

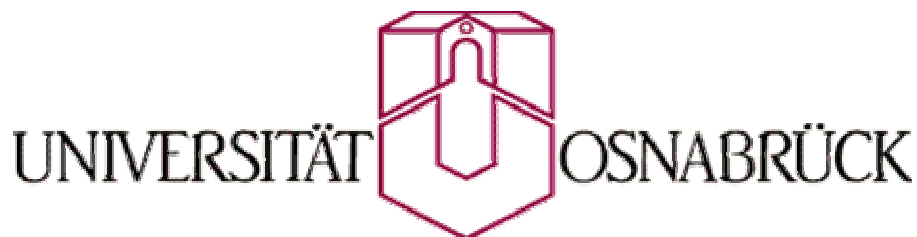
**Transkriptom- und Proteom-Analysen von
Escherichia coli unter hyperosmotischen
Stressbedingungen und biochemische
Charakterisierung von UspG**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereiches Biologie/Chemie
an der Universität Osnabrück

von

Arnim Weber

Osnabrück, im Oktober 2003



Meinem Sohn Yannick

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mechanismen der Adaptation von <i>Escherichia coli</i> unter hypertonen Stressbedingungen	1
1.2 Die „universelle Stress-Protein“ (Usp)-Familie.....	9
2. Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	14
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	16
2.3.1 Anzuchtverfahren	16
2.3.2 Phänotypische Untersuchungen.....	17
2.4 Molekularbiologische und Genetische Methoden.....	18
2.4.1 Plasmidisolierung	18
2.4.2 Isolierung genomischer DNA.....	18
2.4.3 Modifikation von DNA	18
2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	18
2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	18
2.4.6 Markierung von DNA.....	19
2.4.7 Northern-Blotting und Hybridisierung	19
2.4.8 „Transcriptomics“: DNA-Macroarray-Analysen.....	20
2.4.8.1 Isolation von RNA	20
2.4.8.2 cDNA Synthese und Markierung	21
2.4.8.3 DNA-Macroarray Hybridisierung.....	21
2.4.8.4 Datenanalyse	22
2.4.9 Kompetente Zellen und Transformation.....	22
2.4.10 DNA-Sequenzanalyse.....	22
2.4.11 Stammkonstruktion.....	23
2.4.12 Konstruktion der Plasmide	24
2.4.13 RT-PCR.....	24
2.5 Biochemische und Analytische Methoden.....	24
2.5.1 Reinigung von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118)	24
2.5.2 Proteinbestimmung.....	25
2.5.3 Gelretardations-Experimente.....	25
2.5.4 SDS-PAGE.....	26
2.5.5 Native PAGE.....	26
2.5.6 „Proteomics“: Zweidimensionale (2D)-PAGE-Analysen	27
2.5.6.1 <i>in vivo</i> Markierung mittels L-[³⁵ S]Methionin.....	27
2.5.6.2 Zellaufschlussmethoden.....	27
2.5.6.3 Szintillationsmessung radioaktiver Gesamtzellextrakte.....	28
2.5.6.4 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	28
2.5.6.5 Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	29
2.5.6.6 2D-PAGE Auswertung.....	29
2.5.7 Immunoblot	30
2.5.8 Phosphorylierung von 10His-UspG <i>in vitro</i>	30
2.5.9 Adenylierung von 10His-UspG <i>in vitro</i>	31
2.5.10 Dünnschicht-Chromatographie (TLC): UspG~AMP Nachweis.....	31
2.5.11 „Pulse-Chase“ Experimente	32
2.5.12 Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG	32
2.5.13 pH-Stabilitätstest	32
2.5.14 Quervernetzungsstudien	33
2.6 Biophysikalische Methoden.....	33
2.6.1 N-terminale Proteinsequenzierung	33
2.6.2 MALDI.....	33

3. Ergebnisse	35
3.1 „Transcriptomics“: Globale transkriptionale Veränderungen von <i>E. coli</i> unter Osmostress und Kaliumlimitation.....	35
3.1.1 DNA-Macroarray-Analysen unter osmotischen Stressbedingungen.....	35
3.1.1.1 Vergleichende Northern-Blot-Analysen unter osmotischem Stress.....	38
3.1.2 DNA-Macroarray-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen.....	40
3.2 „Proteomics“: Gesamtzellextraktanalyse von <i>E. coli</i> mittels 2D-PAGE unter osmotischen Stressbedingungen und unter Kaliumlimitation.....	42
3.2.1 2D-PAGE-Analysen von <i>E. coli</i> unter osmotischen Stressbedingungen.....	42
3.2.2 2D-PAGE-Analysen von <i>E. coli</i> unter Kaliumlimitation.....	46
3.3 Biochemische Charakterisierung von UspG.....	49
3.3.1 Überproduktion, Lokalisation und Reinigung von 10His-UspG aus <i>E. coli</i>	49
3.3.2 Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von 10His-UspG.....	51
3.3.2.1 Modifikation von 10His-UspG <i>in vitro</i>	51
3.3.2.2 Nachweis der <i>in vitro</i> Adenylierung von 10His-UspG mittels TLC.....	55
3.3.2.3 2D-PAGE von 10His-UspG und Markierung mittels radioaktivem ATP.....	56
3.3.2.4 Untersuchungen zur Identifikation der Adenylierungs- und Phosphorylierungsstellen mittels MALDI-MS-PMF.....	57
3.3.2.5 Untersuchungen zur pH-Stabilität der Adenylierung/Phosphorylierung.....	59
3.3.2.6 Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG.....	60
3.3.3 Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von 10His-UspG.....	61
3.3.3.1 Molekulargewichtsbestimmung von 10His-UspG mittels MALDI-TOF-MS.....	62
3.3.3.2 Quervernetzungsstudien von 10His-UspG.....	63
3.3.3.3 Untersuchungen zu C-terminal verkürztem 10His-UspG: Reinigung und vergleichende Gelelektrophorese.....	64
3.3.4 Untersuchungen zur Modifikation von 10His-UspG(1-118) <i>in vitro</i>	66
3.3.5 Untersuchungen zu den DNA-Bindungseigenschaften von 10His-UspG.....	67
3.3.6 Phänotypische Charakterisierung einer <i>uspG</i> -Mutante.....	70
3.3.6.1 Konstruktion von <i>E. coli</i> AW0607.....	70
3.3.6.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>E. coli</i> AW0607.....	71
4. Diskussion	74
4.1 „Transcriptomics“: DNA-Macroarray-Analysen von <i>E. coli</i> unter hyperosmotischem Stress... 74	74
4.1.1 Geninduktion.....	75
4.1.1.1 Induktion von <i>proP</i> und Nachweis der Gene <i>ompC</i> und <i>ompF</i>	76
4.1.1.2 σ^S -abhängige Gene: <i>otsBA</i> , <i>proVWX</i> , <i>dps</i> , <i>himD</i> , <i>osmC</i> und <i>osmY</i>	76
4.1.1.3 Induktion von <i>rpoS</i> , <i>uspA</i> und weiterer Gene.....	78
4.1.1.4 Identifikation des <i>kdpFABC</i> -Operons.....	80
4.1.2 Genrepression.....	80
4.2 „Proteomics“: 2D-PAGE-Analysen von <i>E. coli</i> unter hyperosmotischem Stress.....	82
4.2.1 Proteinbiosynthese: Induktion.....	82
4.2.2 Proteinbiosynthese: Repression.....	84
4.2.3 Schlussfolgerungen.....	85
4.3 Transkriptom- und Proteom-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen.....	86
4.4 Biochemische Charakterisierung von UspG (YbdQ, UP12).....	88
4.4.1 Modifikation und Dimerisierung von UspG und UspG(1-118).....	88
4.4.2 Modell zur Wirkungsweise von UspG.....	96
4.5 Ausblick.....	99
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis	104

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AP	Alkalische Phosphatase
Ap ^R	Plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulphonat)
Cm ^R	(Plasmid-)vermittelte Chloramphenicol-Resistenz
cpm	„counts“ pro Minute
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
DHBS	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	Dinitrophenol
dNTP	desoxy-Ribonukleotidtriphosphate
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fMet	Formyl-Methionin
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-Ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettichperoxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPG	Immobilisierter pH Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
K _M	Michaelis-Konstante
10His-UspG~AMP	Adenyl-10His-UspG
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionisation
MM	Minimalmedium
MOPS	<i>N</i> -Morpholinopropansulfonat
MW	Molekulargewicht
nt	Nukleotide
NTA	Triazetonitril

OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
Oip	osmotisch induziertes Protein
ORF	offenes Leseraster
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pI	isoelektrischer Punkt
ppGpp	Guanosin 5'-diphosphat 3'-diphosphat
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	„surface plasmon resonance“
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Tris/HCl-Glycerol
TLC	Dünnschicht-Chromatographie
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Nomenklatur

Genprodukte von *uspG* werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird unabhängig ob N-terminal entsprechende „Linker“ oder „Histidin-Tags“ vorausgehen. Einzige Ausnahme sind dabei die in Tabelle 3.5 und Tab. III angegebenen Peptidfragmente und deren Position in 10His-UspG (163 AS), die bei der MALDI-MS-PMF-Analyse identifiziert wurden.

1. Einleitung

1.1 Mechanismen der Adaptation von *Escherichia coli* unter hypertonischen Stressbedingungen

Bakterien sind in ihrer Umgebung ständig wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt, die vielfach zu Veränderungen der Wachstumsrate führen. Parameter, wie das Angebot verschiedener Nährstoffe, das Auftreten von toxischen Substanzen, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Osmolalität und zahlreiche andere Faktoren, können sich innerhalb kürzester Zeiträume unerwartet ändern. Eine erfolgreiche Überlebensstrategie der Bakterien erfordert daher eine ständige Wahrnehmung ihrer Umgebung und eine schnelle, optimale Antwort auf den bestehenden Reiz. Eine solche Adaptation erfolgt vielfach über spezifische Signaltransduktionssysteme, mit denen chemische und physikalische Reize der Umwelt wahrgenommen werden und welche dann zumeist eine Änderung der Genexpression oder der Motilität auslösen (Bourret *et al.*, 1991; Parkinson, 1993; Parkinson & Kofoid, 1992; Stock *et al.*, 1990; Stock *et al.*, 2000). Dabei wird vielen der bakteriellen Signaltransduktionssysteme („Zweikomponenten-Systeme“) eine wichtige Funktion bei Chemotaxis, Metabolismus, Transport, Pathogenität und Osmoregulation zugesprochen (West & Stock, 2001).

Bislang konnte durch globale Analysen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) und durch Einsatz von Reporter-gen-Fusionsstudien gezeigt werden, dass ca. 40 Proteine unter erhöhter externer Osmolalität, verstärkt synthetisiert und ca. 30 Proteine reprimiert werden (Clark & Parker, 1984; Botsford, 1990; Gutierrez *et al.*, 1987; Hengge-Aronis *et al.*, 1993). Es ist daher ersichtlich, dass die Adaptation von *Escherichia coli* auf den Umweltparameter Osmolalität ein sehr komplexes regulatorisches Netzwerk beinhaltet (Osmostress-Stimulon), dessen Umfang und Regulation bis heute nicht vollständig aufgeklärt und verstanden ist. Ein Grund hierfür liegt in sich überschneidenden primären/sekundären physiologischen Veränderungen, die im Falle hyperosmotischer Bedingungen auftreten und somit die Identifizierung des von der Zelle wahrgenommenen Reizes erschweren. So resultiert ein hyperosmotischer Stress zum Beispiel vielfach in einer Reduktion oder gar kompletten Inhibierung der Wachstumsrate über einen längeren Zeitraum hinweg. Dieser Phänotyp, ist jedoch keineswegs eine spezifische Reaktion der Zelle auf einen spezifischen Stress, sondern kann auch durch Einsatz oxidativer Substanzen, pH-Veränderungen, Temperaturveränderungen und Nährstofflimitation hervorgerufen werden und ist somit nicht zwangsläufig ein Resultat höherer externer Osmolalitäten (Csonka, 1989).

Neben spezifischen Stressantworten der Zelle auf einen bestimmten Reiz, besitzen Mikroorganismen so genannte generelle Stressantworten, die in einer ähnlichen Reaktion der Zelle münden. Bei letzterem erfolgt, unabhängig vom auftretenden Reiz, eine über einzelne oder mehrere Masterregulatoren ausgelöste „cross-protection“ gegenüber einer Vielzahl von zellschädigenden Umwelteinflüssen (Hecker *et al.*, 1996; Hecker & Völker, 1998). Eine ganze Reihe von Genen wird in

ihrer Expression sowohl in der stationären Phase als auch unter osmotischem Stress und anderen Stressbedingungen beeinflusst (Chuang *et al.*, 1993; Hengge-Aronis, 1996b). Dabei zeigen stationäre Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer ganzen Reihe chemischer und physikalischer Stressbedingungen wie Hitze, oxidativen Substanzen (z.B. H₂O₂), pH-Wert und hyperosmotischem Stress (McCann *et al.*, 1991; Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Jenkins *et al.*, 1988; Kolter *et al.*, 1993; Bearson *et al.*, 1996). Eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Transkription etlicher der dafür relevanten Gene übernimmt dabei der alternative Sigma-Faktor RpoS (σ^S , Stationärphasen-Sigma-Faktor) (Hengge-Aronis, 1996b). Eine Vielzahl σ^S -kontrollierter Gene wird durch hyperosmotische Bedingungen stimuliert und mittels 2D-Gelelektrophorese konnte für RpoS eine entscheidende Kontrollfunktion bei mindestens 18 unter osmotischem Stress synthetisierten Proteinen nachgewiesen werden (Hengge-Aronis *et al.*, 1993). Insgesamt stehen mehr als 60 Gene unter der Kontrolle von RpoS (Abb. 1.1), wahrscheinlich ist die Anzahl der regulierten Gene jedoch weitaus höher (Hengge-Aronis, 1999; Cheung *et al.*, 2003). Die Regulation von σ^S unter hyperosmotischen Stressbedingungen erfolgt vornehmlich auf posttranskriptionalem Niveau (Translationsebene) sowie durch Regulation des σ^S „turnover“ (Proteolyse); letztere wird unter hyperosmotischem Stress herabgesetzt (Abb. 1.1). Eine transkriptionale Induktion von *rpoS* mittels *rpoS-lacZ*-Fusionsstudien konnte unter hyperosmotischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996; Hengge-Aronis, 2002).

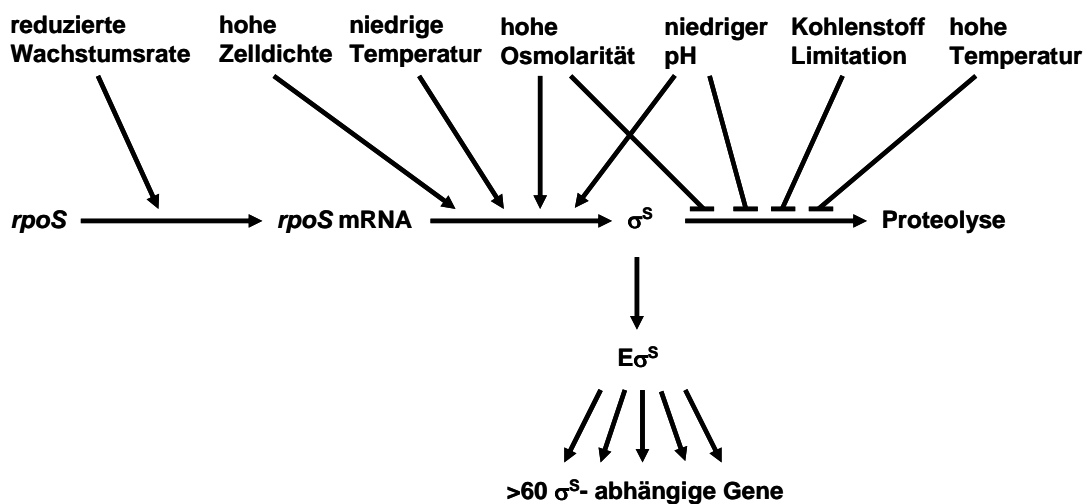


Abb. 1.1: Regulationsebenen von σ^S . Die zelluläre Menge an σ^S kann durch Stimulation der *rpoS*-Transkription, Translation oder durch Inhibition der σ^S Proteolyse erhöht werden. Unter hyperosmotischen Stressbedingungen wird durch eine kombinatorische Regulation auf der Ebene der Translation und Proteolyse die Menge an σ^S innerhalb weniger Minuten stark erhöht. Unter erhöhter Osmolarität steigt die σ^S -Halbwertszeit von 2-3min auf 50min an (aus Hengge-Aronis, 2002).

Diese durch σ^S ausgelöste allgemeine Stressantwort reicht jedoch in vielen Fällen nicht aus, um längere Zeit einem spezifischen Stress (z.B. hyperosmotischer Stress) zu widerstehen. Um längerfristig Veränderungen einer bestimmten Umweltbedingung zu überleben, bedienen sich

Mikroorganismen daher zusätzlicher spezifischer Stressantworten, die es ihnen erlauben das Notfallsystem über sehr komplexe regulatorische Netzwerke zu steuern und zu modulieren. Dabei werden physiologische und genetische Adaptationsprozesse durchgeführt, die es ihnen dann erlauben auch längerfristig einen spezifischen Stress zu überleben (Hengge-Aronis, 1999; Muffler *et al.*, 1997; Bianchi & Baneyx, 1999).

Mikroorganismen haben zwei fundamental unterschiedliche Konzepte entwickelt, um den Turgordruck unter hyperosmotischen Bedingungen aufrecht zu erhalten (Kempf & Bremer, 1998; Oren, 1999; Ventosa *et al.*, 1998). Dabei unterscheidet man die „salt-in“ von der „salt-out“-Strategie. Erstere wird vorwiegend von permanent unter hyperosmotischen Umweltbedingungen lebenden Mikroorganismen angewandt. Hierzu zählen die aeroben *Halobacteriales* (*Archaea*) und die *Holoanaerobiales* (*Bacteria*), die Habitate mit einer Salzkonzentration von 2-5 M besiedeln (Bremer & Krämer, 2000). Dabei häufen diese Organismen vorwiegend K⁺- und Cl⁻-Ionen in molaren Konzentrationen intrazellulär an. Um eine Aggregation/Denaturierung von Makromolekülen zu umgehen, haben diese Mikroorganismen im Laufe der Evolution ihre gesamte Physiologie auf eine hohe intrazelluläre Ionenkonzentration angepasst; für viele biochemische Reaktionen ist sogar eine hohe intrazelluläre Kaliumkonzentration essentiell (Dennis & Shimmin, 1997; Elcock & McCammon, 1998; Pieper *et al.*, 1998). Dabei zeichnet sich das Proteom halophiler Mikroorganismen, wie am Beispiel von *Halobacterium*, durch eine relativ hohe Anzahl negativ geladener Aminosäuren auf entsprechenden Proteinoberflächen, bei gleichzeitig geringerer Hydrophobizität aus (Kennedy *et al.*, 2001). Die „salt-out“ Strategie, wie sie zum Beispiel von *E. coli* und *Bacillus subtilis* angewendet wird, ist ein sehr verbreitetes Konzept. Diese vielseitige und flexible Anpassungsmöglichkeit verlangt im Gegensatz zur „salt-in“ Strategie keine evolutionäre Anpassung von Proteinen und zellulären Prozessen bezüglich einer hohen Salzanpassung, da die sie verwendenden Organismen (Bakterien, Archaea, Pilze, Pflanzen und Tiere) zumeist unter moderat hyperosmotischen Bedingungen leben. Dabei wird nur wenigen Proteinen eine osmosensorische Funktion in Bakterien zugesprochen. Darunter sind Proteine die Teile eines „Zweikomponenten-Systems“ darstellen. Hierzu gehören EnvZ (Mizuno & Mizushima, 1990) und KdpD (s. u., Laimins *et al.*, 1981). Des Weiteren wird für die Transporter ProP aus *E. coli* und BetP aus *Corynebacterium glutamicum*, eine osmosensorische Funktion angenommen (Grothe *et al.*, 1986; Wood, 1999; Rübenhagen *et al.*, 2000).

Das Sensorkinase/Antwortregulator-System EnvZ/OmpR (*ompB*-Locus) aus *E. coli*, reguliert dabei die Transkription der Gene *ompF* und *ompC* in Anhängigkeit von der Osmolalität des Mediums (Pratt & Silhavy, 1995). Beide Gene kodieren für jeweils ein Porin der äußeren Membran in *E. coli* (OmpF, OmpC), deren Diffusionsraten für entsprechende Substrate sich, bedingt durch deren Porendurchmesser (OmpF: ~1,16 nm; OmpC: ~1,06 nm), in etwa um den Faktor 10 unterscheiden (Nikaido & Vaara, 1985; Csonka, 1989). Obwohl die Summe der Porine OmpF und OmpC konstant gehalten wird (ca. 1×10^5 Moleküle pro Zelle, Nikaido, 1996), werden gegenläufig die relativen Proteinmengen an OmpC und OmpF, in Abhängigkeit von der Osmolalität des Mediums angepasst. So

wird bei erhöhter Osmolalität des Mediums verstärkt *ompC* exprimiert, wohingegen gleichzeitig die Expression von *ompF* erniedrigt wird, und umgekehrt. Dabei scheinen intrazelluläre Bedingungen, wie eine erhöhte Konzentration an Kalium und anderen Kationen (Rb^+ , Na^+ und NH_4^+), eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Autokinaseaktivität von EnvZ und dem anschließenden Phosphotransfer auf OmpR zu spielen (Jung *et al.*, 2001a). Eine reziproke Expression der Gene *ompF* und *ompC* wird dabei vornehmlich durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten seitens des phosphorylierten Antwortregulators OmpR~P, zu bestimmten regulatorischen Bereichen stromaufwärts der entsprechenden Promotorbereiche der Gene *ompF* und *ompC* erreicht (Forst *et al.*, 1989; Head *et al.*, 1998; Harlocker *et al.*, 1995). Die Regulation der Porinexpression trägt dabei einen Teil zur Adaptation von *E. coli* hinsichtlich hyperosmotischer Stressbedingungen bei, erfordert aber zusätzliche Mechanismen.

Die spezifische Stressantwort von *E. coli* auf Erhöhungen der externen Osmolalität kann generell in drei Phasen unterteilt werden und soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden (Csonka & Epstein, 1996; Wood, 1999):

- I) Verringerung des Zellvolumens durch verstärkten Wasserausstrom aus der Zelle
- II) Transiente Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Kalium und Glutamat und Synthese/Akkumulation osmotischer Schutzsubstanzen (engl. „compatible solutes“) wie Glycinbetain, Prolin, Trehalose, etc.
- III) Wiederaufnahme der DNA-Replikation, Proteinbiosynthese und Wachstum nach erfolgter Adaptation

I) Im Allgemeinen ist die Gesamtkonzentration von Osmolyten (osmotisch aktive Substanzen) in der Zelle höher als in der sie umgebenden Umwelt. Dadurch fließt Wasser entlang des chemischen Gradienten in die Zelle und führt zur Etablierung des so genannten Zellurgors.

