante mit dem *E. coli rpoS* ebenfalls im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay getestet. Als Negativkontrolle diente die *E. coli rpoS*-Mutante mit dem leeren Expressionsplasmid.

Der Assay ergab eine funktionale Komplementation der *rpoS*-Mutante mit dem speziefremden Protein, da für das eingebrachte *V. cholerae* RpoS annähernd die gleiche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zu dem integrierten *E. coli* RpoS bestimmt wurde (Abb. IV-16). Demzufolge kann das Genprodukt des *V. cholerae rpoS* an die Promotoren  $\sigma^S$ -kontrollierter Gene in *E. coli* binden und deren Transkription aktivieren, so wie es bereits im vorangegangenen Experiment vice versa gezeigt werden konnte.



**Abb. IV-16: Gegenüberstellung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten verschiedener funktionaler Komplementationen einer *rpoS*-abhängigen *lacZ*-Fusion in *E. coli*.** Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde in  $\mu\text{mol} \times (\text{min} \times 1 \times \text{OD}_{600})^{-1}$  angegeben.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der Komplementationsstudien auf die Konservierung der RpoS-Promotorstrukturen in *V. cholerae* und *E. coli* schließen, da sie jeweils durch die RpoS-Proteine beiden Spezies erkannt wurden.

## 5. Identifizierung RpoS-regulierter Gene

Den bisherigen Experimenten zufolge besitzt das *V. cholerae rpoS* in der Stressantwort des Bakteriums nicht die gleiche Bedeutung wie sie für den alternativen  $\sigma^S$ -Faktor aus *E. coli* beschrieben wird (109). Um die tatsächliche Funktion des  $\sigma^S$ -Regulons in *V. cholerae* erschließen zu können, wurden Transkriptom- und Proteomanalysen unter verschiedenen Stress-Bedingungen durchgeführt.

### 5.1 2D-Gelelektrophorese

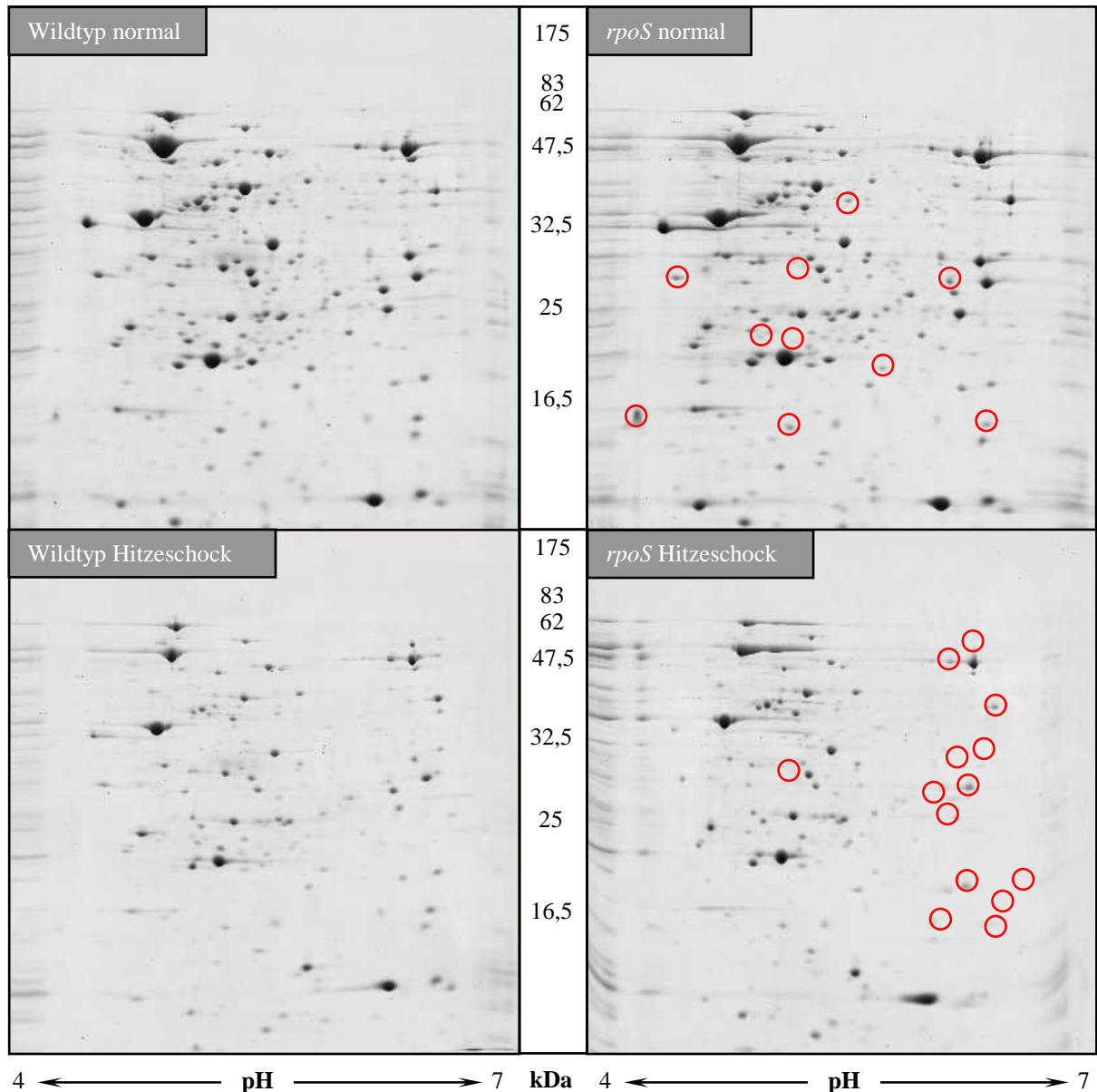
Die mittlerweile als Standardmethode für die Aufklärung zellulärer Funktionen und Regulationsmechanismen etablierte Analyse bakterieller Proteome, findet zunehmend ihre Anwendung für das Studium von Pathogen-Wirt-Interaktionen. Auf diese Weise wurde u. a. bereits das Proteom von *V. cholerae* analysiert, und infolgedessen mehrere, putative Pathogenese-assoziierte Proteine charakterisiert (52, 134).

In dieser Arbeit wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese genutzt, um einen generellen Überblick über die Proteine zu gewinnen, welche durch das *rpoS*-Genprodukt kontrolliert werden. Dazu wurde das Proteom des O1 El Tor Wildtyps P27459-S mit dem der korrespondierenden *rpoS*-Deletionsmutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen verglichen (vgl. III-6.8). Jedes der konzipierten 2D-Experimente wurde dabei mit mindestens drei unabhängigen Proteinpräparationen wiederholt. Ursprünglich wurde die 1. Dimension (Isoelektrische Fokussierung) unter Verwendung von IPG-Streifen, die einen pH-Bereich von 3-10 abdeckten, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der überwiegende Teil der detektierten Proteinspots zwischen pH 4-7 lokalisiert waren. Eine ähnliche Verteilung wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (52), so dass nachfolgend die Proteinproben nur noch über IPG-Stripes mit pH 4-7 aufgetrennt wurden.

Die Auswertung der 2D-Gele mittels der PDQuest Software (BioRad) ergab für die Gegenüberstellung des Wildtyps mit der *rpoS*-Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen mit einer Ausschlussgrenze von mindestens 2x dereguliert 156 veränderte Proteinspots. Von diesen Proteinen wiederum wurden ca. 40% (62 Spots) als vermehrt exprimiert angezeigt, während die restlichen 60% (94 Spots) mit einer verminderten Intensität im Proteom der *rpoS*-Mutante detektiert wurden.

Nachdem die Zellen weiterführend 30 min pH-Stress (vgl. III-7.1) ausgesetzt wurden, ergab der Proteomvergleich der gestressten Zellen 90 definitiv deregulierte Proteine. Dabei wurden

im Vergleich zum Wildtyp im *rpoS*-Proteom 36 Spots als hochreguliert und 54 Proteine als vermindert reguliert identifiziert. Das entspricht der ca. 40 zu 60% Verteilung unter normalen Wachstumsbedingungen.



**Abb. IV-17: Repräsentative Darstellung der Proteomanalyse des *V. cholerae* Wildtyps P27459-S und der zugehörigen *rpoS*-Deletionsmutante unter verschiedenen Bedingungen.** Es wurden 400 µg Gesamtzellprotein aufgetrennt und anschließend über eine Coomassie-Färbung visualisiert. Die in den Experimenten auffällig deregulierten Spots sind markiert.

Die Situation in hitzegeschockten Zellen stellte sich vergleichbar dar (Abb. IV-17): Von den nachweislich mindestens 2x deregulierten Proteinen wurden ca. 35% mit einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Expression im Proteom der *rpoS*-Mutante detektiert, während 65% reprimiert vorlagen.

Zusammengefasst konnte den 2D-Experimenten übereinstimmend entnommen werden, dass ca. 60% der durch das  $\sigma^S$ -Regulon kontrollierten Proteine aktiviert werden, wohingegen die Expression von ca. 40% der kontrollierten Proteine durch RpoS reduziert wird. Die Auswertung der 2D-Gelelektrophorese erlaubte jedoch keine Aussagen darüber, auf welcher Ebene ihrer Synthese der  $\sigma^S$ -Faktor die betroffenen Proteine beeinflusst. Aus diesem Grund wurde der experimentelle Ansatz für die Aufklärung der RpoS-Funktion, um die Methode des Microarray ergänzt.

## 5.2 Microarray

In den folgenden Microarray-Analysen wurde das Transkriptom des gestressten Wildtyps dem Transkriptom der ebenfalls gestressten *rpoS*-Deletionsmutante gegenübergestellt. Die erforderliche RNA wurde aus hitzegeschockten Zellen präpariert (vgl. III-7.2).

Während der laufenden Experimente stellte sich jedoch heraus, dass von der Arbeitsgruppe um Nielsen vergleichbarer Analysen parallel durchgeführt wurden (211). Aufgrund der zahlreichen Übereinstimmungen der bis dahin gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit mit den publizierten Daten, wurde nachfolgend auf eine Wiederholung der bereits durchgeführten Experimente verzichtet.

Kongruent zu Nielsen et al. (211) konnte aus den Resultaten der präsenten Transkriptom-Analysen folgendes abgeleitet werden: Der Array ergab eine starke Reprimierung für das *rpoS*-Gen (VC0534). Dies war aufgrund der Deletion zu erwarten und konnte demzufolge als externe Kontrolle für die Zuverlässigkeit des Array-Experimentes verwendet werden. Ansonsten fiel v. a. die extreme Deregulierung zahlreicher Chemotaxis-assoziiertes Proteine auf. So befanden sich unter den als reprimiert angezeigten Genen u. a. 23 der insgesamt 43 „Methyl-accepting chemotaxis proteins“, sowie Gene, welche Komponenten des Chemotaxis-Signaltransduktionssystems bezeichnen (Tab. IV-1). Letzteres wird in drei separaten Genclustern codiert (32), von denen zwei auf dem Chromosom 1 des *V. cholerae* Genoms lokalisiert sind. Der Transkriptom-Analyse zufolge scheinen dabei vorrangig Vertreter der Cluster I und III durch RpoS induziert zu werden. Die dem Chemotaxis-System von *V. cholerae* zugehörigen Gene, deren Transkription von RpoS unter Hitzeschock mehr als 2x induziert wurde, sind in der Tabelle IV-1 nochmals explizit aufgeführt.

**Tab. IV-1: RpoS-regulierte Chemotaxis-Gene.** Die Tabelle fasst Gene zusammen, die in dem Microarray Wt versus *rpoS*-Deletionsmutante unter Hitzeschock-Bedingungen mindestens 2x runterreguliert wurden. Die präsentierten Daten wurden mit den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Nielsen et al. (211) abgeglichen. Die Zuordnung der Gene zu in *V. cholerae* bekannten Chemotaxis-Clustern ist mit „I“ und „III“ gekennzeichnet.

	ORF	Genfunktion	x-fache Expression
I	VC0098	methyl-accepting chemotaxis protein	-2,664
	VC1248	methyl-accepting chemotaxis protein	-20,494
	VC1394	methyl-accepting chemotaxis protein	-3,701
	VC1398	chemotaxis protein CheY ( <i>cheY-2</i> )	-2,581
	VC1399	chemotaxis protein methyltransferase CheR ( <i>cheR-1</i> )	-4,620
	VC1401	protein-glutamate methylesterase CheB ( <i>cheB-1</i> )	-3,189
	VC1402	purine-binding chemotaxis protein CheW, putativ	-6,548
	VC1403	methyl-accepting chemotaxis protein	-4,847
	VC1405	methyl-accepting chemotaxis protein	-2,309
	VC1406	methyl-accepting chemotaxis protein	-2,818
III	VC1868	methyl-accepting chemotaxis protein	-10,115
	VC2161	methyl-accepting chemotaxis protein	-2,907
	VC2202	chemotaxis protein CheV ( <i>cheV-3</i> )	-3,629
	VCA0008	methyl-accepting chemotaxis protein	-3,385
	VCA0268	methyl-accepting chemotaxis protein	-3,084
	VCA1056	methyl-accepting chemotaxis protein	-3,462
	VCA1088	methyl-accepting chemotaxis protein	-4,245
	VCA1089	protein-glutamate methylesterase CheB ( <i>cheB-3</i> )	-4,454
	VCA1090	chemotaxis protein CheD, putative	-5,166
	VCA1091	chemotaxis protein methyltransferase CheR ( <i>cheR-3</i> )	-3,192
	VCA1092	methyl-accepting chemotaxis protein	-11,589
	VCA1093	purine-binding chemotaxis protein CheW ( <i>cheW-2</i> )	-5,592
	VCA1094	purine-binding chemotaxis protein CheW ( <i>cheW-3</i> )	-4,521
	VCA1095	chemotaxis protein CheA ( <i>cheA-3</i> )	-8,822
	VCA1096	chemotaxis protein CheY ( <i>cheY-4</i> )	-20,849

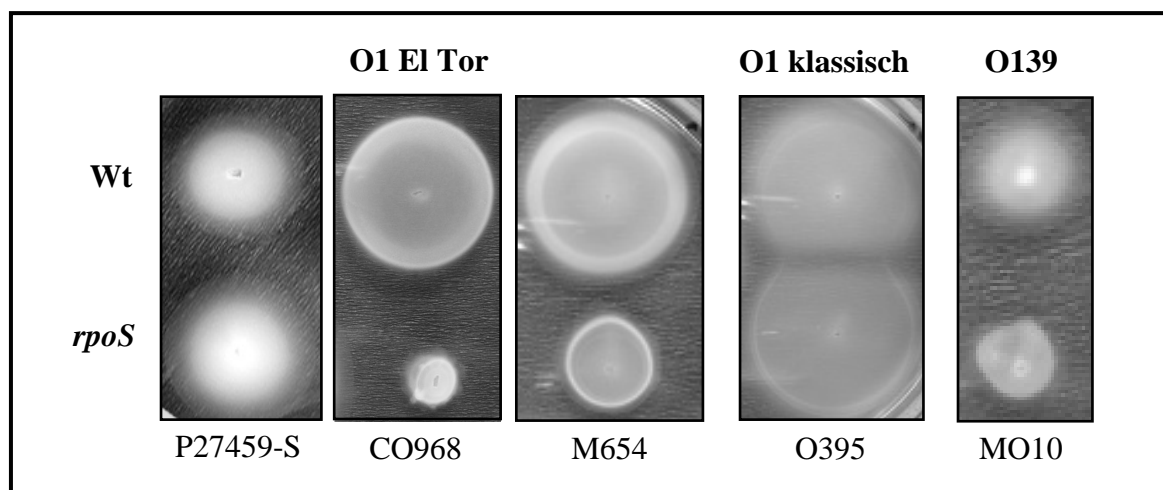
### 5.3 Mutationen in *rpoS*, *lon*, *clpX* und *rssB* beeinflussen die *V. cholerae* Motilität

Als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen führt eine stimulierte Chemotaxis-Kaskade zu Modifikationen der Motilitätseigenschaften. Die Fähigkeit zur Motilität gilt daher in vielen pathogenen Spezies als wichtiger Virulenzfaktor, wird in einigen Fällen jedoch invers zur Expression der Virulenzfaktoren reguliert (219). Auch für *V. cholerae* wird postuliert, dass Motilität und Chemotaxis eine Rolle bei der Besiedelung des Wirtes spielen, aber die Frage nach der Relevanz der beiden Prozesse während der Infektion wurde bisher noch nicht eindeutig geklärt (85, 162). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Produktion von zwei Hauptvirulenzfaktoren, CT und TCP, in Abhängigkeit verschiedener Motilitätsphänotypen beeinflusst wird (88).

Den vorangegangenen Transkriptom-Analysen zufolge, wird ein Großteil des Chemotaxis-Systems von *V. cholerae* durch den  $\sigma^S$ -Faktor kontrolliert, wenn die Zellen Stress ausgesetzt sind. Da das chemotaktische Verhalten wiederum die Motilitätseigenschaften des Bakteriums beeinflusst, sollte die Motilitätsfähigkeit einer *rpoS*-Mutante eingeschränkt sein. Für die Definition dieses Phänotypen wurden LB-Agarplatten mit einem verringerten Agaroseanteil (vgl. III-7.6) verwendet und mehrere Wildtypen mit ihrer korrespondierenden *rpoS*-Mutante verglichen. In Anlehnung an die von Nielsen et al. beschriebene Methode (211) wurde die Schwarmfähigkeit außerdem auf definiertem M9-Minimalmedium mit Maltose als C-Quelle getestet.

Der gewählte experimentelle Ansatz deckte auf, dass die Schwarmfähigkeit der O1 El Tor Stämme P27549-S bzw. CO968 auf dem Vollmedium LB durch die Mutation nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu stellten sich die beobachteten Phänotypen auf dem M9-Minimalmedium wie folgt dar: Bei der Gegenüberstellung der *rpoS*-Mutante des Stammes O395 (O1 klassisch) mit ihrem Wildtypen wurden keine Unterschiede im Schwarmverhalten ermittelt. Dahingegen zeigten die O1 El Tor *rpoS*-Mutanten der Wildtypen CO968 und M654 ein deutlich verringertes Wachstum auf den Testplatten, was auf eine reduzierte Ausprägung der Motilität in diesen Stämmen schließen lässt. Für die ebenfalls getesteten *rpoS*-Mutanten des O1 El Tor Wildtyps P27459-S bzw. des O139-Isolates MO10 wurde nur eine geringe Beeinflussung ihrer Motilität nachgewiesen (Abb. IV-18).

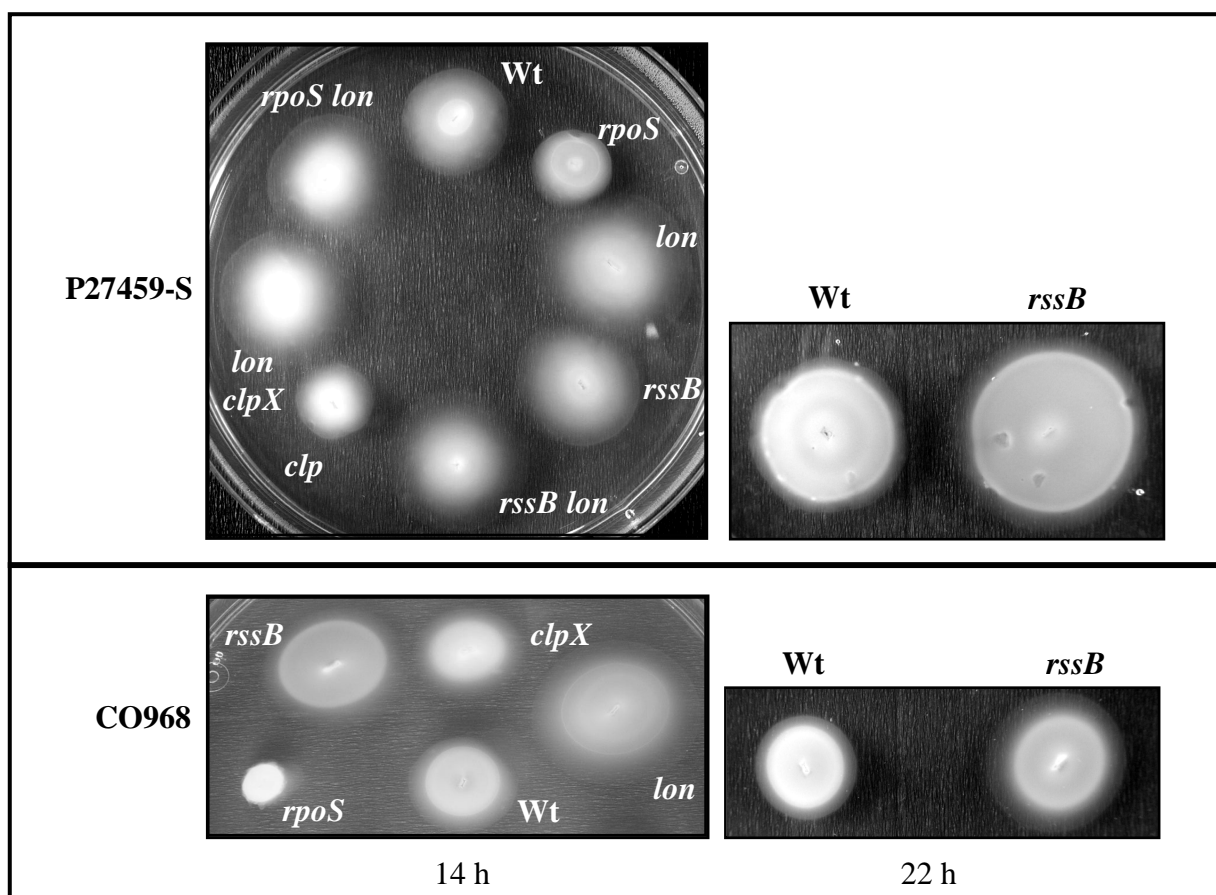


**Abb. IV-18: Schwarmfähigkeit verschiedener *V. cholerae* Wildtypisolate (Wt) und der korrespondierenden *rpoS*-Mutanten (*rpoS*) auf M9-Maltosemedium.** Die Gegenüberstellung wurde 14 h nach dem Beimpfen des Motilitätsagars dokumentiert.