Unter hyperosmotischen Bedingungen wird in *E. coli* durch den verstärkten Wasserausstrom (Dehydratisierung) über die Membran bzw. über so genannte Aquaporine (AqpZ) (Delamarche *et al.*, 1999), der intrazelluläre osmotische Druck (Π) in der Zelle erniedrigt. Es kommt zu einer zeitweiligen Reduktion des Turgors und zur Plasmolyse der Zelle bei gleichzeitiger Verringerung des Zellvolumens. Innerhalb weniger Minuten erfolgt in *E. coli* eine vorübergehende Einstellung der Respiration, wobei gleichzeitig die intrazelluläre Konzentration an ATP über Substratketten-Phosphorylierung im Zuge der Glykolyse, wie auch der interne pH-Wert, ansteigen (Meury, 1994; Ohwada & Sagisaka, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988). Da eine Aufrechterhaltung des Zellurgors essentiell für das Wachstum von *E. coli* ist, ist ein komplexer Adaptationsprozess, bei dem Variationen des Zellurgors in akzeptablen Grenzen gehalten werden, unerlässlich (Norris & Manners, 1993).

II) Erste Adaptationsmechanismen, die der Aufrechterhaltung bzw. Regeneration des Zellurgors dienen, beinhalten eine rasche Aufnahme und transiente Akkumulation von K^+ -Ionen (Dinnbier *et al.*, 1988; Epstein & Schultz, 1965; Meury *et al.*, 1985; Record *et al.*, 1998). Die Anhäufung von K^+ -Ionen im Zytoplasma spielt dabei bei Bakterien nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation des Turgors, sondern ist auch für die Aktivierung von Enzymen und die Regulation des zytoplasmatischen pH-Wertes von Bedeutung (Booth, 1985; Stumpe *et al.*, 1996).

E. coli besitzt mehrere Transportsysteme, TrkH, TrkG, Kup und KdpFABC, die der Aufnahme von K^+ -Ionen dienen und deren Transportraten mit Ausnahme des Kup-Systems unter hyperosmotischen Bedingungen erhöht sind (Rhoads & Epstein, 1978; Rhoads *et al.*, 1978). Neben den in *E. coli* konstitutiv exprimierten K^+ -Aufnahmesystemen TrkG, TrkH und Kup, ist KdpFABC das einzige, dessen Synthese reguliert werden kann. Die Menge an *kdpFABC*-Transkript ist dabei bei erhöhter Osmolalität etwa 8-fach erhöht; unter K^+ -limitierenden Bedingungen (0,01 mM K^+) steigt die Transkriptmenge von *kdpFABC* sogar um den Faktor 370 innerhalb der ersten 10min (Jung *et al.*, 2001b). Eine Induktion der Expression von *kdpFABC* unter Kaliumlimitation erfolgt nur dann, wenn eine Aufrechterhaltung des intrazellulären K^+ -Gehaltes mittels der konstitutiv exprimierten Aufnahmesysteme TrkH, TrkG und Kup nicht mehr gewährleistet ist, bzw. die Zelle einem hyperosmotischen Stress durch erhöhte Mengen an externer Salzkonzentration (NaCl) ausgesetzt ist (Dosch *et al.*, 1991; Schlösser *et al.*, 1992; Bossemeyer *et al.*, 1989; Laimins *et al.*, 1981; Jung *et al.*, 2001b). Interessanterweise konnte auf der Proteinebene indes kein KdpFABC nachgewiesen werden, wenn hyperosmotische Bedingungen durch Zucker hervorgerufen wurden (Hasemeier, 1999).

Die Expression des *kdpFABC*-Operons, das für die bakterielle P-Typ-ATPase KdpFABC codiert, wird von dem Sensorkinase/Antwortregulatorsystem KdpD/KdpE aus *Escherichia coli*, einem typischen Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem, reguliert (Walderhaug *et al.*, 1992). Die Kdp-ATPase transportiert K^+ -Ionen mit hoher Affinität ins Zytoplasma der Zelle (Altendorf & Epstein, 1996). Der K_M -Wert der Kaliumaufnahme wurde auf $\sim 2 \mu\text{M}$ bestimmt (Rhoads *et al.*, 1976). Von den vier Untereinheiten des Transportsystems KdpA, KdpB, KdpC und KdpF (Laimins *et al.*, 1981; Hesse *et al.*, 1984; Gaßel *et al.*, 1998) ist die 59 kDa schwere, aus 10 Transmembrandomänen bestehende Untereinheit KdpA für die Bindung und den Transport von K^+ verantwortlich (Buurmann *et al.*, 1995). Die energieliefernde Untereinheit ist KdpB mit einem Molekulargewicht von 72 kDa und vermutlich 6 Transmembrandomänen (Siebers & Altendorf, 1989; Siebers & Altendorf, 1993). Der 20 kDa schweren Untereinheit KdpC wird eine essentielle Funktion für den Transport und eine vermutliche Beteiligung an der Membranassemblierung des Komplexes zugeschrieben (Laimins *et al.*, 1981; Gaßel, 1999). Eine wahrscheinlich stabilisierende Wirkung auf den Komplex hat das hydrophobe, nur 3 kDa schwere Peptid KdpF, das aber für den Transport von K^+ nicht essentiell ist (Gaßel *et al.*, 1999). Das *kdpFABC*-Operon bildet zusammen mit dem *kdpDE*-Operon das *kdp*-Regulon, welches bei 16,5min auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert ist (Bachmann, 1990) (Abb. 1.2).

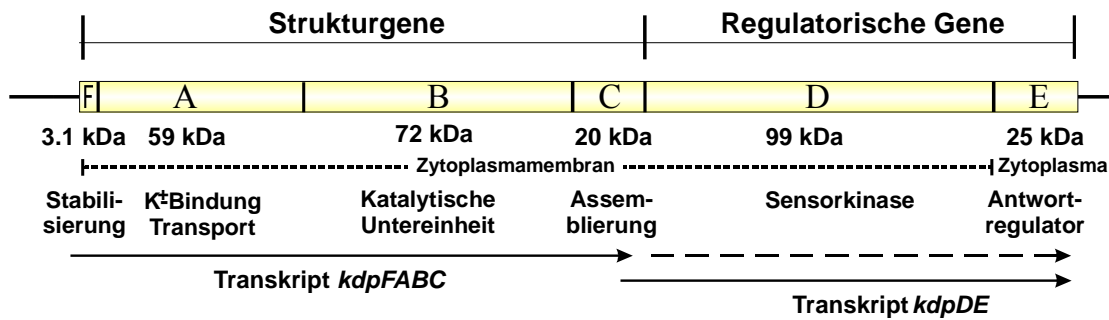


Abb. 1.2: Das *kdp*-Regulon aus *Escherichia coli* (verändert nach Epstein, 1985).

Innerhalb des *kdpC*-Gens ist der Promotor des *kdpDE*-Operons lokalisiert, dessen -35 bzw. -10 Region der Konsensus-Sequenz typischer vegetativer *E. coli*-Promotoren ähnelt. Der Transkriptionsstart für das *kdpDE*-Operon, das für die Sensorikinease KdpD und den Antwortregulator KdpE kodiert, befindet sich daher 5 bp vor dem *kdpC*-Stopkodon (Polarek *et al.*, 1992; Walderhaug *et al.*, 1992). Unter *kdp*-induzierenden Bedingungen konnte *in vivo* eine stark erhöhte Synthese von KdpD beobachtet werden, was auf eine in das *kdpDE*-Operon fortgesetzte Transkription von *kdpFABC* schließen lässt (Polarek *et al.*, 1992; Zimmann, 1995).

Um der Anhäufung größerer Mengen an positiver Ladung durch die Aufnahme von K⁺-Ionen unter hyperosmotischen Bedingungen entgegenzuwirken, werden vorübergehend verstärkt Protonen aus der Zelle geschleust (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994). Dies führt zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität der Zelle, bei einer gleichzeitigen Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes. Als Gegenmaßnahme synthetisiert *E. coli* innerhalb kürzester Zeit verstärkt Glutamat, bei gleichzeitiger Reduktion des Umsatzes an intrazellulärem Glutamat (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Csonka & Epstein, 1996). Eine Erhöhung der intrazellulären K⁺-Glutamat-Konzentration fördert dabei eine effektive Transkription RpoS-abhängiger Promotoren unter hyperosmotischen Bedingungen (Kusano *et al.*, 1996). Polymanin-Efflux dient ebenso der Aufrechterhaltung der Elektroneutralität (Schiller *et al.*, 2000). Die Kalium-abhängige *de novo* Synthese von Glutamat erfolgt bei *Enterobacteriaceae* mit Hilfe zweier Enzyme: Glutamat-Dehydrogenase und Glutamat-Synthase.

Neben dem organischen Anion Glutamat, nutzen eine Vielzahl von Mikroorganismen ein ganzes Repertoire weiterer organischer Osmolyte (Schutzsubstanzen), die sie im Zuge der späteren Adaptation in hohen Konzentrationen unter hyperosmotischen Bedingungen in der Zelle anhäufen, ohne die zellulären physiologischen Prozesse zu stören (Bremer & Krämer, 2000). Wenn exogen vorhanden, werden diese osmotischen Schutzsubstanzen (z.B. Glycinbetain) bevorzugt durch mehr oder weniger spezifische Transportsysteme anstelle von Kalium aufgenommen oder müssen, wenn nicht vorhanden, durch endogene *de novo* Synthese akkumuliert werden (Csonka & Hanson, 1991; Gowrishankar, 1985; Gowrishankar, 1986; Grothe *et al.*, 1986; Milner *et al.*, 1988; Bremer & Krämer, 2000). Diese Osmolyte können als chemische Chaperone angesehen werden und bewirken als

kosmotrope Substanzen eine bessere Hydratisierung und damit Wahrung nativer Konformationen von Polypeptiden unter verschiedensten Bedingungen wie Austrocknung, Kälte und Hitze (Kaushik & Bhat, 2003). Gleichzeitig wird durch die Akkumulation der Osmolyte der intrazelluläre osmotische Druck erhöht. Das Spektrum bislang identifizierter osmotischer Schutzsubstanzen umfasst Aminosäuren (z.B. Glutamat, Prolin), Aminosäure-Derivate (Prolinbetain, Ectoin), Methylamine (Glycinbetain, Carnitin), kleine Peptide, Sulfatester (Cholin-*O*-Sulfat), Polyole (Glycerol, Glycosylglycerol) und Zucker (Trehalose, Saccharose). Bei Bakterien sehr verbreitet sind Glycinbetain (Trimethyl-Ammonium-Verbindung), Ectoin, Prolin und Trehalose (Bremer & Krämer, 2000).

Mikroorganismen wie *E. coli* besitzen eine Vielzahl von Transportsystemen, die es ihnen ermöglicht, rasch ein breites Spektrum dieser in der Umwelt vorkommenden Schutzsubstanzen in großen Mengen in die Zelle zu transportieren und dort anzuhäufen. *E. coli* besitzt hierzu zwei wichtige Transportsysteme: ProP und ProU (Abb. 1.3). Während ProP (Substrat/H⁺-Symporter) aus einem einzelnen integralen Membranprotein besteht, stellt der ProU-Transporter, bestehend aus den Proteinen ProV (ATPase), ProW (Transporter) und ProX (periplasmatisches Bindeprotein für Glycinbetain/Prolinbetain) einen durch ATP getriebenen ABC-Transporter dar (Abb. 1.3).

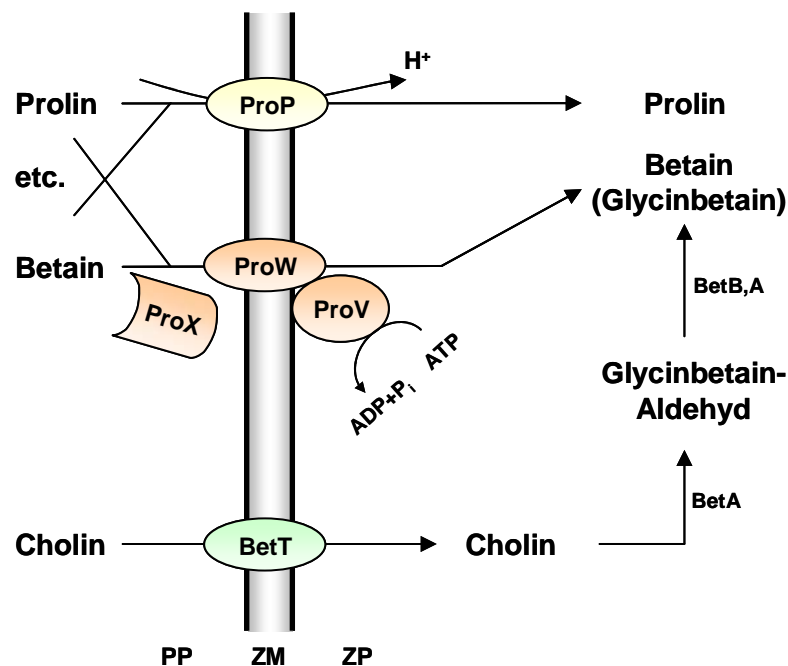


Abb. 1.3 Transporter für osmotische Schutzsubstanzen, bzw. deren Vorstufen in *E. coli*. Zur Erklärung siehe Text. PP: Periplasma; ZM: Zytoplasmamembran; ZP: Zytoplasma. ProP und ProU (ProVWX) besitzen ein recht breites Substratspektrum und können neben Glycinbetain und Prolin auch Prolinbetain sowie weitere Schutzsubstanzen transportieren. BetA: Cholin-Dehydrogenase; BetB: Glycinbetain-Aldehyd-Dehydrogenase.

Beide Transporter besitzen ein recht breites Substratspektrum und werden sowohl auf der Ebene der Expression, als auch auf der Ebene der Aktivität reguliert (Csonka & Epstein, 1996; Bremer & Krämer, 2000). Beide Transportsysteme werden verstärkt unter hyperosmotischem Stress induziert

und werden positiv durch Kalium, im Falle der Expression des *proU*-Operons (*proVWX*), sowie auf der Ebene der Aktivität von ProP, reguliert (Mellies *et al.*, 1995; Gowrishankar & Manna, 1996; Lucht *et al.*, 1994; Koo *et al.*, 1991; Racher *et al.*, 1999). Des Weiteren werden beide Operone durch RpoS in ihrer Transkription positiv beeinflusst, allerdings spielt RpoS für die Expression von *proP* unter osmotischem Stress und während der exponentiellen Wachstumsphase keine Rolle (Manna & Gowrishankar, 1994; Mellies *et al.*, 1995; Xu & Johnson, 1997; Hengge-Aronis, 1996b).

Neben der Aufnahme von exogenem Glycinbetain sind Mikroorganismen wie *E. coli* und *B. subtilis* in der Lage, dieses bei Abwesenheit im Zuge von hyperosmotischen Bedingungen zu synthetisieren. Die Synthese erfolgt dabei aus der Vorstufe Cholin, das von beiden Mikroorganismen nicht selbst synthetisiert werden kann. Beide Organismen besitzen zur Cholinaufnahme spezifische, unter hyperosmotischen Bedingungen in ihrer Expression stimulierte Transportsysteme; in *E. coli* BetT (Abb. 1.3) und in *B. subtilis* OpuB (ABC-Transporter). Beide Mikroorganismen wandeln in einer zweistufigen Oxidationsreaktion aufgenommenes Cholin zunächst in Glycinbetain-Aldehyd um. Anschließend wird die toxische Zwischenstufe in das Stoffwechselprodukt Glycinbetain überführt (Abb. 1.3, siehe Review Bremer & Krämer, 2000). Prolin, eine weitere vielfach vorkommende Schutzsubstanz, kann im Gegensatz zu *B. subtilis* von *E. coli* nicht verstärkt synthetisiert werden (Whatmore *et al.*, 1990). Grund hierfür liegt in der durch Prolin hervorgerufenen „Feedback Inhibierung“, der für die Prolin-Synthese benötigten Gene (Bremer & Krämer, 2000).

Unter hyperosmotischen Stressbedingungen kann Trehalose von *E. coli* nur genutzt werden, sofern diese Substanz durch die *de novo* Synthese von der Zelle hergestellt wird. Dies liegt daran, dass das für die Trehaloseaufnahme spezifische Phosphotransferase-System (PTS, TreB) unter hyperosmotischem Stress reprimiert wird und gleichzeitig, die unter der Kontrolle von RpoS stehende periplasmatisch lokalisierte Trehalase (TreA), auf der Ebene der Transkription stimuliert wird (Boos *et al.*, 1990; Rimmele & Boos, 1994; Gutierrez *et al.*, 1989; Hengge-Aronis, 1996a). Somit steht exogen zugefügte Trehalose unter moderaten Osmolalitäten nur als Energiequelle, nicht aber als kompatibles Solut für die Zelle zur Verfügung. Bei erhöhter Osmolalität erfolgt die *de novo* Synthese von Trehalose durch die Trehalose-6-P-Synthase (OtsA)-vermittelte Kondensation zweier Trehalosevorstufen: Glukose-6-P und UDP-Glukose. Trehalose entsteht anschließend durch die Dephosphorylierung des Intermediats Trehalose-6-P durch die Trehalose-6-P-Phosphatase (OtsB) (Csonka & Epstein, 1996). Das für diese Enzyme kodierende *otsBA*-Operon steht unter der Kontrolle von σ^S und verleiht *E. coli* zudem Thermotoleranz in der stationären Phase (Hengge-Aronis *et al.*, 1991).

III) Durch die oben beschriebenen Adaptationsmechanismen ist es vielen Mikroorganismen möglich im späteren Verlauf die ursprünglichen vegetativen Zellprozesse (Zellteilung, Proteinbiosynthese, etc.) wieder aufzunehmen. Die spezifische Adaptation von *Escherichia coli* auf den Umweltparameter Osmolalität, beinhaltet dabei ein sehr komplexes regulatorisches Netzwerk. Sie ist Teil der generellen

Stressantwort von *E. coli* und führt zu einer Vielzahl von sich überschneidenden primären/sekundären physiologischen Veränderungen, die auch unter anderen Stresssituationen zu beobachten sind.

Im Zuge dessen treten immer wieder charakteristische Proteine auf, die unterschiedlichste Funktionen in der Zelle ausüben können. Ein klassisches Beispiel stellen die so genannten „universellen Stress-Proteine“ (Usp's) dar, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

1.2 Die „universelle Stress-Protein“ (Usp)-Familie

Die Superfamilie der Usp-Proteine umfasst eine konservierte Proteingruppe, die sowohl in Bakterien, Archea, und Eukaryonten (Pilzen, Pflanzen) vorkommt. Dabei besitzt eine Vielzahl von Organismen ein ganzes Repertoire an Usp-Proteinen. Diese Proteine liegen vielfach als „single-type“ Proteine vor und bestehen aus einer einzigen konservierten Usp-Domäne (umfasst ca. 140-160 Aminosäurereste), die das gesamte Protein umfasst (Pfam Nr. PF00582; Bateman *et al.*, 2000). In einigen Fällen sind zwei Usp-Domänen direkt hintereinander auf einer Polypeptidkette lokalisiert („tandem-type“-Usp-Proteine).

E. coli besitzt insgesamt 6 über das gesamte Chromosom verteilte Gene, die für Proteine kodieren, die der Usp-Proteinfamilie zugeordnet werden können und vermutlich durch Genduplikation entstanden sind (Gustavsson *et al.*, 2002). Hierzu zählen die Gene *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE*, *uspF* und *uspG*. Dabei sind in *E. coli* einige dieser *usp*-Gene in enger Nachbarschaft zu anderen Genen lokalisiert, deren Produkte wichtige Funktionen bei verschiedensten Stressadaptationen übernehmen (Kvint *et al.*, 2003). So liegt *uspC* direkt stromabwärts des für die Synthese von Trehalose benötigten *otsBA*-Operon (Csonka & Epstein, 1996). *uspE* ist direkt stromabwärts des Gens *fnr* lokalisiert, dessen Produkt (FNR) den globalen Regulator bei der Adaptation hinsichtlich anaerober Bedingungen darstellt (Kiley & Beinert, 1998). Das Gen *uspG* (*ybdQ*) liegt direkt stromaufwärts der Gene *ahpC* und *ahpF*. Beide Genprodukte spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress, indem sie bei der Reduktion von organischen Hydroperoxiden beteiligt sind (Wood *et al.*, 2001).

Die entsprechenden *usp*-Genprodukte können aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen der Usp-Domänen in zwei Subfamilien, die UspA-Subfamilie und die UspFG-Subfamilie, unterteilt werden (Gustavsson *et al.*, 2002): Drei der Usp-Proteine, UspA (Gen: *uspA*), UspC (*uspC*, *yecG*) und UspD (*uspD*, *yiiT*) gehören phylogenetisch der UspA-Subfamilie an. Zwei weitere Proteine, UspF (*uspF*, *ynaF*) und UspG (*uspG*, *ybdQ*) können der zweiten UspFG-Subfamilie zugeordnet werden. Bei dem sechsten Usp-Protein UspE (*uspE*, *ydaA*) handelt es sich um ein „tandem-type“-Usp-Protein, das aus zwei Usp-Domänen besteht. Die zweite Domäne zeigt dabei im Sequenzvergleich eine enge Zugehörigkeit zur UspFG-Subfamilie, während die erste Domäne eher zwischen diesen beiden Subfamilien angeordnet werden kann (Abb. 1.4; Gustavsson *et al.*, 2002).

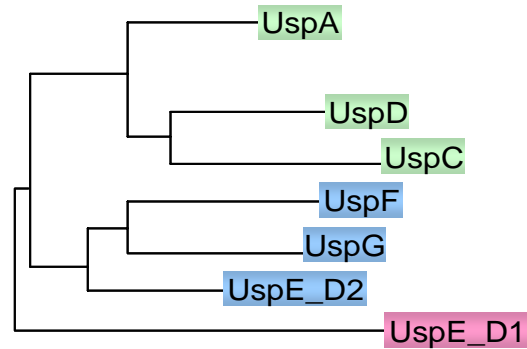


Abb. 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der Usp-Proteine aus *E. coli* (nach Gustavsson *et al.*, 2002). Der Stammbaum wurde gemäß der „neighbor-joining“ Methode nach Saitou & Nei, 1987 erstellt. **Blau hinterlegt** sind Proteine der UspFG-Subfamilie dargestellt; **grün hinterlegt** sind Vertreter der UspA-Subfamilie angedeutet. Bei dem UspE-Protein handelt es sich um ein „tandem-typ“-Usp-Protein. Dabei ist die UspE-Domäne Nr. 2 (C-Terminus, UspE_D2) der UspFG-Subfamilie zuzuordnen, während die N-terminale Domäne (UspE_D1, **pink hinterlegt**) phylogenetisch zwischen den beiden Usp-Subfamilien steht.

Die Kristallstrukturen zweier Usp-Proteine, die jeweils Vertreter beider Subfamilien repräsentieren, konnten inzwischen aufgeklärt werden. Dazu zählt zum einen die Struktur von UspA aus *Haemophilus influenzae* und zum anderen, die des Usp-Proteins MJ0577 aus *Methanococcus jannaschii*, einem Vertreter der UspFG-Proteinfamilie (Sousa & McKay, 2001; Zarembinski *et al.*, 1998). Beide Usp-Proteine lagen dabei in ihrer Kristallstruktur als Homodimere vor. Im Falle der Strukturaufklärung des MJ0577-Proteins konnte ATP co-kristallisiert werden. Erste biochemische Untersuchungen zur Enzymaktivität von MJ0577 zeigten, dass das MJ0577-Protein vermutlich eine faktorabhängige ATPase darstellt, dessen enzymatische Aktivität von einem oder mehreren zellulären Faktoren beeinflusst wird. So konnte im Gegensatz zu gereinigtem Protein nur eine Hydrolyse von ATP durch das MJ0577-Protein beobachtet werden, wenn *M. jannaschii*-Gesamtzellextrakt zum Reaktionsansatz zugeführt und gleichzeitig die Inkubationstemperaturen auf 80°C erhöht wurden. Eine eigenständige enzymatische Funktion konnte für das gereinigte Protein bislang nicht gezeigt werden (Zarembinski *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte in der Struktur von UspA aus *H. influenzae* kein gebundenes ATP nachgewiesen werden, obwohl beide Usp-Proteine eine sehr ähnliche Tertiärstruktur aufweisen. Aufgrund von Aminosäure-Sequenzunterschieden in der ATP-Bindetasche des MJ0577-Proteins zum *H. influenzae* UspA-Protein wird angenommen, dass beide Subfamilien womöglich unterschiedliche Ligandspezifitäten aufweisen (Sousa & McKay, 2001). Dabei scheinen Vertreter der UspFG-Subfamilie ATP zu binden, wohingegen Vertreter der UspA-Subfamilie dazu nicht in der Lage sind. Zudem existieren für UspF (YnaF) aus *E. coli* ebenfalls Experimentaldaten, die auf eine Bindung von ATP hindeuten (Saveanu *et al.*, 2002).

Durch *in vitro* Studien mit UspA aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass dieses Protein bei Zugabe von radioaktivem ATP und GTP phosphoryliert wird. Untersuchungen zur Säurestabilität von phosphoryliertem UspA und die Dünnschichtchromatographie entsprechender Hydrolyseprodukte konnten zeigen, dass die Phosphorylierung sowohl an einem Serin, wie auch an einem Threonin

erfolgt (Freestone *et al.*, 1997). Die *in vivo*-Phosphorylierungsrate von UspA wird allerdings in *E. coli* von einem zweiten Tyrosin-Phosphoprotein TypA (*typA*, *o591*), einem GTP-bindenden Protein, um ein Vielfaches verstärkt (Faktor 10.000). So wird in *E. coli typA::kan*-Mutanten eine Phosphorylierung von UspA bei Eintritt in die stationäre Phase verhindert (Freestone *et al.*, 1997). Zudem ist TypA für die Phosphorylierung mindestens 5 weiterer Proteine während Nährstofflimitation verantwortlich. Das UspA-Protein ist vermutlich ebenfalls an weiteren posttranslationalen Modifikationen anderer Proteine beteiligt; so führt eine Überproduktion von UspA zu einer Veränderung der isoelektrischen Punkte von mindestens 6 weiteren Proteinen (Nyström & Neidhardt, 1996). Ob TypA und UspA dabei gemeinsam an der Modifikation der Proteine involviert sind, ist bislang jedoch unbekannt (Nyström & Neidhardt, 1996).

Durch phänotypische Untersuchungen von *E. coli usp*-Mutanten konnte dem UspA-Protein eine wichtige Rolle bei der Überlebensrate nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass wachstumsinhibierende Bedingungen, wie höhere Mengen an CdCl₂, H₂O₂, DNP, CCCP und osmotischer Stress (1 M NaCl), denen die Zellen über einen längeren Zeitpunkt ausgesetzt waren, in *uspA::kan*-Insertionsmutanten zu einer starken Reduktion der Überlebensrate führten (Nyström & Neidhardt, 1994). Das UspA Protein wird dabei unter verschiedensten Bedingungen, wie dem Eintritt in die stationäre Phase, bei Nährstofflimitation von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphat, Schwefel und Aminosäuren, sowie bei moderater Hitze (bis 42°C), Ethanolstress (4%), osmotischem Stress, und in Anwesenheit einer ganzen Reihe toxischer Substanzen (Mitomycin C, H₂O₂, CCCP, DNP, etc.), verstärkt synthetisiert. Gleiche Bedingungen führten ebenfalls zu einer verstärkten Neusynthese der Usp-Proteine UspC, UspD und UspE in *E. coli*; diese werden somit koordiniert reguliert. Dabei scheint das Alarmon ppGpp essentiell für eine Induktion von *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE* zu sein (Gustavsson *et al.*, 2002; Kvint *et al.*, 2003). Zudem stehen die Gene *uspA* und *uspD* unter der negativen Kontrolle des FadR-Regulators, der bei der Regulation des Fettsäure-Metabolismus in *E. coli* eine wichtige Rolle spielt. FadR reguliert als Repressor die *fad*-Gene (Gene des Fettsäureabbaus) und als Aktivator die *fab*-Gene (Gene der Fettsäurebiosynthese) (Kvint *et al.*, 2003; Farewell *et al.*, 1996). Dabei wird während der stationären Phase *uspA* induziert, indem durch eine „stringente“ RNA-Polymerase die negative Regulation von *uspA* durch den FadR-Repressor aufgehoben wird (Kvint *et al.*, 2000). Welche Rolle UspA letztendlich bei dem Fettsäure-Metabolismus spielt ist bislang allerdings unklar. Einige Usp-Proteine aus *Mycobacterium smegmatis* stehen unter der Kontrolle eines „Zweikomponenten-Systems“. Dort wird ihnen eine Funktion bei der Adaptation unter anaeroben Bedingungen zugesprochen (O’Toole *et al.*, 2003). *uspG* scheint unter der Kontrolle des Histidinkinase/Antwortregulatorsystems NtrB/NtrC zu stehen. *E. coli*-Deletionsmutanten dieses Systems, zeigten eine verringerte Menge an *uspG*-Transkript (Kvint *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2002). Für UspA, UspC, UspD und UspE konnte eine wichtige kooperative Funktion bei der Resistenz gegen UV-Schäden gezeigt werden; die Funktionsweise ist allerdings weiterhin unbekannt. Es werden jedoch alle 4 Usp-Proteine benötigt, um *E. coli* eine gewisse Resistenz gegen UV-Schäden zu ermöglichen;

Mutationen in nur einem der genannten *usp*-Gene, führte bereits zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate (Gustavsson *et al.*, 2002). Ob die beschriebenen pleiotropen Effekte von *usp*-Mutanten letztendlich auf die bereits oben beschriebene posttranslationale Modifikation anderer Proteine zurückzuführen ist, ist bislang unklar.

Neben den Usp-Proteinen tragen auch eine ganze Reihe anderer Proteine unterschiedlichster Funktionen ein oder zwei Usp-Domänen („Hybridproteine“). Dazu zählen zum Beispiel einige Na⁺/H⁺-Antiporter, Aminosäure-Transporter, spannungsabhängige Cl⁻-Kanäle, Serin/Threonin-Kinasen und Protein-Kinasen (Kvint *et al.*, 2003). In der Sensorkinase KdpD aus *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* und einer Vielzahl weiterer Organismen, scheint ebenfalls eine Usp-Domäne im N-terminalen Bereich existent zu sein, auch wenn die Sequenzidentitäten von 10-17%, relativ gering sind. Mikroorganismen wie *Deinococcus*, *Myxococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Anabena* und *Synechocystis*, besitzen kein vollständiges KdpD-Protein, wie es z.B. in *E. coli* und anderen Organismen vorkommt. Trotzdem besitzt auch hier die N-terminale Domäne von KdpD in den verkürzten Formen (Aminosäure: 1- ca. 390) eine Usp-Domäne (AS: ~250-390). Bis heute ist jedoch die physiologische und biochemische Funktion der Usp-Domäne in den genannten „Hybridproteinen“ völlig ungeklärt. Auffällig ist, dass bei den oben erwähnten Hybridproteinen zumeist Usp-Domänen der UspFG-Subfamilie Verwendung finden.

Aufgabenstellung

Bislang existieren für *E. coli* eine ganze Reihe von Informationen über die Adaptationsprozesse hinsichtlich hyperosmotischer Stressbedingungen. Vielfach handelt es sich allerdings um Untersuchungen bezüglich der Rolle einzelner Gene und ihrer Genprodukte bei der Anpassung an steigende externe Osmolalität. Globalere Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese und transkriptionale Untersuchungen wurden bislang nur zu späteren Zeitpunkten (>25min) durchgeführt, wobei die dabei „identifizierten“ Proteine zumeist unbekannt blieben.

Globale transkriptionale und translationale Untersuchungen zur frühen Phase der Adaptation unter hyperosmotischem Stress fehlen bis dato in *E. coli* völlig. Da die Wahrnehmung des Umweltparameters Osmolalität und die Adaptation jedoch innerhalb kürzester Zeit ablaufen muss, sollten umfassende Untersuchungen globaler transkriptionaler und translationaler Veränderungen zu einem frühen Zeitpunkt (<15min) durchgeführt werden. Dazu sollten in *E. coli* durch den Einsatz bestimmter Methoden (DNA-Array-Technologie, 2D-Gelelektrophorese) daran beteiligte Gene und Proteine identifiziert werden. Interessante Kandidaten sollten für weitere Fragestellungen gereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Für diese Arbeit fanden folgende Materialien Verwendung:

Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
DNA-Polymerase	Gibco/BRL (Eggenstein)
2Log DNA Leiter (0,1-10kb)	New England Biolabs (Frankfurt)
„QIAprep-Spin-Miniprep“-Kit	Qiagen (Hilden)
„QIAquick-Gel-Extraction“-Kit	Qiagen (Hilden)
„QIAquick Nucleotide Removal“-Kit	Qiagen (Hilden)
„DNeasy-Tissue“-Kit	Qiagen (Hilden)
„RNeasy Mini“-Kit	Qiagen (Hilden)
„DyeEx-Spin“-Kit	Qiagen (Hilden)
„Centri-Sep-Spin Columns“	Princeton Separations (Adelphia, New York)
“Big Dye Terminator Ready-Reaction“-Mix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
[γ - ³² P]ATP	Amersham Biosciences (Freiburg)
[α - ³² P]ATP	Amersham Biosciences (Freiburg)
[α - ³² P]dCTP	Amersham Biosciences (Freiburg)
[α - ³³ P]dCTP	Amersham Biosciences (Freiburg)
L-[³⁵ S]Methionin (<i>in vivo</i> cell labeling grade)	Amersham Biosciences (Freiburg)
„Mark12“-Proteinstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
„SeeBlue Plus2 Pre-stained“-Proteinstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
Antiserum α KdpFABC	A. Siebers (Universität Osnabrück)
Ziege-anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper-AP	Biomol (Hamburg)
Esel-anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper-HRP	Pierce (Rockford, Illinois)
Penta-His-Antikörper	Qiagen (Hilden)
Ziege-anti-(Maus-IgG)-Antikörper-AP	Pierce (Rockford, Illinois)
Esel-anti-(Maus-IgG)-Antikörper-HRP	Pierce (Rockford, Illinois)
“ECL Super Signal“-Entwicklerlösung	Pierce (Rockford, Illinois)
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid	Calbiochem (La Jolla, Kalifornien)
KdpFABC	M. Bramkamp (Universität Osnabrück)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Hybond N Nylon-Membran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Immobilon-P (PVDF)-Membran	Millipore (Eschborn)
Nitrozellulose-Filter	Millipore (Eschborn)
Panorama™ <i>E. coli</i> Gene Array	Sigma-Genosys Ltd. (The Woodlands, Texas)
<i>E. coli</i> cDNA Labeling Primers (ORFmers)	Sigma-Genosys Ltd. (The Woodlands, Texas)
AMV Reverse Transkriptase (RT), inkl. Puffer	Sigma-Genosys Ltd. (The Woodlands, Texas)
dNTPs (dATP, dGTP, dTTP)	Gibco/BRL (Eggenstein)
„RNase-free DNase“ Set	Qiagen (Hilden)
„Rediprime™ II“-Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Immobiline™ DryStrips (IPG) pH 3-10, pH 4-7	Amersham Biosciences (Freiburg)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de

Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad "pro analysis" bezogen.

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tab. 2.1 aufgelistet. In Tab. 2.2 und 2.3 sind die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
AW0607	BW25113 mit $\Delta uspG'::cat$ (Cm^R)	diese Arbeit
BL21(DE3)pLysS	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysS (Cm^R)	Studier & Moffatt (1986)
BW25113	$lacI^q rrnB_{T14} \Delta lacZ_{WJ16} hsdR514 \Delta araBAD_{AH33} \Delta rhaBAD_{LD78}$	Datsenko & Wanner (2000)
JM109	$recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 \Delta(lac-proAB)/F'[traD36 proAB lacI^q lacZ\Delta M15]$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
MC4100	$F^- araD139\Delta(argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25$	Casadaban (1976)
TN3151	$uspA::kan$ -Mutante in <i>E. coli</i> W3110	Nyström & Neidhardt (1994)

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
pKD3	Cm^R	2804 bp pANTS γ Derivat mit <i>FRT</i> flankierter Chloramphenicol Kasette (<i>cat</i>)	Datsenko & Wanner (2000)
pKD46	Ap^R	6329 bp pINT-ts Derivat; <i>araC-P_{araB} γ β exo</i> (λ Red Rekombinase)	Datsenko & Wanner(2000)
pET-16b	Ap^R	5711 bp Expressionsvektor, N-terminaler 10His-Tag unter T7 Promotor Kontrolle	Novagen
pET-UspG	Ap^R	<i>uspG</i> in pET-16b über <i>NdeI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pET-UspG(1-136)	Ap^R	<i>uspG</i> ¹⁻¹³⁶ in pET-16b über <i>NdeI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
b0607(ybdQ) sense	5'-ATGTATAAGACAATCATTAT-3'
b0607(ybdQ) antisense	5'-TTAACGCACAACCAGCACC-3'
b0753(ybgS) sense	5'-ATGAAAATGACAAAACCTGGCCAC-3'
b0753(ybgS) antisense	5'-TTACTGCGTGGTACCGTCGGTTTTGG-3'
b1481(yddx) sense	5'-ATGTGCTTTATAAATCTGCGATCC-3'
b1481(yddx) antisense	5'-TTAAAGCGTAGGGTGCTGGCCAC-3'
cspA sense	5'-ATGTCCGGTAAAATGACTGGTATC-3'
cspA antisense	5'-TTACAGGCTCGTTACGTTACCAGC-3'
dps sense	5'-ATGAGTACCGCTAAATTAGTTAAATC-3'
dps antisense	5'-TTATTCCATGTTAGACTCGATAAAC-3'
hupA sense	5'-ATGAACAAGACTCAACTGATTGAT-3'
hupA antisense	5'-TTACTTAACTGCGTCTTTCAGTGC-3'
kdpA sense (R400Q sense)	5'-CTGATGATTGGTCAGACACCCGAGTATCTG-3'
kdpA antisense	5'-TCAGGAGAGATATTCCGCCACCGG-3'
kdpB sense	5'-ATCAGGTTGCGCCTCAGGGAGCCA-3'
kdpBrev (H4H5rev)	5'-GGATCCTTACTATTACTGTTTGCCAATGTGCAC-3'
kdpC sense	5'-TGATACGGTGCGCGGTTCCGGCAT-3'
kdpC antisense	5'-CGGCAATTCGTTATTCATCAAGTTTATCC-3'
metE sense	5'-ATGACAATATTGAATCACACCCTCG-3'
metE antisense	5'-TTACCCCGACACAAGTTCTGCGC-3'
ompC sense	5'-ATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTC-3'
ompC antisense	5'-TTAGAACTGGTAAACCAGACCCAG-3'
ompF sense	5'-ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAG-3'
ompF antisense	5'-TTAGAACTGGTAAACGATACCCAC-3'
ompT sense	5'-ATGCGGGCGAAACTTCTGGGAATAG-3'
ompT antisense	5'-TTAAAATGTGTACTTAAGACCAGC-3'
osmY sense	5'-ATGACTATGACAAGACTGAAGATTTC-3'
osmY antisense	5'-TTACTTAGTTTTTCAGATCATTTTTAACG-3'
otsA sense	5'-ATGAGTCGTTTAGTCGTAGTATCTAAC-3'

(1989), das MOPS-MM nach Neidhardt *et al.* (1974) und das TrisG-MM nach Echols *et al.* (1961) Verwendung. Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% Agar (w/v) hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg/ml (Kanamycin), bzw. 34 µg/ml (Chloramphenicol) zugesetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgte aerob bei 37°C. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 420 nm oder 600 nm in einem Uvikon 943-Spektralphotometer (Kontron Instruments) bestimmt.

2.3.2 Phänotypische Untersuchungen

Für die vergleichenden phänotypischen Untersuchungen einer *E. coli uspG*-Mutante (AW0607, 2.4.11) und dem entsprechenden isogenen *E. coli* BW25113-Mutterstamm wurden die Zellen für die Bestimmung der Wachstumsraten wie unter 2.3.1 beschrieben in entsprechenden Minimalmedien angezogen und der Wachstumsverlauf bei einer Optischen Dichte bei 420 nm spektrophotometrisch verfolgt. Als Stress-induzierende Substanzen kamen 1 M NaCl (0-7h Inkubation bei $OD_{420} = 0,5$) und 3 mM H_2O_2 (0-60min) in Glukose-Minimal-MOPS Medium zum Einsatz (Nyström & Neidhardt, 1994). Nach entsprechenden Zeitpunkten wurden Verdünnungsreihen der Zellkulturen durchgeführt und die Zellen auf LB-Platten über Nacht inkubiert. Die Überlebensrate erfolgte anschließend durch Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (cfu). Zur Kontrolle wurde die *E. coli uspA*-Mutante (TN3151; Nyström & Neidhardt, 1994) verwendet, die zuvor hinsichtlich ihrer Richtigkeit durch PCR mittels der Primer *uspA* sense und *uspA* antisense überprüft wurde. Des Weiteren wurden Zellen der oben genannten Stämme mittels Verdünnungsreihe auf LB-Platten ausplattiert und anschließend mit UV-Licht (~280-312 nm, Schütt) für 0-4min (ca. 30 cm Abstand zum Objekt) exponiert (Gustavsson *et al.*, 2002). Anschließend wurde die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt. Zum testen der Mitomycin C-Sensitivität der Stämme AW0607, BW25113 und TN3151 wurde Zellen in LB-Medium angezogen, 1:10 in M9-MM verdünnt und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen Mitomycin C (0-15 µg/ml) versetzt und für 1h weiter inkubiert. Anschließend wurden das Mitomycin C durch waschen entfernt und die Zellen nach entsprechenden Verdünnungsreihen auf LB-Platten ausplattiert (Diez *et al.*, 2000). Untersuchungen zum Einfluss von CCCP auf die Überlebensrate von *E. coli* AW0607 und BW25113 erfolgte durch ausplattieren (LB-Platten + 0-40 µM CCCP) der Stämme entsprechender Verdünnungsreihen, die zuvor in 0,132 mM Phosphat-versetztem TrisG-MM bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C angezogen wurden (Bochkareva *et al.*, 2002). Auch hier erfolgte anschließend die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten als Maß für die Überlebensrate der Stämme. Zur Untersuchung der Wachstumswiederaufnahme von AW0607 und BW25113 wurden Zellen in 1,32 mM versetztem TrisG-MM (2.3.1) für 20h bei 37°C angezogen und anschließend unter Phosphat-limitierenden Bedingungen in TrisG-MM [0,06 mM KH_2PO_4] überführt und das Wachstum über 11 Stunden weiter spektrophotometrisch (OD_{600}) verfolgt (Bochkareva *et al.*, 2002).

2.4 Molekularbiologische und Genetische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen mittels des "QIAprep-Spin-Miniprep"-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert und in 30-50 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus 0,25 ml Übernachtskulturen mittels des "DNeasy-Tissue"-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurde dabei nach dem empfohlenen Protokoll für Gram-negative Bakterien verfahren. In Abwandlung des Protokolls wurde die DNA zweimal in 100 µl EB-Puffer aufgenommen. Die Eluate wurden anschließend vereinigt.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1987) durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1,0-1,5% Agarose (w/v) in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer [50% Glycerin (v/v); 0,1 M EDTA; 1% SDS (w/v); 0,1% Bromphenolblau (w/v)] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragment-Größen diente 1 kb DNA-Leiter-Standard oder 2Log-Leiter-Standard der Firmen Gibco/BRL (Eggenstein) oder New England Biolabs (Frankfurt). Der Gellauf wurde in einer "Mini Sub DNA Cell"-Agarosegel-Laufkammer (BioRad, München) bei konstant 100 V für 30-60min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit der Gel-Dokumentationsanlage "E.A.S.Y."store (Herolab, Wiesloch).