In vorangegangenen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden Komponenten identifiziert, welche nachweislich die Abbaurate und somit die intrazelluläre Konzentration

von RpoS beeinflussen (vgl. IV-3.2). Die beobachtete Stabilität des Proteins in der entsprechenden *rssB*-, *clpX*- bzw. *lon*-Mutante sollte sich demzufolge ebenfalls auf die Motilität auswirken und wurde für die Stämme P27459-S und CO968 untersucht.

In beiden Stamm-Hintergründen führte die jeweilige *lon*-Mutation zu einem hypermotilen Phänotypen (Abb. IV-19). Außerdem wurde eine leicht erhöhte Schwarmfähigkeit für P27459-S $\Delta$ *rssB* sowie für die *rssB*-Mutante des CO968-Stammes im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Die zusätzlich getesteten *lon/rssB* – bzw. *lon/clpX* - Doppelmutationen resultierten für den Stamm P27459-S ebenfalls in einer verstärkt ausgeprägten Motilität (Abb. IV-19).



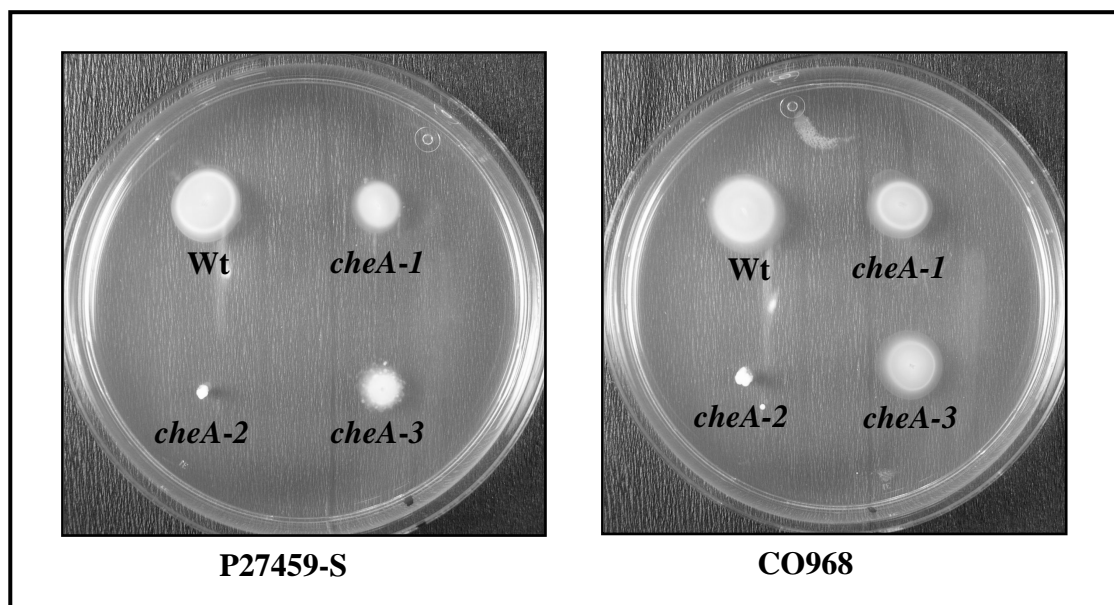
**Abb. IV-19: Motilitätsphänotypen verschiedener Mutanten der *V. cholerae* O1 El Tor Stämme P27459-S und CO968.** Agarkulturen der Bakterien wurden auf M9-Motilitätsagar mit 0,2% Maltose überimpft und anschliessend bei 37 °C inkubiert. Der entsprechende Phänotyp wurde nach 14 h bzw. 22 h dokumentiert.

Um eine Vorrangstellung bei der Ausbildung des Phänotypen zuordnen zu können, wurde zusätzlich die Doppelmutante P27459-S $\Delta$ *rpoS lon*::pGP auf ihre Schwarmfähigkeit getestet. Aufgrund der resultierenden Hypermotilität (Abb. IV-19) ist davon auszugehen, dass die Lon-Protease der dominierende Faktor für die Kontrolle der Motilität in dem untersuchten O1 El Tor Stamm ist.

#### 5.4 Ausprägung eines Chemotaxis-Phänotypen in Abhängigkeit der drei CheA-Homologe von *V. cholerae*

Die kürzlich veröffentlichte Genomsequenz offenbarte für *V. cholerae* mehrere Chemotaxis-assoziierte Gen-Homologe, von denen der überwiegende Teil in drei verschiedenen Regionen des Genoms gruppiert ist (106). In weiterführenden Analysen konnten jeweils drei Gene mit einer starken Übereinstimmung zu dem *E. coli* Chemotaxisprotein-Locus *cheA* identifiziert werden. Dabei sind *cheA-1* (VC1397) und *cheA-2* (VC2063) auf dem Chromosom 1 von *V. cholerae* lokalisiert, während *cheA-3* (VCA1095) auf dem kleineren Chromosom 2 codiert ist (95).

Um die jeweilige Bedeutung für die Chemotaxis von *V. cholerae* ermitteln zu können, wurde für jedes *cheA*-Homolog eine Mutante generiert und diese anschließend in Bezug auf ihre Schwarmfähigkeit unter Verwendung von M9-Motilitätsagar analysiert.



**Abb. IV-20: Motilitätsanalyse verschiedener *cheA*-Mutanten.** Es wurde das Schwarmverhalten der *cheA*-Mutanten der O1 El Tor Wildtypen P27459-S und CO968 auf M9-Motilitätsagar mit 0,2% Maltose verglichen. Die Platten wurden 14 h bei 37 °C inkubiert.

Die Gegenüberstellung der *cheA*-Mutanten mit ihrem Wildtyp ergab für beide der getesteten O1 El Tor Isolate vergleichbar große Schwarmkreise für die jeweilige *cheA-1*- und die *cheA-3*-Mutante (Abb. IV-20). Die Inaktivierung der *cheA-2*-Homologe hingegen führte zu einer deutlich reduzierten Schwarmfähigkeit für die betroffenen Mutanten (Abb. IV-20). Diesen Ergebnissen zufolge ist in den getesteten Stämmen nur das Genprodukt des *cheA-2*-Homologs an der Ausprägung der Schwarmfähigkeit beteiligt. Aufgrund vergleichbarer Resultate mit



einem anderem *V. cholerae* Stamm in früheren Arbeiten (95) überraschte die aktuelle Beobachtung nicht.

### 5.5 Die RpoS-Proteolyse in Abhängigkeit der CheA-Kinase

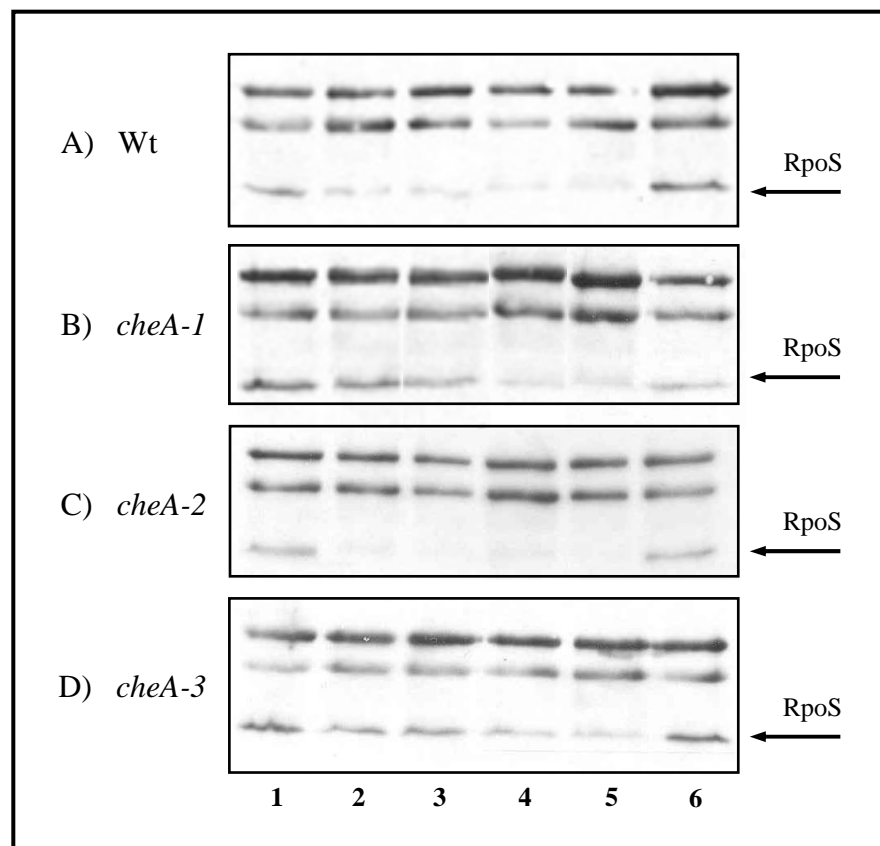
Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, dass die Komponenten, welche die Regulation der intrazellulären RpoS-Konzentration durch Proteolyse vermitteln, ebenso die Ausprägung der RpoS-abhängigen Motilität beeinflussen. Der auf entsprechenden Schwarmplatten beobachtete Motilitätsphänotyp (Abb. IV-19) zeigte sich nachfolgend auch für das inaktivierte CheA-2 (Abb. IV-20), ein Homolog der *E. coli* Chemotaxis-assoziierten Sensor-Histidinkinase CheA. Darüber hinaus wurde aufgedeckt, dass die drei CheA-Homologe in *V. cholerae* der transkriptionalen Kontrolle durch RpoS unterliegen (211, Tab. IV-1). Auf dieser Basis wurde im Folgenden die Frage nach einer putativen, intermolekularen Verknüpfung zwischen RpoS-Proteolyse und Chemotaxis zentralisiert. Dabei wurde vorrangig der mögliche Einfluss der CheA-Kinasen auf die RpoS-Degradation adressiert. Aufgrund des stärker ausgeprägten Chemotaxis-Phänotypen der *rpoS*-Mutante des *V. cholerae* O1 El Tor Wildtyps CO968 (vgl. Abb. IV-19) wurden die entsprechenden *cheA*-Mutanten dieses *V. cholerae* Stammes in einem Proteolyse-Assay getestet (vgl. III-7.4).

Um den für die Funktion des Chemotaxis-Systems notwendigen Chemotaxis-Gradienten aufzubauen, wurden die Experimente unter Verwendung von M9-Minimalmedium mit 0,2% Maltose als C-Quelle durchgeführt. Die entsprechenden Proteolyse-Experimente wurden anschließend mit Hilfe von Westernblot-Analysen (Abb. IV-21) ausgewertet.

Dabei zeigte sich, dass die Abbaurate des alternativen  $\sigma^S$ -Faktors im Wildtyp unter den Bedingungen des Minimalmediums stark erhöht ist. Ähnlich dem vormals beobachteten *lon*-Phänotypen (vgl. Abb. IV-10D) wurde bereits wenige Minuten nach der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Cm kaum noch RpoS nachgewiesen (Abb. IV-21A).

Interessanterweise hatten die jeweiligen Einzelmutationen der drei CheA-Homologe unter den getesteten Bedingungen verschiedene Auswirkungen auf die RpoS-Stabilität. So konnte für die *cheA-1*- und *cheA-3*-Mutante eine dem LB-Medium analoge Proteolyserate detektiert werden (Abb. IV-21B, D). In der Folge ist auszuschließen, dass die für den Wildtyp beobachteten Effekte auf die Funktion des *cheA-1*- oder *cheA-3*-Genproduktes zurückgehen. Im Vergleich dazu konnte für die *cheA-2*-Mutante in Bezug auf die RpoS-Degradation unter Minimalbedingungen kaum ein Unterschied zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. IV-21C). Dieses Ergebnis deutet auf die Beteiligung des CheA-2-Proteins an der Kontrolle der

intrazellulären RpoS-Konzentration, wodurch wiederum die postulierte intermolekulare Interaktion von Chemotaxis-Kinasen und RpoS-Proteolyse bestätigt werden konnte.



**Abb. IV-21: Analyse der Beteiligung der CheA-Homologe CheA-1-3 an der intrazellulären RpoS-Konzentration des *V. cholerae* O1 El Tor Wildtyps CO968.** Für die Analyse wurde die Chemotaxis-abhängige RpoS-Proteolyse in den einzelnen Knockout-Mutanten dokumentiert. Der Aufbau eines Chemotaxis-Gradienten wurde durch das Wachstum in M9-Minimalmedium mit 0,2% Maltose erzeugt. Die jeweilige RpoS-Degradation wurde anschließend im Westernblot-Verfahren unter Verwendung RpoS-spezifischer Antikörper determiniert. 1)  $K_{0\text{min}}$ ; 2) 5 min nach Cm-Zugabe; 3) 15 min nach Cm-Zugabe; 4) 30 min nach Cm-Zugabe; 5) 60 min nach Cm-Zugabe; 6) Kontrolle  $t_{60\text{min}}$ .

## 6. OsmRK und RpoS: Signal-Integration für die post-translationale Kontrolle des generellen Stressregulators?

Die Anpassung an völlig veränderte Milieubedingungen erfordert nicht nur die Wahrnehmung von Umweltsignalen, sondern auch die entsprechende Umsetzung dieser Stimuli. Dabei wird die notwendige Integration von Signalen und korrespondierenden Regulationsmechanismen häufig durch einen einzelnen Masterregulator vermittelt. In der Theorie fungiert dieser Masterregulator als übergeordnete Einheit eines Regulationsnetzwerkes, welche ankommende Informationen verarbeitet und nachfolgend stress-assoziierte zelluläre Prozesse induziert

(291). In der generellen Stress-Reaktion von *E. coli* gilt RpoS als der Masterregulator und das zelluläre Level des Proteins als entscheidender Parameter für die Funktion des Netzwerkes (111). Aus früheren Arbeiten zu diesem Thema geht hervor, dass die  $\sigma^S$ -Konzentration auf jeder theoretisch möglichen Ebene reguliert werden kann, wobei verschiedene Umweltsignale auch unterschiedliche Prozesse in der  $\sigma^S$ -Regulation beeinflussen (vgl. Abb. II-6). Aufgrund dieser weitreichenden Kontrollmechanismen konnte die Frage nach der entsprechenden Signalintegration für den alternativen Sigmafaktor bislang noch nicht geklärt werden. Darauf aufbauend sollte im Folgenden neben den Chemotaxis-Kinasen am Beispiel der bislang kaum untersuchten Regulation der Osmostress-Adaption in *V. cholerae* weitere stress-assoziierte Sensoren für die RpoS-Funktion identifiziert werden.

### **6.1 Charakterisierung des putativ osmosensitiven Zwei-Komponentensystems OsmRK**

Das putativ osmosensitive Zwei-Komponentensystem OsmRK setzt sich aus der Sensor-Histidinkinase „OsmK“ und dem putativen Regulator „OsmR“ zusammen. Die 56,5 kDa bzw. 28,1 kDa großen Genprodukte der Loci VCA0565 und VCA0566 wurden im Rahmen einer Transposonmutagenese als Bestandteile der hyperosmotischen Stressantwort bei *V. cholerae* entdeckt (247). Aufgrund des deutlich ausgeprägten Wachstumsdefizits der Transposonmutante P27459*osmK::TncatpirkanR* unter hypertonen Bedingungen, wurden die identifizierten ORFs entsprechend als *osmK* und *osmR* annotiert. Auf der Basis einer weiterführenden Blast-Analyse wurde zudem die Homologie von OsmRK zu Genprodukten aus anderen *Vibrio* Spezies aufgedeckt, so dass auf eine generelle Verbreitung des Zwei-Komponentensystems in der Familie der *Vibrionaceae* geschlossen wurde.

Ein Beweis dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit mittels PCR-Analysen erbracht. Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide für die ORF's VCA0565 (VCA0565-SacI-intern, VCA0565-XbaI-intern) und VCA0566 (VCA0566-SacI-intern, VCA0566-XbaI-intern) wurden PCR-Reaktionen für weitere *Vibrio* sp. mit der jeweiligen chromosomalen DNA als Template konzipiert. Eine Amplifikation der Zielgene *osmK* und *osmR* konnte für einen klassischen O1 (O395), zwei Umweltisolate (O6 und V194) sowie einen O139-Stamm (MO10) nachgewiesen werden.

Daraufhin sollten die unter hyperosmolaren Bedingungen beobachteten Wachstumsdefekte der Transposonmutante P27459*osmK::TncatpirkanR* bestätigt werden. Dazu wurden zunächst

Knockout-Mutanten für die Leseraster VCA0565 und VCA0566 im O1 El Tor Stamm P27459-S über eine definierte pGP-Insertion generiert und nachfolgend charakterisiert.

## 6.2 Wachstum unter Salzstress

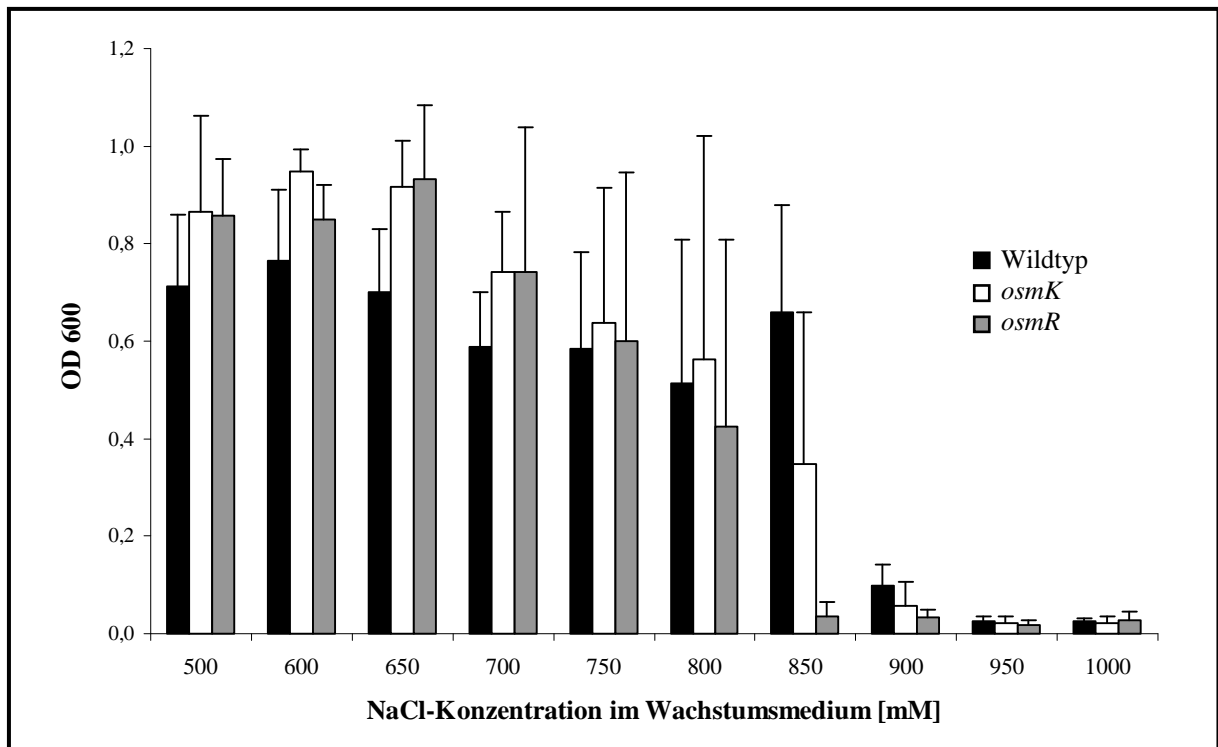
Die Insertionsmutanten für die Kinase (P27459-S *osmK*) und den Regulator (P27459 *osmR*) des putativen Zwei-Komponentensystems OsmRK wurden auf ihre Fähigkeit getestet, unter hyperosmolaren Bedingungen zu wachsen. Dazu wurde der osmotische Stress über die Zugabe von NaCl in ein definiertes Wachstumsmedium (minimales M9-Glucosemedium) erzeugt. Die Mutanten und der Wildtyp wurden mehrere Tage in den mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen angereicherten M9-Medien bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 24, 48 und 72 h wurde die OD<sub>600</sub> jeder Probe bestimmt (vgl. III 7.1 „Osmokurve“).