2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des "QIAquick-Gel-Extraction"-Kit nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

2.4.6 Markierung von DNA

DNA Fragmente wurden mittels ORF-spezifischer Primer über PCR nach Isolation chromosomaler DNA aus *E. coli* MC4100 amplifiziert (siehe Tab. 2.3). DNA Fragmente, die als Sonden für Northern-Hybridisierungen eingesetzt wurden, sind standardmäßig mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP mit Hilfe des „Rediprime™ II“-Kit nach Angaben des Herstellers markiert worden. Dabei wurde pro Reaktion jeweils 50-100 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Die Reaktion wurde für 10min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 5 μl EDTA [200 μM , pH 8,0] abgestoppt. Die markierte Sonde wurde anschließend mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal“-Kits von überschüssiger Radioaktivität nach Angaben des Herstellers befreit und in 50 μl Elutionspuffer bei -20°C aufbewahrt. DNA-Fragmente bzw. Primer (wurden zuvor für 10min bei 95°C aufgekocht und auf Raumtemperatur langsam abgekühlt), die für die Gelretardations-Experimente (2.5.3) eingesetzt wurden, wurden mittels 10 U T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, Frankfurt) in entsprechendem Puffer in einem Reaktionsvolumen von 50 μl nach Angaben des Herstellers für 1h bei 37°C mit 5 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) markiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 μl 0,5 M EDTA wurde überschüssige Radioaktivität mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal“-Kits (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers entfernt und die DNA in 30 μl Elutionpuffer bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7 Northern-Blotting und Hybridisierung

DNaseI-behandelte RNA-Proben (4 μg), die auch für die DNA-Microarray-Untersuchungen Verwendung fanden (2.4.8ff), wurden für 10min bei 68°C in RNA-Denaturierungslösung [50% Formamid (v/v); 6,5% Formaldehyd (v/v); 1 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0)] denaturiert. Der Transfer der RNA aus drei unabhängigen Experimenten auf eine Hybond-N Nylon Membran erfolgte mittels einer Vakuum Transferapparatur der Firma Gibco/BRL (Eggenstein), nachdem die Proben 1:2 in 20 x SSC verdünnt wurden. Die RNA Proben wurden anschließend durch zweistündiges Backen bei 120°C mit der Nylonmembran quervernetzt. Als Positivkontrollen zur Hybridisierung der DNA-Sonden mit der RNA diente chromosomale DNA von *E. coli* MC4100 (100 ng) und PCR Produkte (20-30 ng) der zu verifizierenden Gene. Nach Vernetzung wurde die Membran mit 7,5 ml Hybridisierungslösung [5 x SSC; 5 x Denhardt's Reagenz (siehe 2.4.8.3); 0,1% SDS (w/v); 1 μg Heringsperma DNA (Boehringer, Mannheim)] für zwei Stunden bei 60°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP-markierte DNA-Sonde wurde kurz vor der Verwendung für 10min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte dann durch Zugabe der jeweiligen [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP-markierten DNA-Sonde (5-25 ng) zu der Membran in 7,5 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 60°C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5min mit 40 ml Waschlösung [2 x SSC; 0,1% SDS (w/v)] bei 42°C gewaschen. Die inkubierten Membranen wurden anschließend kurz auf Filterpapier getrocknet und für mindestens 24h unter einem „Storage

Phosphor Screen“ (Molecular Dynamics, Freiburg) exponiert. Eine entsprechende Quantifizierung der Hybridisierungssignale (Doppelbestimmung) erfolgte mittels der Software ImageQuant (Version 5.0).

2.4.8 „Transcriptomics“: DNA-Macroarray-Analysen

Typische transkriptionale Expressionsstudien umfassen folgende 5 Schritte:

- 1) Zellanzucht unter den bestimmten zu untersuchenden Bedingungen (s. u.);
- 2) RNA Isolation (2.4.8.1);
- 3) Herstellung radioaktiv markierter cDNA der entsprechenden RNA (2.4.8.2);
- 4) Hybridisierung der markierten cDNA mit den Arrays (2.4.8.3);
- 5) statistische Auswertung der entsprechenden Signalintensitäten (2.4.8.4; 3.1.1).

Analysen globaler stressinduzierter transkriptionaler Veränderungen unter Kaliumlimitation und Osmostress wurden in je drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Hierzu wurde *E. coli* MC4100 über Nacht aerob bei 37°C in K10-MM mit 0,4% Glukose (w/v) angezogen (Epstein & Kim, 1971) und anschließend 1:50 in selbigem Medium verdünnt (50 ml Kulturvolumen). Das Wachstum wurde spektrophotometrisch bei 600 nm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 verfolgt. Zu diesem Zeitpunkt wurden Zellaliquots (je 10 ml Kultur) über eine 0,45 µm Nitrozellulose-Membran (Millipore, Eschborn) filtriert und im Zuge der Kaliumlimitation in frisches vorgewärmtes K0,1-MM bzw. als Kontrolle in K10-MM resuspendiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Im Falle der Untersuchungen hinsichtlich Osmostress wurden Zellen in K10-MM bis zu einer Optischen Dichte von 0,6 angezogen. Anschließend wurden je 10 ml Zellen in K10-MM + 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol durch Filtration überführt (Kontrolle in K10-MM ohne NaCl bzw. Sorbitol) und für weitere 9min inkubiert. Im Falle des Vergleichs von in K10-MM und K115-MM Medium angezogenen Zellen wurden entsprechende über Nacht Kulturen von *E. coli* MC4100 1:50 in entsprechende Medien überführt und anschließend für 3h bei 37°C aerob angezogen (Optische Dichte bei 600 nm: 0,6). Die anschließende RNA Isolation erfolgte wie unter 2.4.8.1 beschrieben.

2.4.8.1 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA aus *E. coli* MC4100 erfolgte nach entsprechender Anzucht (2.4.8) mittels der sauren Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Methode nach Aiba *et al.* (1981) aus jeweils 10 ml Zellkultur, wobei sämtliche für die RNA-Isolation benötigten Lösungen mit 0,1% DEPC (v/v) behandeltem ddH₂O in sterilen Gefäßen angesetzt und möglichst alle Reinigungsschritte auf Eis durchgeführt wurden. Die erhaltenen RNA-Proben wurden durch RNase-freie DNase-Behandlung der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers auf „RNeasy“ Säulchen von möglichen DNA Kontaminationen befreit. Die Eluate wurden in 0,1% DEPC-ddH₂O (v/v) bei -20°C für mehrere Wochen gelagert. Kontrolle auf Reinheit der RNA Proben erfolgte visuell anhand der 16S- und 23S

rRNA Banden über Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.4.4) sowie spektrophotometrisch durch das Verhältnis OD₂₆₀/280 in einer UVette der Firma Eppendorf mit Hilfe eines Spektrophotometers (Eppendorf Bio Photometer). Zur weiteren Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen wurde mittels PCR-Test untersucht, ob Produkte des *kdpFABC*-Operons gewonnen werden konnten. Die RNA Konzentrationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bei 260 nm bestimmt und entsprechend auf 1 µg/µl eingestellt. Dabei entspricht OD₂₆₀ = 1 einer RNA Menge von 40 µg/ml.

2.4.8.2 cDNA Synthese und Markierung

Die cDNA Synthese erfolgte in einem 30 µl Reaktionsansatz, der neben 1 µg Gesamt-RNA je 330 µM dATP, dGTP, dTTP (Gibco/BRL, Eggenstein) sowie 4 µl „*E. coli* cDNA Labeling Primer“ (ORFmers) in entsprechendem Transkriptase-Puffer der Firma Sigma-Genosys [5 x Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 8,8; 40 mM MgCl₂; 150 mM KCl; 5 mM DTT] enthielt. Der Vorteil dieser ORF-spezifischen Primer besteht darin, das generelle Problem der hohen Anteile an rRNA und tRNA in *E. coli* Gesamt-RNA Isolaten zu umgehen und somit eine effizientere Markierung der cDNA zu erzielen. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 2min bei 90°C denaturiert, und anschließend innerhalb von 20min schrittweise auf 42°C in einem PCR-Gerät der Firma Eppendorf abgekühlt. Bei Erreichen der 42°C wurde die cDNA Synthese durch Zugabe von 50 U AMV Reverse Transkriptase (Sigma-Genosys) und 30 µCi [$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP (2000-3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) gestartet und für weitere 3h bei 42°C inkubiert. Die radioaktiv markierte cDNA wurde anschließend mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal“-Kits von überschüssiger Radioaktivität nach Angaben des Herstellers befreit und direkt für die Hybridisierung eingesetzt.

2.4.8.3 DNA-Macroarray Hybridisierung

Die verwendeten „Panorama™ *E. coli* Gene Macroarrays“ der Firma Sigma-Genosys wurden in 2x SSPE [0,36 M NaCl; 20 mM Natriumphosphat, pH 7,7; 1 mM EDTA] für 5min gewässert und anschließend mit 7,5 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung [5 x SSPE; 2% SDS (w/v); 1 x Denhardt's Reagenz (0,02% Ficoll (v/v); 0,02% Polyvinylpyrrolidon (v/v); 0,02% BSA (w/v))]; 100 µg/ml denaturierter Heringsperma DNA] für 1,5h bei 65°C in einem Hybridisierungssofen vorinkubiert. Die gesamte [$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP-markierte cDNA wurde kurz vor der Verwendung für 10min bei 90-95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte dann durch Zugabe der [$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP-markierten cDNA zu der Membran in 5 ml Hybridisierungslösung über Nacht (ca. 19h) bei 65°C. Anschließend wurde die Membran einmal für 5min mit 40 ml Waschlösung [0,5 x SSPE; 0,2% SDS (w/v)] bei RT und anschließend noch zweimal für je weitere 20min bei 65°C gewaschen. Die DNA-Macroarrays wurden anschließend kurz auf Zellstoff für 3min getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschweißt und für mindestens 24h je nach Signalintensitäten unter einem „Storage Phosphor Screen“ exponiert. Membranen konnten mehrfach (3-5mal) benutzt werden indem die Arrays nach Exposition für 20min

in Stripping-Puffer [1% SDS (w/v); 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0] bei 90°C inkubiert wurden. Eine Lagerung bereits benutzter Arrays erfolgte bei -20°C.

2.4.8.4 Datenanalyse

Die Quantifizierung sämtlicher offenen Leseraster (ORF's) erfolgte mittels der Arrays-Vision v5.1 Software (Imaging Research, Inc.). Sämtliche Daten wurden nach entsprechender Bearbeitung in Microsoft Excel Tabellen aufgenommen und mit Hilfe des statistischen Programms „SAM“ („Significance Analysis of Microarrays“) (Tusher *et al.*, 2001) ausgewertet. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der in ihrer Expression signifikant veränderten Gene mit Hilfe des „Student's t-Test“-Programms „EZSTAT-E“. Die Kriterien, die bei der Auswertung hinsichtlich der Signifikanz der veränderten RNA-Mengen vorausgesetzt wurden werden im Rahmen der Ergebnisse beschrieben (3.1.1).

2.4.9 Kompetente Zellen und Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches Medium überimpft und aerob bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3-0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 x g für 10min abzentrifugiert und in dem halben Volumen kalter Lösung A (10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl) resuspendiert. Nach erneuter zehnmütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (10 mM MOPS, pH 7,5; 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl) resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für Transformationen verwendet. Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 100-200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1,5min bei 42°C) wurde zu jedem Ansatz 1 ml KML-Medium gegeben und für mindestens eine Stunde aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 200 µl des Transformationsansatzes, bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurde der gesamte Ansatz in einem Volumen von 200 µl ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C sofern keine Plasmide mit temperatursensitiven Replikons (z.B. pKD46, 30°C) verwandt wurden (2.4.11).

2.4.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“, welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Als Primer fanden verschiedene synthetische Oligonukleotide

(Invitrogen GmbH, Karlsruhe) Verwendung, welche komplementär zu bestimmten Abschnitten im *uspG*-Gen bzw. zu äußeren Bereichen des *uspG*-Gens waren. Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl mit entweder 200-500 ng Plasmid-DNA, oder mit entsprechender Menge an PCR-Produkt, 3 pmol Primer und 4 µl "Big Dye Terminator Ready-Reaction"-Mix in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg). Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte dabei pro Reaktionszyklus für 0,5min bei 96°C, das Anlagern der Primer für 0,25min bei 45°C und die DNA-Amplifikation für 4min bei 60°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gekühlt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe von "Centri Sep Spin Columns" oder dem "DyeEx Spin"-Kit nach Angaben des jeweiligen Herstellers gereinigt und das "Pellet" in einer Vakuumzentrifuge bei 42°C getrocknet. Die Proben wurden anschließend in einem "ABI Prism 377 DNA Sequenzer" oder einem "ABI Prism 310 Genetic Analyser" (Applied Biosystems) einer Elektrophorese unterzogen und ausgewertet (Spezielle Botanik, Universität Osnabrück). Alternativ wurden DNA-Sequenzanalysen durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) mit entsprechendem Plasmid und Primer durchgeführt und ausgewertet.

2.4.11 Stammkonstruktion

Der Stamm *E. coli* AW0607 entstand durch Teildeletion des *uspG*-Gens (Δ UspG 45-115) in *E. coli* BW25113 bei gleichzeitiger Insertion des Chloramphenicol-Resistenzgens (*cat*) in *uspG* mittels homologer Rekombination nach einer Methode von Datsenko & Wanner (2000). Dazu wurde *E. coli* BW25113 mit dem Vektor pKD46 (trägt „ λ Red Recombinase“) transformiert (2.4.9) und über Nacht bei 30°C mit 100 µg/ml Ampicillin in SOB-Medium [2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v); 0,0584% NaCl (w/v); 0,018% KCl (w/v)] und 1% Arabinose (w/v) angezogen. Um elektrokompente Zellen zu erhalten, wurden Zellen der über Nacht Kultur 1:50 in frischem 0,2% Arabinose-haltigem SOB-Medium verdünnt und bei OD₆₀₀ = 0,5 durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem Wasser bzw. 10% Glycerol (v/v) behandelt. 10-20 ng *DpnI*-verdautes PCR-Fragment wurde anschließend durch Elektroporation (BioRad-MicroPulser) in BW25113/pKD46 hineingebracht. PCR Fragmente (1,1 kb) entstanden mittels pKD3 als Matrizen-DNA und *cat*-homologer Primer (Δ ybdQ(H2P2) sense, Δ ybdQ(H1P1) antisense), die homologe Bereiche (je 41 nt) zu *uspG* tragen. Die Zellen wurden nach Elektroporation für 1h bei 37°C in 1 ml SOC-Medium [SOB + 20 mM MgCl₂; 20 mM Glukose] inkubiert, für 24h bei RT stehen gelassen und anschließend hinsichtlich der Chloramphenicol-Resistenz und auf Verlust des pKD46 Vektors (pKD46-Vektor besitzt temperatursensitives Replikon) bei 37°C selektioniert. Die Richtigkeit der Insertion des *cat*-Gens in *uspG* (Δ *uspG'*::*cm*) erfolgte durch Kolonie-PCR und Sequenzierung mit externen Primern (*ybdQ*-ext. sense, *ybdQ*-ext. antisense), die homolog zu chromosomalen Bereichen außerhalb des *uspG*-Gens von *E. coli* AW0607 waren bzw. durch entsprechende Kombinationen der oben genannter Primer. Als PCR-Kontrolle diente chromosomale DNA von *E. coli* BW25113.

2.4.12 Konstruktion der Plasmide

Das Plasmid pET-UspG entstand durch Amplifikation eines DNA-Fragmentes von chromosomaler DNA aus *E. coli* MC4100 mit den Primern ybdQ-NdeI sense und ybdQ-BamHI antisense. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pET-16b ligiert. Das Plasmid pET-UspG(1-136), welches für ein um 6 Aminosäuren C-terminal verkürztes UspG-Protein kodiert, entstand durch Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus pET-UspG mit den Primern ybdQ-NdeI sense und ybdQ-(Δ C137-142)-BamHI antisense. Das dabei entstehende DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und in entsprechend linearisierten Vektor pET-16b ligiert. Alle Konstrukte wurden mittels Restriktionsanalysen und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.4.13 RT-PCR

Die reverse Transcription der mRNA-Transkripte von *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* erfolgte mittels der jeweiligen Primer (Tab. 2.3, je 5 pmol) und durch Zugabe von je 330 μ M dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Gibco/BRL, Eggenstein) wie unter 2.4.8.2 beschrieben. Als Matrizen-RNA dienten Gesamt-RNA-Proben, die auch für die DNA-Macroarray Untersuchungen zum Einsatz kamen (2.4.8.1). Die gewonnene cDNA wurde über das „QIAquick Nucleotide Removal“-Kit gereinigt und anschließend einer PCR unterzogen. Dabei kamen jeweils 5 pmol der jeweiligen Primer und eine vom Hersteller (Applied Biosystems, ABI) bereitgestellte Polymerase im entsprechenden Puffer („SYBR-Green RT-PCR-Kit“) zum Einsatz. Die PCR wurde anschließend online in einem „GeneAmp5700 Sequence Detection System“ der Firma ABI über 25 Zyklen verfolgt und anschließend die Ausgangsmenge an cDNA der jeweiligen Gene *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* mit entsprechender Software der Firma ABI bestimmt.

2.5 Biochemische und Analytische Methoden

2.5.1 Reinigung von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118)

Die Reinigung von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) erfolgte mittels Ni^{2+} -NTA (Triazetonitril)-Agarose im „batch“-Verfahren. Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG bzw. *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG(1-136) in Luria-Bertani-Medium bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,6$ bei 25°C inkubiert und anschließend für weitere 3h mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Sorval RC5C-Zentrifuge für 15min bei 10.000 rpm pelletiert und anschließend in Waschpuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl_2] gewaschen. Die Zellpellets wurden in Aufschlusspuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 0,5 mM PMSF bzw. Sigma Protease-Inhibitor-Cocktail; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 30 ng/ml DNase] resuspendiert [0,2 g Zellen (Feuchtwicht)/ml Puffer] und nach Homogenisierung mit Hilfe des Hochdruck-

Zellaufschlussgerätes der Firma IUL Instruments (Königswinter) aufgeschlossen. Nach Zellaufschluss folgte eine niedertourige Zentrifugation bei 10.000 rpm (4°C) gefolgt von 45min Zentrifugation bei 60.000 x g (Beckmann Optima L-70K) und 4°C um lösliche Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen. Das Zytosol (13 mg Gesamtprotein) wurde mit 40 mM Imidazol und 10 mM β -Mercaptoethanol versetzt und anschließend mit zuvor äquilibrierter (2x mit Reinigungspuffer: [40 mM Imidazol; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 0,5 M NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,4 mM PMSF] Ni²⁺-NTA-Agarose (200-300 μ l) (Qiagen, Hilden) für 60min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach Absetzen der Ni²⁺-NTA-Agarose wurden nichtgebundene Proteine durch dreimaliges Waschen der Agarose mit jeweils 8 ml Reinigungspuffer (s.o.) entfernt. Die Elution der UspG-Proteine erfolgte durch zweimalige Zugabe von je 1 ml Elutionspuffer [250 mM Imidazol; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 0,5 M NaCl; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1,4 mM PMSF]. Durch Dialyse der Eluate in tausendfachem Volumen Dialysepuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 80 mM NaCl; 1 mM β -Mercaptoethanol] für 2h und anschließend über Nacht, konnte das Imidazol entfernt werden. Die dialysierten Proteinfractionen wurden durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Sofern angegeben, wurden die Proteine 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) aus dem Zytosol durch eine 35%ige Ammoniumsulfat-Fällung (0,194 g/ml) für 1h bei 4°C von einem Grossteil der zytoplasmatischen Proteine getrennt und anschließend für 30min (10.000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Gefälltes Protein wurde dann in 1/3 Aufgangsvolumen in Reinigungspuffer (s.o.) renaturiert und wie oben beschrieben im „batch“-Verfahren gereinigt.

2.5.2 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden sowohl für Lösungen mit Gesamtzellextrakten wie auch für gereinigte Proteinfractionen mit geringeren Proteinkonzentrationen mittels einer Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Pierce) verwendet.

2.5.3 Gelretardations-Experimente

Untersuchungen potentieller DNA-Protein-Wechselwirkungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dazu wurde ein 443 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus chromosomaler DNA von *E. coli* MC4100 mit Hilfe der Primer ybdQ-inter. sense und ybdQ-inter. antisense amplifiziert und radioaktiv markiert (2.4.6). Zusätzlich wurden synthetische Doppelsträngige DNA-Fragmente verwendet, die zum einen eine gekrümmte Konformation (SOA sense und SOA antisense) bzw. eine nicht gekrümmte Konformation (SOB sense und SOB antisense) einnehmen (Azam & Ishihama, 1999). Doppelsträngige synthetische DNA-Fragmente wurden dabei nach entsprechendem Aufkochen und anschließender Reduktion der Temperatur erhalten und ebenfalls entsprechend Abschnitt 2.4.6 radioaktiv markiert. Ein typischer Bindungsansatz umfasst 2-15 ng radioaktiv markierte DNA (60.000

cpm) mit unterschiedlichen Konzentrationen an gereinigtem 10His-UspG im Puffer [20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 32 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 4 mM β-Mercaptoethanol] in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Wenn angegeben, wurden als Kompetitor-DNA 1 µg poly(dIdC) je Reaktionsansatz zugesetzt, der gesamte Reaktionsansatz für 10min bei variierenden Temperaturen (4-37°C) inkubiert und anschließend mit „Sucrose-Dye“-Lösung [0,25% Bromphenolblau (w/v); 0,25% Xylencyanol (v/v); 40% Saccharose (w/v)] versetzt. Die Trennung von DNA und DNA-Protein-Komplexen erfolgte auf einem nativen 5% PAA-Gel [37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid]. Der Gellauf wurde für 3,5h in einer SE400-Elektrophoresekammer (Hoefer) für große Gele in 1 x TBE-Laufpuffer [90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0] bei konstant 110 V bei 4°C durchgeführt. Die Gele wurden anschließend für 1h auf Filterpapier mittels eines „Slab Gel Dryer SE1160“-Vakuumtrockners (Hoefer, Freiburg) bei 80°C getrocknet und unter einem „Storage Phosphor Screen“ für 2h exponiert.

2.5.4 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm oder 16 x 20 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9%. Im Trenngel variierte die Acrylamidkonzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 10% und 12,5%. Die SDS-Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung [30% Acrylamid (v/v); 0,8% Bisacrylamid (w/v)] (Biozym Diagnostics GmbH) hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% Glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 5% β-Mercaptoethanol (v/v) und 0,005% Bromphenolblau (w/v) erzielt wurde. Der Aufschluss „ganzer Zellen“ erfolgte nach Pelletieren der Zellen (1 ml OD₆₀₀ = 0,5) durch Zugabe von 150 µl SDS-Probenpuffer. Als Proteinstandard wurde „Mark12“ bzw. „SeeBlue Plus2 Pre-stained“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Gellauf wurde in einer „Mini-Protean“-Laufanlage (BioRad) für Minigele bei konstant 200 V bzw. in einer SE400-Elektrophoresekammer (Hoefer) für große Gele bei konstant 60 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber & Osborn (1969) detektiert, wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine zusätzlich 10% TCA (w/v) enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in 5% Methanol (v/v) und 7,5% Essigsäure (v/v). Alternativ wurde eine sensitivere Detektion der Proteine mittels Silberfärbung erzielt (Blum *et al.*, 1987). Zur Konservierung wurden die Gele anschließend zwischen Folie bei 80°C in einem „Slab Gel Dryer SE1160“ (Hoefer) getrocknet.