Das Wachstumsverhalten der Mutanten unter Salzstress zeigte im Vergleich zum Wildtyp nach 24 h folgende Eigenschaften: Alle getesteten Stämme wuchsen bis zu einer Salzkonzentration von 700 mM NaCl auf eine nahezu vergleichbare OD<sub>600</sub> von ca. 0,8-1 an. Mit 800 mM NaCl im Medium konnte sich nur der Wildtyp bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,3 eingeschränkt durchsetzen. Im Vergleich dazu zeigten sowohl die Kinase- als auch die Regulator-Mutante kein Wachstum (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der generellen Wachstumsverzögerung in Minimalmedium konnte aus diesen Ergebnissen noch nicht auf ein tatsächlich vorhandenes Wachstumsdefizit für die Mutanten geschlossen werden. Insofern überraschte es nicht, dass die Daten nach 48 h den beginnenden Ausgleich des beobachteten Wachstumsdefizits andeuteten: Es konnte zwar keine Zunahme der OD-Werte bis zu einem hyperosmolaren Stress von 700 mM NaCl im Vergleich zum Vortag nachgewiesen werden, dafür zeigten die getesteten *Vibrio*-Stämme von 750 bis 850 mM NaCl ein deutliches Wachstum. Dabei wurde die stärkste Zunahme der OD<sub>600</sub> für den Wildtyp beobachtet. Bei einem Salzstress von 850 mM NaCl im Medium traten die bereits nach 24 h bei 800 mM NaCl tendenziell beobachteten Wachstumsunterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp nun deutlich hervor. Während letzterer Stamm ein deutliches Wachstum zeigte, waren die Mutanten nur bedingt wachstumsfähig, wobei sich die Insertionsmutante für den putativen Regulator OsmR kaum durchsetzen konnte (zusammengefasst in Abb. IV-22).

Nach 72 h wurde ein Wachstum für alle getesteten Stämme bis zu hypertonen Bedingungen von 900 mM NaCl beobachtet. Die deutlichste Verbesserung des Wachstumsdefizits ließ sich dabei für 900 mM NaCl dokumentieren. Sowohl der Wildtyp als auch die Kinase-Mutante

zeigten eine Zunahme ihre OD bei 600 nm. Dennoch zeichnete sich erneut das deutlich eingeschränkte Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ab.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die erwartete Wachstumsverzögerung für die mutierten Komponenten des putativen OsmRK-Systems bestätigt werden konnte.



**Abb. IV-22: Wachstum verschiedener *V. cholerae* O1 El Tor Stämme unter hypertonen Bedingungen nach 48 h in minimalem M9-Glucosemedium.** Dargestellt sind die  $OD_{600}$ -Werte des Wildtyps (P27459-S) sowie der korrespondierenden *osmK*- und *osmR*-Mutante in Abhängigkeit verschiedener NaCl-Konzentrationen. Jeder Messpunkt wurde mindestens viermal unabhängig bestimmt.

Weitere Arbeiten zum Thema Osmoregulation sagen aus, dass sogenannte osmoprotektive Verbindungen das Wachstum von Bakterien in hyperosmolaren Medien stimulieren können. Diese zwitterionischen Solute werden entweder – sofern sie verfügbar sind – aus der Umgebung aufgenommen oder durch das Bakterium selbst synthetisiert. Als potentes Osmo-Protektan generiert *E. coli* u. a. das kompatible Solut Ectoin (125). In Kooperation mit E. Brehmer (Marburg) wurde die Synthese von Ectoin gleichermaßen in hyperton-gestressten Kulturen des Wildtypes P27459-S und der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* nachgewiesen (S. Schild). Diese Rolle von Ectoin in der Osmostress-Adaptation von *V. cholerae* ist bereits beschrieben worden (224). Demnach zeigen Mutanten, die nicht mehr zu einer Biosynthese des endogenen Osmo-Protektans befähigt waren, deutliche Wachstumsdefizite unter hyperosmolaren Bedingungen. Aus diesem Grund wurde die Mutante P27459- $\Delta$ *ectC* für die in dieser Arbeit konzipierte Testreihe als Negativkontrolle

mitgeführt. Dabei war das Wachstumsverhalten dieser Mutante dem der *osmK*-Insertionsmutante vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Die hyperosmolaren Bedingungen wurden über die Zugabe verschiedener NaCl-Konzentrationen in M9-Glucosemedium simuliert. Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass die NaCl-bedingte Stressantwort einiger Bakterien nicht unbedingt auf eine Osmoregulation zurückzuführen ist. So wurde z. B. beschrieben, dass die Transkription von *nhaA* (codiert für einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter) in *E. coli* durch Na<sup>+</sup> induziert wird (139, 231). Um demzufolge ausschließen zu können, dass das beobachtete Verhalten nicht auf eine Osmostress-Adaptation zurückgeht, wurde dem hypertonen Medium in einer weiteren Testreihe zusätzlich das kompatible Solut Betain (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt, infolgedessen der Wachstumsdefekt weitgehend aufgehoben wurde. Dieses Ergebnis wurde im Rahmen der Dissertation von S. Schild erzielt. Da somit bereits bestätigt werden konnte, dass die beobachteten Wachstumsdefekte der Mutante P27459*osmK::TncatpirkanR* unter den getesteten Bedingungen tatsächlich auf einen NaCl-bedingten, osmotischen Stress zurückzuführen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit auf diese Testreihen verzichtet.

### 6.3 Identifizierung OsmRK regulierter Gene

Die Osmostress-bedingten Wachstumsdefizite der Mutanten des putativen Zwei-Komponentensystems OsmRK deuten auf eine Funktion der Genprodukte der Loci VCA0565 und VCA0566 in der Osmostress-Adaptation von *V. cholerae* hin. Um diese näher beschreiben zu können, sollten die durch das OsmRK-System kontrollierten Gene in Microarray-Analysen identifiziert werden. Dazu wurde zunächst die RNA der entsprechenden Mutanten, P27459*osmK* und P27459*osmR*, sowie des Wildtyps aus Zellen isoliert, die in M9-Glucosemedium bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 1 kultiviert worden waren. Diese RNA wurde in den Microarray-Experimenten der RNA aus osmotisch gestressten Zellen gegenübergestellt. Hyperosmolare Bedingungen wurden dadurch simuliert, dass die Zellen nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> ~ 1) für 90 min in M9-Medium mit 800 mM NaCl inkubiert wurden. Jede der Gegenüberstellungen wurde mindestens dreimal mit unabhängig isolierter RNA durchgeführt. Die benötigten Microarray-Slides des gesamten *V. cholerae* Genoms wurden von der Arbeitsgruppe um J. J. Mekalanos sowohl mit PCR-Fragmenten als auch mit Oligonukleotiden zur Verfügung gestellt. Entsprechende Vorversuche ergaben eine qualitativ bessere Auswertbarkeit für die Slides mit den PCR-Produkten, weshalb die Hybridisierungsversuche auf diese Slides beschränkt wurden.

Die vollständige Auswertung aller durchgeführten Microarray-Experimente befindet sich auf der beigefügten CD im Anhang. Im Folgenden werden daher nur einige wenige Details vorgestellt, die im Zusammenhang mit der Fragestellung nach der putativen Osmostress-Adaptation in *V. cholerae* von Interesse sind.

Um zunächst einen generellen Überblick über die Regulationsvorgänge in hyperton geschockten *V. cholerae* Zellen zu gewinnen, wurde das Transkriptom des Wildtyps mit dem des osmo-gestressten Wildtyps verglichen. Dabei wurden mit einer Ausschlussgrenze von mindestens 2x dereguliert insgesamt 237 Gene mit verändertem Transkriptionsgrad angezeigt. Eine Einteilung der deregulierten Gene nach ihrer funktionellen Zugehörigkeit findet sich in Tabelle IV-2.

**Tab. IV-2. Anzahl der deregulierten Gene für das Microarray-Experiment Wildtyp versus Wildtyp osmo-gestresst.** Aufgeführt sind mindestens 2x deregulierte Gene. Die Auswertung wurde mit ImaGene 5.0 und GeneSight 5.3 durchgeführt.

Funktionale Gruppe	Anzahl deregulierter Gene	
	Vermeehrt exprimiert	Vermindert exprimiert
Osmostress-assoziierte Gene	4	1
Generelle Stress-Systeme	10	1
Transkriptionsregulator	9	8
Transportsysteme	6	3
Metabolismus	37	15
Virulenzgene	11	0
Hypothetische Proteine (Nicht annotiert)	90	9
Konservierte hypothetische Proteine	27	6
<b>Σ</b>	<b>194</b>	<b>43</b>

Die in diesem Experiment am stärksten deregulierten Gene waren Systeme, welche bereits als Osmostress-assoziiert beschrieben sind. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Gene für die Ectoin-Biosynthese (VCA0822-824) hervorzuheben. Ein Transporter der BccT-Familie (VC1279) sowie die Komponenten des Chitobiose-spezifischen PTS-Systems (VC1281-1283) wurden ebenfalls verstärkt aktiviert. In Bezug auf die Virulenz wurde die Synthese für den Toxin-coregulierten Pilus (TCP) als vermehrt exprimiert angezeigt.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden daraufhin Microarray-Experimente konzipiert, um die durch das putative Zwei-Komponentensystem OsmRK kontrollierten Gene zu identifizieren. Dazu wurde das Transkriptom des Wildtyps mit der RNA aus Zellen der *osmK*-Mutante und der *osmR*-Mutante verglichen. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, die sich nur auf

Osmostress-bedingte Reaktionen zurückführen lassen, wurden alle Stämme vor der RNA-Isolierung hypertonen Bedingungen ausgesetzt.

Mit einer Ausschlussgrenze von mindestens 2x dereguliert ergab die Auswertung dieser Microarrays 297 Gene, die sowohl durch die Kinase als auch durch den Regulator des putativen Zwei-Komponentensystems unter Osmostress kontrolliert wurden. Dabei wurden 105 Gene durch das OsmRK-System aktiviert und 192 Gene reprimiert. Zu den transkriptionell aktivierten Genen zählten u. a. Systeme, die bekanntermaßen eine Funktion in der Osmostress-Adaptation einnehmen, z. B. der Spermidin/Putrescin ABC Transporter (VCA113) und ein Natrium/Carboxylat Symporter (VC1235). Unter den reprimierten Genen befand sich u. a. *ectC* (VCA0823), dessen Genprodukt in der Ectoinsynthese involviert ist.

Besonders interessant erschien die in diesen Microarray-Experimenten unterschiedlich ausgeprägte Expression des Genproduktes OmpU (VC0633): Unter hypertonen Bedingungen wurde die Transkription des Gens *ompU* im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der Mutante P27459*osmK* als auch in der *osmR*-Mutante mehrfach runterreguliert. Diese aktuellen Daten deuten auf die aktivierende Funktion des Zwei-Komponentensystems OsmRK für *ompU* hin. Dieser Zusammenhang überraschte, da die Expressionskontrolle des Außenmembranporins OmpU bisher ausschließlich dem membranständigen Regulator ToxR zugeordnet wurde, welchem u. a. auch die Kontrolle der *ctx*- sowie der *tcp*-Synthesegene unterliegt (192, 193). In diesem Zusammenhang wurde der Verlust der aktivierenden (OmpU) bzw. reprimierenden (OmpT) Wirkung von ToxR mit zunehmender NaCl-Konzentration bereits beobachtet, aber nicht näher untersucht (193).

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden weiterführende Microarray-Experimente durchgeführt, welche die Funktion von ToxR als transkriptionalen Regulator unter hypertonen Bedingungen fokussierten. Dazu wurde das Transkriptom osmogestresster Wildtypzellen mit dem Transkriptom aus Zellen einer ebenfalls NaCl-gestressten *toxR*-Mutante verglichen. Mit einer Ausschlussgrenze von mindestens 2x dereguliert ergab diese Gegenüberstellung mindestens 263 Gene, die durch ToxR unter hypertonen Bedingungen reprimiert sowie 63 Gene, die aktiviert wurden. Zu den auffällig deregulierten Genen zählte u. a. *ompU* (VC0633), dessen Transkription als um ein Vielfaches reduziert angezeigt wurde. Unter Berücksichtigung der bekanntermaßen aktivierenden Funktion von ToxR für *ompU*, war dieses Ergebnis in einer *toxR*-Deletionsmutante zu erwarten und konnte somit als interne Kontrolle für den Erfolg der Arrays verwendet werden. Als weitere Gene mit einer verminderten Transkriptionsrate wurden diverse Proteine mit regulativen Aufgaben - z. B. VCA0056, ein transkriptionaler Regulator



der MerR-Familie oder VC0076, das universelle Stressprotein A - angezeigt. Die Auswertung der hochregulierten, also sonst durch ToxR reprimierten Gene, ergab eine auffällige Deregulierung für die Ectoinsynthese-Gene (VCA0822-824), welche allerdings nicht durch eine de facto verminderte Ecotoinsynthese bestätigt werden konnte (pers. Mitteilung E. Bremer).

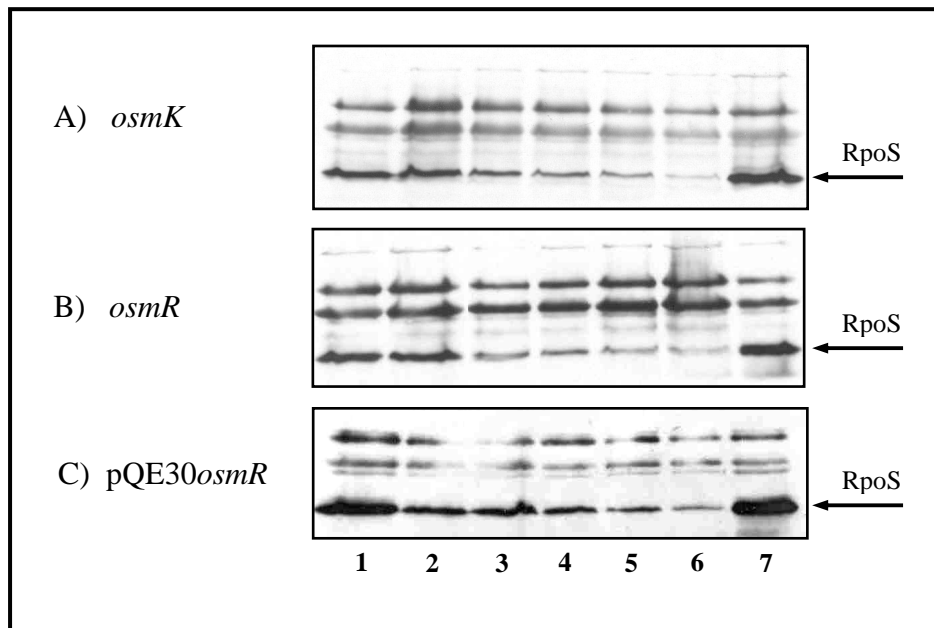
Die Konsequenz für die Kontrolle von *ompU* ergibt sich danach aus der Gegenüberstellung der Transkriptomprofile der *toxR*-Mutante mit den Transkriptomprofilen der Mutanten für das putative Zwei-Komponentensystem unter Osmostress. Dieser Vergleich wurde theoretisch mit den Daten der Microarrays „Wildtyp osmogestresst versus *osmK/ osmR*-Mutante osmogestresst“ und „Wildtyp osmogestresst versus *toxR*-Mutante osmogestresst“ durchgeführt. Dabei wurden mindestens 53 gemeinsam deregulierte Gene identifiziert, von denen 3 Gene aktiviert und 50 Gene reprimiert werden. Unter den Genen, die sowohl über ToxR als auch durch das OsmRK-System aktiviert wurden, befand sich neben *speG* (Spermidin-Acetyltransferase) auch *ompU*. Zu den gemeinsam reprimierten Genen zählten u. a. die Enzyme der Ectoinbiosynthese.

Auf der anderen Seite konnte die Frage nach den molekularen Mechanismen der Osmostress-Adaptation in Abhängigkeit des OsmRK-Systems über den vorliegenden experimentellen Ansatz nicht beantwortet werden. Dennoch spricht die beobachtete Osmosensitivität der einzelnen Komponenten für die Beteiligung des Zwei-Komponentensystems an den Regulationsvorgängen.

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass zelluläre Reaktionen auf veränderte Milieubedingungen auf die Induktion RpoS-abhängiger Gene zurückgeführt werden können (108, 113, 160, 197, 198). Demnach können Faktoren der spezifischen Stressantwort ebenso durch den Masterregulator der generellen Stress-Reaktion aktiviert werden. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise in *E. coli* beobachtet, dass eine Gruppe osmostress-regulierter Gene durch den alternativen Sigmafaktor unter Stationärphase-Bedingungen gleichermaßen induziert wurde (113). Obwohl über die Rolle des alternativen Sigmafaktors in der spezifischen Stressantwort bisher nur spekuliert wurde, belegen die Daten der vorliegenden Arbeit den reduzierten Abbau des RpoS-Proteins in individuellen Stress-Situationen (vgl. IV-3.1).

Des Weiteren erschwert die bisher ungeklärte Frage nach der Signaltransduktion für die weitreichenden Kontrollmechanismen des Masterregulators zusätzlich die Lösung des Problems. Aus diesem Grund wurde getestet, ob das OsmRK-System als postulierter Sensor der *V. cholerae* Osmostress-Adaptation an der Regulation der intrazellulären RpoS-Konzentration beteiligt ist. Um die mögliche molekulare Verbindung zwischen spezifischer

und genereller Stressantwort nachweisen zu können, wurde die Degradation des  $\sigma^S$ -Faktors in der *osmK*- bzw. *osmR*-Mutante adressiert. Die Auswertung der entsprechenden Proteolyse-Assays (vgl. III-7.4) ergab jedoch, dass der Abbau des RpoS-Proteins durch die Mutationen nicht beeinflusst wurde (Abb. IV-23A, B). Dabei war der beobachtete Proteolyse-Grad dem zeitlichen Ablauf der Degradation, wie er für den Wildtyp dokumentiert wurde (vgl. Abb. IV-6), vergleichbar. Die gezielte Überexpression des Regulators OsmR wirkte sich ebenso wenig auf die intrazelluläre RpoS-Konzentration aus (Abb. IV-23C).



**Abb. IV-23: Einfluss des osmosensitiven Zwei-Komponentensystems OsmRK auf die intrazelluläre RpoS-Konzentration verschiedener *V. cholerae* P27459-S Stämme.** Dargestellt sind Westernblot-Analysen der Proteolyse-Assays in LB-Medium für die Mutanten der A) Kinase (P27459-S *osmK*::pGP) und des B) Regulators (P27459-S *osmR*::pGP). C) In der Mutante pQE30*osmR* wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG zu exponentiell wachsenden Zellen die Überexpression des OsmR-Regulators induziert und anschließend die RpoS-Proteolyse verfolgt. 1) vor der Induktion; 2) 1 min nach Cm-Zugabe; 3) 5 min nach Cm-Zugabe; 4) 15 min nach Cm-Zugabe; 5) 30 min nach Cm-Zugabe; 6) 60 min nach Cm-Zugabe; 7) Kontrolle  $t_{60 \text{ min}}$ .

Diesen Daten zufolge, konnte über den gewählten experimentellen Ansatz eine Beteiligung des osmosensitiven Zwei-Komponentensystems OsmRK an der Regulation der RpoS-Konzentration nicht nachgewiesen werden.

## V DISKUSSION

### **RpoS aus *V. cholerae* kontrolliert Stationärphase-Funktionen, unterscheidet sich jedoch in seiner Bedeutung für die Stress-Resistenz von dem *E. coli* Homolog**

Aus der Literatur gehen bislang drei verschiedene Funktionen für das RpoS-Protein hervor: Neben der ursprünglichen Charakterisierung als zentraler Regulator des frühen Stationärphasen-Wachstums in *E. coli* (156) wurde der Transkriptionsaktivator inzwischen ebenso als „Masterregulator“ der generellen Stressantwort in relevanten humanpathogenen Bakterien beschrieben (109, 160, 298). Darüber hinaus gibt es erste Hinweise für die Bedeutung des alternativen Sigmafaktors als Virulenzfaktor (110, 211). In der vorliegenden Arbeit wurde die Konservierung dieser bekannten Funktionen für das *V. cholerae* Homolog untersucht, wobei die gewonnenen Daten sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede hinsichtlich der Rolle des *V. cholerae* RpoS im Vergleich zu anderen Spezies indizieren.

Beispielsweise belegen Experimente, in denen das Akkumulationsverhalten des  $\sigma^S$ -Faktors aus *V. cholerae* analysiert wurde, dass das Protein bereits in der frühen log-Phase synthetisiert wird. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des Transkriptionsaktivators in *E. coli* erst während des Übergangs in die Stationärphase nachgewiesen (156). Dennoch ergab die phänotypische Analyse der *V. cholerae* *rpoS*-Deletionsmutante die Beteiligung des Genproduktes an Funktionen, die für *E. coli* als Stationärphasen-spezifisch angegeben werden. So entwickelten *E. coli*-Zellen mit einer Transposonmutation im *rpoS*-Gen weder die für den Übertritt in die Stationärphase charakteristische Thermotoleranz noch die typische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz ausgehungerner Zellen (156). Zudem ließ sich in der Transposonmutante weder die Produktion von Glycogen noch die Induktion der Stationärphasen-spezifischen sauren Phosphatase AppA nachweisen (156). In Übereinstimmung dazu zeigte die *V. cholerae* *rpoS*-Deletionsmutante gleichermaßen eine eingeschränkte Glycogensynthese bzw. eine verminderte Katalase-bedingte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz. In Hinblick auf den putativen Einfluss von RpoS auf Stationärphasen-typische Prozesse bestätigten die vorliegenden Daten außerdem, dass die Sekretion der Hämagglutinin-Protease HapA ebenfalls durch RpoS kontrolliert wird (298). Da diese Metalloprotease nachweislich unter Stationärphase-Bedingungen wie Nährstoffmangel oder akkumulierten Quorum-Sensing-Signalen synthetisiert wird (191), kann dem *V. cholerae* RpoS eine seinem *E. coli* Homolog vergleichbare Bedeutung für das Stationärphasen-Wachstum zugesprochen werden. Diese These wird durch das Ergebnis einer

Proteomanalyse gestützt, welche die *rpoS*-abhängige Expression von mindestens 25 Proteinen in der Stationärphase aufdeckte (298). Auf der anderen Seite weisen neueste Daten darauf hin, dass die *rpoS*-Transkription wiederum unter HapR-Kontrolle steht (Joelsson, in press). Demnach würde das Signal Quorum-Sensing die Genexpression von *rpoS* induzieren. Auf der anderen Seite kommt dieser Korrelation von *rpoS*-Transkription und Zelldichte-Regulation der Induktion des *E. coli* RpoS in Abhängigkeit der Wachstumsphase sehr nahe.

Im Vergleich dazu, unterscheidet sich die Bedeutung des *V. cholerae* RpoS für die generelle Stressantwort von den Beobachtungen für das *E. coli* Homolog. Während in Letzterem die Akkumulation des alternativen Sigmafaktors unter pH-Stress-Bedingungen, Hyperosmolarität, C-Mangel, extremen Temperaturschwankungen und oxidativen Stress dokumentiert wurde (111), führten vergleichbare Bedingungen in *V. cholerae* nicht zur Anreicherung von RpoS. Auf der anderen Seite wurde für diese Stress-Situationen der reduzierte Abbau des alternativen Sigmafaktors nachgewiesen, so dass das Ergebnis der Akkumulationsexperimente paradox erscheint. Dieser Widerspruch lässt sich jedoch vermutlich auf die weitreichenden Kontrollmechanismen für die RpoS-Konzentration zurückführen (für Details siehe Diskussionspunkt „RIP“).

Das divergente Akkumulationsverhalten von  $\sigma^S$  deutet die eingeschränkte Bedeutung des Sigmafaktors für die generelle Stress-Reaktion in *V. cholerae* an. Dies spiegelte sich de facto in den äquivalenten Überlebens-Assays wider: Für keine der getesteten atypischen Wachstumsbedingungen konnten signifikante Unterschiede in der Überlebensfähigkeit von *rpoS*-Mutante und Wildtyp aufgedeckt werden. Dieses Ergebnis überraschte, da in der Vergangenheit die essentielle Rolle von RpoS für das Überleben von *V. cholerae* O1 El Tor in verschiedenen Stress-Situationen bereits beschrieben wurde (298). Yildiz and Schoolnik zufolge vermittelt das *rpoS*-Genprodukt die Adaptation des Bakteriums an C-Mangelbedingungen, Hyperosmolarität und oxidativen Stress, woraufhin eine *E. coli*-analoge Funktion postuliert wurde. Im Hinblick auf die Bedeutung von RpoS als Masterregulator der generellen Stressantwort fällt jedoch auf, dass sich in der Literatur kein Konsens diesbezüglich finden lässt. Während einige Arbeitsgruppen eine vergleichbare Funktion für andere *Vibrio* sp. angeben (117), werden beispielsweise die Konsequenzen des RpoS-Verlustes in *Pseudomonas* sp. ebenfalls als vom *E. coli*-Phänotypen abweichend dargestellt (232, 266). Selbst innerhalb der Gattung *Vibrio* gehen die Beobachtungen auseinander. So resultierte die *rpoS*-Inaktivierung in *V. harveyi* zwar in der verminderten Resistenz gegenüber Membranstress oder C-Mangel, das Überleben unter hyperosmolaren Bedingungen oder oxidativem Stress wurde jedoch nicht beeinträchtigt (165). Diese Unstimmigkeiten in Bezug

auf den *rpoS*-Phänotypen zeigten sich auch in der vorliegenden Arbeit: Die Analyse der Motilitätseigenschaften für die *rpoS*-Mutanten verschiedener *V. cholerae* Stämme ergab sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten im Vergleich zum Schwarmverhalten des jeweiligen Wildtyps (vgl. Abb. IV-18).

In Anbetracht dieser unterschiedlichen Ergebnisse, kann dem alternativen Sigmafaktor  $\sigma^S$  außerhalb von *E. coli* nicht ohne Einschränkungen die Rolle des Stress-Masterregulators zugeordnet werden. Vielmehr indizieren die Differenzen neben RpoS zusätzliche Regulatoren für die Stress-Kontrolle, die spezifischer arbeiten und direkt durch den Stimulus - also *rpoS*-unabhängig - aktiviert werden können. Alternativ könnte über die Existenz von Hilfssystemen spekuliert werden, die induziert sind, sobald *rpoS* ausfällt.

Andererseits deutet die unerwartete Fähigkeit der *rpoS*-Deletionsmutante, in verschiedenen Stress-Situationen zu überleben, auf einen selektiven Vorteil des Bakteriums. Diese These stützt sich auf die Beobachtung eines als GASP („growth advantage in stationary-phase“) bezeichneten Phänotypen in *E. coli*, wonach attenuierte *rpoS*-Mutationen die Überlebenschancen unter Stationärphase-bedingtem Nährstoffmangel verbesserten (215). Interessanterweise treten solche spontanen *rpoS*-Mutationen sowohl in natürlichen als auch in Labor-Populationen von *E. coli* recht häufig auf (287) und wurden darüber hinaus auch schon für *Salmonella enterica* (132) beobachtet. Zudem konnte dieses Phänomen bereits mit *V. cholerae* in Verbindung gebracht werden. Danach konnte die *in trans* *rpoS*-Komplementante eines *V. cholerae* O1 El Tor Stammes Nährstoffe effizienter erwerben als der Wildtyp (184). Dies überraschte insofern, da andere Studien für das Einbringen von *rpoS* auf Plasmiden vermindert komplementierte Phänotypen belegten (101, 298). Allerdings erklärt sich über das Ereignis GASP der von *E. coli* abweichende *V. cholerae* *rpoS*-Phänotyp nur teilweise. So deckten weiterführende Experimente auf, dass der durch den Nährstoffmangel bedingte RpoS-Verlust zwar einen Selektionsvorteil unter Stationärphase-Bedingungen bedeutete, die betroffenen Stämme jedoch anderen Umweltveränderungen gegenüber anfälliger wurden (77, 184).

Zusätzlich zu dem GASP-Phänomen könnte der negative Phänotyp der *V. cholerae* *rpoS*-Mutante in den Überlebens-Assays durch die Konkurrenz des  $\sigma^S$ -Faktors um das RNA-Polymerase Core-Enzym mit dem  $\sigma^{70}$ -Faktor bedingt sein. In diesem Zusammenhang wurden in *E. coli* Gene beschrieben, deren Zugehörigkeit zum  $\sigma^S$ -Netzwerk von definierten Umweltbedingungen abhängt. Beispielsweise wurde die „*gad*“-Gruppe als  $\sigma^S$ -kontrollierte Gene identifiziert, welche die Resistenz gegenüber saurem pH vermitteln und unter Stationärphase-Bedingungen  $\sigma^S$ -abhängig induziert werden. Dahingegen zeigten die gleichen

Gene unter pH-Stress keine RpoS-Abhängigkeit mehr (291). In dieser Situation wurde die Kontrolle der „gad“-Gengruppe durch  $\sigma^{70}$  diskutiert, da kein anderer Sigmafaktor unter diesen Bedingungen aktiv ist. Die Konkurrenz beider Sigmafaktoren basiert auf der hohen Ähnlichkeit der jeweils erkannten Promotorstrukturen, was wiederum den Wechsel zwischen der  $\sigma^S$ - und der  $\sigma^{70}$ -Abhängigkeit erlauben würde.

An diesem Beispiel der pH-Stress-Kontrolle wird die Komplexität des Regulationsnetzwerkes für die Stressantwort in *E. coli* deutlich. Dementsprechend sollte nicht ausgeschlossen werden, dass in *V. cholerae* die getesteten Stress-Reaktionssysteme ähnlich komplex aufgebaut sind und mit den hier verwendeten Methoden nicht erfasst werden konnten. Darüber ließe sich auch der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Widerspruch erklären, dass trotz der determinierten reduzierten Katalase-Aktivität die *rpoS*-Deletionsmutante gegen oxidativen Stress bis zu 88 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dem Wildtyp vergleichbar resistent war (Daten nicht gezeigt). Die gleiche Unstimmigkeit wurde bereits für *P. aeruginosa* beschrieben (266), wobei die Abweichung vom *E. coli*-Phänotypen auf den differenten Metabolismus in *Pseudomonas* sp. zurückgeführt wurde und somit die RpoS-vermittelte Stress-Resistenz möglicherweise durch analoge Gene vermittelt wird.

In der Zusammenfassung ergibt sich für die phänotypische Charakterisierung der *V. cholerae* *rpoS*-Deletionsmutante folgendes Fazit: Obwohl in der vorliegenden Arbeit die *E. coli* RpoS-Funktion als übergeordneter Stressregulator in *V. cholerae* nicht bestätigt werden konnte, deuten die Daten auf eine vergleichbare Bedeutung in der Stationärphase. Wie ähnlich sich die *rpoS*-Gene aus *V. cholerae* bzw. *E. coli* tatsächlich sind, konnte de facto in Komplementationsstudien gezeigt werden. Interessanterweise waren sowohl das *V. cholerae* als auch das *E. coli* *rpoS*-Genprodukt dazu in der Lage, die Knockout-Mutation des jeweils anderen Organismus' funktionell zu komplementieren. Die Befähigung,  $\sigma^S$ -abhängige Promotoren auch außerhalb der eigenen Spezies zu induzieren, spricht für die Konservierung der RpoS-Output-Funktion in beiden Bakterien, lediglich die Zielgene selbst sind unterschiedlich.

### **Die post-translationale Kontrolle des RpoS-Proteins wird über den Mechanismus einer „regulated intracellular proteolysis“ (RIP) vermittelt**

In *E. coli* wird als entscheidender Parameter für die bekannten RpoS-assoziierten Funktionen die intrazelluläre Konzentration des Transkriptionsaktivators angegeben (111). Trotz der intensiven Untersuchungen über die Funktion und Bedeutung des RpoS-Proteins in *V.*

*cholerae* ist bislang über dessen Regulation kaum etwas bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sie vornehmlich den bekannten Kontrollmechanismen in *E. coli* entspricht. Tatsächlich konnten im Laufe dieser Arbeit mehrere Übereinstimmungen aufgedeckt werden. So kann den vorliegenden Daten u. a. entnommen werden, dass die intrazelluläre Konzentration des *V. cholerae* Proteins gleichermaßen durch Degradation beeinflusst wird. Die weiterführende Charakterisierung der RpoS-Proteolyse ergab außerdem, dass der Abbau unter atypischen Wachstumsbedingungen um ein Vielfaches reduziert ist, so wie es auch für das *E. coli* RpoS beschrieben wird (111). Damit sprechen diese Ergebnisse zumindest für die analoge Bedeutung der RpoS-Proteolyse in der generellen Stressantwort beider Spezies.

Darüber hinaus konnten für die Stellung beider  $\sigma^S$ -Faktoren in der jeweiligen Stress-Reaktion keine Gemeinsamkeiten definiert werden. Beispielsweise konnte in weiterführenden Experimenten divergent zu den Beobachtungen für das *E. coli*-Genprodukt die Akkumulation des *V. cholerae* Proteins in diversen Stress-Situationen nicht ermittelt werden, was in Anbetracht der zuvor beobachteten Reduktion des Abbaus unter den gleichen Bedingungen zunächst überraschte. Diese widersprüchlichen Beobachtungen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die intrazelluläre Konzentration des  $\sigma^S$ -Faktors in *E. coli* auf jeder theoretisch möglichen Stufe der Proteinexpression beeinflusst werden kann. In diesem Zusammenhang ist außerdem bekannt, dass in Abhängigkeit des Umweltsignals unterschiedliche Kontrollmechanismen aktiviert werden, obwohl letztendlich allen Prozessen das gleiche Ziel zugrunde liegt, nämlich die RpoS-Konzentration zu erhöhen (110). Diesbezüglich ist zudem belegt, dass ein einzelnes Signal mehrere Prozesse kontrolliert; z. B. induziert Hyperosmolarität nicht nur die *rpoS*-Translation, sondern inhibiert auch die RpoS-Proteolyse (199). Desgleichen kann die Individualität eines Signals für eine der möglichen Kontrollmechanismen nicht ausgeschlossen werden. So könnte in *V. cholerae* der Stimulus, welcher den RpoS-Abbau inhibiert, nur auf dieser Ebene der Proteinexpression wirken, während die Transkription des Gens durch andere Faktoren beeinflusst wird. Auf der anderen Seite gibt es Indizien dafür, dass der Level und die Aktivität des Sigmafaktors nicht zwangsläufig korrelieren (81). Demnach kann eine Regulation der  $\sigma^S$ -Aktivität – insbesondere in Bezug auf die Assoziation des Sigmafaktors mit der RNA-Polymerase – nicht ausgeschlossen werden (111). Obwohl der endgültige Beweis dieser Hypothese bislang noch nicht erbracht wurde, besteht die Möglichkeit einer regulierten RpoS-Aktivität auch für *V. cholerae*, was wiederum die fehlende Akkumulation unter Stress erklären würde. Der Energieaufwand einer Neusynthese könnte über die Erhöhung der Aktivität der bereits vorhandenen  $\sigma^S$ -Faktoren reduziert werden. Dieser Theorie sind jedoch die Ergebnisse der

Überlebens-Assays entgegensetzen, wonach das *rpoS*-Genprodukt aus *V. cholerae* nicht in dem Maße an der bakteriellen Resistenz gegenüber diversen Stress-Situationen beteiligt ist, wie es im Vergleich dazu für *E. coli* dargestellt wird.

Dessen ungeachtet besteht die Gemeinsamkeit, dass der Abbau des  $\sigma^S$ -Faktors in beiden Spezies unter Stress reguliert wird. Dass RpoS in *V. cholerae* zudem das Substrat einer zu *E. coli* analogen, regulierten Proteolyse – der sogenannten RIP – ist, geht ebenfalls aus den Westernblot-Analysen der Akkumulationsexperimente hervor. Diese Daten belegen ein deutlich erhöhtes RpoS-Level in der *rssB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Weiterführende Experimente, welche die RpoS-Stabilität in Abhängigkeit verschiedener Faktoren adressierten, bestätigten die Notwendigkeit des RssB-Proteins für die RpoS-Proteolyse in *V. cholerae*. Die nachweisliche Beteiligung des *rssB*-Genproduktes an der Degradation überraschte nicht, da sie bereits für Allele des Erkennungsfaktors in anderen bakteriellen Spezies gleichfalls beschrieben wurde (4, 12, 227).

Als weitere am  $\sigma^S$ -Abbau in *V. cholerae* beteiligte Komponente, wurde die Protease ClpXP identifiziert. Dass der alternative Sigmafaktor das Substrat dieses ATP-hydrolysierenden Proteasekomplexes ist, war für *E. coli* bereits bekannt (249); die Zuordnung in *V. cholerae* hingegen ist neu. Das Model der RpoS-RIP in *V. cholerae* stellt sich demnach bisher wie in *E. coli* dar: Zunächst erkennt und bindet RssB das Substrat und führt es anschließend der degradierenden ClpXP-Protease zu.

Ein zusätzlicher Vergleich der Aminosäuresequenzen der beteiligten Interaktionspartner deckte ebenfalls bemerkenswerte Übereinstimmungen auf: So sind die RpoS-Proteine aus *V. cholerae* und *E. coli* nicht nur in dem Bereich identisch, in welchem der Targetingfaktor an das *E. coli* Protein bindet. Darüber hinaus weisen die dazu korrespondierenden Abschnitte in den jeweiligen RssB-Proteinen enorme Ähnlichkeiten auf. Außerdem sind die Bestandteile des ClpXP-Komplexes zu mindestens 80% sequenzidentisch.

Trotz der weitreichenden Konsense ist den Daten der vorliegenden Arbeit zu entnehmen, dass RpoS aus *V. cholerae* weder durch das speziessfremde RssB noch durch das *E. coli* ClpXP abgebaut werden kann. Auf der anderen Seite sprechen die Ergebnisse eines *in vitro*-Assays für die Affinität des *E. coli* Targetingfaktors gegenüber dem *V. cholerae* RpoS. Damit sollte die ungenügend funktionelle Komplementation der *rssB*- bzw. *clpXP*-Mutation in *V. cholerae* nicht darauf zurückgeführt werden, dass RpoS durch die homologen *E. coli* Proteine nicht erkannt wird. Vielmehr scheinen die RssB-Faktoren nicht dazu in der Lage, mit der fremden



ClpXP-Protease interagieren zu können. Diese These wird dadurch gestützt, dass sich die Targetingfaktoren in dem Bereich unterscheiden, der in *E. coli* für die Interaktion mit der ClpXP-Protease verantwortlich ist (pers. Mitteilung E. Klauck).

Daneben wurde mit den aktuellen Experimenten ein weiterer essentieller Unterschied zwischen den RssB-Proteinen beider Spezies aufgedeckt: Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu der Familie der Zwei-Komponenten Response-Regulatoren, wird die Aktivität der RssB-Faktoren durch Phosphorylierung moduliert. Als die mit RssB interagierende Kinase wurde in *E. coli* erst kürzlich ArcB identifiziert (188). Die Inaktivierung des ArcB-homologen Genproduktes FexB hatte in *V. cholerae* jedoch keine nachweislichen Auswirkungen auf die RpoS-Proteolyse. Somit muss die Beteiligung der ArcB-homologen Kinase am  $\sigma^S$ -Turnover ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis überraschte, da die gleiche Aminosäure, an welcher in *E. coli* die RssB-Aktivität moduliert wird (D58) im *V. cholerae* RssB-Targetingfaktor an der gleichen Position zu finden ist. Es liegt damit nahe, dass die Aktivität des *V. cholerae* RssB ebenfalls durch Phosphorylierung moduliert wird. Diese Aufgabe wird jedoch nicht durch das ArcB-Homolog, sondern durch andere Kinasen übernommen. Auf der anderen Seite mag dieser Unterschied in der RpoS-Proteolyse-Kaskade eine weitere Erklärung dafür sein, warum die Komplementationsversuche der RssB-Knockout-Mutation mit dem *E. coli*-Homolog in *V. cholerae* erfolglos verliefen: Wird das *E. coli* RssB im *V. cholerae* Hintergrund nicht phosphoryliert, kann es seine Aufgabe als Targetingfaktor auch nicht erfüllen.

Außerdem könnte die im Vergleich zu *E. coli* untergeordnete Bedeutung des alternativen Sigmafaktors in der *V. cholerae* Stress-Regulation auf die Kinase-Differenz zurückgeführt werden. In Anbetracht dessen, dass die *E. coli* Kinase ArcB bestimmte Signale für die Modifikation der RssB-Aktivität und damit der RpoS-Konzentration weiterleitet, wird der  $\sigma^S$ -Faktor in *V. cholerae* offenbar durch andere Signale reguliert.

Im Verlauf der Experimente für die Identifizierung der an der RpoS-Proteolyse beteiligten Faktoren fiel neben ClpXP eine weitere ATP-abhängige Protease auf: Bereits fünf Minuten nach der Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Chloramphenicol konnte in *V. cholerae* Zellen, in denen die Lon-Protease inaktiviert war, kein RpoS mehr detektiert werden. Diese deutliche Auswirkung der mutierten Protease auf die RpoS-Stabilität spricht für die Beteiligung des *lon*-Genproduktes an der post-translationalen Kontrolle des  $\sigma^S$ -Faktors. Dass die Abwesenheit von Lon den beschleunigten Abbau des RpoS-Protein zur Folge hatte, zeugt

jedoch von der indirekten Beteiligung der Protease an der Regulation der RpoS-Proteolyse, vermutlich über eines der degradierten Lon-Substrate.

Den bisherigen Kenntnissen über die regulierte RpoS-Proteolyse zufolge, kommt als Angriffspunkt für die Lon-Regulation nur der RssB-abhängige Weg in Frage. Eine Bestätigung dieser Vermutung sollte in weiterführenden Analysen mit einer *rssB-lon*-Doppelmutante erbracht werden. Aus den entsprechenden Experimenten geht hervor, dass die Degradation von RpoS in dieser Doppelmutante tatsächlich reduziert ist (vgl. Abb. IV-10E). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Lon-vermittelte  $\sigma^S$ -Regulation auf die Beteiligung des RssB-Faktors angewiesen ist.

Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang bereits eine erhöhte Expression der ClpXP-Komponenten in einer *lon*-Mutante für die Hitzeschock-Antwort bei *E. coli* belegt (pers. Mitteilung R. Hengge). Diese Erhöhung der ClpXP-Konzentration in Abhängigkeit der inaktivierten Lon-Protease würde den beschleunigten Abbau des RpoS-Proteins in der *V. cholerae lon*-Mutante erklären. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit über den gewählten experimentellen Ansatz der Nachweis dieser These nicht erbracht werden: Davon ausgehend, dass die Anreicherung der ClpXP-Protease als Folge der Lon-Inaktivierung den betroffenen Zellen einen artifiziellen Hitzeschock-Zustand vermittelt, wurde die RpoS-Degradation in tatsächlich hitzegeschockten Zellen analysiert. Allerdings konnte der *lon*-Effekt auf die Regulation des *V. cholerae* RpoS unter Hitzeschock nicht reproduziert werden. Statt dessen war den entsprechenden Experimenten zu entnehmen, dass die RpoS-Proteolyse in hitzegeschockten Zellen reduziert wurde, was wiederum auf eine erhöhte Stabilität des Proteins hindeutete (Daten nicht gezeigt).

Neben der Bedeutung der Lon-Protease für die *E. coli* Hitzeschock-Antwort, ist Lon aufgrund der degradierten Substrate an weiteren stress-assoziierten Zell-Reaktionen beteiligt. So zählt der Zellteilungs-Inhibitor SulA ebenfalls zu den bekannten Substraten der *E. coli* Lon-Protease. Entsprechend zeigten sich *lon*-Mutanten gegenüber DNA-Schäden sensitiv, nachdem sie UV-Licht ausgesetzt wurden (195). Neben der Akkumulation von SulA resultierte die Lon-Mutation in der Stabilisierung des RscA-Proteins, einem Transkriptionsaktivator für Kapselsynthesegene (177, 274), was in der Folge zu einem mucoiden Phänotypen führte. Später wurde gezeigt, dass *lon*-Mutanten bei hohen Temperaturen gegen DNA-Schäden relativ resistent sind (44). Das führte wiederum zu der Annahme, dass die Lon-Substrate durch eine weitere Protease degradiert werden können. Tatsächlich beschrieb Wu et al. die gleichen *lon*-Phänotypen für die Hitzeschock-induzierte

Protease HslVU (295). Aufgrund der verkürzten Halbwertszeit der Lon-Substrate Sula und RscA unter Hitzeschock trotz *lon*-Mutation, wurde über eine überlappende Substratspezifität von Lon und HslVU diskutiert (295). In Bezug auf den *lon*-Effekt für die RpoS-Regulation konnte diese Hypothese in *V. cholerae* jedoch nicht bestätigt werden. Hier resultierte die Inaktivierung des HslVU-Homologs nicht in dem beschleunigten Abbau, so wie es in der *lon*-Mutante beobachtet wurde. Im Gegenteil: Die Degradation des alternativen Sigmafaktors stellte sich vergleichbar zum Wildtyp dar (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt betrachtet ergibt sich gegenwärtig für die post-translationale Kontrolle des RpoS-Proteins folgendes Fazit: In Übereinstimmung zu den aktuellen Kenntnissen der *E. coli* RpoS-RIP zeigte sich, dass die intrazelluläre Konzentration des  $\sigma^S$ -Faktors unter diversen Stress-Situationen in *V. cholerae* ebenfalls kontrolliert wird. Der  $\sigma^S$ -Faktor aus *V. cholerae* ist überdies das Substrat einer zu *E. coli* ähnlichen Proteolyse-Kaskade. Dabei überschneiden sich die Systeme beider Spezies in der Funktion des Targetingfaktors RssB und der degradierenden ClpXP-Protease. Dahingegen konnte die analoge Beteiligung des Homologs der RssB-aktivierenden ArcB-Kinase an der *V. cholerae* RpoS-Proteolyse nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde die potentielle Bedeutung der Lon-Protease an der Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration aufgedeckt, einschließlich der Notwendigkeit von RssB für diesen noch unbekanntem Mechanismus. Darüber hinaus kann zu diesem Zeitpunkt über die molekularen Details der Lon-vermittelten RpoS-Regulation nur spekuliert werden.

### **Die Chemotaxis-Kinasen CheA-1 und CheA-3 sind an der RssB-abhängigen Proteolyse des *V. cholerae* RpoS beteiligt**

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge, ist der beschleunigte Abbau des  $\sigma^S$ -Faktors in der *V. cholerae lon*-Mutante von dem Targetingfaktor RssB abhängig. Demnach greift der *lon*-Effekt oberhalb der RssB-Erkennung in die RpoS-Proteolyse-Kaskade ein. Im Hinblick darauf, dass die aus der Knockout-Mutation resultierende Akkumulation eines der unbekanntem Lon-Substrate die vermehrte Induktion der RpoS-Degradation zu Folge hatte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Lon-Substrat RssB aktiviert. In *E. coli* wird diese Funktion der ArcB-Kinase zugeordnet (188). Eine vergleichbare Bedeutung konnte jedoch für das *V. cholerae* Homolog FexB nicht bestätigt werden. Andererseits geben *in vitro* Daten mit *E. coli*-Zellen erste Hinweise darauf, dass der Proteolyse-Targetingfaktor RssB gleichermaßen durch die CheA-Kinase phosphoryliert werden kann (296). Die CheA-Kinase wiederum ist ein wichtiger Bestandteil des gut charakterisierten Chemotaxis-Systems in *E.*

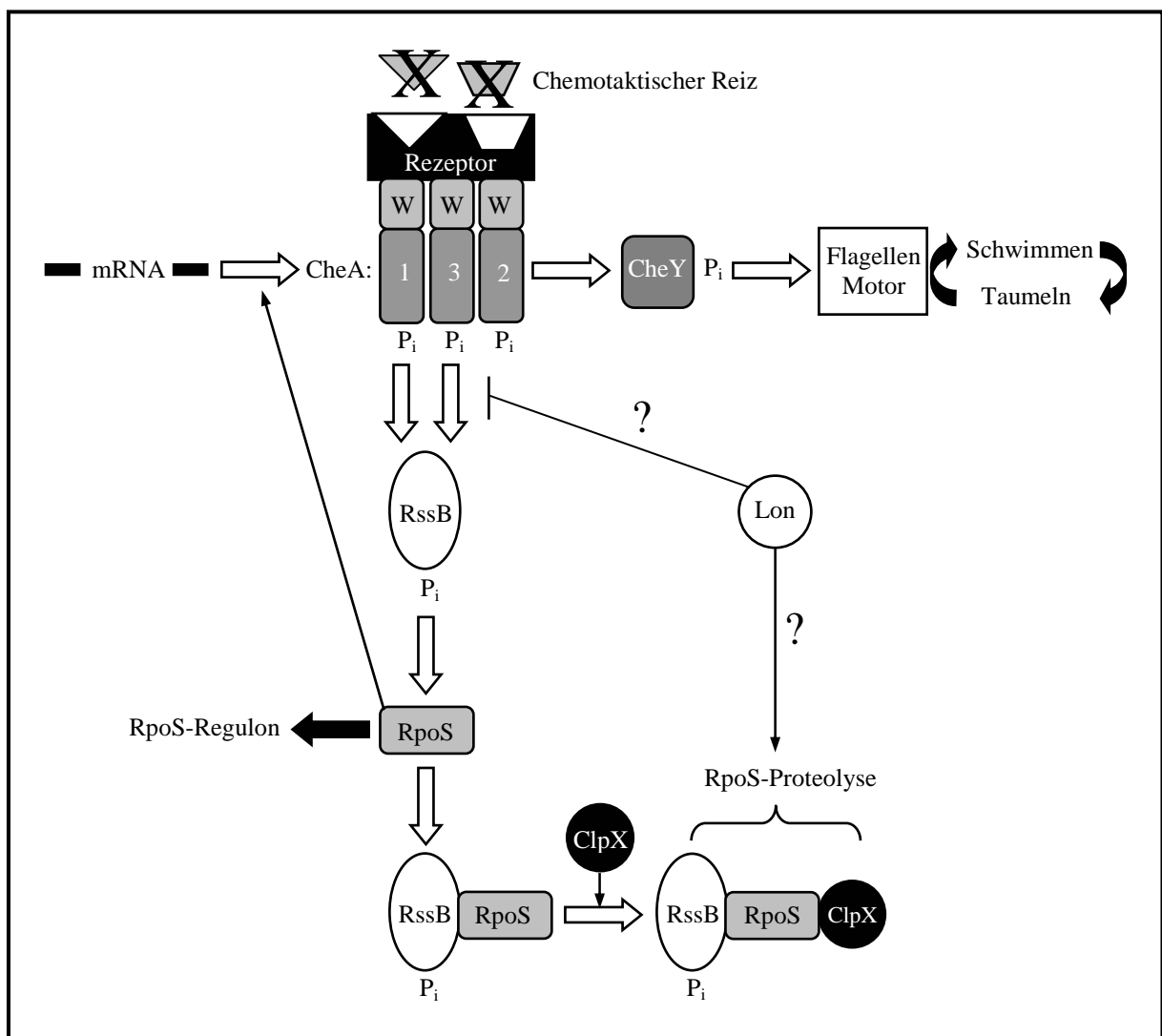
*coli* (vgl. Abb. II-4). Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit ermittelt, dass die Transkription der Chemotaxis-assoziierten Gene der Kontrolle von RpoS unterliegt. Diese bis dahin unbekannte Funktion des alternativen Sigmafaktors wurde über die erst kürzlich veröffentlichten Daten vergleichbarer Analysen bestätigt (211).

Frühere Untersuchungen identifizierten drei Homologe des *E. coli cheA*-Gens im Genom von *V. cholerae* (95). In Übereinstimmung dazu wurde die Existenz multipler Chemotaxis-Gencluster in der Vergangenheit bereits für andere Organismen, einschließlich *P. aeruginosa* (264), *Rhodobacter sphaeroides* (173) und *Myxococcus xanthus* (297) aufgedeckt. Den Daten der vorliegenden Arbeit zufolge, ist in *V. cholerae* jedoch nur das Genprodukt des *cheA*-2-Homologs an der Ausprägung der Schwarmfähigkeit beteiligt. Diese Beobachtung ist kongruent zu anderen Arbeiten, in denen vergleichbare Experimente durchgeführt wurden (95, 162).

Auf der Basis dieser bekannten Fakten wurden in der Folge Experimente konzipiert, um den in *E. coli* bislang nur spekulierten Einfluss des Chemotaxis-Systems auf die RpoS-Kontrolle (pers. Mitteilung R. Hengge) in *V. cholerae* klar zu definieren. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit der Theorie nachgegangen, wonach die CheA-Kinasen nicht nur den Response-Regulator CheY phosphorylieren, sondern auch den Targetingfaktor der RpoS-Proteolyse RssB. In Anlehnung an die Regulationskaskade des Chemotaxis-Systems in *E. coli* würde sich der postulierte Einfluss auf die RpoS-Proteolyse wie folgt darstellen: Unter nicht-chemotaktischen Wachstumsbedingungen ist die CheA-Kinase aktiv; sie phosphoryliert die Regulatoren CheY und RssB. In der Folge wird nicht nur die geradlinige Schwimmbewegung des Bakteriums in die Taumelphase überführt, sondern auch die RpoS-Proteolyse induziert. Bindet hingegen ein chemotaktischer Ligand an die CheA-Kinase, wird diese inaktiviert. Ohne die Phosphorylierung durch CheA verursacht der Mangel an phosphoryliertem CheY die Umstellung des Flagellenmotors in eine gerichtete Schwimmbewegung. Gleichzeitig würde der RssB-vermittelte Abbau des RpoS-Proteins gehemmt, so dass der alternative Sigmafaktor stabil bleibt (Abb. V-1).

Dieses postulierte Modell wird durch Westernblot-Analysen unterstützt, welche die Stabilität des alternativen Sigmafaktors in Abhängigkeit des Chemotaxis-Systems adressierten. Da es aber im Gegensatz zu *E. coli* in *V. cholerae* drei CheA-Kinasen gibt, wurden in den entsprechenden Experimenten die Knockout-Mutanten aller drei Homologe untersucht. Interessanterweise unterschieden sich die Ergebnisse für die einzelnen CheA-Kinasen: Während für den Wildtyp und die CheA-2 Kinase eine beschleunigte RpoS-Degradationsrate

nachgewiesen wurde, resultierte die Inaktivierung der CheA-1- bzw. CheA-3 Kinase in einem deutlich verzögertem Abbau des RpoS-Proteins (vgl. Abb. IV-23).



**Abb. V-1: Postuliertes Modell für die Regulation der RpoS-Proteolyse in *V. cholerae* in Abhängigkeit des Chemotaxis-Systems.** In der Abwesenheit eines chemotaktischen Gradienten wird die Kinasefunktion der drei *cheA*-Homologe über Autophosphorylierung aktiviert und somit die entsprechende CheA-Kaskade induziert. Die Details des Modells sind im Text beschrieben. W) CheW – Kopplungsprotein zwischen Rezeptor und CheA-Kinase.

In Ergänzung zu den Ergebnissen des mit diesen RpoS-Proteolyse-Assays in Abhängigkeit des *V. cholerae* Chemotaxis-Systems fiel auf, dass von den drei bekannten *E. coli cheA*-Homologen nur das *cheA-2*-Genprodukt eine nachweisliche Funktion für die Ausprägung des Schwarmverhaltens besitzt. Aus diesem Grund überraschte die Beobachtung der Proteolyse-Assays, dass CheA-2 keinen Einfluss auf die RpoS-Proteolyse hat, wohingegen die Experimente andeuteten, dass die Kinasen CheA-1 und CheA-3 die postulierte Aktivierung des RssB-Faktors katalysieren.

Die Existenz von drei *cheA*-Homologen und letztere Beobachtung führen in der Kombination zu mehreren Spekulationen über die Bedeutung: Die Ausprägung des Motilitätsphänotypen geht nur auf das mutierte *cheA-2* zurück (95). Möglicherweise handelt es sich deshalb bei *cheA-1* und *cheA-3* um *cheA-2*-„Notfallsysteme“ für Bedingungen, die bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Andererseits zeigt sich die Beteiligung des Chemotaxis-Systems an der RpoS-Proteolyse nur für die Kinasen CheA-1 und CheA-3. Das deutet darauf, dass die Phosphorylierung des RssB-Proteins durch die CheA-Homologe vermittelt wird, denen in Abhängigkeit des gewählten experimentellen Ansatzes keine Funktion in der Chemotaxis nachgewiesen werden konnte. Diese Fakten charakterisieren ein System, in welchem Kinasen mit unterschiedlichen Substraten nicht nur einem gemeinsamen Transkriptionsaktivator unterstehen, sondern auch durch den gleichen Stimulus aktiviert werden. Obwohl bisher noch keine schlüssigen Beweise für diese postulierte heterogene Substratspezifität erbracht werden konnten, ließe sich darüber die Vielzahl der *cheA*-Gene erklären. Die zukünftige Analyse einer *cheA-1-3*-Doppelmutante hinsichtlich der RpoS-Stabilität könnte diese Hypothese demzufolge festigen und somit den gültigen Beweis für eine CheA-RssB-Interaktion erbringen. Darüber hinaus müsste getestet werden, ob die überexprimierten Kinasen CheA-1 bzw. CheA-3 tatsächlich einen beschleunigten RpoS-Abbau zu Folge haben. Weiterführende *in vitro* Bindestudien für die gereinigten CheA-Kinasen und das RssB-Protein sind ebenfalls notwendig und würden zur Aufklärung dieser These beitragen.

Zusammengefasst ist zu diesem Zeitpunkt der Aussage, dass die Chemotaxis-Kinasen den RpoS-Proteolyse-Targetingfaktor RssB aktivieren, nichts entgegenzusetzen. Indessen würde die Beteiligung der MCP-Rezeptoren an der Kontrolle der intrazellulären RpoS-Konzentration, und damit an der Transkription der Chemotaxis-Gene selbst, erstmals ein Regulationssystem beschreiben, wonach innerhalb der Chemotaxis-Kaskade die Rezeptoraktivität mit der eigenen Gen-Expression gekoppelt ist.

### **RpoS kontrolliert relevante Gene der Cholera-Pathogenese**

Neben der Funktion als Masterregulator der Stationärphase und generellen Stress-Reaktion wird über die Rolle von RpoS in der Virulenz spekuliert. Die Meinungen darüber sind so divers wie die vielen pathogenen Bakterien, in denen diese studiert wurde. Beispielsweise resultierte die Mutation im *rpoS*-Locus des Enteropathogens *S. typhimurium* im Mausmodell tatsächlich in der attenuierten Virulenz (74, 292). In *Shigella flexneri* wurde des Weiteren die Notwendigkeit des *rpoS*-Genproduktes für die Ausbildung der Säureresistenz dargestellt. Da

diese das enteropathogene Bakterium bei der Ausprägung der Shigellose im extrem sauren Magen-Darmtrakt schützt (261, 288), wurde in diesem Fall ebenfalls auf die Beteiligung von RpoS an der Pathogenese geschlossen. Daneben wurde in *P. aeruginosa* aus den Effekten der *rpoS*-Mutation auf die Akkumulation von Exo-Toxinen die Bedeutung des alternativen Sigmafaktors in der Virulenz abgeleitet (266).

Die potentielle Rolle von RpoS in der *V. cholerae* Pathogenese leitet sich aus der postulierten Funktion des Proteins in der Kolonisationsphase des Bakteriums ab und wurde sogar mehrfach untersucht. Während einigen Arbeiten zufolge, die entsprechenden *rpoS*-Mutanten im infantilen Mausmodell nicht attenuiert waren (147, 298), sprechen die Daten anderer Arbeitsgruppen im gleichen Modell für die Rolle von RpoS in der Kolonisation (185). Diese beobachteten Unstimmigkeiten sind sicherlich von vielen Faktoren abhängig. Sie könnten beispielsweise auf die Verwendung verschiedener *V. cholerae* Isolate zurückgeführt werden. Tatsächlich wurden bereits Unterschiede in der Gen-Regulation und -Expression zwischen zwei verschiedenen *V. cholerae* Biotypen dokumentiert (204, 257). In diesem Zusammenhang wurde außerdem gezeigt, dass abweichende Phänotypen in verschiedenen *E. coli*-Stämmen das Resultat von *rpoS*-Mutationen oder -Polymorphismen sind (110). Variationen in der verwendeten Methode wären eine weitere Erklärungsmöglichkeit.

Interessanterweise ergibt sich aus der Literatur dennoch ein Konsensus: Sofern es getestet wurde, konnte für verschiedene Organismen – einschließlich *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. und *Yersinia enterocolitica* - der Einfluss des RpoS-Proteins auf die Motilität und/ oder die Produktion von extrazellulären Proteinen nachgewiesen werden (117, 120, 245, 266, 298). In Übereinstimmung dazu wurden in der vorliegenden Arbeit für die *rpoS*-Deletionsmutanten unterschiedlicher *V. cholerae* Wildtypen desgleichen Defekte im Schwarmverhalten und in der Produktion der Hämagglutinin-Protease HapA belegt.

Auf der Basis diverser Beobachtungen wurde in früheren Arbeiten sowohl der Motilität als auch der Metalloprotease HapA eine Bedeutung in der Cholera-Pathogenese zugesprochen: Beispielsweise wurde aufgedeckt, dass definierte nicht-motile Mutanten des O1 El Tor Biotyps im Infektionsmodell mit infantilen Mäusen stark attenuiert sind (162). Gleiches konnte für nicht-motile *V. vulnificus* dokumentiert werden (234). Aus diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass die Motilität des monopolar, monotrich begeißelten Bakteriums *V. cholerae* das Erreichen des Kolonisationsortes Dünndarm entscheidend beeinflusst und damit für die Etablierung der Cholera von essentieller Bedeutung ist.

Auf der anderen Seite degradiert HapA nachweislich mehrere physiologisch relevante Wirtsproteine wie Mukin (78) oder Tight-Junction-assoziierte Proteine intestinaler Epithelzellen (294). Beides spricht dafür, dass die Aktivität der HapA-Protease *V. cholerae* den Übertritt in die Mukusschicht des Duodenums und damit seinem eigentlichen Kolonisationsort erleichtert. Silva et al. bestätigten diese These mit *in vitro*-Daten, wonach die Expression von HapA für das Durchdringen eines Mukin-haltigen Gels essentiell ist (252). Doch ein definitiver Beweis für die Bedeutung der Hämagglutinin-Protease als tatsächlicher Virulenzfaktor konnte trotz verschiedener Tiermodelle bisher noch nicht erbracht werden (80, 103).