2.5.5 Native PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen erfolgte mittels nativer PAGE nach Ornstein-Davis (1964) nach einem Protokoll der Firma BioRad („A guide to native PAGE“). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die

Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug dabei 4% (v/v), die des Trenngels 10% (v/v). Die Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung [30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid] (Biozym Diagnostics GmbH) hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% Glycerol (v/v) und 0,025% Bromphenolblau (w/v) erzielt wurde. Der Gellauf erfolgte bei konstant 1W für 2h. Als Proteinstandards fanden neben BSA (Pierce, 66 kDa), Lysozym (Sigma, 14,3 kDa), Trypsin-Inhibitor der Sojabohne (Sigma, Deisenhofen, 20 kDa) und Conalbumin (Roche Diagnostics, 77 kDa) Verwendung.

2.5.6 „Proteomics“: Zweidimensionale (2D)-PAGE-Analysen

Die Auftrennung von *E. coli* Gesamtzellextrakten erfolgte mit Hilfe von 2D-PAGE-Untersuchungen. Dabei werden in der ersten Dimension zunächst Proteine hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes (pI) (2.5.6.4) und anschließend bezüglich ihres Molekulargewichts über SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.6.5). Um globale Veränderung auf translationalem Niveau unter verschiedenen Stressbedingungen (K⁺-Limitation, Osmostress) bei *E. coli* MC4100 zu untersuchen, wurden Zellen wie unter 2.4.8 beschrieben angezogen. K⁺-limitierende Bedingungen wurden auch hier für jeweils 5min in drei unabhängigen Experimenten untersucht bzw. entsprechende Vorkulturen direkt 1:50 in K10-MM bzw. K0,1-MM verdünnt und bei einer OD₆₀₀ = 0,6 geerntet (entspricht „steady-state“-Bedingungen nach 3h Kaliumlimitation). Im Zuge der Osmostress-Analysen wurden die Zellen für 9min mit 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol inkubiert und anschließend wie unter 2.5.6.2 beschrieben aufgeschlossen. Untersuchungen hinsichtlich der Neusynthese von Proteinen in der exponentiellen Wachstumsphase erfolgten durch *in vivo* Markierung in einem Zeitfenster von 14min Osmostress bzw. 10min Kaliumlimitation mittels L-[³⁵S]Methionin nach einem modifizierten Protokoll von M.H.W. Weber (Universität Marburg, persönliche Mitteilung) wie unter 2.5.6.1 beschrieben.

2.5.6.1 *in vivo* Markierung mittels L-[³⁵S]Methionin

E. coli MC4100-Zellen (10 ml Kulturen) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (2.5.6) für jeweils weitere 5min durch Zugabe von 5 µCi/ml L-[³⁵S]Methionin (3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Anschließend wurden entnommene Zellproben (2 x 1,5 ml) durch Zugabe von 1/9 Volumen Stopp-Lösung I [100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1mg/ml Chloramphenicol; 10 mM „kaltes“ L-Methionin] für 10min auf Eis inkubiert und wie unter 2.5.6.2 beschrieben mit Hilfe der „Freeze & Thaw“-Methode aufgeschlossen. Anschließende Szintillationsmessungen sind unter 2.5.6.3 beschrieben.

2.5.6.2 Zellaufschlussmethoden

E. coli Gesamtzellextrakte wurden entweder durch Ultraschallbehandlung oder durch eine „Freeze & Thaw“-Methode aufgeschlossen. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen (OD₆₀₀ = 0,6) nach

Zugabe von 1/9 Volumen Stopp-Lösung II [100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1mg/ml Chloramphenicol] für zwei min auf Eis inkubiert, anschließend bei 4°C pelletiert (11.000 x g, 5min) und einmal mit 1/3 Ausgangsvolumen mit Wasch-Puffer [100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 mg/ml Chloramphenicol] gewaschen. Der Ultraschallaufschluss erfolgte anschließend auf Eis in 200-300 µl Zellaufschlusspuffer [10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 50µg/ml RNase; 50 µg/ml DNase; 100 µg/ml Lysozym; 1,39 mM PMSF] für 3-5 x 30 sek. mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Ø2,0 mm). Im Zuge der „Freeze & Thaw-Methode“ wurden die gewaschenen Zellpellets durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer [40 mM Tris/HCl, pH 7,4; 4% CHAPS (w/v); 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 50 µg/ml RNase; 50 µg/ml DNase; 50 µg/ml Lysozym; 1,39 mM PMSF] und sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und einmaligem Auftauen auf Eis aufgeschlossen. Nach Entfernung verbliebener Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (11.000 x g, 10min) bei 4°C wurden die Gesamtproteinmenge durch Lyophilisation und Aufnahme in TE-Puffer [10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0] für die Coomassie bzw. Silbergelanalysen auf 25-35 mg/ml eingestellt und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Menge an eingebautem L-[³⁵S]Methionin im Zuge der *in vivo* Markierungen erfolgten über Szintillationsmessungen (2.5.6.3)

2.5.6.3 Szintillationsmessung radioaktiver Gesamtzellextrakte

Die Szintillationsmessungen erfolgten nach einem Protokoll von M.H.W. Weber (Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Jeweils 3 x 5 µl der L-[³⁵S]Methionin-markierten Proteinlösung wurden auf Filterpapier (7 x 7 mm) für 30min getrocknet und anschließend für 10min in 10% TCA (v/v) auf Eis gefällt. Die Proteinlösungen wurden nochmals für weitere 10min in 5% TCA (v/v) inkubiert (Eis) und anschließend zweimal mit 96% Ethanol bei RT gewaschen und schließlich getrocknet. Die Filterpapiere wurden mit 4 ml Szintillationscocktail versetzt und in einem Tri-Carb 2300TR-Messgerät der Firma Packard Bioscience GmbH (Dreieich) vermessen. Zusätzlich erfolgte eine Proteinbestimmung der radioaktiven Gesamtzellextrakte wie unter 2.5.2 beschrieben.

2.5.6.4 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung markierter wie auch unmarkierter Proteingemische oder gereinigter Proteinfractionen erfolgte mittels Immobiline™ DryStrips (IPG) der Firma Amersham Biosciences nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers (Amersham Biosciences, 1998). Hierbei fanden pH-Bereiche zwischen pH 3-10 NL (nicht linear) bzw. pH 4-7 L (linear) Verwendung. Die IEF-Streifen (13 cm) wurden zunächst 19h bei konstant 20°C und 50 V (50 µA/Streifen) in 250 µl Rehydratisierungspuffer [8 M Harnstoff (w/v); 2 M Thio-Harnstoff (w/v); 2% CHAPS (w/v); 0,5-1,25% IPG-Puffer (v/v) (pH 4-7 L, pH3-10 NL); 28,4 mM DTT] mit entsprechenden Proteinmengen (2-400 µg) rehydratisiert. Anschließend fand eine Fokussierung der Proteine für 19650 Vh auf einer IPGphor-Fokussierungsapparatur der Firma Amersham Biosciences statt (Programm: 2h 500 V „Gradient“; 1h 500 V „Step-n-hold“; 1h 1000 V „Step-n-hold“; 2h 8000 V „Step-n-hold“). Die

fokussierten IPG-Streifen wurden anschließend zweimal je 15min in Äquilierungspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 6 M Harnstoff; 30% Glycerol (v/v); 4% SDS (w/v); 18,2 mM DTT] bei RT geschwenkt und anschließend der zweiten Dimension (SDS-PAGE) unterworfen (2.5.6.5) oder bei -80°C gelagert.

2.5.6.5 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension erfolgte wie bereits unter 2.5.4 beschrieben unter denaturierenden Bedingungen mit folgenden Modifikationen: Alle für die Gelelektrophorese benötigten Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert. Um eine einwandfreie Übertragung der IPG-Strips der 1. Dimension (2.5.6.4) auf das Sammelgel zu gewährleisten, fanden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 16 x 20 cm Verwendung. Zur Auftrennung von Proteinen im Bereich von ca. 6 – 120 kDa wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 13% sowie 7%ige Sammelgele (2 cm Trennstrecke) verwendet. Die Herstellung der speziellen Gele erfolgte mit Hilfe einer Acrylamid/Bisacrylamid Fertiglösung [29:1; 30% (w/v)] der Firma SERVA Electrophoresis GmbH (Frankfurt). Um eine möglichst planare Geloberfläche zu erhalten, wurden die Sammelgele mit Isopropanol während der zweistündigen Polymerisation überschichtet, anschließend die fokussierten IPG Strips (2.5.6.4) appliziert und mit 0,6%iger (w/v) mit Bromphenolblau-versetzter Agarose fixiert. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei konstant 5-7,5 mA/Gel in einer Hoefer SE600-Gelelektrophoresekammer bei konstant 15°C. Die Visualisierung aufgetrennter Proteine erfolgte anschließend durch 4h Inkubation mit Kolloidaler-Coomassie-Färbelösung [1,6% Phosphorsäure (v/v); 8% Ammoniumsulfat (w/v); 20% Methanol (v/v); 0,1% Serva Blau G-250 (w/v)] und anschließender Entfärbung mit destilliertem Wasser. Alternativ wurden Proteine mittels Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) angefärbt. Im Falle der Auftrennung L-[³⁵S]Methionin-markierter Proteingemische (2.5.6.1) erfolgte eine Detektion durch Exposition der getrockneten SDS-Gele unter einem "Storage Phosphor Screen" und anschließender Analyse des Autoradiogramms mittels eines "PhosphorImager SI" (Molecular Dynamics).

2.5.6.6 2D-PAGE Auswertung

Resultierende SDS-Gele der 2D-PAGE wurden mittels der 2D-Analysesoftware „Z3“ der Firma Compugen Ltd. (Tel-Aviv, Israel) ausgewertet. Dabei wurden jeweils drei Gele einer Bedingung in die Betrachtung und den Vergleich der Gele untereinander einbezogen (ungestresst/gestresst). Entsprechende Zweikanal-Analysen wurden mit Hilfe von Photoshop 5.0 nach Bernhardt *et al.* (1999) durchgeführt. Eine Identifikation und Zuordnung der variierenden Proteine erfolgte entweder über immunologischen Nachweis (2.5.7) oder über direkten Vergleich mit Hilfe von publizierten *E. coli* Standard-Gelen (Swiss-2D-Page: www.expasy.org/ch2d; Tonella *et al.*, 1998; Tonella *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden die N-terminale Sequenzierung (2.6.1) und die MALDI-TOF-Massenspektroskopie (2.6.2) zur Identifikation gewählter Proteine herangezogen.

2.5.7 Immunoblot

Der Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelelektrophoresen auf Nitrozellulose (Porengröße 0,45 μm) bzw. PVDF Membranen erfolgte mit Hilfe einer "Trans-Blot SD semi dry"-Anlage (BioRad) für 20min bei 20 V. Dafür wurde nach Angaben des Herstellers ein Puffer mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% Methanol (v/v) verwendet. Anschließend wurde die verwendete Membran für mindestens eine Stunde in Puffer A [0,9% NaCl (w/v); 50 mM Tris/HCl, pH 7,4] + 5% Magermilch (w/v) inkubiert. Mit Hilfe des Antiserums $\alpha\text{KdpFABC}$ (1:10.000 verdünnt in Puffer A + 5% Magermilch (w/v)) konnte der Kdp-Komplex (Siebers & Altendorf, 1988) und mit Hilfe des Penta-His Antikörpers (Qiagen) (1:5000 verdünnt in Puffer A + 3% BSA (w/v)) konnten "His-getaggte"-Proteine nachgewiesen werden. Zur weiteren Detektion wurde ein zweiter Antikörper verwendet. Dazu wurde gemäß dem Protokoll nach Zimmann (1995) Ziege-anti-(Kaninchen-IgG) konjugiert mit Alkalischer Phosphatase zur Detektion von KdpFABC verwendet. Für die Detektion von "His-getaggten"-Proteinen wurde Ziege-anti-(Maus-IgG) konjugiert mit Alkalischer Phosphatase verwendet. Die Entwicklung des Immunoblots erfolgte durch Zugabe von Substratlösung [41 mM Natriumcarbonat pH 9,5; 0,009% Nitro-Blue-Tetrazolium (w/v); 0,045% 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (w/v)]. Wurde in Abwandlung des Protokolls von Zimmann (1995) Esel-anti-(Kaninchen-IgG) konjugiert mit Meerrettichperoxidase als zweiter Antikörper für die Detektion von KdpFABC, oder Esel-anti-(Maus-IgG) konjugiert mit Meerrettichperoxidase verwendet, so erfolgte die Entwicklung des Immunoblots mit Hilfe von Super Signal-Entwicklerlösung (Pierce) und anschließender Exposition für etwa 60s auf "Hyperfilm ECL" (Amersham Biosciences). Die Entwicklung der Filme erfolgte mit Hilfe einer "Medical Film Processor QX-70"-Filmentwicklermaschine (Konica).

2.5.8 Phosphorylierung von 10His-UspG *in vitro*

In vitro Untersuchungen zur Autophosphorylierungsaktivität von UspG wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Freestone *et al.* (1997) durchgeführt. Dazu wurden gereinigte Proteinfractionen (1-2 μg /Ansatz) von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) verwendet. Die Phosphorylierung von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) erfolgte in PA-Puffer [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% Glycerol (v/v); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM MnCl_2 ; 2 mM DTT] wie jeweils angegeben, nach Zugabe von 5 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) - 2 mM [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (99,3 mCi/mmol) bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 25 μl . Zu verschiedenen Zeiten wurden dem Ansatz Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Die anschließende Trennung von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben auf 12,5% SDS-Gelelektrophoresen und anschließender Exposition der Gele für mindestens 24h unter einem "Storage Phosphor Screen". Sofern angegeben wurden die Gele wie unter 2.5.7 beschrieben auf Nitrozellulose bzw. PVDF Membranen transferiert und anschließend die Membranen für mindestens 24h unter einem "Storage Phosphor Screen" exponiert. Die phosphorylierten Proteine konnten mittels "PhosphorImager SI" detektiert und die Phosphorylierung quantifiziert werden.

2.5.9 Adenylierung von 10His-UspG *in vitro*

Untersuchungen zur Autoadenylierung von gereinigtem 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) (1-2 µg/Reaktionsansatz) erfolgten wie in 2.5.8 beschrieben, wobei 5 µCi (3000 Ci/mmol) - 2 mM (99,3 mCi/mmol) [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP wie jeweils angegeben, eingesetzt wurden. Dem Reaktionsansatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mit SDS-Probepuffer abgestoppt. Alle Proben wurden sofort einer SDS-PAGE (2.5.4) unterzogen. Die Gele wurden anschließend für mindestens 24h unter einem "Storage Phosphor Screen" exponiert und mittels ImageQuant 5.0 quantifiziert. Sofern angegeben wurden die Gele wie unter 2.5.7 beschrieben auf Nitrozellulose bzw. PVDF Membranen transferiert. Die Exposition und Quantifizierung der markierten Proteine erfolgte wie oben beschrieben.

2.5.10 Dünnschicht-Chromatographie (TLC): UspG~AMP Nachweis

Zum Nachweis der Adenylierung von UspG wurden 3 µg gereinigtes 10His-UspG in PA-Puffer (2.5.8) in einem 25 µl Reaktionsvolumen mit 10 µM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (79,48 Ci/mmol) für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von SDS-Probepuffer gestoppt und einer SDS-PAGE unterzogen (2.5.4). Die anschließende Weiterbehandlung von markiertem UspG erfolgte nach einem Protokoll von Bradley *et al.* (1984). Die korrespondierende 10His-UspG Bande wurde hierfür aus dem Gel ausgeschnitten und für 18h bei 37°C mit Elutionspuffer [50 mM NH_4HCO_3 ; 0,1% SDS (w/v); 1% β -Mercaptoethanol (v/v)] unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und das 10His-UspG Protein mittels 30 minütiger Inkubation bei -20°C mit 1,5fachem Volumen kaltem Aceton und unter Zugabe von 50µg BSA gefällt. Der präzipitierte 10His-UspG~AMP Komplex wurde anschließend aufgeteilt, wobei eine Hälfte für 2h bei 37°C mit 0,5 M Piperidin (Hexahydropyridin) (Bradley *et al.*, 1984) und die andere Hälfte zur Kontrolle ohne Piperidin für 2h bei 37°C inkubiert wurde. Nach Entfernung des Piperidins mittels Vakuumzentrifugation bei 42°C und Aufnahme in sterilem HPLC-Wasser, wurden die Piperidin-Hydrolysate anschließend mittels Dünnschicht-Chromatographie auf TLC-PEI-Zellulose F Platten (10 x 6,5 cm) der Firma Merck (Darmstadt) analysiert. Dazu wurden die PEI-Platten zunächst mit 10% NaCl (w/v) und anschließendem Lauf mit destilliertem Wasser (Randerath & Randerath, 1965) vorbehandelt. Die eigentliche Auftrennung der durch Piperidin freigesetzten Produkte erfolgte im ersten Lauf mit 0,5% Ameisensäure (v/v) und im zweiten Lauf mit 0,15 M Li^+ -Formiat pH 3,0 bei RT (Volckaert & Fiers, 1977). Nach entsprechender Trocknung der TLC-PEI Platten wurden diese für 24h unter einem "Storage Phosphor Screen" exponiert und mittels "PhosphorImager SI" analysiert. Als interne Standards wurden parallel je 25 nmol ATP, ADP und AMP (+/- 0,5 M Piperidin) mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt, unter einem UV-Tisch visualisiert und anschließend radioaktiv markiert.

2.5.11 „Pulse-Chase“ Experimente

Zum Nachweis kovalenter Modifikationen von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) durch ATP wurde je 1 µg gereinigtes Protein mit je 5 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) in PA-Puffer bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 25 µl für 30 bzw. 60min inkubiert. Durch SDS-Probenpuffer wurden anschließend die Reaktionen abgestoppt. Das Chase-Experiment erfolgte nach 30min Vorinkubation mit 5 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) wobei zu diesem Zeitpunkt den Reaktionsansätzen 2 mM kaltes ATP zugesetzt wurden (die spezifische Radioaktivität nach Zugabe von 2 mM kaltem ATP betrug danach 99,3 mCi/mmol). Nach weiteren 30min Inkubation wurde die Reaktion mit Hilfe des SDS-Probenpuffers abgestoppt. Zur Kontrolle wurde je 1 µg 10His-UspG bzw. 10His-UspG(1-118) mit je 2 mM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (99,3 mCi/mmol) für 1h bei 37°C inkubiert und durch SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die anschließende Trennung von markiertem 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben auf 12,5% SDS-Gelen und anschließender Exposition der Gele für mindestens 24h unter einem “Storage Phosphor Screen“.

2.5.12 Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG

Je 1 µg gereinigtes 10His-UspG wurde mit [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (jeweils 1986-99,3 mCi/mmol) [Endkonzentration an kaltem ATP: 0,1-2 mM] GTP [0,1-2 mM] und 2,5 mM CTP in PA-Puffer für 1h bei 37°C in inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils 1 µg 10His-UspG mit 5 µCi (je 1,65 pmol) [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP mit einer spezifischen Radioaktivitäten von 3000 Ci/mmol in PA-Puffer für 1h bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug jeweils 25 µl. Abgestoppt wurden die Reaktionsansätze durch Zugabe von SDS-Probenpuffer. Die anschließende Trennung von 10His-UspG erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben auf 12,5% SDS-Gelen und anschließender Exposition der Gele unter einem “Storage Phosphor Screen“. Die anschließende Auswertung erfolgte durch Quantifizierung der auftretenden Signalintensitäten mittels ImageQuant V5.0.

2.5.13 pH-Stabilitätstest

Zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der Modifikation von 10His-UspG wurden je 1 µg gereinigtes 10His-UspG, wie unter 2.5.8 und 2.5.9 beschrieben, radioaktiv markiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer des radioaktiv markierten Proteins auf eine PVDF-Membran, wurden die entsprechenden Proteinbanden in Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten überführt. Dabei wurde im Falle der Säurebehandlung von phosphoryliertem- bzw. adenyliertem Protein, nach einem modifizierten Protokoll von Zimmann (1995), die Membran für 1,5h bei 43°C mit 1 M HCl inkubiert. Im Falle der Alkalibehandlung wurden entsprechende Proteinbanden mit 3 M NaOH für 1,5h bei 43°C behandelt. Die Membranen wurden anschließend mehrmals mit ddH₂O abgespült, in 100 mM Tris/HCl pH 7,0 neutralisiert und anschließend unter einem “Storage Phosphor Screen“ exponiert.

2.5.14 Quervernetzungsstudien

Eine Quervernetzung zwischen Lysin-Resten erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen (0,001%-0,1% Glutaraldehyd (v/v) (Sigma) in Na/Hepes-Quervernetzungspuffer [10 mM Na/Hepes pH 8,0; 5 mM Mg-Acetat; 50 mM Na-Acetat; 12% Glycerol (v/v); 5 mM DTT] für 10min bei RT, wie bei Strausak & Solioz (1997) beschrieben, wobei die Reaktion mit etwa 1 µg gereinigtem 10His-UspG durchgeführt wurde. Nach Zugabe von 110 mM Ethanolamin (Fluka) wurde die Reaktion abgestoppt. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE (2.5.4) aufgetrennt und wie unter 2.5.7 beschrieben auf PVDF Membranen übertragen und immunologisch nachgewiesen.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der bei der 2D-PAGE (2.5.6) ermittelten Proteine, wurden 2D-Gele auf Immobilon-P (PVDF)-Membran (Porengröße 0,45 µm) der Firma Millipore (Eschborn) durch 3h Transfer in einer Trans-Blot Naßblotkammer (BioRad) mit einem Carbonat-Puffer [3 mM Na₂CO₃; 10 mM NaHCO₃, pH 9,9; 0,001% SDS (w/v); 20% Methanol (v/v)] übertragen. Nach Anfärben der Proteine durch 0,25% (w/v) Amidoblack in Methanol/Essigsäure (Verhältnis 45:10:45) wurden die Proteinbanden nach Trocknung aus der PVDF-Membran geschnitten und mit einem Applied Biosystems 473A Aminosäure Sequenzierer (ABI, Weiterstadt) von Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück) ansequenziert.