Dessen ungeachtet besteht der nachweislich induzierende Einfluss des *V. cholerae* RpoS auf Motilität und HapA-Produktion, was somit für die Bedeutung des alternativen Sigmafaktors in der Cholera-Pathogenese spricht. Obwohl der Beitrag der HapA-Protease diesbezüglich gut verstanden ist, wird über die Rolle der Motilität für die Virulenz unterschiedlich diskutiert. Beispielsweise wurde erst kürzlich aufgedeckt, dass die Expression wichtiger Virulenzfaktoren wie das Cholera-toxin, der toxincoregulierte Pilus oder HapA in Motilitätsmutanten *in vitro* um ein Vielfaches aktiviert ist (253). Das steht im Widerspruch zu der weit verbreiteten These, wonach die Motilität in der Kolonisationsphase des pathogenen *V. cholerae* von entscheidender Bedeutung ist (85, 237). Darüber hinaus belegen aktuelle Transkriptom-Analysen (211) und die Daten der vorliegenden Arbeit die Funktion von RpoS als Transkriptionsaktivator für Chemotaxis- und Motilitätsgene in der stationären Phase des Bakteriums.

Aufgrund dieser Beobachtungen postulierten Nielsen et al. erstmals die Notwendigkeit von RpoS für die letzte Phase der Cholera-Pathogenese (211). Demnach würde die in dieser Phase beobachtete synchrone Aktivierung von Chemotaxis, Motilität und Ablösen der bakteriellen Zellen auf den alternativen Sigmafaktor zurückgehen. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen diese Hypothese nicht nur, sie fügen ihr darüber hinaus neue Aspekte zu.

Die Bedeutung von RpoS für die Motilität wurde in dieser Arbeit beispielsweise über die entsprechenden Phänotypen inaktivierter Proteolysefaktoren ermittelt. Dabei fielen zunächst die Unstimmigkeiten in Bezug auf die Motilitätsphänotypen von *rpoS*-Mutanten verschiedener *V. cholerae* Wildtypen auf. Während das Schwarmverhalten eines klassischen O1-Isolates und eines O139-Stammes durch die *rpoS*-Mutation kaum beeinträchtigt wurde, zeigten zwei von drei getesteten O1 El Tor *rpoS*-Stämmen wiederum eine eingeschränkte



Motilität. Die differente Genexpression zwischen verschiedenen *V. cholerae* Biotypen wurde in der Vergangenheit bereits dokumentiert (204, 257) und kann demzufolge auf den Stamm-Hintergrund zurückgeführt werden.

Neben den Effekten der *rpoS*-Mutation auf die Ausprägung der Motilität wurden die Auswirkungen einer deaktivierten RpoS-Proteolyse-Kaskade diesbezüglich getestet. Interessanterweise wiesen Mutanten, in denen der Proteolyse-assoziierte Faktor RssB inaktiviert war, einen hypermotilen Phänotypen auf. Die Beeinträchtigung des RpoS-Abbaus hatte vermutlich die Akkumulation des alternativen Sigmafaktors zur Folge, wodurch wiederum die vermehrte Transkription der Motilitätsgene und damit die divergente Motilität induziert wurde.

Ein gleichermaßen hypermotiler Phänotyp wurde für die *lon*-Mutanten der O1 El Tor Wildtypen P27459-S und CO968 aufgedeckt. Aufgrund der im Proteolyse-Assay für die *lon*-Mutanten dokumentierten beschleunigten RpoS-Degradation, erscheint diese Beobachtung eigentlich widersprüchlich. Wird jedoch davon ausgegangen, dass die Lon-Substrate an der Regulation der Chemotaxis und damit an den Motilitätseigenschaften direkt involviert sind, würde die durch die Knockout-Mutation bedingte Akkumulation des Substrates in der veränderten Motilität resultieren. Den bisherigen Kenntnissen zufolge, einschließlich des ungeklärten Effektes der *lon*-Mutation auf die Regulation der RpoS-Konzentration, könnten die CheA-Kinasen potentielle Substrate der Protease darstellen.

Interessanterweise traten die Motilitätsphänotypen von *rpoS*, *rssB* und *lon* nur unter Verwendung von Schwarmplatten auf, in denen chemotaktische Bedingungen simuliert wurden. Auf korrespondierenden Schwarmplatten mit Vollmedium hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *rpoS*-Mutante detektiert. Demnach ist es möglich, dass die nachgewiesenen Effekte der Mutationen nicht durch die veränderte Expression der Motilitätsgene, sondern durch Variationen im chemotaktischen Verhalten verursacht wurden. Die Unterscheidung beider Phänotypen ist in Anbetracht der verwendeten Methode tatsächlich schwierig. Im letzteren Fall resultiert das verminderte Schwarmverhalten des Chemotaxis-Phänotypen aus der beschränkten Fähigkeit, sich neu zu orientieren und nicht aus der reduzierten Quantität der Motilitätsgene.

Insgesamt betrachtet deuten die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Erkenntnisse auf die Beteiligung der alternativen  $\sigma^S$ -Faktors an der Pathogenese des Cholera-Erregers *V. cholerae*. Dafür spricht sowohl die zweifach-unabhängig voneinander nachgewiesene Transkriptionskontrolle Chemotaxis-assoziiierter Gene (diese Arbeit, 211), als auch die

Ausprägung der Motilitätseigenschaften in Abhängigkeit von Faktoren der RpoS-Proteolyse-Kaskade. In zukünftigen Arbeiten könnte die Analyse der Virulenzeigenschaften der *cheA*-, *rssB*- und/oder *lon*-Mutante im Tiermodell die definitive Notwendigkeit dieser Faktoren im Infektionszyklus von *V. cholerae* belegen.

### **Das putative Zwei-Komponentensystem OsmRK ist ein Osmostress-Sensor und kontrolliert das Außenmembranporin OmpU**

Die Anpassung an völlig veränderte Milieubedingungen erfordert nicht nur die Wahrnehmung von Umweltsignalen, sondern auch die entsprechende Umsetzung dieser Stimuli. Als Bewohner aquatischer Ökosysteme und dem Duodenum als Kolonisationsort kommt in *V. cholerae* der Adaptation an Schwankungen der osmolaren Verhältnisse eine besondere Bedeutung zu. Während in *E. coli* die Funktion der Osmostress-Adaptation maßgeblich durch Zwei-Komponentensysteme wie EnvZ/OmpR (213) oder KdpDE (105) vermittelt wird, ist ein analoges Regulationssystem in *V. cholerae* bislang nicht beschrieben. Allerdings konnten bereits zu EnvZ/OmpR homologe Systeme identifiziert werden (247). Demnach gibt es aufgrund der Homologie zu den ORFs VCA0565, VCA0257 und dem mit der höchsten Ähnlichkeit zu EnvZ annotierten ORF VC2713 drei putative Osmostress-Sensoren im *V. cholerae* Genom. Außerdem ergibt sich die Zugehörigkeit der in VCA0565 codierten Kinase und des im selben Operon lokalisierten Regulators VCA0566 zu einem Zwei-Komponentensystem. Aufgrund der detektierten Osmosensitivität der als OsmK bzw. OsmR bezeichneten Genprodukte, wurde auf die Beteiligung an den zellulären Prozessen der Osmostress-Adaptation geschlossen (247).

In der vorliegenden Arbeit wurden für das postulierte Osmostress-Regulationssystem OsmRK definierte Insertionsmutanten generiert und ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten unter hypertonen Bedingungen getestet. Dabei konnte die erwartete Wachstumsverzögerung für die mutierten Komponenten des putativen Regulationssystems bestätigt werden. Die 2x unabhängig voneinander beobachtete Osmosensitivität des Systems lässt definitiv auf die Funktion als Osmostress-Sensor schließen.

Auf dieser Basis wurden daraufhin Transkriptom-Analysen durchgeführt, um die intrazellulären Prozesse der Osmostress-Adaptation in Abhängigkeit des phänotypisch osmosensitiven Zwei-Komponentensystems aufklären zu können. In der Folge konnten zahlreiche, spezifisch unter hypertonen Bedingungen induzierte Gene identifiziert werden. Zu den im Wildtyp am stärksten deregulierten Genen zählten Systeme, deren Beteiligung an der

Osmostress-Adaptation in *E. coli* bereits diskutiert wurde (125). Diesbezüglich ist u. a. die um ein Vielfaches aktivierte Transkription der Ectoin-Biosynthesegene hervorzuheben. Ectoin wird in *E. coli* als osmoprotektives Solut beschrieben (125) und in *V. cholerae* konnte desgleichen die verstärkte Synthese in hypertonen gestressten Zellen nachgewiesen werden (pers. Mitteilung E. Brehmer). Weiteren Transkriptom-Analysen ist jedoch zu entnehmen, dass der Osmostress-Sensor OsmRK nicht der Regulator der Ectoin-Biosynthese unter hyperosmolaren Bedingungen ist. Dafür fiel die aktivierende Funktion des Zwei-Komponentensystems für einige Transportersysteme, einschließlich dem Spermidin/Putrescine-Transporter und  $\text{Na}^+/\text{CO}_2^-$  Symporter, auf. Eine Beteiligung dieser Genprodukte an der Regulation der osmolaren Verhältnisse ist berechtigt, da sie den Export von geladenen Ionen vermitteln, die in hohen Konzentrationen den Metabolismus beeinträchtigen würden.

Besonders interessant erscheint jedoch die hier aufgedeckte Funktion des OsmRK-Systems als Transkriptionsaktivator des *ompU*-Gens. Neben OmpT ist OmpU das häufigste Porin in der Außenmembran von *V. cholerae* und gilt als wichtiger Virulenzfaktor. Dabei spielt OmpU eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber anionischen Detergenzien wie z. B. Gallensäure (228, 229), nach neueren Untersuchungen aber auch bei der Resistenz gegen einige Defensine wie P2 oder Polymyxin B (174). Eine Funktion für das Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen ist dahingegen bislang noch nicht beschrieben. Bisher wurde die Expressionskontrolle der Außenmembranporine OmpU und OmpT ausschließlich dem membranständigen Regulator ToxR zugedacht, dem u. a. auch die Kontrolle des *ctx*- sowie des *tcp*-Gens unterliegt (192, 193). In diesem Zusammenhang wurde der Verlust der aktivierenden (OmpU) bzw. reprimierenden (OmpT) Wirkung von ToxR mit zunehmender NaCl-Konzentration bereits beobachtet, aber nicht näher untersucht (193). Auf der Basis entsprechender Transkriptom-Analysen im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expressionskontrolle des Außenmembran-Porins OmpU durch ToxR bestätigt werden.

Zusammen mit der beobachteten Osmostress-vermittelten Regulation zeichnet sich in der Folge für OmpU - und 52 weitere theoretisch identifizierte Gene - potentiell ein Kontroll-Netzwerk ab, welches durch mehr als einen Regulator beeinflusst wird.

In der Konsequenz dieser Beobachtungen kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass die Osmostress-Adaptation ausschließlich einem einzigen System unterliegt. Das Beispiel OmpU verdeutlicht vielmehr, dass die Zelle über Regulatoren verfügt, die zwar die gleichen Promotorstrukturen erkennen, aber durch unterschiedliche Signale aktiviert werden. Die Funktion solcher multilateral kontrollierbaren Gene könnte somit in verschiedenen zellulären Prozessen genutzt werden. Für diese These spricht eine Beobachtung in *E. coli*, wonach eine

Gruppe osmoregulierter Gene durch den alternativen Sigmafaktor RpoS unter Stationärphase-Bedingungen gleichermaßen aktiviert wurde (113). Demzufolge wäre es möglich, dass die spezifischen Funktionen der Osmostress-Adaptation durch RpoS vermittelt werden. Demgegenüber steht der Fakt, dass für die *rpoS*-Mutante in *V. cholerae* keine signifikanten Wachstumsdefizite unter verschiedenen hypertonen Bedingungen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Frage, ob das *V. cholerae* RpoS tatsächlich in der Osmostress-Regulation des Bakteriums involviert ist, muss demnach anderweitig untersucht werden. Zukünftige Arbeiten sollten jedoch berücksichtigen, dass die Signalintegration für die diversen RpoS-kontrollierten Funktionen bislang nicht verstanden ist. Für das Beispiel der zweifach regulierten Osmostress-Gene zeichnet sich jedoch ab, dass der alternative  $\sigma^S$ -Faktor nicht der Kontrolle des Systems untersteht, welches in *E. coli* den Stimulus Osmostress weiterleitet. Zumindest wird die Transkription des *E. coli* *rpoS* durch den hyperosmolaren Schock nachweislich nicht beeinflusst (113). Der Beweis für die potentielle Beteiligung eines definierten Osmostress-Sensors an der Regulation der intrazellulären RpoS-Konzentration, konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden: Weder die Inaktivierung der Komponenten des OsmRK-Systems noch die gezielte Überexpression des Regulators OsmR wirkten sich auf das RpoS-Level aus. Diesen Fakten kann jedoch entgegengesetzt werden, dass die Regulation des alternativen Sigmafaktors auf jeder theoretisch möglichen Ebene erfolgen kann. Es liegt somit nahe, dass über den gewählten experimentellen Ansatz nicht alle Kontrollmechanismen erfasst werden konnten.

Zusammengefasst kann den vorliegenden Daten folgendes entnommen werden: Obwohl die Funktion des Zwei-Komponentensystems OsmRK als Osmostress-Sensor bestätigt wurde, konnte das Wachstumsdefizit hyperton geschockter Zellen in Abhängigkeit des osmosensitiven Sensors nicht aufgeklärt werden. Dafür konnte OsmRK neben ToxR als weiterer Regulator für das Außenmembranporin OmpU identifiziert werden, infolgedessen sich ein weitreichendes Netzwerk unter der Kontrolle mehrerer Regulatoren abzeichnet.

Eine Überschneidung der Osmostress-Regulation mit dem alternativen Sigmafaktor RpoS konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt eine Beteiligung von RpoS an den zellulären Prozessen der Osmostress-Adaptation nicht ausgeschlossen werden, zumal am Beispiel *ompU* verdeutlicht wurde, dass Promotoren durch mehr als nur einen Regulator gebunden werden können. Um die tatsächliche Bedeutung von RpoS in der Osmostress-Reaktion von *V. cholerae* zu verstehen, sind folglich weitere Experimente, z. B. in Form von Transkriptom-Analysen, erforderlich.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

1. **Albert, J. B., A. K. Siddique, M. S. Islam, A. S. G. Faruque, M. Anzarzaman, S. M. Faruque, and R. Sack.** 1993. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet* **341**: 704
2. **Aldova, E., K. Laznickova, E. Stepanovka, and J. Lietava.** 1968. Isolation of non-agglutinable vibrios from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. *J. Infect. Dis.* **118**: 25-31
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. J. Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
4. **Andersson, R. A., E. T. Palva, and M. Pirhonen.** 1999. The response regulator ExpM is essential for the virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and acts negatively on the sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ). *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12**: 575-584
5. **Andoh, A., Y. Fujiyama, H. Sakumoto, H. Uchihara, T. Kimura, S. Koyama, and T. Bamba.** 1998. Detection of complement C3 and factor B gene expression in normal colorectal mucosa, adenoms and carcinomas. *Clin. Exp. Immunol.* **111**: 477-483
6. **Attridge, S. R., A. Fazeli, P. A. Manning, J. Holmgren, and G. Jonson.** 1996. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect. Immun.* **64**: 3369-3373
7. **Baker, R. M., F. L. Singleton, and M. A. Hood.** 1983. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 930-940
8. **Bannwell, J. G., N. F. Pierce, R. C. Mitra, G. J. Brigham, G. J. Caranasos, R. J. Keimowitz, D. S. Fedson, J. Thomas, S. L. Gorbach, R. B. Sack, and A. Mondal.** 1970. Intestinal fluid and electrolyte transport in human cholera. *J. Clin. Invest.* **49**: 183-195
9. **Baselski, V. S., S. Upurch, and C. D. Parker.** 1978. Isolation and phenotypic characterization of virulence-deficient mutants of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **22**: 181-188
10. **Baselski, V. S., R. A. Medina, and C. D. Parker.** 1979. *In vivo* and *in vitro* characterization of virulence deficient mutants of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **24**: 111-116
11. **Barua, D.** 1991. History of cholera, p. 1-35. D. Barua and W. B. Greenough III (ed.) *In: Cholera*. Plenum Medical Book Company, New York
12. **Bearson, S. M. D., W. H. Benjamin Jr., W. E. Swords, and J. W. Foster.** 1996. Acid shock induction of RpoS is mediated by mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**: 2572-2579
13. **Beck, N. A., E. S. Krukonis, and V. J. DiRita.** 2004. TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP. *J. Bacteriol.* **186**: 8309-8316
14. **Becker, G., E. Klauck, and R. Hengge-Aronis.** 1999. Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with a turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6439-6444
15. **Becker, G., and R. Hengge-Aronis.** 2001. What makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma^S$ -dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of  $\sigma^S$ . *Mol. Microbiol.* **39**: 1153-1165
16. **Becker, G., E. Klauck, and R. Hengge-Aronis.** 2000. The response regulator RssB, a recognition factor for  $\sigma^S$  proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti- $\sigma^S$  factor. *Mol Microbiol.* **35**: 357-366
17. **Benenson, A. S., M. R. Islam, and W. B. Greenough III.** 1964. Rapid identification of *Vibrio cholerae* by Darkfield microscopy. *Bull World Health Organ.* **30**: 827-831
18. **Benitez, J. A., R. G. Spelbrink, A. J. Silva, T. E. Phillips, C. M. Stanley, M. Boesman-Finkelstein, and R. A. Finkelstein.** 1997. Adherence of *Vibrio cholerae* to cultured differentiated human intestinal cells: An *in vitro* colonization model. *Infect. Immun.* **65**: 539-545
19. **Bennish, M. L.** 1994. Cholera: Pathophysiology, clinical features, and treatment, p. 229-255, *In: K. I. Wachsmuth, P. A. Blake and Ø. Olsvik (ed.), Vibrio cholerae and cholera: Molecular to global perspectives*. ASM Press, Washington, D. C.
20. **Berche, P., C. Poyart, E. Abachin, H. Lelievre, J. Vandepitte, A. Dodin, and J. M. Fournier.** 1994. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **170**: 701-704
21. **Bernadini, M. L., A. Fontaine, and P. J. Sansonetti.** 1990. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **172**: 6274-6281
22. **Bibikov, S. I., L. A. Barnes, Y. Gitin, and J. S. Parkinson.** 2000. Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5830-5835

23. **Bik, E. M., A. E. Bunschoten, R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: Evidence of horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* **14**: 209-216
24. **Bik, E. M., R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: A tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1453-1461
25. **Bina, J., and J. J. Mekalanos.** 2001. *Vibrio cholerae tolC* is required for bile resistance and colonization. *Infect. Immun.* **69**: 4681-4685
26. **Bina, J., J. Zhu., M. Dziejman, S. Faruque, S. B. Calderwood, and J. J. Mekalanos.** 2003. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrio shed by cholera patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2801-2806
27. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
28. **Bishop, R. E., B. K. Leskiw, R. S. Hodges, C. M. Kay, and J. H. Weiner.** 1998. The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J. Mol. Biol.* **280**: 583-596
29. **Blair, D. F.** 1995. How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 489-522
30. **Blake, P. A.** 1983. *Vibrios* on the half-shell: What the walrus and carpenter didn't know. *Ann. Intern. Med.* **99**: 558-559
31. **Blake, P. A., R. E. Weaver, and D. G. Hollins.** 1980. Disease of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**: 341-367
32. **Boin, M. A., M. J. Austin, and C. C. Hase.** 2004. Chemotaxis in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**: 1-8
33. **Booth, B. A., M. Boesman-Finkelstein, and R. A. Finkelstein.** 1983. *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme. *Infect. Immun.* **42**: 639-644
34. **Booth, B. A., M. Boesman-Finkelstein, and R. A. Finkelstein.** 1984. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* **45**: 558-560
35. **Borukhov, S., and E. Nudler.** 2003. RNA polymerase holoenzyme: Structure, function and biological implications. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 93-100
36. **Bouché, S., E. Klauck, D. Fischer, M. Lucassen, K. Jung, and R. Hengge-Aronis.** 1998. Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: A role for actetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol. Microbiol.* **27**: 787-795
37. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
38. **Brown, A. D.** 1986. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803-840
39. **Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, and J. D. Gralla.** 2000. The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**: 4129-4136
40. **Butler, S. M., and A. Camilli.** 2004. Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 5018-5023
41. **Butler, S. M., and A. Camilli.** 2005. Going against the grain: Chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 611-620
42. **Calamita, G., W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino, and P. Agre.** 1985. Molecular cloning and characterization of a water channel in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 29063-29066
43. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**: 2796-2801
44. **Canceill, D., E. Dervyn, and O. Huisman.** 1990. Proteolysis and modulation of the activity of the cell division inhibitor SulA in *Escherichia coli lon* mutants. *J. Bacteriol.* **172**: 7297-7300
45. **Caroll, P. A., K. T. Tashima, M. B. Rogers, V. J. DiRita, and S. B. Calderwood.** 1997. Phase variation in *tcpH* modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 1099-1111
46. **Cash, R. A., S. I. Music, J. P. Libonati, M. J. Snyder, R. P. Wenzel, and R. B. Hornick.** 1974. Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum. *J. Infect. Dis.* **129**: 45-52
47. **Champion, G. A., M. N. Neely, M. A. Brennan, and V. J. DiRita.** 1997. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol. Microbiol.* **23**: 323-331
48. **Chiang, S. L., and J. J. Mekalanos.** 1998. Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. *Mol. Microbiol.* **27**: 97-805
49. **Chiang, S. L., and J. J. Mekalanos.** 1999. *Rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. *Infect. Immun.* **67**: 976-980
50. **Chiavelli, D. A., J. W. Marsh, and R. K. Taylor.** 2001. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3220-3225
51. **Chongsa-Nguan, M., W. Chaicumpa., P. Moolasart, P. Kandhasingha, T. Shimada, H. Kurazono, and Y. Takeda.** 1993. *Vibrio cholerae* O139 in Bangkok. *Lancet* **342**: 430-431

52. **Coelho, A., E. deOliveira Santos, M. C. Faria, D. P. deCarvalho, M. R. Soares, W. M. Kruger, and P. M. Bisch.** 2004. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics* **5**: 1491-1504
53. **Colwell, R. R.** 1996. Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. *Science* **274**: 2025-2031
54. **Colwell, R. R., J. Kaper, and S. W. Joseph.** 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* **198**: 394-396
55. **Colwell, R. R., and W. M. Spira.** 1992. The ecology of *Vibrio cholerae*. pp 107-127, **In**: D. Barua, and W. B. Greenough III (ed.), *Cholera*, Plenum, New York
56. **Conell, T. D., D. J. Metzger, J. Lynch, and J. P. Foster.** 1998. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the *eps*-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**: 5591-5600
57. **Control, C. o. D.** 1993. Imported cholera associated with a newly described toxigenic O139 strain. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **42**: 501-503
58. **Crawford, J. A., J. B. Kaper, and V. J. DiRita.** 1998. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of *ompU*, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **29**: 235-246
59. **Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147
60. **Dalsgaard, A., O. Serichantalergs, A. Forslund, W. Lin, J. J. Mekalanos, E. Mintz, T. Shimada, and J. G. Wells.** 2001. Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4086-4092
61. **DePaola, A.** 1981. *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: A literature review. *F. Food. Sci.* **46**: 66-70
62. **DiRita, V. J., and J. J. Mekalanos.** 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* **65**: 29-37
63. **Djordjevic, S. and A. M. Stock.** 1998. Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: Components of a dynamic signaling system. *J. Struct. Biol.* **124**: 189-200
64. **Dziejman, M., E. Balon, D. Boyd, C. M. Fraser, J. F. Heidelberg, and J. J. Mekalanos.** 2002. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: Genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1556-1561
65. **Dziejman, M., and J. J. Mekalanos.** 1994. Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol. Microbiol.* **13**: 485-494
66. **Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper.** 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive selection suicide vector. *Infect. Immun.* **59**: 4310-4317
67. **Dorman, C. J., S. Chatfield, C. F. Higgins, C. Hayward, and G. Dougan.** 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella thyphimurium*: *OmpR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect. Immun.* **57**: 2136-2140
68. **Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, and M. J. Trent.** 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* **21**: 10-14
69. **Echeverria, P. B., A. Harrison, C. Tirapat, and A. McFarland.** 1983. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 32-36
70. **Epstein, P. R.** 1993. Algae blooms in the spread and persistence of cholera. *Biosystems* **31**: 209-221
71. **Epstein, W.** 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 73-78
72. **Espinosa-Urgel, M., C. Chamizo, and A. Tormo.** 1996. A consensus structure for  $\sigma^S$ -dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **21**: 657-659
73. **Falke, J. J., R. B. Bass, S. L. Butler, S. A. Chervitz, and M. A. Danielson.** 1997. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: A molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 457-512
74. **Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, and D. G. Guiney.** 1992. The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11978-11982
75. **Faruque, S. M., M. J. Albert, and J. J. Mekalanos.** 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1116-1122
76. **Faruque, S. M., N. Chowdhury, M. Kamruzzaaman, Q. S. Ahmad, A. S. Faruque, M. A. Salam, T. Ramamurthy, G. B. Niar, A. Weintraub, and D. A. Sack.** 2003. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerging Infect. Dis.* **9**: 1116-1122
77. **Finkel, S. E., E. R. Zinser, and R. Kolter.** 2000. Long-term survival and evolution in the stationary-phase, pp. 231-238. **In**: G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress response*. ASM Press, Washington, D. C.
78. **Finkelstein, R. A., and L. F. Hanne.** 1982. Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **36**: 1199-1208

79. **Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finkelstein, and P. Holt.** 1983. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 1092-1095
80. **Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finkelstein, Y. Chang, and C. C. Häse.** 1992. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. Infect. Immun. **60**: 472-478
81. **Fischer, D., A. Teich, P. Neubauer, and R. Hengge-Aronis.** 1998. The general stress sigma factor  $\sigma^S$  of *Escherichia coli* is induced during diauxic shift from glucose to lactose. J. Bacteriol. **180**: 6203-6206
82. **Franzon, V. L., A. Barker, and P. A. Manning.** 1993. Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose-resistant hemagglutinin of *Vibrio cholerae* O1 and construction of a mutant. Infect. Immun. **61**: 3032-3037
83. **Freter, R., and P. C. O'Brien.** 1981. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria within mucus: Fitness and virulence of non-chemotactic *Vibrio cholerae* mutants in infant mouse. Infect. Immun. **34**: 222-233
84. **Freter, R., P. C. O'Brien, and M. S. Macsai.** 1979. Effect of chemotaxis on the interaction of cholera vibrios with intestinal mucosa. Am. J. Clin. Nutr. **32**: 128-132
85. **Freter, R., P. C. O'Brien, and M. S. Macsai.** 1981. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *In vivo* studies. Infect. Immun. **34**: 234-240
86. **Fullner, K. J., and J. J. Mekalanos.** 1999. Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. **67**: 1393-1404
87. **Galinski, E. A., and H. G. Trüper.** 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. FEMS Microbiol. Lett. **15**: 95-108
88. **Gardel, C., and J. J. Mekalanos.** 1996. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. Infect. Immun. **64**: 2246-2255
89. **Gardener, A. D., and K. V. Ventatraman.** 1935. The antigens of the cholera group of vibrios. J. Hyg. **25**: 262-282
90. **Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen, and M. Cashel.** 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. J. Bacteriol. **175**: 7982-7989
91. **Germer, J., G. Becker, M. Metzner, and R. Hengge-Aronis.** 2001. Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS activated  $\sigma^S$ -dependent promoter in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **41**: 705-716
92. **Goldberg, M. B., V. J. DiRita, and S. B. Calderwood.** 1991. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae* using TnphoA mutagenesis. Infect. Immun. **58**: 55-60
93. **Goldberg, M. B., S. A. Boyko, and S. B. Calderwood.** 1991. Transcriptional regulation of an iron-regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 1125-1129
94. **Görg, A., W. Postel, and S. Günther.** 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH-gradients. Electrophoresis **9**: 531-546
95. **Gosink, K. K., R. Kobayashi, I. Kawagishi, and C. C. Häse.** 2002. Analysis of the roles of the three *cheA* homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **184**: 1767-1771
96. **Gottesman, S., W. P. Clark, V. de Crecy-Lagard, and M. R. Maurizi.** 1993. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*: Sequence and *in vivo* activities. J. Biol. Chem. **273**: 12476-12481
97. **Grimaud, R., M. Kessel, B. Beuron, A. C. Steven, and M. R. Maurizi.** 1998. Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. J. Biol. Chem. **273**: 12476-12481
98. **Grimberg, J., S. Maquire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *Escherichia coli* DNA. Nucleic Acids Res. **17**: 8893
99. **Gustafsson, B., and T. Holme.** 1985. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 by motility inhibition and immunofluorescence with monoclonal antibodies. Eur. J. Clin. Microbiol. **4**: 291-294
100. **Guzman, L.-M., D. Beblin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. J. Bacteriol. **177**: 4121-4230
101. **Hales, L. M., and H. A. Shuman.** 1999. The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. J. Bacteriol. **181**: 4879-4889
102. **Hall, R. H., F. M. Khambaty, M. Kothary, and S. P. Keasler.** 1993. Non-O1 *Vibrio cholerae*. Lancet 1993 **342**: 430
103. **Häse, C. C., and R. A. Finkelstein.** 1991. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an Ha/protease-negative strain. J. Bacteriol. **173**: 3311-3317
104. **Häse, C. C., and J. J. Mekalanos.** 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 730-734
105. **Heermann, R., and K. Jung.** 2004. Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. **7**: 168-174



106. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, U. L., S. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishman, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483
107. **Hengge-Aronis, R.** 1993. Survival hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary-phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**: 165-168
108. **Hengge-Aronis, R.** 1996. Back to log phase:  $\sigma^S$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 887-893
109. **Hengge-Aronis, R.** 2000. The general stress response in *Escherichia coli*, pp. 161-178. **In:** G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress response*. ASM Press, Washington, D. C.
110. **Hengge-Aronis, R.** 2000. A role for the  $\sigma^S$  subunit RNA polymerase in the regulation of virulence genes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**: 85-93
111. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 373-395
112. **Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmel, and W. Boos.** 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **24**: 7918-7924
113. **Hengge-Aronis, R., R. Lange, N. Henneberg, and D. Fischer.** 1993. Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 259-265
114. **Herrington, D. A., R. H. Hall, G. Losonsky, J. J. Mekalanos, R. K. Taylor, and M. M. Levine.** 1988. Toxin, toxin-coregulated pili and the ToxR regulation are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* **168**: 1487-1492
115. **Higa, N., Y. Homna, J. M. Albert, and M. Iwanaga.** 1993. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal isolated from patients with cholera-like disease in Bangladesh. *Microbiol. Immunol.* **37**: 971-974
116. **Higgins, D. E., and V. J. DiRita.** 1994. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **14**: 17-29
117. **Hülsmann, A., T. M. Rosche, I.-S. Kong, H. M. Hassa, D. M. Beam, and J. D. Oliver.** 2003. RpoS-dependent stress response and exoenzyme production in *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6114-6120
118. **Huq, A., R. R. Colwell, M. A. Chowdhury, B. Xu, S. M. Moniruzzaman, M. S. Islam, M. Yunus, and M. J. Albert.** 1995. Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. *Lancet* **345**: 1249
119. **Huq, A., P. A. West, E. B. Small, M. I. Huq, and R. R. Colwell.** 1984. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of the toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 420-424
120. **Iriarte, M., I. Stainier, and G. R. Cornelis.** 1995. The *rpoS* gene of *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect. Immun.* **63**: 1840-1847
121. **Islam, M. S., B. S. Drasar, and R. B. Sack.** 1994. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: A review. *J. Diarrhoel. Dis.* **12**: 87-96
122. **Islam, M. S., M. A. Miah, M. K. Hasan, R. B. Sack, and M. J. Albert.** 1994. Detection of non-culturable *Vibrio cholerae* O1 associated with a cyanobacterium from an aquatic environment in Bangladesh. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 289-299
123. **Ito, T., T. Higuchi, M. Hirobe, K. Hiramatsu, and T. Yokota.** 1994. Identification of a novel sugar, 4-amino-4,6-dideoxy-2-o-methylmannose in the lipopolysaccharid of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Carbohydr. Res.* **256**: 113-128
124. **Iwanaga, M., K. Yamamoto, N. Higa, Y. Ichinose, N. Nakasone, and M. Tanabe.** 1986. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* **30**: 1075-1083
125. **Jebbar, M. R. Talibart, K. Gloux, T. Bernard, and C. Blanco.** 1992. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: Uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* **174**: 5027-5035
126. **Jenkins, D. E., J. E. Schultz, and A. Matin.** 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3910-3914
127. **Jishage, M., and A. Ishihama.** 1995. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular levels of  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{38}$ . *J. Bacteriol.* **177**: 6832-6835
128. **Jishage, M., A. Iwata, S. Ueda, and A. Ishihama.** 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **178**: 5447-5451

129. **Jobling, M. G., and R. K. Holmes.** 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Mol. Microbiol.* **26**: 1023-1034
130. **Joelsson, A., B. Kan, and J. Zhu.** 2007. Quorum sensing enhances stress-response in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.02804-06
131. **Johnson, J. A., C. A. Salles, P. Panigrahi, M. J. Albert, A. Wright, R. J. Johnson, and J. G. J. Morris.** 1994. *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae* O1 El Tor but has important differences. *Infect. Immun.* **62**: 2108-2110
132. **Jorgenson, F., S. Leach, S. J. Wilde, A. Davies, G. Stewart, and T. Humphrey.** 2000. Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 and serovar Enteritidis phage type 4 strain. *Microbiology* **146**: 3227-3235
133. **Joseph, S. W., R. R. Colwell, and J. B. Kaper.** 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.* **10**: 77-110
134. **Kan, B., H. Habibi, M. Schmid, W. Liang, R. Wang, D. Wang, and P. R. Jungblut.** 2004. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics.* **4**: 3061-3067
135. **Kaper, J. B., A. Fasano, and M. Truckis.** 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*, pp. 145-176, **In:** K. I. Wachsmuth, P. A. Blake and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D. C.
136. **Kaper, J. B., J. G. Morris Jr., and M. M. Levine.** 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 48-86
137. **Karolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves.** 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, non-toxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3191-3198
138. **Karaolis, D. K., J. A. Johnson, C. C. Bailey, E. C. Boedeker, J. B. Kaper, and P. R. Reeves.** 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3134-3139
139. **Karpel, R., T. Alan, G. Glaser, S. Schuldiner, and E. Padan.** 1991. Expression of a sodium proton antiporter (NhaA) in *Escherichia coli* is induced by Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> ions. *J. Biol. Chem.* **266**: 21753-21759
140. **Kaysner, C. A., and W. E. Hill.** 1994. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. **In:** K. I. Wachsmuth, P. A. Blake and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D. C.
141. **Kazmierczak, M. J., M. Wiedemann, and K. J. Boor.** 2005. Alternative sigma factors and their role in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 527-543
142. **Kazmierczak, M. J., S. C. Mithoe, K. J. Boor, and M. Wiedemann.** 2003. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185**: 5722-5734
143. **Kempf, B., and E. Bremer.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330
144. **Kim, Y. I., R. E. Burton, B. M. Burton, R. T. Sauer, and T. A. Baker.** 2000. Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell.* **5**: 639-648
145. **Kirn, T. J., M. J. Lafferty, C. M. P. Sandoe, and R. K. Taylor.** 2000. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 896-910
146. **Klauck, E., M. Lingnau, and R. Hengge-Aronis.** 2001. Role of the response regulator RssB in  $\sigma^S$  recognition and initiation of  $\sigma^S$  proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59
147. **Klose, K. E., and J. J. Mekalanos.** 1998. Distinct roles of alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol.* **28**: 501-520
148. **Knirel, Y. A., L. Paredes, P.-E. Jansson, A. Weintraub, G. Widmalm, and M. J. Albert.** 1995. Structure of the capsular polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal containing D-galactose-4,6-cyclophosphate. *Eur. J. Biochem.* **232**: 391-396
149. **Knirel, Y. A., G. Widmalm, S. N. Senchenkova, P.-E. Jansson, and A. Weintraub.** 1997. Structural studies on the short-chain lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *Eur. J. Biochem.* **247**: 402-410
150. **Koch, R.** 1884. An address on cholera and its bacillus. *Br. Med. J.* **2**: 403-407
151. **Kovach, M. E., M. D. Shaffer, and K. M. Peterson.** 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**: 2165-2174
152. **Kovacicova, G., and K. Skorupski.** 2001. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* **41**: 393-407
153. **Kovacicova, G., and K. Skorupski.** 2002. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter. *Mol. Microbiol.* **46**: 1135-1147

154. **Kovacicova, G., and K. Skorupski.** 1999. A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J. Bacteriol.* **181**: 4250-4256
155. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during their assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
156. **Lange, R., and R. Hengge-Aronis.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59
157. **Lange, R., and R. Hengge-Aronis.** 1994. The cellular concentration of the  $\sigma^S$  subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8**: 1600-1612
158. **Laroque, R. G., J. B. Harris, M. Dziejman, X. Li, and A. I. Khan.** 2005. Transcriptional profiling of *Vibrio cholerae* recovered directly from patient specimens during early and late stages of human infection. *Infect. Immun.* **73**: 4488-4493
159. **Lazar, S, and M. K. Waldor.** 1998. ToxR-independent expression of cholera toxin from the replicative form of CTX $\Phi$ . *Infect. Immun.* **66**: 394-397
160. **Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, and J. W. Foster.** 1995. The stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **17**: 155-167
161. **Lee, S. H., D. L. Hava, M. K. Waldor, and A. Camilli.** 1999. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* **99**: 625-634
162. **Lee, S. H., S. M. Butler, and A. Camilli.** 2001. Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6889-6894
163. **Levina, N., S. Töttemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, and M. A. Jones.** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS mechanosensitive channels: Identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* **19**: 1730-1737
164. **Li, C. C., J. A. Crawford, V. J. DiRita, and J. B. Kaper.** 2000. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 189-203
165. **Lin, Y. H., C. Miyamoto, and E. A. Meighen.** 2002. Cloning, sequencing, and functional studies of the *rpoS* gene from *Vibrio harveyi*. *BBRC* **293**: 456-462
166. **Lipinska, B., S. Sharma, and C. Georgopoulos.** 1998. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: A sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10053-10067
167. **Loewen, P. C., and B. L. Triggs.** 1984. Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 668-675
168. **Madigan, M. T., and M. J. Parker.** *Mikrobiologie*, 9. ed. Brock, ed. G. W. 2001, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin
169. **Mallow, E. B., A. Harris, N. Salzman, J. P. Russell, R. J. DeBerardinis, E. Ruchelli, and C. L. Bevins.** 1996. Human enteric defensins. *J. Biol. Chem.* **271**: 4038-4045
170. **Manning, P. A., U. H. Stroecher, L. E. Karageorgos, and J. K. Morona.** 1994. Molecular basis for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba switching., pp. 77-94. In: K. I. Wachsmuth, P. A. Blake and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D. C.
171. **Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase gene fusion. *Meth. Cell. Biol.* **34**: 61-75
172. **Marshall, C., V. Labrousse, M. Kreimer, D. Weichart, A. Kolb, and R. Hengge-Aronis.** 1998. Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on  $\sigma^S$  and requires activation by cAMP-CRP. *J. Mol. Biol.* **276**: 339-353
173. **Martin, A. C., G. H. Wadhams, and J. P. Armitage.** 2001. The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **40**: 1261-1272
174. **Mathur, J., and M. K. Waldor.** 2004. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers to antimicrobial resistance. *Infect. Immun.* **72**: 3577-3583
175. **Matin, A.** 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general stress resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 3-10
176. **Maurizi, M. R., W. P. Clark, Y. Katayama, S. Rudikoff, J. Pumphrey, B. Bowers, and S. Gottesman.** 1990. Sequence and structure of ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 12536-12545
177. **Maurizi, M. R., P. Trisler, and S. Gottesman.** 1985. Insertional mutagenesis of the *lon* gene in *Escherichia coli*: *Lon* is dispensable. *J. Bacteriol.* **164**: 1124-1135
178. **McCann, M. P., J. P. Kidwell, and A. Matin.** 1991. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4188-4194

179. **McKenney, D., J. Hubner, E. Muller, Y. Wanf, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of capsular polysaccharid/ adhesin. *Infect. Immun.* **66**: 4711-4720
180. **Medrano, A. I., V. J. DiRita, G. Castillo, and J. Sanchez.** 1999. Transient transcriptional activation of the *Vibrio cholerae* El Tor virulence regulator ToxT in response to culture conditions. *Infect. Immun.* **67**: 2178-2183
181. **Meibom, K. L., X. B. Li, A. T. Nielson, C. Y. Wu, S. Roseman, and G. K. Schoolnik.** 2004. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2524-2529
182. **Meighen, E. A.** 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* **55**: 123-124
183. **Mekalanos, J. J., D. J. Schwartz, G. D. Pearson, N. Harford, F. Groyne, and M. deWilde.** 1983. Cholera toxin genes: Nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature*: **306**: 551-557
184. **Merrell, D. S., S. M. Buttler, F. Qadri, A. Dolganov, A. Alam, M. B. Cohen, S. B. Calderwood, G. K. Schoolnik, and A. Camilli.** 2002. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* **417**: 642-645
185. **Merrell, D. S., A. D. Tischler, S. H. Lee, and A. Camilli.** 2000. *Vibrio cholerae* requires *rpoS* for efficient intestinal colonization. *Infect. Immun.* **68**: 6691-6696
186. **Merrick, M. J.** 1993. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigmaN). *Mol. Microbiol.* **10**: 903-909
187. **Metzner, M., J. Germer, and R. Hengge.** 2004. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex  $\sigma^S$ -dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon. *Mol. Microbiol.* **51**: 799-811
188. **Mika, F., and R. Hengge.** 2005. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA and RssB coordinates synthesis and proteolysis of  $\sigma^S$  (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev.* **19**: 2770-2780
189. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
190. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetic. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
191. **Miller, M. B., K. Skorupski, D. H. Lenz, R. K. Taylor, and B. L. Bassler.** 2002. Parallel quorum-sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**: 303-314
192. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-83
193. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1984. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3471-75
194. **Missiakas, D., and S. Raina.** 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: Role and regulation. *Mol. Microbiol.* **28**: 1059-1066
195. **Mizusawa, S., and S. Gottesman.** 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: The *lon* gene controls the stability of the Sula protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 358-362
196. **Morris, J. G.** 1990. Non-O1-group *Vibrio cholerae*: A look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol. Rev.* **12**: 179-191
197. **Muffler, A., M. Barth, C. Marshall, and R. Hengge-Aronis.** 1997. Heat shock regulation of  $\sigma^S$  turnover: A role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma^S$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 445-452
198. **Muffler, A., D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz, and R. Hengge-Aronis.** 1996. The response regulator RssB controls stability of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 1333-1339
199. **Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange, and R. Hengge-Aronis.** 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1607-1613
200. **Mukhopadhyay, A. K., S. Chakraborty, Y. Takeda, G. B. Nair, and D. E. Berg.** 2001. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **183**: 4737-4746
201. **Mullis, K. B., and F. Fallona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-340
202. **Mulvey, M. R., and P. C. Loewen.** 1989. Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggest KatF protein is a novel transcription factor. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 9979-9991
203. **Murley, Y. M., J. Behari, R. Griffin, and S. B. Calderwood.** 2000. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* **183**: 3010-3014
204. **Murley, Y. M., P. A. Caroll, K. Skorupski, R. K. Taylor, and S. B. Calderwood.** 1999. Differential transcription of the *tcpPH* operon confers biotype-specific control of the *Vibrio cholerae* ToxR virulence regulon. *Infect. Immun.* **67**: 5117-5123