2.6.2 MALDI

Die Molekulargewichtsbestimmung der gereinigten Proteine 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) erfolgte mittels MALDI-TOF-MS als Auftragsarbeit durch die Firma TopLab (Martinsried). Dazu wurden die Proteinproben vor der Massenbestimmung über ein ZipTip C4 (Millipore, Eschborn) entsalzt. Das „reversed-phase“ Material wurde mit 0,1% TFA (v/v) äquilibriert, die Probe wurde aufgegeben, mit 0,1% TFA (v/v) gewaschen und mit 80% ACN/0,1% TFA (v/v) eluiert. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in ACN/0,1% TFA (40:60, v/v) verwendet. Kalibriert wurde extern auf den Standard C3 von Applied Biosystems mit Insulin ([M+H]⁺ 5734 Da), Thioredoxin ([M+H]⁺ 11674 Da sowie [M+2H]²⁺ 8376 Da) und Apomyoglobin ([M+H]⁺ 16952 Da). Die Massenanalyse erfolgte schließlich in einem Voyager-DE STR MALDI-MS der Firma Applied Biosystems. Durch die Firma Toplab wurden MALDI-MS-PMF-Untersuchungen zum Nachweis der Modifikationen an 10His-UspG durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes Protein in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, pH 8,0 mit „modified sequencing grade“ Trypsin (Roche Diagnostics) bei 37°C über Nacht verdaut. Die Peptidmischung wurde über ein ZipTip C18 (Millipore, Eschborn) entsalzt und ankonzentriert (gleiches Protokoll wie bei ZipTip C4). Als Matrix wurde

DHBS verwendet, eine Mischung der gesättigten Lösungen (ca. 20 mg/ml) von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure, jeweils in 20% Acetonitril/0,1% TFA (v/v), im Verhältnis 9:1. Die tryptischen Peptide wurden auf dem MALDI-Target im Verhältnis 1:1 mit DHBS-Matrix gemischt und nach erfolgreicher Kristallisation im Reflektormodus des Voyager-DE STR MALDI-MS (Applied Biosystems) im Bereich 700-4000 Da gemessen. Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf bekannte Massen der Autolysepeptide von Trypsin.

Zur Bestimmung der bei der 2D-PAGE (2.5.6) ermittelten Proteine, wurden die aufgetrennten Proteine (300 µg) anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber & Osborn (1969) detektiert, ausgeschnitten und als Auftragsarbeit von Dr. Haike Henkel (Universität Greifswald) mittels MALDI-MS nach tryptischem Verdau (s. o.) nachgewiesen.

3. Ergebnisse

3.1 „Transcriptomics“: Globale transkriptionale Veränderungen von *E. coli* unter Osmostress und Kaliumlimitation

Durch die Entschlüsselung der Genomsequenz von *E. coli* K-12 MG1655 durch Blattner *et al.* im Jahre 1997 ist es möglich, neue Methoden zur Analyse Genom-umfassender Veränderungen auf transkriptionalem Niveau heranzuziehen. Die Firma Sigma-Genosys bietet hierzu DNA-Macroarrays an, die 4290 PCR-amplifizierte Protein-kodierende Gene auf einer Nylonmembran beinhalten und damit >98% sämtlicher bis zum Jahr 2003 annotierten offenen Leseraster (ORF's) repräsentieren. Vorteil der DNA-Macroarray Nylonmembranen ist die einfache Handhabung und der Einsatz klassischer Southern-Hybridisierungsmethoden zum Nachweis veränderter Transkriptmengen.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten wenig Untersuchungen, die sich mit globalen transkriptionalen Veränderungen von *E. coli* hinsichtlich osmotischem Stress befasst haben (Gutierrez *et al.*, 1987). Vergleichende globale transkriptionale Untersuchungen hinsichtlich Kaliumlimitation sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht worden. Aus diesem Grund sollte der Frage nachgegangen werden, ob und in wiefern Veränderungen in der frühen Phase der Adaptation von *E. coli* hinsichtlich osmotischem Stress (3.1.1) und Kaliumlimitation (3.1.2) auf transkriptionalem Niveau gemessen werden können. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei nicht auf „steady-state“-Bedingungen sondern auf Untersuchungen hinsichtlich einer frühen Adaptationsphase von *E. coli* auf Veränderungen dieser Umweltparameter gelegt.

3.1.1 DNA-Macroarray-Analysen unter osmotischen Stressbedingungen

Untersuchungen globaler transkriptionaler Veränderungen unter osmotischen Stressbedingungen wurden in je drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dazu wurde *E. coli* MC4100 wie unter 2.4.8 beschrieben in K10-Minimalmedium (K10-MM, 2.3.1) angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase für einen Zeitraum von 9min einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt. Der Zeitrahmen von 9min wurde gewählt, da bereits zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der RNA-Transkripte der Gene *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* unter osmotischem Stress nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.1; Jung *et al.*, 2001). Nach anschließender Isolation der Gesamt-RNA (2.4.8.1) und Synthese radioaktiv markierter cDNA mittels ORF-spezifischer Primer (2.4.8.3) erfolgte die Analyse der auf transkriptionalem Niveau veränderten RNA-Mengen durch Hybridisierung der cDNA mit den DNA-Macroarrays. Die Quantifizierung sämtlicher 4290 offenen Leseraster von *E. coli* K-12 (Stamm MG1655) erfolgte mittels der Arrays-Vision v5.1 Software (Imaging Research, Inc.). Mehrere Kriterien hinsichtlich der Signifikanz der veränderten RNA-Mengen unter den getesteten Bedingungen wurden dabei vorausgesetzt (Weber & Jung, 2002): Nur Gene, deren durchschnittliche Pixelintensitäten den gleichen regulatorischen Trend (hoch-reguliert bzw. runter-reguliert) in

mindestens zwei von drei Experimenten aufwiesen, wurden berücksichtigt. Jedem Gen wurde ein prozentuales Expressionssignal zugeordnet indem die relativen Signalintensitäten eines individuellen Gens in Relation zur Gesamtintensität des kompletten Arrays betrachtet wurden. Voraussetzung war, dass diese Expressionsintensitäten deutlich über denen des Hintergrundes lagen (in diesem Fall \geq dreimal die Signalintensität des Hintergrundwertes). Die Hintergrundwerte wurden bestimmt, indem 294 individuell über den gesamten Array verteilte Bereiche, gemittelt wurden. Dabei lagen die Signalintensitäten von 72% (\pm 3%) sämtlicher Gene bei der Kontrolle und 75% (\pm 8%) der Gene unter NaCl-Stress über dem so ermittelten Hintergrundwert. Ähnliche Signalintensitäten waren für die „Sorbitol-Arrays“ zu beobachten. Ein Gen (i) wurde danach als verändert eingestuft, wenn der Quotient der prozentualen Expressionssignale von induziert und uninduziert $\geq \pm 1,4$ betrug (Induktions-/Repressionsfaktor). Um falsch-positive oder falsch negative Signalveränderungen zu eliminieren, erfolgte eine statistische Auswertung sämtlicher quantifizierten Daten durch das Programm „SAM“ (Tusher *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieses Statistik-Programms konnte durch entsprechende Verteilungen ein Wahrscheinlichkeitswert ermittelt werden, mit der ein Gen auf Grundlage der vorhandenen Daten, signifikant verändert vorliegt. Die als so genannte „false discovery rate“ (FDR) bezeichnete Größe betrug bei dem Durchsatz sämtlicher Gene 12%. Der SAM-Grenzwert-Parameter betrug bei der Analyse $\Delta=1,3$ und lag damit im Bereich bereits publizierter Werte (Tusher *et al.*, 2001). Durch weitere Analyse dieser Gene und durch Setzen des Schwellenwertes auf $\geq \pm 1,4$ konnte die FDR auf null Prozent herabgesetzt werden ($\Delta=2,8$). Jedem Gen wurde bei der Analyse ein so genannter „SAM“-Wert $d(i)$ vom Programm zugewiesen. Dabei entspricht ein $d(i)$ -Wert von 4 in etwa einem „Student's *t-Test*“-Wert von $p \leq 0,05$. Je höher dieser Wert $d(i)$, desto signifikanter ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Experiment (Anhang).

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 3.1. Eine detaillierte Auflistung sämtlicher Gene und deren durch osmotischen Stress veränderte RNA-Mengen sind im Anhang in der Tab.I angegeben. Danach zeigten von den 4290 analysierten Genen 152 Gene ($\sim 3,5\%$) einen unter hyperosmotischen Stressbedingungen veränderten Level an RNA-Transkripten. 45 Gene ($\sim 1\%$) zeigten dabei eine erhöhte Expression, während 107 Gene ($\sim 2,5\%$) eine verringerte Expression aufwiesen. Wie Tabelle 3.1 zeigt, betrifft dies Gene, die verschiedensten funktionellen Gruppen zuzuordnen sind.

Eine erhöhte Expression unter osmotischen Stressbedingungen zeigen Gene, die vornehmlich bei Zellprozessen (inkl. Adaptation und Protektion, 7 Gene) und bei Transportprozessen (5 Gene) eine Rolle spielen. Neben dem *proP*-Gen, konnte für eine Reihe von Genen, die einen Teil des SigmaS-Regulons darstellen, eine erhöhte Menge an RNA-Transkript nachgewiesen werden. Dazu gehören die Gene *otsA*, *otsB*, das *proU*-Operon (*proV*, *proW*, *proX*), *dps*, *osmC* und *osmY*. Auch eine deutlich erhöhte Menge an *rpoS*-Transkript konnte durch die DNA-Macroarray-Analysen nachgewiesen werden (Faktor 1,4; maximaler Wert $d(i)=43$) (Tab. 3.2, Anhang Tab. I). Der Anteil an bis dato vermeintlichen Regulatorproteinen (YbgS, YegW), sowie hypothetischen, nicht-klassifizierten oder

unbekannten Proteinen beträgt 33% sämtlicher unter osmotischem Stress verstärkt exprimierter Gene. Hierzu zählen neben weiteren Genen das *yddX*-Gen, sowie die Gene *ymfS* und *ybdQ* (*uspG*). Eine ganze Reihe anderer induzierter Gene (*aceK*, *arp*, *copA*, *crr*, *cynT*, *dfp*, *div*, *leuC*, *lpxA*, *metC*, *metF*, *moaC*, *moeA*, *ribE*, *rnt*, *sbcB*, *tmk* und *xerD*) verteilt sich auf eine Vielzahl weiterer funktioneller Gruppen (siehe Tab. 3.1).

Funktionelle Gruppen ^(a)	Anzahl ges. Gene	Anzahl der Gene nach osmotischem Schock im Vergleich zur Kontrolle		Gene ^(b)
		erhöht	erniedrigt	
Gesamtes Genom	4.290	45	107	
Aminosäure-Biosynthese und Metabolismus	97	2	12	<i>aroD</i> , <i>asd</i> , <i>cysK</i> , <i>cysM</i> , <i>dapB</i> , <i>gdhA</i> , <i>hisC</i> , <i>leuD</i> , <i>leuC</i> , <i>metC</i> , <i>metE</i> , <i>proA</i> , <i>trpB</i> , <i>thrC</i>
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischer Gruppen und "Carrier"	106	3	1	<i>folE</i> , <i>moaC</i> , <i>moeA</i> , <i>ribE</i>
Katabolismus von Kohlenstoffverbindungen	124	0	1	<i>gatY</i>
Zellprozesse (inkl. Adaptation, Protektion)	170	7	10	<i>acrB</i> , <i>ahpC</i> , <i>cspA</i> , <i>div</i> , <i>dps</i> , <i>ftsK</i> , <i>ftsN</i> , <i>ftsZ</i> , <i>osmC</i> , <i>osmY</i> , <i>otsA</i> , <i>otsB</i> , <i>proX</i> , <i>sufI</i> , <i>tig</i> , <i>tpx</i> , <i>uspA</i> *
Zellstruktur	85	1	9	<i>glgA</i> , <i>lpp</i> , <i>lpxA</i> , <i>kdsB</i> , <i>mrcA</i> , <i>mrdA</i> , <i>murA</i> , <i>ompF</i> , <i>ompT</i> , <i>yccZ</i>
Zentraler intermediärer Metabolismus	149	3	8	<i>aceK</i> , <i>cynT</i> , <i>cysD</i> , <i>cysH</i> , <i>cysI</i> , <i>cysJ</i> , <i>gecP</i> , <i>gltB</i> , <i>gltD</i> , <i>metF</i> , <i>ydiD</i>
DNA Replikation, Rekombination, Modifikation und Reparatur	105	4	4	<i>dfp</i> , <i>himD</i> , <i>hupA</i> , <i>hupB</i> , <i>priB</i> , <i>rnt</i> , <i>topA</i> , <i>xerD</i>
Energie-Metabolismus	136	0	18	<i>aldA</i> , <i>appC</i> , <i>atpC</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH</i> , <i>atpI</i> , <i>yedN</i> , <i>cyoC</i> , <i>fdol</i> , <i>fumB</i> , <i>gapA</i> , <i>gpmA</i> , <i>hyaF</i> , <i>nuoF</i> , <i>sdhC</i> , <i>sdhD</i> , <i>sucD</i> , <i>yjcU</i>
Fettsäure- und Phospholipid Metabolismus	41	1	0	<i>arp</i>
Hypothetisch, nicht klassifiziert, unbekannt	1.428	13	5	<i>bax</i> , <i>lomR</i> , <i>ybaD</i> , <i>ybdM</i> , <i>ybdQ</i> , <i>ybfN</i> , <i>yegO</i> , <i>ycaA</i> , <i>yddX</i> , <i>ydfS</i> , <i>ydiH</i> , <i>yfhJ</i> , <i>yfhN</i> , <i>ygaY</i> , <i>yhcB</i> , <i>yjbM</i> , <i>yjgH</i> , <i>ymfS</i>
Nukleotid-Biosynthese and Metabolismus	66	1	4	<i>carA</i> , <i>carB</i> , <i>purF</i> , <i>pyrB</i> , <i>tmk</i>
Phagen, Transposon oder Plasmid	91	1	2	<i>nfrB</i> , <i>pspB</i> , <i>ybcC</i>
Putative Zellstrukturen	43	0	0	
Putative Enzyme	453	0	1	<i>ysgA</i>
Putative Faktoren	67	0	1	<i>ycbF</i>
Putative Membranproteine	54	0	1	<i>yiaT</i>
Putative Regulatorproteine	167	2	1	<i>ybgS</i> , <i>yegW</i> , <i>yohl</i>
Putative Transportproteine	291	0	1	<i>prlA</i>
Regulatorische Funktion	208	0	3	<i>fnr</i> , <i>phoU</i> , <i>relB</i>
Transkription, Prozessierung und Abbau von RNA	28	2	0	<i>rpoS</i> , <i>sbcB</i>
Translation, post-translationale Modifikation	128	0	21	<i>ileS</i> , <i>prfB</i> , <i>rplC</i> , <i>rplD</i> , <i>rplE</i> , <i>rplF</i> , <i>rplI</i> , <i>rplU</i> , <i>rplW</i> , <i>rplX</i> , <i>rplM</i> , <i>rpsA</i> , <i>rpsI</i> , <i>rpsJ</i> , <i>rpsN</i> , <i>rpsR</i> , <i>rpsS</i> , <i>rpsT</i> , <i>slyD</i> , <i>thrS</i> , <i>trmD</i>
Transport- und Bindeproteine	254	5	4	<i>copA</i> , <i>crr</i> , <i>cysW</i> , <i>fruB</i> , <i>proP</i> , <i>proV</i> , <i>proW</i> , <i>ptsN</i> , <i>rbsB</i>

Tab. 3.1: Funktionelle Klassifizierung der unter Osmostress beeinflussten Gene von *E. coli* MC4100. ^{a)} Die Einteilung der in *E. coli* K-12 bekannten offenen Leseraster (Σ 4290) in funktionelle Gruppen erfolgte nach Blattner *et al.*, 1997, Riley, 1998 und Tao *et al.*, 1999. ^{b)} **Fett unterlegt** dargestellt sind Gene, die einen erhöhten transkriptionalen RNA-Level bei Inkubation der Zellen für 9min mit 0,4 M NaCl im Vergleich zu Kontrollkulturen zeigen. Die übrigen Gene beziffern Gene mit erniedrigtem RNA-Level unter osmotischem Stress. ^{c)} *UspA* zeigte im Vergleich zu Northern-Blot-Analysen ein widersprüchliches Ergebnis (siehe Tab. 3.2).

Auffällig ist, dass vornehmlich Gene, die eine Rolle bei der Translation, posttranslationalen Modifikation (21 Gene), des Energie-Metabolismus (18 Gene) und Aminosäure-Biosynthese und Metabolismus (12 Gene) spielen, in ihrer Expression erniedrigt werden. Diese drei funktionellen Gruppen beinhalten rund 48% aller unter osmotischem Stress reprimierten Gene. Vergleichbare Beobachtungen konnten bei der Applikation eines osmotischen Stresses durch 0,7 M Sorbitol gemacht werden. Auch wenn die entsprechenden Induktions-/Repressionsfaktoren einzelner Gene im Vergleich zu den NaCl Daten variierten (siehe Anhang Tab. I), zeigten doch alle in Tabelle 3.1 aufgelisteten Gene den gleichen regulatorischen Trend.

3.1.1.1 Vergleichende Northern-Blot-Analysen unter osmotischem Stress

Um die mittels der Macroarray-Analysen identifizierten Gene durch eine unabhängige Methode zu überprüfen, wurden 14 der 152 Gene mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen vergleichend untersucht (Abb. 3.1; Tab. 3.2). Dabei wurden Gene mit variierender Signifikanz $d(i)$ und unterschiedlicher regulatorischer Trends herangezogen (Siehe Anhang Tab. I). Hierzu zählen die durch die Array-Untersuchungen induziert gefundenen Gene *dps*, *osmY*, *otsA*, *proX*, *rpoS*, *ybdQ*, *ybgS*, *yddx* sowie die reprimierten Gene *uspA*, *cspA*, *hupA*, *metE*, *ompT* und *ompF*. Tendenziell fielen die Induktions-/Repressionsfaktoren, der mittels Northern-Blot-Analysen nachgewiesenen Transkripte, in vielen Fällen höher aus als bei den Array-Untersuchungen. Dies gilt insbesondere für die Gene *dps*, *otsA*, *proX*, *ybgS* und *yddx*. Für diese Gene lag der Induktionsfaktor etwa um den Faktor 5 höher als bei den Array-Untersuchungen (Tab. 3.2). Unabhängig davon, zeigten alle 14 getesteten Gene mit Ausnahme des *uspA*-Gens einen zu den Macroarray-Analysen vergleichbaren regulatorischen Trend, unabhängig vom verwendeten Osmolyt (0,4 M NaCl, Abb. 3.1; 0,7 M Sorbitol, Sorbitol-Daten nicht gezeigt). Im Falle des *uspA*-Gens zeigten die Northern-Blot-Analysen eine erhöhte Menge an *uspA*-Transkript (Faktor: 2,1), während die Macroarray-Analysen eine erniedrigte RNA-Menge von *uspA* aufwiesen (Faktor: -1,9) (Tab. 3.2).

Mit Hilfe der Macroarray-Analysen konnten weder eine Induktion des *ompC*-Gens noch für die Gene des *kdpFABC*-Operons nachgewiesen werden. Während durch Northern-Blot-Untersuchungen diese Beobachtung für das *ompC*-Gens innerhalb des getesteten Zeitfensters bestätigt werden konnte (Faktor: 1,1), wurde für die Gene *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* eine deutliche Induktion der mRNA-Transkriptmengen durch Northern-Blot-Analysen gemessen (Abb. 3.1; Tab. 3.2). Diese liegen mit Induktionsfaktoren von 2,7 bis 6,1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich über den gemessenen Faktoren der DNA-Array-Analysen (Faktor: 1,1-1,3, Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass das *kdpF*-Gen auf den DNA-Macroarrays nicht repräsentiert wird. Experimente zur Bestimmung der Transkriptmengen von *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* mittels RT-PCR-Analysen (2.4.13) korrelierten mit den Ergebnissen der DNA-Macroarray Untersuchungen insofern, als dass auch mit dieser Methode keine signifikanten Unterschiede der Transkriptmengen zwischen osmotisch gestressten Zellen und Kontrolle nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

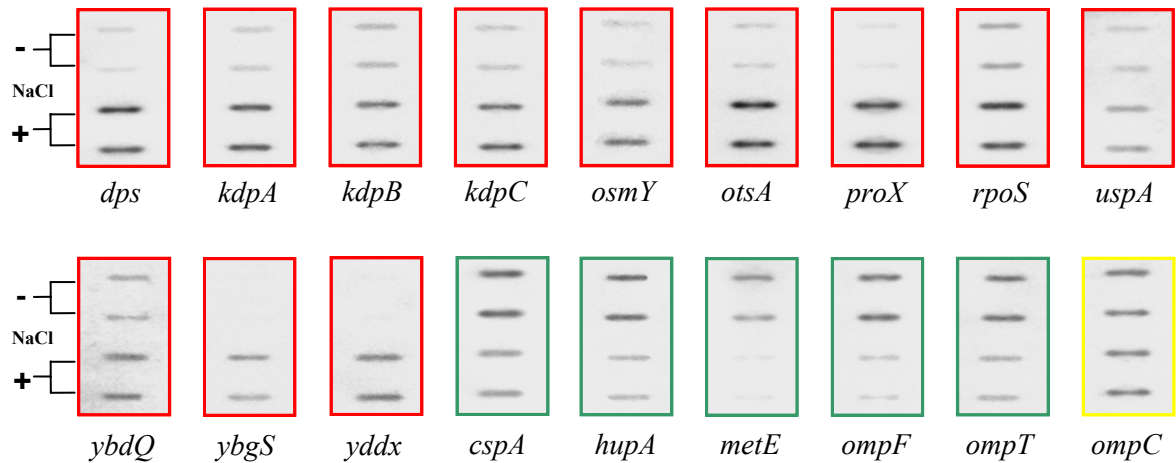


Abb. 3.1: Northern-Blot-Analysen ausgewählter Gene, die im Vergleich zur Kontrolle (-) einen durch Applikation von 0,4 M NaCl (+) variierenden RNA-Level zeigten. Je 4 µg Gesamt-RNA (Doppelbestimmung) der entsprechenden Kulturen wurden mittels einer Vakuum Transferapparatur auf Nylon-Membranen transferiert und anschließend mit [α^{32} P]dCTP-markierten DNA-Sonden gegen die jeweiligen Gene hybridisiert (2.4.7). Gene, die eine erhöhte Menge an Transkript im Vergleich zur Kontrolle zeigten, sind **rot**, Gene mit erniedrigtem RNA-Level **grün**, und Gene mit unveränderten Transkriptmengen **gelb** umrandet.

Gene	Blattner Nr. ¹	Induktions-/Repressionsfaktoren bestimmt durch:	
		Northern-Blot-Analysen	Macroarray-Analysen ²
<i>cspA</i>	b3556	-1,7 (\pm 0,3)	-1,9
<i>dps</i>	b0812	8,3 (\pm 3,2)	1,8
<i>hupA</i>	b4000	-2,0 (\pm 0,2)	-1,8
<i>kdpA</i>	b0698	6,1 (\pm 0,6)	1,1
<i>kdpB</i>	b0697	2,7 (\pm 0,4)	1,1
<i>kdpC</i>	b0696	6,1 (\pm 0,9)	1,3
<i>metE</i>	b3829	-5,0 (\pm 0,6)	-5,1
<i>ompC</i>	b2215	1,1 (\pm 0,2)	1,1
<i>ompF</i>	b0929	-4,2 (\pm 0,4)	-6,9
<i>ompT</i>	b0565	-2,0 (\pm 0,2)	-3,1
<i>osmY</i>	b4376	6,0 (\pm 0,7)	3,0
<i>otsA</i>	b1896	8,1 (\pm 1,4)	1,5
<i>proX</i>	b2679	19,9 (\pm 1,7)	3,7
<i>rpoS</i>	b2741	3,3 (\pm 0,1)	1,4
<i>uspA</i>	b3495	2,1 (\pm 0,0)	-1,9
<i>ybdQ (uspG)</i>	b0607	1,7 (\pm 0,1)	1,5
<i>ybgS</i>	b0753	8,1 (\pm 2,7)	1,4
<i>yddX</i>	b1481	8,5 (\pm 1,4)	1,5

Tab. 3.2: Vergleich der Induktions-/Repressionsfaktoren der RNA Transkripte zwischen DNA-Macroarray- und Northern-Blot-Analysen. Zellen wurden, wie unter 2.4.8 beschrieben, nach Anzucht in K10-MM für 9min einem 0,4 M NaCl-Stress ausgesetzt. Die Signalintensitäten der Northern-Blots (vgl. Abb. 3.1) wurden nach Exposition der Membranen mittels ImageQuant quantifiziert. Die Induktions-/Repressionsfaktoren der Northern-Blots entstanden durch Mittlung der Signalintensitäten dreier unabhängiger Experimente im Vergleich zu Kontrolleexperimenten. Werte in Klammern geben die Standardabweichungen an. ²⁾ Die angegebenen Induktions- und Repressionsfaktoren der DNA-Macroarray-Analysen stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dar (siehe Anhang Tab. I). ¹⁾ Neben den Gennamen sind ebenfalls die Blattner Nummern der entsprechenden Gene angegeben (Blattner *et al.*, 1997).

3.1.2 DNA-Macroarray-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen

Untersuchungen zu globalen transkriptionalen Veränderungen unter Kalium-limitierenden Bedingungen wurden in je drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dazu wurde *E. coli* MC4100 in Minimalmedium (10 mM K⁺, siehe 2.3.1) angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase für 5min einer Kaliumlimitation (0,1 mM K⁺) unterzogen (2.4.8). Dabei ergaben die Untersuchungen mittels DNA-Macroarray-Analysen innerhalb der ersten 5min nach Kaliumlimitation veränderte Transkriptmengen von insgesamt 24 Genen. 12 Gene wiesen dabei signifikant erhöhte Transkriptmengen auf; weitere 12 Gene zeigten reduzierte Transkriptmengen. Wie aus der Tabelle 3.3 hervorgeht, sind diese Gene verschiedensten funktionellen Gruppen zuzuordnen. Dabei zeigten alle hier angegebenen Gene einen „Student's *t*-Test“-Wert von $p \leq 0,05$; als Schwellenwert der Induktions-/Repressionsfaktoren wurde ebenfalls ein Wert von $\geq \pm 1,4$ angesetzt. Insgesamt lagen die Signalintensitäten von rund 63% ($\pm 3\%$) aller 4290 analysierter Gene über dem bestimmten Hintergrundwert. Dabei sei an dieser Stelle erwähnt, dass der Vergleich parallel gemessener Transkriptionsmuster von in K10-MM bzw. K115-MM (115 mM K⁺) gewachsenen *E. coli* Zellen (wurden für 3h bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen; 2.4.8) keine signifikanten Veränderungen aufzeigte (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt tauchen 8 Gene (67%) der 12 unter Kaliumlimitation reprimierten Gene (*ompF*, *carA*, *carB*, *metE*, *prlA*, *rplE*, *rplX* und *ysgA*) ebenfalls reprimiert unter hyperosmotischen Stressbedingungen auf (vgl. Tab. 3.1 & Tab. 3.3). Neben den unter Kaliumlimitation induzierten Genen *dps* und *himD* gab es keine weiteren signifikant induzierten Gene, die auch unter hyperosmotischen Stressbedingungen mittels DNA-Macroarray-Analysen auftauchten. Die Gene *lpp* und *aceK* zeigten einen gegenläufigen regulatorischen Trend (vgl. Tab. 3.1). Erstaunlicherweise sind die entsprechenden Induktionsfaktoren der Gene des *kdpFABC*-Operons auch unter Kaliumlimitation relativ gering und liegen mit Ausnahme des *kdpC*- und *kdpE*-Gens unter dem angesetzten Schwellenwert von 1,4. Dabei betragen die Induktionsfaktoren der Gene für *kdpA*: 1,2, für *kdpB*: 1,1 und *kdpD*: 1,3 (Daten nicht gezeigt). Ähnlich niedrige Induktionsfaktoren konnten auch bereits bei den DNA-Macroarray-Analysen beobachtet werden, die für die Untersuchungen hyperosmotischer Stressbedingungen herangezogen wurden (vgl. 3.1.1.1 & Tab. 3.2). Die geringen Induktionsfaktoren der Gene des *kdpFABC*-Operons waren insofern überraschend, da bereits andere Untersuchungen zeigen konnten, dass sowohl eine transkriptionale als auch eine translationale Induktion des gesamten *kdpFABC*-Operons unter Kalium-limitierenden Bedingungen stattfindet (Jung *et al.*, 2001; Hasemeier, 1999). Aus diesem Grund wurden zur Überprüfung ausgewählte Gene (*kdpA*, *kdpB* und *kdpC*) des *kdpFABC*-Operons mittels Northern-Blot-Analysen erneut untersucht. Dabei konnte für alle getesteten Gene eine deutliche Induktion innerhalb von 5min Kaliumlimitation beobachtet werden. Dabei fielen die mittels Northern-Blot-Analysen erhaltenen Induktionsfaktoren für die Gene *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* (Induktionsfaktor: 4,8-16,6) deutlich höher aus als bei den DNA-Macroarray-Untersuchungen (Abb. 3.2).

Funktionelle Gruppen	Gene	Induktions-/ Repressionsfaktor
Zellstruktur	<i>lpp</i> , <i>rffM</i> , <i>ompF</i>	1,9; 1,5; -1,4
Transport- und Bindeproteine	<i>kdpC</i>	1,4
Regulatorische Funktion	<i>kdpE</i>	1,4
Zellprozesse (inkl. Adaptation, Protektion)	<i>minD</i> , <i>minE</i> , <i>dps</i>	1,5; 1,4; 1,5
DNA Replikation, Rekombination, Modifikation und Reparatur	<i>himD</i>	1,4
Hypothetisch, nicht klassifiziert, unbekannt	<i>b1957</i> , <i>b2629</i> , <i>ycaJ</i> , <i>yjbC</i>	1,5; 1,4; 1,4; 1,7
Aminosäure-Biosynthese und Metabolismus	<i>glnA</i> , <i>metE</i>	-1,8; -2,0
Nukleotid-Biosynthese and Metabolismus	<i>carA</i> , <i>carB</i>	-1,5; -1,5
Putative Transportproteine	<i>prlA</i>	-1,5
Putative Enzyme	<i>ysgA</i>	-1,4
Energie-Metabolismus	<i>ackA</i>	-1,4
Translation, post-translationale Modifikation	<i>rpsM</i> , <i>rplE</i> , <i>rplX</i>	-1,4; -1,4; -1,4
Zentraler intermediärer Metabolismus	<i>aceK</i>	-1,6

Tab. 3.3: Funktionelle Klassifizierung der unter Kaliumlimitation beeinflussten Gene. Zellen von *E. coli* MC4100 wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ in K10-MM angezogen und anschließend für weitere 5min in K0,1-MM überführt. Als Kontrolle dienten gleich behandelte Zellen, die jedoch für das gleiche Zeitintervall in K10-MM überführt wurden. **Fett unterlegt** dargestellt sind Gene, die einen erhöhten transkriptionalen RNA-Level im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Die übrigen Gene beziffern Gene mit erniedrigtem RNA-Level unter Kaliumlimitation. Die entsprechenden Induktions- bzw. Repressionsfaktoren der Gene sind in der rechten Spalte angegeben. Die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen erfolgte wie in Tab. 3.1. Die entsprechenden Genprodukte sind namentlich im Anhang angegeben (Tab. II).

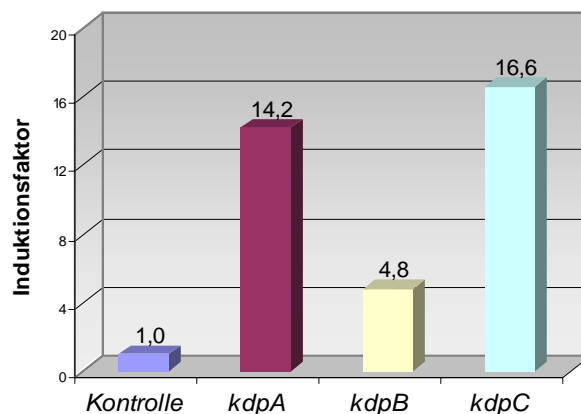


Abb. 3.2: Northern-Blot-Analysen zur Bestimmung der Induktionsfaktoren von *kdpABC* unter Kaliumlimitation. Gesamt-RNA von *E. coli* MC4100 wurde nach 5min Kaliumlimitation ($0,1 \text{ mM K}^+$) bei einer $OD_{600} = 0,6$ isoliert und nach Transfer auf eine Nylon-Membran, mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ -markierten DNA-Sonden der Gene *kdpA*, *kdpB*, *kdpC* hybridisiert (2.4.7). Dargestellt sind die Induktionsfaktoren (Doppelbestimmung) der Gene *kdpA*, *kdpB* und *kdpC* in Relation zur jeweiligen Kontrolle (10 mM K^+).

3.2 „Proteomics“: Gesamtzellextraktanalyse von *E. coli* mittels 2D-PAGE unter osmotischen Stressbedingungen und unter Kaliumlimitation

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE), die durch die Einführung von immobilisierten pH Gradienten durch Bjellqvist *et al.* (1982) revolutioniert wurde, ermöglicht die Auftrennung komplexer Proteingemische mit hohem Auflösungsvermögen. Neben der simultanen Auftrennung mehrerer hundert Proteine in einem Experiment, können wertvolle Informationen hinsichtlich der isoelektrischen Punkte (pI) von Proteinen, deren apparentes Molekulargewicht (MW), sowie über die jeweilige Proteinmenge gewonnen werden. Durch Vergleiche theoretischer und experimentell gewonnener Daten können somit globale Veränderungen von Proteinmustern biologischer Proben wie zum Beispiel Proteolyse, post- und co-translationale Modifikationen von Proteinen, die aufgrund von Genomsequenzanalysen nicht vorhersagbar sind, detektiert werden.

Bis dato existieren für *E. coli* lediglich Untersuchungen zu globalen Veränderungen der Proteinmuster im Zuge hyperosmotischer Stressbedingungen, die sich mit späteren Zeitpunkten der Adaptation beschäftigten (Jenkins *et al.*, 1990; Botsford, 1990). Da bislang weder Analysen globaler Veränderungen auf translationalem Niveau zu frühen Zeitpunkten der Adaptation (<15min) im Zuge eines hyperosmotischen Stresses noch hervorgerufen durch Kaliumlimitation publiziert wurden, sollten durch den Einsatz der 2D-PAGE-Methode Variationen im Proteinmuster sowohl unter osmotischem Stress (3.2.1), wie auch unter Kaliumlimitation (3.2.2) untersucht werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Untersuchungen hinsichtlich der Neusynthese von Proteinen mittels [³⁵S]Methionin-Markierung gelegt.

3.2.1 2D-PAGE-Analysen von *E. coli* unter osmotischen Stressbedingungen

Globale Veränderungen unter osmotischen Stressbedingungen wurden auf translationalem Niveau bei *E. coli* MC4100 mittels der 2D-PAGE untersucht. Zellen wurden hierzu wie unter 2.5.6 beschrieben in K10-MM angezogen und anschließend im Gegensatz zu Kontrollkulturen mit 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol für 9min inkubiert. Im Zuge der [³⁵S]Methionin-Markierung wurde das Zeitfenster um weitere 5min verlängert. Gesamtzellextrakte wurden nach Aufschluss der Zellen (2.5.6.2), wie beschrieben fokussiert (IEF, 2.5.6.4) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.6.4). Die isoelektrischen Fokussierungen der Gesamtzellextrakte wurden unter denaturierenden Bedingungen durch den Einsatz von 8 M Harnstoff als neutrales chaotropes Agens und durch Zusatz von 2 M Thio-Harnstoff, welches die Solubilisierung von Proteinen verbessert, durchgeführt (Rabilloud *et al.*, 1997). Zur Minimierung von Proteinaggregaten fanden Carrier Ampholyte (IPG-Puffer) mit Konzentrationen zwischen 0,5-1,25% (v/v) der entsprechenden pH-Bereiche Verwendung, wobei zur Verbesserung der Solubilisierung von Proteinen 2% (w/v) CHAPS (Zwitterionisches Detergenz) zugesetzt wurde. Disulfid-Brückenbindungen wurden durch Zugabe von DTT aufgehoben, sodass die Proteine in ihrer

reduzierten Form vorlagen. Durch diese Prozedur konnten Proteinmengen mit bis zu 400 µg je IPG-Streifen (13 cm) fokussiert werden.

Erste Versuche konnten zeigen, dass das Auflösungsvermögen der IEF-Streifen in einem linearen pH-Bereich zwischen 4-7 deutlich höher lag als es bei den IEF-Streifen 3-10 (NL, nicht linear) der Fall war (Daten nicht gezeigt). Zudem ergab eine Computer-gestützte Analyse aller *E. coli* Proteine, dass ca. 62% aller Proteine hinsichtlich ihres theoretischen pI im Bereich zwischen pH 4-7 liegen (Daten nicht gezeigt). Die IEF-Streifen 3-10 zeigten zudem ein schlechtes Auflösungsvermögen (starke Streifenbildung) im Bereich jenseits eines pH-Wertes von 7 (Daten nicht gezeigt), sodass für die folgenden Untersuchungen die IEF-Streifen 4-7 verwendet wurden.

Abb. 3.3 stellt ein vergleichendes 2D-Proteinmuster [³⁵S]Methionin-markierter Gesamtzellextrakte von *E. coli* unter osmotischem Stress (9min K10-MM/0,4 M NaCl + 5min radioaktiver „Pulse“) im Vergleich zu Kontrollkulturen (9min K10-MM + 5min radioaktiver „Pulse“) dar. Dabei konnte innerhalb des untersuchten Zeitfensters von 14min für 30 Proteine eine signifikant verstärkte Proteinneusynthese unter hyperosmotischen Bedingungen nachgewiesen werden. Die Identifikation der unter osmotischem Stress verstärkt neu synthetisierten Proteine erfolgte entweder über Edman-Abbau der Proteine SodB, Tpx, UspA (Dr. R. Schmid, Universität Osnabrück), mittels MALDI-Analysen der Proteine NifU (IscU), OmpX, OsmY, ProX und DnaK (Dr. Haike Henkel, Universität Greifswald) oder durch den Vergleich publizierter *E. coli* Referenzgele (Proteine: Dps, GroEL, GroES; www.expasy.org/ch2d; Tonella *et al.*, 1998; Tonella *et al.*, 2001; Kirkpatrick *et al.*, 2001; Abb. 3.3). Eine detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine zeigt Tab. 3.4. 19 weitere Proteine, die unter osmotischem Stress als signifikant „induziert“ nachgewiesen wurden, bislang aber noch nicht identifiziert werden konnten, sind mit Oip1-Oip19 („osmotisch induziertes Protein“) gekennzeichnet (Abb. 3.3, Tab. 3.4).

Für die experimentelle Bestimmung der pIs wurden spezielle pI-Skalen (Amersham Biosciences; Abb 3.3) herangezogen und anschließend der errechnete (www.expasy.org/tools/pi_tool.html) mit dem experimentellen Wert verglichen (Tab. 3.4). Die hier errechneten pIs weichen zu ± 0,2 Einheiten von den experimentell bestimmten Werten ab. Diese Abweichungen liegen dabei im Toleranzbereich, da der theoretische pI gewöhnlich um ± 0,25 Einheiten für denaturierte unmodifizierte Proteine vom experimentellen pI variieren kann (Bjellqvist *et al.*, 1993).

Die angegebenen Verhältnisse der mittleren Signalintensitäten einzelner Proteine wurden mittels ImageQuant v5.0 (Molecular Dynamics) bestimmt. Dazu wurden zunächst jeweils drei Gele der jeweiligen Bedingung mit Hilfe des 2D-Analyseprogramms Z3 (Compugen Ltd, Israel) nach Proteindetektion übereinander gelegt und anschließend die radioaktiven Signalintensitäten der einzelnen Proteine nach Kalibrierung der Gele bestimmt. Zur Kalibrierung dreier Gele eines Experiments, wurden 6 Proteine mit den geringsten Abweichungen in ihrer Intensität verteilt auf sämtliche Gele genutzt und als „Trend-Proteine“ beziffert (mit gelben Kreuzen in Abb. 3.3 markiert). Die größten Veränderungen in der mittleren Signalintensität unter osmotischem Stress zeigten dabei die Proteine

ProX, OsmY, Oip7 und OmpX (Faktor 14,7 bis 107,6). Alle anderen verstärkt neu synthetisierten Proteine liegen im Bereich zwischen einem Induktionsfaktor 1,5 und 10,7 (Tab. 3.4). In ihrer Proteinneusynthese reduziert konnten die beiden CysK-Proteine, zwei Isoformen des RS6-Proteins und das RS1-Protein identifiziert werden. Kein signifikanter Unterschied war für das identifizierte Protein Mdh (Malat-Dehydrogenase) zu beobachten (Abb. 3.3).

Es sei darauf hingewiesen, dass die Menge an präzipitierbarem radioaktiv markierten [³⁵S]Methionin-Protein (2.5.6.3) unter osmotischen Stressbedingungen rund 20% niedriger lag, als im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigt der Vergleich der [³⁵S]Methionin-Gele zwischen den Kontrollkulturen und den hyperosmotischen Stressbedingungen qualitativ weitere Unterschiede. Obwohl bei der jeweiligen 2D-PAGE-Analyse im Zuge der isoelektischen Fokussierung für beide Bedingungen die gleiche Menge an radioaktiv markierten Proteinen aufgetragen wurde (je 300.000 cpm), liegt die gemessene Gesamtsignalintensität aller aufgetrennten Proteine im pH-Bereich von 4-7 unter Kontrollbedingungen um etwa 20% höher als unter hyperosmotischen Bedingungen (Abb. 3.3). Dies spiegelt sich insbesondere durch die stärkeren Signalintensitäten von vornehmlich größeren Proteinen unter Kontrollbedingungen wider. Unter Osmostress werden die reduzierten Signalintensitäten dieser Proteine durch die Neusynthese anderer Proteine zwar zum größten Teil kompensiert, die reduzierte Gesamtsignalintensität impliziert aber auch gleichzeitig, dass zumindest ein Teil von radioaktiv markierten Proteinen, die im Zuge eines osmotischen Stresses neu synthetisiert werden, nicht durch die 2D-PAGE aufgelöst werden konnte. Untersuchungen zur Gesamtproteinmenge mittels Silber-Färbung, bzw. Coomassie-Blau-Färbung unter Einbeziehung der Zweikanal-Analysen (Bernhardt *et al.*, 1999) konnten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen osmotisch gestressten und nicht gestressten Zellen der Proteine darlegen (Daten nicht gezeigt).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich die gewonnenen Resultate der Proteinmuster der 2D-Analysen unter NaCl Stress von denen zu Sorbitol nicht signifikant unterschieden. Dabei ergaben sowohl die Gesamtproteinanalyse mittels Coomassie-Blau-Färbung oder Silber-Färbung wie auch die Analyse neu synthetisierter Proteine mittels *in vivo* Markierung mit [³⁵S]Methionin (2.5.6.1) keine zwischen NaCl und Sorbitol messbaren Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, dass alle hier als verändert dargestellten Proteine nicht das Resultat der Zelle auf Variationen in der Ionenstärke des Mediums sind, sondern als Folge einer Erhöhung der Osmolalität in ihrer Neusynthese beeinflusst werden.

Protein	Ratio mittlerer Signal- Intensitäten der Proteine (Kontrolle : 0,4 MNaCl)	Vorhergesagt		Experimentell	
		pI	MW (kDa)	pI	MW (kDa)
ProX	107,6	5,7	34	5,7	33
OsmY	41,8	5,4	18	5,3	20
OmpX	14,7	5,3	16	5,3	17
Tpx (Thiol-Peroxidase)	8,8	4,8	18	4,9	18
SodB (Superoxid-Dismutase)	8,1	5,6	21	5,6	23
Dps	7,2	5,7	19	5,8	19
NifU (IscU)	5,8	4,8	14	4,8	15
UspA	4,8	5,1	16	5,1	15
GroES (HspA)	2,4	5,1	10	5,2	15
DnaK (Hsp70)	1,8	4,8	69	4,8	70
GroEL (Hsp60)	1,5	4,9	57	4,9	57
Oip1	6,7			4,6	15
Oip2	5,7			4,6	28
Oip3	8,6			4,9	42
Oip4	10,7			5,4	30
Oip5	7,8			5,4	27
Oip6	6,5			5,4	43
Oip7	17,6			5,5	10
Oip8	10,6			5,5	15
Oip9	10,2			5,5	15
Oip10	7,2			5,6	26
Oip11	8,0			5,6	25
Oip12	5,3			5,6	9
Oip13	8,8			5,6	33
Oip14	7,6			6,0	18
Oip15	4,8			6,0	57
Oip16	6,7			6,1	16
Oip17	4,4			6,2	15
Oip18	3,8			5,0	25
Oip19	2,4			5,0	19
CysK (Protein 1+2)	-3,6/-4,6	-/5,8	34	5,6/5,8	35
30 S r-Protein RS1	-4,2	4,9	61	4,9	65
30 S r-Protein RS6 (Isoformen 1+2)	-9,8/-1,9	5,2/5,3	15	5,2/5,3	16

Tab. 3.4: Identifizierte Proteine der 2D-PAGE nach *in vivo* Markierung mit [³⁵S]Methionin. Der obere Bereich stellt die unter Osmostress verstärkt neu synthetisierten Proteine dar. Der mittlere Bereich zeigt die „osmotisch induzierten Proteine“ (Oip's), die bislang nicht namentlich identifiziert werden konnten. Der untere Bereich zeigt drei Proteine (+ Isoformen), die unter osmotischem Stress im Vergleich zur Kontrolle eine verringerte Neusynthese zeigten. Die unmodifizierte Form von RS6 besitzt einen pI von 5,3. Die entsprechenden Verhältnisse mittlerer Proteinsignalintensitäten wurden durch vergleichende Untersuchungen von je drei Gelen mittels Z3- und ImageQuant-Analysen gewonnen. Die jeweiligen Massen und pI's der Proteine sind rechts angegeben.