205. Nagamune, K., K. Yamamoto, A. Naka, J. Matsuyama, T. Miwatani, and T. Honda. 1996. *In vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor El Tor cytolysin/hemolysin (ProHlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae* trypsin, and other proteases. *Infect. Immun.* **64**: 4655-4658
206. Nalin, D. R. 1976. Cholera, copepods, and chitinase. *Lancet* **792**: 958
207. Nelson, E. T., J. D. Clements, and R. A. Finkelstein. 1976. *Vibrio cholerae* adherence and colonization in experimental cholera: Electron microscopic studies. *Infect. Immun.* **14**: 527-547
208. Nesper, J. 2000. Charakterisierung von spontan phagenresistenten *V. cholerae* O1 El Tor Mutanten: LPS-Struktur, Gal-Stoffwechsel, Virulenzeigenschaften und Biofilmbildung. Dissertation Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
209. Nesper, J., C. M. Lauriano, K. E. Klose, D. Kapfhammer, A. Kraiss, and J. Reidl. 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**: 435-445
210. Neuhoff, V., R. Stamm, and H. Eibl. 1985. Clear background and highly sensitivity protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448
211. Nielsen, A. T., N. A. Dolganov, G. Otto, M. C. Miller, C. Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 2006. RpoS controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. *PLoS Pathog.* **2**: [Epub ahead of print]
212. Nobechi, K. 1923. Immunological studies upon types of *Vibrio cholerae*. *Sci. Rep. Inst. Infect. Dis. Tokyo Univ.* **2**: 43
213. Norioka, S., G. Ramakrishnan, K. Ikenaka, and M. Inouye. 1986. Interaction of a transcriptional activator, OmpR, with reciprocally osmoregulated genes, *ompF* and *ompC*, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **36**: 17113-17119
214. Notley, L., and T. Ferenci. 1996. Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: What level of nutrient limitation induces the stationary-phase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1465-1468
215. Notley-McRobb, L., T. King, and T. Ferenci. 2002. *RpoS* mutations and loss of general stress resistance in *E. coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J. Bacteriol.* **184**: 806-811
216. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021
217. Ogg, J. E., M. E. Shrestha, and L. Poudayl. 1978. Phage-induced changes in *Vibrio cholerae*: Serotype and biotype conversions. *Infect. Immun.* **19**: 231-239
218. Okita, T. W., R. L. Rodriguez, and J. Preiss. 1981. Biosynthesis of bacterial glycogen: Cloning of the glycogen biosynthetic enzyme structural genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**: 6944-6952
219. Ottemann, K. M., and J. F. Miller. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.* **24**: 1109-1117
220. Paget, M. S. and J. D. Helmann. 2003. The sigma 70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**: 203
221. Pearson, G. D. N., A. Woods, S. L. Chiang, and J. J. Mekalanos. 1993. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3750-3754
222. Peterson, K. M., and J. J. Mekalanos. 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: Identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **56**: 2822-2829
223. Pfau, J. D., and R. K. Taylor. 1998. Mutations in *toxR* and *toxS* that separate transcriptional activation from DNA binding at the cholera toxin promoter. *J. Bacteriol.* **180**: 4724-4733
224. Pflughoeft, K. J., K. Kierek, and P. Watnik. 2003. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl. Env. Microbiol.* **69**: 5919-5927
225. Pigot, P. J., and D. W. Hilbert. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 579-586
226. Pollizer, R. 1959. Cholera, Monograph Series, No 43. Geneva, World Health Organisation
227. Pratt, L. A., and T. J. Silhavy. 1996. The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2488-2492
228. Provenzano, D., and K. E. Klose. 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10220-10224
229. Provenzano, D., C. M. Lauriano, and K. E. Klose. 2001. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* **183**: 3652-3662
230. Pruteanu, M., and R. Hengge-Aronis. 2002. The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for  $\sigma^S$  proteolysis: Implications for RssB regulation and signal transduction in  $\sigma^S$  turnover in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1701-1713
231. Rahav-Manor, O., O. Carmel, R. Karpel, D. Taglicht, G. Glaser, S. Schuldiner, and E. Padan. 1992. NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR) regulates *nhaA*, the sodium protein antiporter gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 10433-10438

232. **Ramos-González, M. I., and S. Moli.** 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS*-gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**: 3421-3431
233. **Ramamurthy, T., S. Grag, and R. Sharma.** 1993. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* **341**: 703-704
234. **Ran Kim, Y., and J. Haeng Rhee.** 2003. Flagellar basal body *flg* operon as a virulence determinant of *Vibrio vulnificus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**: 405-410
235. **Reidl, J., and K. E. Klose.** 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: Out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 125-139
236. **Repik, A., A. Rebbapragada, M. S. Johnson, J. O. Haznedar, I. B. Zhulin, and B. L. Taylor.** 2000. PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**: 806-813
237. **Richardson, K.** 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: Analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* **59**: 2727-2736
238. **Robinson, V. L., D. R. Backler, and A. M. Stock.** 2000. A tale of two components: A novel kinase and a regulatory switch. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 626-633
239. **Roebler, M., and V. Müller.** 2001. Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**: 743-754
240. **Ruiz, N., C. N. Peterson, and T. J. Silhavy.** 2001. RpoS-dependent transcriptional control of *sprE*: Regulatory feedback loop. *J. Bacteriol.* **183**: 5974-5981
241. **Sack, D. A., G. B. Nair, and A. K. Siddique.** 2004. Cholera. *The Lancet* **363**: 223-233
242. **Sak, B. D., A. Eisenstarck, and D. Touati.** 1989. Exonuklease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3271-3275
243. **Sambrook, J., E. F. Fritsche, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: 2<sup>nd</sup> ed.
244. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
245. **Sarniguet, A., J. Kraus, M. Henkels, A. M. Muehlchen, and J. E. Loper.** 1995. The sigma factor  $\sigma^S$  affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12255-12259
246. **Schena, M., D. Schalon, R. W. Davis, and P. O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470
247. **Schild, S.** 2005. Bedeutung der Lipopolysaccharidstrukturen bei pathogenen *Vibrio cholerae* Stämmen für die Ausbildung von Cholera und Abgrenzung zu Umweltisolaten. Dissertation Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
248. **Schuhmacher, D. A., and K. E. Klose.** 1999. Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**: 1508-1514
249. **Schweder, T. K.-H. Lee, O. Lomovskaya, and A. Matin.** 1996. Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor ( $\sigma^S$ ) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* **178**: 470-476
250. **Service, P. H. L.** 1993. *Vibrio cholerae* O139 and epidemic cholera. *Commun. Dis. Rep. Weekly* **3**: 173
251. **Sharma, S., J. R. Hoskins, and S. Wickner.** 2005. Binding and degradation of heterodimeric substrates by ClpAP and ClpXP. *J. Biol. Chem.* **280**: 5449-5455
252. **Silva, A. J., and J. A. Benitez.** 2004. Transcriptional regulation of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease by the cyclic AMP receptor protein and RpoS. *J. Bacteriol.* **186**: 6374-6382
253. **Silva, A. J., G. J. Leitch, A. Camilli, and J. A. Benitez.** 2006. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera. *Infect. Immun.* **74**: 2072-2079
254. **Silva, A. J., K. Pham, and J. A. Benitez.** 2003. Hemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **149**: 1883-1891
255. **Singleton, F. L., R. W. Attwell, M. S. Jangi, and R. R. Colwell.** 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1047-1058
256. **Singleton, F. L., R. W. Attwell, M. S. Jangi, and R. R. Colwell.** 1982. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1080-1085
257. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **25**: 1003-1009
258. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1999. A new level in the *V. cholerae* ToxR virulence cascade: AphA is required for transcriptional activation of *tcpPH* operon. *Mol. Microbiol.* **31**: 763-771
259. **Sleator, R. D., and C. Hill.** 2001. Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 49-71
260. **Sledjeski, D. D., A. Gupta, and S. Gottesmann.** 1996. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *E. coli*. *EMBO J.* **15**: 3993-4000

261. **Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, and J. L. Slonczewski.** 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**: 1729-1737
262. **Sperandio, V., J. A. Bailey, J. A. Giron, V. J. DiRita, W. D. Silveira, A. L. Vettore, and J. B. Kaper.** 1996. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *V. cholerae*. *Infect. Immun.* **64**: 5406-5409
263. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **51**: 503-17
264. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Kim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, and I. T. Pulse.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 947-948
265. **Stüdemann, A., M. Noirclerc-Savoie, E. Klauck, G. Becker, D. Schneider, and R. Hengge.** 2003. Sequential recognition of two distinct sites in  $\sigma^S$  by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. *EMBO J.* **22**: 4111-4120
266. **Suh, S. J., L. Silo-Suh, D. E. Woods, D. J. Hasset, S. E. H. West, and D. E. Ohman.** 1999. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 3890-3897
267. **Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinec, and C. Kung.** 1997. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: The *mscL* gene, protein and activities. *Anu. Rev. Physiol.* **59**: 633-657
268. **Swerdlow, D. L., and A. A. Ries.** 1993. *Vibrio cholerae* non-O1 – the eighth pandemic? *Lancet* **342**: 382-383
269. **Takayanagi, Y., K. Tanaka, and H. Takahashi.** 1994. Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **243**: 525-531
270. **Tarzi, R., and C. Pruzzo.** 1999. Role of surface proteins in *Vibrio cholerae* attachment to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1348-1351
271. **Tauxe, R., L. Seminario, R. Tapita, and M. Libel.** 1994. The latin american epidemic, pp. 321-344. In: K. I. Wachsmuth, P. A. Blake and Ø. Olsvik (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D. C.
272. **Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong, and J. J. Mekalanos.** 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2833-2837
273. **Teich, A., S. Meyer, H. Y. Lin, L. Andersson, S. O. Enfors, and P. Neubauer.** 1999. Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators  $\sigma^S$  and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **15**: 123-129
274. **Torres-Cabassa, A. S., and S. Gottesman.** 1987. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J. Bacteriol.* **171**: 3348-3353
275. **Touati, E., E. Dassa, and P. L. Bouquet.** 1986. Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilization in CRP-deficient strains in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 257-264
276. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
277. **Travers, A. A., and R. R. Burgess.** 1969. Cyclic reuse of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* **222**: 1168-1174
278. **Tuveson, R. W., and R. B. Jones.** 1979. Genetic control of near-UV (300-400 nm) sensitivity independent of the *recA* gene in strains of *Escherichia coli* K12. *Photochem. Photobiol.* **30**: 667-676
279. **Typas, A., G. Becker, and R. Hengge.** 2007. The molecular basis of selective promoter activation by the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **63**: 1296-1306
280. **Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**.
281. **Wachsmuth, K. I., P. A. Blake, and Ø. Olsvik.** 1994. *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM Press, Washington, D. C.
282. **Wai, S. N., Y. Mizunoe, and S. Yoshida.** How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 123-131
283. **Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos.** 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect. Immun.* **62**: 72-78
284. **Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos.** 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910-1914

285. **Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos.** 1996. *Vibrio cholerae*: Molecular pathogenesis, immune response, and vaccine development. In: Enteric Infections and Immunity. Paradise, L. J. et al. (eds.), New York: Plenum Press, pp. 37-56
286. **Wang, J. M., J. A. Hartling, and J. M. Flanagan.** 1997. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**: 447-456
287. **Watermann, S. R., and P. L. C. Small.** 1996. Characterization of the acid phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**: 2808-2811
288. **Watermann, S. R., and P. L. C. Small.** 1996. Identification of  $\sigma^S$ -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **21**: 925-940
289. **Watnik, P., and R. Kolter.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**: 586-595
290. **Watnik, P. I., C. M. Lauriano, K. E. Klose, L. Croal, and R. Kolter.** 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **39**: 223-235
291. **Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, and R. Hengge.** 2005. Genomewide analysis of general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**: 1591-1603
292. **Wilmes-Riesenberg, M. R., J. W. Foster, and R. Curtis III.** 1997. An altered *rpoS* allele contributes to the avirulence of *Salmonella typhimurium* LT2. *Infect. Immun.* **65**: 203-210
293. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **23**: 629-638
294. **Wu, Z., P. Nybom, and K. E. Magnusson.** 2000. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight-junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell. Microbiol.* **2**: 11-17
295. **Wu, W.-F., Y. Zhou, and S. Gottesman.** 1999. Redundant *in vivo* proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslVU) protease. *J. Bacteriol.* **181**: 3681-3687
296. **Yamamoto, K., K. Hirao, T. Oshima, H. Aiba, R. Utsumi, and A. Ishihama.** 2005. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**: 1448-1456
297. **Yang, Z., Y. Geng, D. Xu, H. B. Kaplan, and W. Shi.** 1998. A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **30**: 1123-1130
298. **Yildiz, F. H. and G. K. Schoolnik.** 1998. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**: 773-784
299. **Yildiz, F. H., and G. K. Schoolnik.** 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4028-4033
300. **Zhou, Y., and S. Gottesman.** 1998. Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. *J. Bacteriol.* **180**: 1154-1158
301. **Zhou, Y., S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi, and S. Wickner.** 2001. The RssB response regulator directly targets  $\sigma^S$  for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* **15**: 627-637
302. **Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Russell, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos.** 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *V. cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3129-3134
303. **Zhu, J., and J. J. Mekalanos.** 2003. Quorum-sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev. Cell* **5**: 647-656
304. **Zor, T. and Z. Selinger.** 1995. Linearization of the Bradford assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**: 302-308



## VII ANHANG

### 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	„accessory colonization factor“
ATP	Adenosintri-phosphat
Ap <sup>r/s</sup>	Ampicillin resistent/ sensitiv
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bla	β-Lactamase-Gen
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bp	Einheit: Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cm <sup>r</sup>	Chloramphenicol resistent
CT	Choleratoxin
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
cfu	Einheit: „colony forming units“
Δ	Deletion
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamin-Tetraacetat
g	Einheit: Gramm
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
h	Einheit: Stunde
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kanR	Kanamycinresistenz-Gen aus pACYC177
kb	Einheit: Kilobasenpaare
kDa	Einheit: Kilo-Dalton
Km <sup>r/s</sup>	Kanamycin resistent/ sensitiv
l	Einheit: Liter
LB	Luria-Bertoni
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Einheit: Milliampere
mg	Einheit: Milligramm
μg	Einheit: Mikrogramm
ml	Einheit: Milliliter
μl	Einheit: Mikroliter
min	Einheit: Minute
MSHA	„mannose sensitive hemagglutinin“, ein Typ IV Pilus
N	Stickstoff
NEB	„New England Biolabs“
nm	Einheit: Nanometer
OD	Optische Dichte
oNPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid

---

ORF	„open reading frame“ (Offener Leserahmen)
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pers.	persönlich
pI	isoelektrischer Punkt
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
rpm	Einheit: „rounds per minute“
RIP	„regulated intracellular proteolysis“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Einheit: Sekunde
Sm <sup>r/s</sup>	Streptomycin resistant/ sensitiv
Tab.	Tabelle
TCP	„toxin coregulated pilus“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
V	Einheit Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VPI	„ <i>Vibrio cholerae</i> pathogenicity island“
VPS	„ <i>Vibrio</i> polysaccharide“
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid

## 2. Zusätzliche Abbildungen

<i>V. cholerae</i>	MSVSNIVTKVEEFDFFEDALEVLETDALTSDEELVAVEG	40
<i>E. coli</i>	--MSQNTLKVHDLN----EDAEFDENGVEVFDEKALVEQEP	35
<i>V. cholerae</i>	ASEDVREFF----DASAKSLDATQMYLSEIGFSPLLTAEE	76
<i>E. coli</i>	SDNDLAEFEELLSQGATQRVLDATQLYLGEIGYSPLLTAEE	75
<i>V. cholerae</i>	EVLVYARRALRGDEAARKRMIESNLRLVVKISRRYSNRGLA	116
<i>E. coli</i>	EVYFARRALRGDVA SRRRMIESNLRLVVKIARRYCNRGLA	115
<i>V. cholerae</i>	LLDLIEEGNLGLIRAVEKFDPERGFRFSTYATWWIRQTIE	156
<i>E. coli</i>	LLDLIEEGNLGLIRAVEKFDPERGFRFSTYATWWIRQTIE	155
<i>V. cholerae</i>	RALMNQTRTIRLP IHVVKELNLYLRTARELSQRDLHEPTIP	196
<i>E. coli</i>	RAIMNQTRTIRLP IHVVKELNVYLRTARELSFKLDHEPSA	195
<i>V. cholerae</i>	EETALELDRPVDDVTKMLRLNERISSVDTPIGCDGDKALL	236
<i>E. coli</i>	EETAEQLDKPVDDVSRMLRLNERITISVDTPIGCDSEKALL	235
<i>V. cholerae</i>	DIILPDSHNADPEFSTQDDDIRESLINWLDDELNPKQKEVLA	276
<i>E. coli</i>	DIILADEKENGPEDTIQDDDMKQSIWKWLFELNAKQREVLA	275
<i>V. cholerae</i>	RRFGLLGYEPTILEEVGREINLTRERVRQIQVEGLRRLRE	316
<i>E. coli</i>	RRFGLLGYEATILEDVGREICLTRERVRQIQVEGLRRLRE	315
<i>V. cholerae</i>	IIIVKQGLNMEALENVEYDN	335
<i>E. coli</i>	IIIQTQGLNTEALERE----	330

**Abb. VII-1: Vergleich der RpoS-Proteine aus *V. cholerae* und *E. coli*.** Das Alignment wurde mit der Matrix Blosum 62 des „Bio Edit Sequence Alignment Editor“ erstellt. Schwarz hervorgehobene AS sind in beiden Proteinen identisch, graue unterlegte AS geben eine Ähnlichkeit von mindestens 60% an. Rot gekennzeichnete AS repräsentieren das „Turnover -Element“ für die RssB-Bindung

### 3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name: Anja Halscheidt  
Geburtsdatum: 15. November 1978  
Geburtsort: Mühlhausen  
Familienstand: ledig

#### Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Altengottern  
1989 – 1997 Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium Grossengottern  
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

#### Studium

Oktober 1997 – März 2002 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Pharmakologie  
April 2002 - April 2003 Diplomarbeit zum Thema „Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Esterasen aus ausgewählten Weißfäulepilzen“ an der Friedrich-Schiller-Universität Jena; Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie von Frau Prof. G. Diekert in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Nüske

#### Promotion

Seit Dezember 2003 Dissertation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Institut für Hygiene und Mikrobiologie von Prof. M. Frosch in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Reidl

## 4. Publikationsliste

### Originalarbeiten:

**Halscheidt, A., K. Lamprecht, T. Berg, and J. Reidl.** 2007. Chemotaxis-response and proteolytic control of sigma factor RpoS are connected in *Vibrio cholerae* (submitted).

### Kongressbeiträge:

**Halscheidt, A., and J. Reidl.** Proteolysis and expression control of the RpoS-protein in *Vibrio cholerae*.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der DGHM 2006 (Würzburg)

**Halscheidt, A., and J. Reidl.** Role of the RpoS-protein in stress survival of *Vibrio cholerae*.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der VAAM 2006 (Jena)

**Halscheidt, A., S. Schild, and J. Reidl.** New two-component signal system is involved in survival under hyperosmotic conditions of *Vibrio cholerae*.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der DGHM 2005 (Göttingen)

**Halscheidt, A., R. Ullrich, K. Scheibner, and J. Nüske.** Novel extracellular ester cleaving enzyme produced by the litter decomposing fungus *Marasmius alliaceus* in liquid culture.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der VAAM 2003 (Berlin)

**Ullrich, R., A. Halscheidt, K. Scheibner, M. Hofrichter, and J. Nüske.** Enzymatic depolymerization of acetylated and non-acetylated beech wood lignin.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der VAAM 2002 (Göttingen)

**Ullrich, R., A. Halscheidt, J. Nüske, and K. Scheibner.** Extracellular ester cleaving enzymes in ligninolytic fungi and their importance for the degradation of acetylated wood.

Posterpräsentation zur Jahrestagung der VAAM 2002 (Göttingen)