3.2.2 2D-PAGE-Analysen von *E. coli* unter Kaliumlimitation

Veränderungen hinsichtlich des Proteinmusters von *E. coli* in Reaktion auf Kaliumlimitation wurden mittels der 2D-PAGE-Analyse untersucht. Zellen von *E. coli* MC4100 wurden hierzu in K10-MM angezogen und anschließend in der exponentiellen Wachstumsphase für 5min in K0,1-MM überführt

(2.5.6). Innerhalb dieses Zeitintervalls konnten unter keiner der getesteten Bedingungen signifikante Unterschiede im Proteinmuster der aufgetrennten Gesamtzellextrakte in einem pH-Bereich von 4-7 bzw. pH 3-10 NL festgestellt werden. Dies ergaben die Analysen von Gelen, deren Proteine sowohl mit Coomassie-Blau wie auch mit Silber angefärbt wurden; zudem konnte keine Protein-Komponente des KdpFABC-Systems mittels Western-Blot-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen innerhalb des getesteten Zeitfensters nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate waren insofern verwunderlich, da bekannt ist, dass zumindest das hoch affine Kalium-Aufnahmesystem KdpFABC innerhalb kürzester Zeit (<5min) auf der Proteinebene mittels eindimensionalen SDS-Gelen detektiert werden kann (Hasemeier, 1999). Diese Ergebnisse konnten unter den hier getesteten Bedingungen mittels eindimensionaler SDS-PAGE im Gegensatz zur 2D-PAGE bestätigt werden. Dabei zeigte ein immunologischer Nachweis mittels Antiserum gegen den KdpFABC-Komplex und die Entwicklung mit Alkalischer Phosphatase ein schwaches Signal im Western-Blot innerhalb der ersten 5min, das bei Vergrößerung des Zeitintervalls auf 60min an Intensität weiter zunahm. In K10-MM angezogene Zellen zeigten hingegen keine KdpFABC-Produktion (Daten nicht gezeigt).

Da nicht auszuschließen war, dass die Menge an synthetisiertem Komplex innerhalb dieses kurzen Zeitintervalls der Kaliumlimitation unter der Nachweisgrenze der 2D-PAGE liegt und die Empfindlichkeit der eingesetzten Nachweismethoden zur Detektion des gebildeten Komplexes nicht ausreichen, wurde das Zeitfenster auf 3h Kaliumlimitation (0,1 mM K⁺; Kontrolle 10 mM K⁺) erhöht (2.5.6) und anschließend die Gesamtzellextrakte mittels 2D-PAGE analysiert (Abb. 3.4, A).

Bei dem Vergleich der Proteinmuster und der Proteinmengen zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, sodass exemplarisch in Abb. 3.4 nur Gesamtzellextrakte von *E. coli* unter Kalium-limitierenden Bedingungen aufgelöst dargestellt wurden. Lediglich ein Protein mit einem apparenten pI von 5,9 und einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa konnte unter Kalium-limitierenden Bedingungen innerhalb des getesteten Zeitfensters beobachtet werden (Abb. 3.4, A, B). Eine sehr schwache Detektion dieses Proteins war hierbei sowohl auf Coomassie-Blau gefärbten wie auch auf Silber gefärbten Gelen bei Auftrennung ausreichender Mengen an Gesamtprotein (100-400 µg) möglich. Ein immunologischer Nachweis mit Hilfe des Antiserums α KdpFABC und anschließender Entwicklung mittels Chemilumineszenz (2.5.7) konnte dieses Protein als KdpC identifizieren (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Menge an gebildetem KdpC erst nach längerer Kaliumlimitation ausreicht, um dieses mittels einer 2D-PAGE nachzuweisen. Eine Kaliumlimitation von 5min war indes nicht ausreichend (s. o.). Die anderen Komponenten (KdpF, KdpA und KdpB) des hoch affinen Kaliumtransportsystems KdpFABC konnten weder mittels immunologischem Nachweis, noch durch Standardfärbemethoden unabhängig vom verwendeten pH-Bereich der eingesetzten IEF-Streifen (pH 4-7 L; pH 3-10 NL) detektiert werden (Gel mit pH 3-10 NL nicht gezeigt). An dieser Stelle sollte allerdings darauf hingewiesen werden, dass KdpF bedingt durch sein geringes Molekulargewicht (3 kDa), nicht aufgelöst werden konnte. Zudem ist KdpA aufgrund der geringen

antigenen Eigenschaften gegenüber dem verwendeten Antiserum α KdpFABC (Siebers, 1988) immunologisch nicht nachzuweisen.

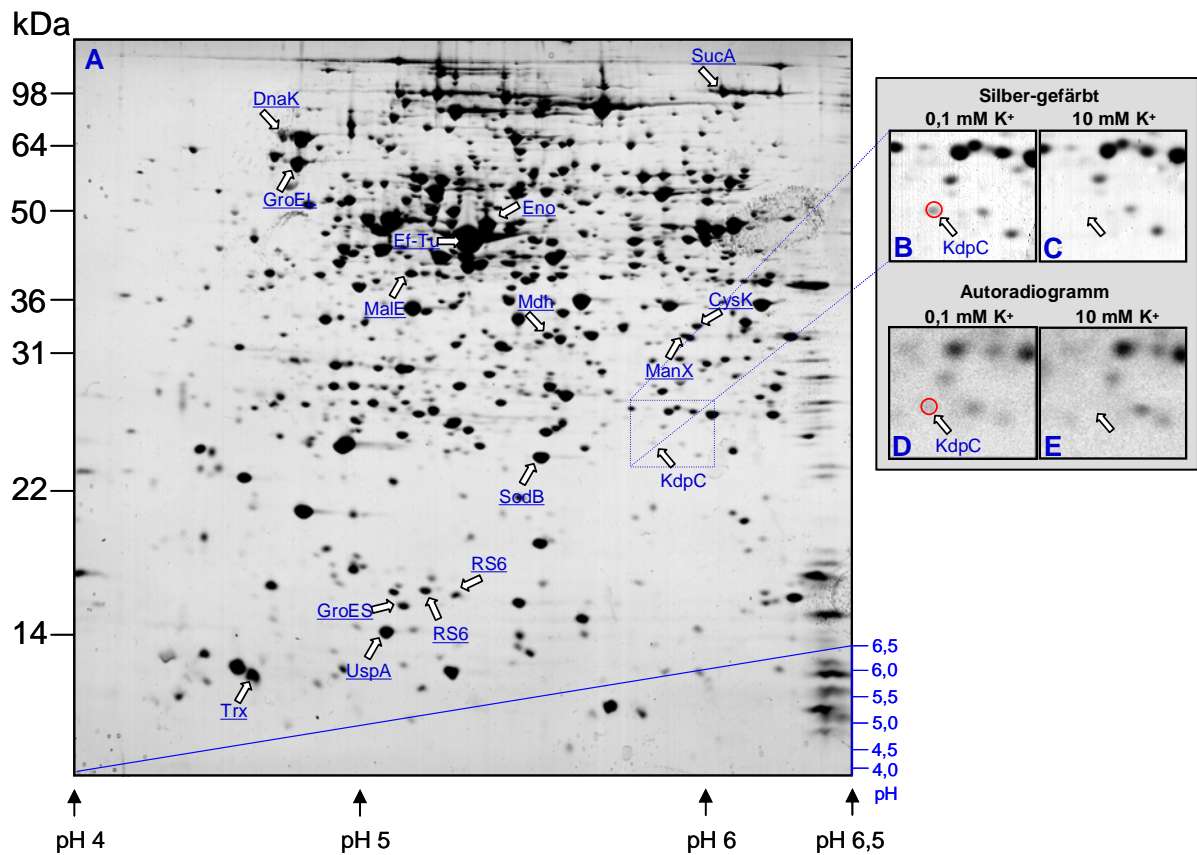


Abb. 3.4: 2D-PAGE von *E. coli* MC4100 Gesamtzellextrakten unter Kaliumlimitation (Silber-gefärbt). Zellen wurden für je 3h bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ in $K_0,1$ -MM (Referenzgel links A) bzw. K_{10} -MM angezogen und anschließend je 100 μ g Gesamtprotein in einem linearen pH-Bereich zwischen 4-7 fokussiert. Die zweite Dimension erfolgte auf einem 13% SDS-Gel. Zur Orientierung ist eine Reihe an Proteinen, die mittels Vergleich publizierter Gele (www.expasy.org/ch2d) identifiziert werden konnte, **unterstrichen blau** angegeben (A). Vergrößert dargestellt ist ein Sektor in dem KdpC unter Kaliumlimitation (3h) (B) im Vergleich zur Kontrolle (C) nachgewiesen werden konnte. **D:** Autoradiogramm [35 S]Methionin-markierter Gesamtzellextrakte unter Kaliumlimitation (Ausschnitt). Zellen wurden hierzu bei $OD_{600} = 0,6$ für 10min einer Kaliumlimitation (inkl. 5min „Pulse“) unterzogen. Eine Neusynthese von KdpC innerhalb dieses Zeitintervalls ist im Vergleich zum Kontrollautoradiogramm (E) zu beobachten. Aufgetrennt wurden ca. 15 μ g (300.000 cpm) radioaktiv markiertes Gesamtprotein. Links dargestellt ist ein Proteinmarker, **unten blau** angegeben die entsprechende pI-Skala. Der Zellaufschluss erfolgte bei Gesamtzellextrakt-Analysen mittels Ultraschall, bei den *in vivo* Markierungen mittels „Freeze & Thaw“ (2.5.6.2).

Um der Frage nachzugehen, ob möglicherweise eine ineffiziente Solubilisierung des Kdp-Komplexes durch das eingesetzte Detergenz CHAPS Ursache des nicht detektierbaren KdpB-Proteins darstellt, wurden parallel Untersuchungen zur Solubilisierung des KdpFABC-Komplexes durchgeführt. Diese zeigten, dass mit Ausnahme von KdpC (~60% Solubilisierungsrate), insbesondere KdpB nur zu ca. 25% durch CHAPS als Detergenz gelöst werden kann (Daten nicht gezeigt). Eine fast vollständige Solubilisierung des Komplexes konnte hingegen durch die Verwendung von 1% (w/v) Dodecylmaltosid erreicht werden (Dateien nicht gezeigt). Zudem ließ sich KdpB nur signifikant mit gereinigtem Komplex (Dr. Marc Bramkamp, Universität Osnabrück) bei Verwendung eines pH-

Bereiches 3-10 NL, jenseits eines pI von 7 fokussieren. Diese Beobachtung korreliert mit dem theoretisch zu erwartenden pI von KdpB (pI: 7,6; MW: 72 kDa). Im Gegensatz zu KdpC, zeigte dabei die Fokussierung des gereinigten Komplexes für KdpB jedoch keinen distinkten „Protein-Spot“ sondern schmierte sehr stark auch bei Zugabe von 1% (w/v) Dodecylmaltosid (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen zur Neusynthese von Proteinen mittels *in vivo* [³⁵S]Methionin-Markierung (2.5.6.1) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollkulturen und Zellen, die in K10-MM angezogen wurden und in der exponentiellen Wachstumsphase anschließend für 10min (inkl. 5min radioaktiver „Pulse“) einer Kaliumlimitation (0,1 mM K⁺) ausgesetzt wurden (Gele nicht gezeigt). Lediglich für das KdpC-Protein konnte innerhalb dieses Zeitfensters eine schwache Neusynthese unter Kaliumlimitation im Vergleich zur Kontrolle bei Verwendung eines linearen pH-Bereiches von 4-7 beobachtet werden (Abb. 3.4, D, E).

3.3 Biochemische Charakterisierung von UspG

Untersuchungen globaler transkriptionaler Veränderungen unter osmotischen Stressbedingungen zeigten durch den Einsatz der DNA-Microarray-Methode sowohl unter NaCl wie auch unter Sorbitol einen erhöhten Level an *ybdQ*-Transkript (*uspG*). Dies konnte auch durch die Analyse mittels Northern-Blots bestätigt werden (3.1ff; Tab. 3.2). Das entsprechende Protein wurde ursprünglich als UP12-Protein (unbekanntes Protein Nr. 12) in früheren Arbeiten auf *E. coli* 2D-Gelen identifiziert (Pasquali *et al.*, 1996). Untersuchungen zur Domänenhomologie von UP12 ergaben im Rahmen dieser Arbeit, dass es sich dabei um einen Vertreter der Usp-Proteinfamilie in *E. coli* handelt. Dies wurde durch Gustavsson *et al.* (2002) kürzlich bestätigt, und das entsprechende UP12 (YbdQ)-Protein wurde dort in UspG umbenannt. Um erstmalig biochemische Informationen bezüglich des UspG-Proteins zu erhalten (z. B. Enzymaktivitäten), sollte das UspG-Protein gereinigt und anschließend mittels *in vitro* Studien charakterisiert werden.

3.3.1 Überproduktion, Lokalisation und Reinigung von 10His-UspG aus *E. coli*

Durch Vergleiche der Hydropathieprofile entsprechender Vertreter der Usp-Proteinfamilie wird angenommen, dass es sich bei diesen Proteinen um zytosolisch lokalisierte Proteine handelt (Bochkareva *et al.*, 2002). Das Hydropathieprofil, welches mit Hilfe des Internet-Analyse Programms „GREASE“ nach Kyte & Doolittle (1982) für 10His-UspG errechnet wurde, ist in Abbildung 3.5 dargestellt (<http://workbench.sdsc.edu/>). 10His-UspG zeigt dabei eine mittlere Hydrophobizität von -0,3056. Auch eine zusätzliche Analyse hinsichtlich transmembraner Regionen mittels des Internet-Programms „DAS“ (www.sbc.su.se/~miklos/DAS/) ergab keinerlei Hinweise auf potentielle Transmembrandomänen und unterstreicht damit den „zytosolischen Charakter“ von UspG.

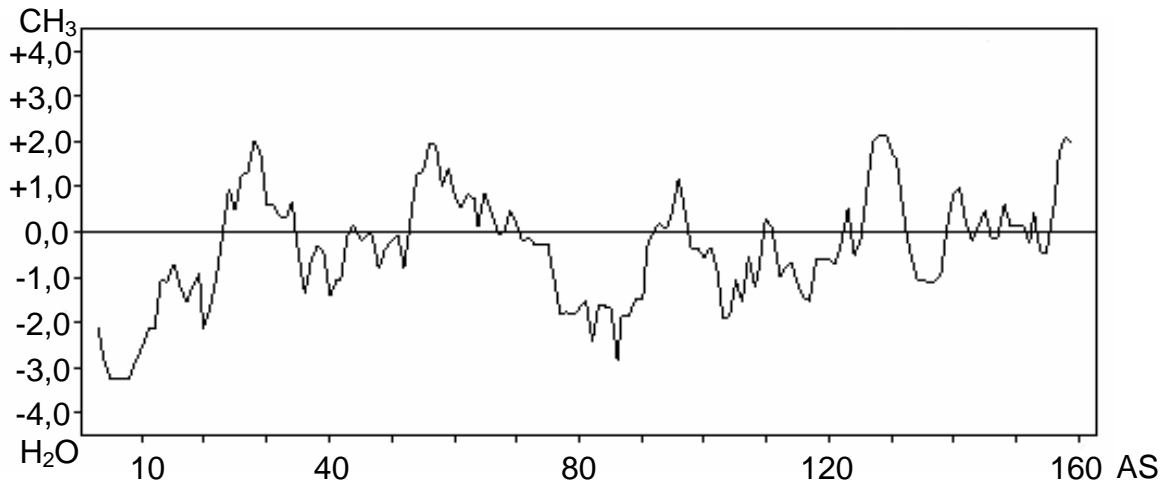


Abb. 3.5: Hydrophathieprofil von 10His-UspG. Das Profil wurde nach Kyte & Doolittle (1982) mit Hilfe des Programms „GREASE“ errechnet. Die mittlere Hydrophobizität lag bei -0,3056. X-Achse: Aminosäuren (AS), Y-Achse: Hydrophobizität. Fenster = 7.

Für die Reinigung von 10His-UspG wurden durch Amplifikation des *uspG*-Gens von chromosomaler DNA aus *E. coli* MC4100 und anschließender Klonierung in den Expressionsvektor pET16b am 5'Ende des *uspG*-Gens zehn Kodons für Histidin inklusive einem „Linker“ von 9 Aminosäuren angefügt (2.4.12). Die anschließende Expression des *uspG*-Gens erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysS nach Transformation des Plasmids pET-UspG, wie unter 2.5.1 beschrieben. 10His-UspG konnte anschließend aus der zytosolischen Fraktion mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (2.5.1) gereinigt werden (Abb. 3.6).

Durch Erniedrigung der Induktionstemperatur auf 25°C war es möglich, einen Großteil an 10His-UspG in der löslichen Form zu halten (Abb. 3.6, Spur 5). Die Menge an löslichem 10His-UspG reichte dabei unter diesen Induktionsbedingungen aus, um unter nativen Bedingungen reinigen zu können. 10His-UspG lag dabei nach der Affinitätschromatographie zu >95% rein in Lösung vor (Abb. 3.6, Spur 6). Die Menge an gereinigtem 10His-UspG betrug pro Liter Zellkultur etwa 0,1-0,2 mg. Den möglichen Ursachen des Auftretens von 10His-UspG bei der niedertourigen Zentrifugation im Pellet (Abb. 3.6, Spur 3) als auch in geringen Mengen in der Membranfraktion (Abb. 3.6, Spur 4) wurden nicht weiter nachgegangen. Vermutlich handelt es sich jedoch um unlösliche 10His-UspG-Einschlusskörperchen („inclusion-bodies“). Dabei trägt sicherlich ein Teil an nicht aufgeschlossenen Zellen zur detektierbaren Menge an 10His-UspG in der Pelletfraktion bei. 10His-UspG besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 18,5 kDa (Monomer). Der immunologische Nachweis von gereinigtem 10His-UspG erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen den „His-Tag“ (2.5.7). Das im Immunoblot auftretende Signal bei etwa 18,5 kDa stimmte dabei mit dem berechneten Molekulargewicht der monomeren Form von 10His-UspG gut überein (Abb. 3.6, Spur 7). Ein zusätzliches schwaches Signal trat bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa im Western-Blot auf (Abb. 3.6, Spur 7). Vermutlich handelt es sich dabei um eine dimere Form von 10His-UspG (siehe 3.3.3ff).

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass eine verbesserte Reinigung von 10His-UspG durch eine vorgeschaltete Ammoniumsulfat-Fällung der zytosolischen Fraktion erreicht werden konnte, ohne die Aktivitäten von 10His-UspG zu beeinflussen (2.5.1; Daten nicht gezeigt).

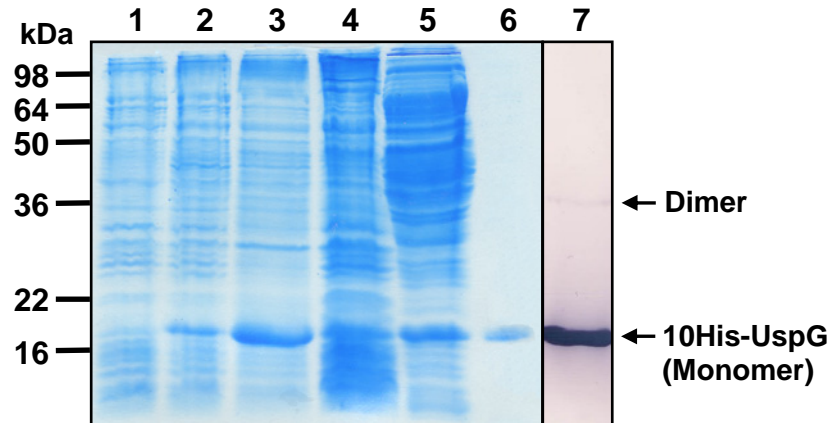


Abb. 3.6: Lokalisation und Reinigung von 10His-UspG. Die Abbildung zeigt links ein Coomassie-Blau gefärbtes 12,5% SDS-Gel der verschiedenen Zellfraktionen von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG nach 3h Induktion. **Spur 1:** 25 µg Gesamtzellextrakt der uninduzierten Kontrolle; **Spur 2:** 25 µg Gesamtzellextrakt nach Induktion. **Spur 3-5:** Die durch Zentrifugation gewonnenen Pellets wurden im gleichen Volumen wie die Überstände resuspendiert und anschließend jeweils gleiche Volumina auf das SDS-Gel aufgetragen. **Spur 3:** Fraktion nach niedertouriger Zentrifugation; **Spur 4:** Membranfraktion nach hochtouriger Zentrifugation; **Spur 5:** Zytoplasmafraktion; **Spur 6:** mit 250 mM Imidazol eluiertes 10His-UspG (3 µg) nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie; **Spur 7:** Immunoblot von gereinigtem 10His-UspG (1,5 µg) mit monoklonalen Antikörpern gegen den "His-Tag" (2.5.7). Die monomere Form von 10His-UspG zeigt ein apparentes MW von ~18,5 kDa. Eine schwache Dimer-Bande von 10His-UspG ist im Western-Blot (**Spur 7**) bei ca. 37 kDa zu erkennen.

3.3.2 Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von 10His-UspG

Bisher wird angenommen, dass *E. coli* zwei Usp-Subfamilien besitzt: Zum einen die UspA-Subfamilie, deren Vertreter UspA, posttranslational an bislang nicht identifizierten Serinen- und Threoninen phosphoryliert wird (Freestone *et al.*, 1997); zum anderen die UspFG-Subfamilie, deren Vertreter vermutlich ATP binden können (Zarebinski *et al.*, 1998; Sousa & McKay, 2001; Saveanu *et al.*, 2002; Kvint *et al.*, 2003). Letztere Annahme entstammt dabei kristallographischen Untersuchungen zum MJ0577-Protein aus *Methanococcus jannaschii*, einem Vertreter der UspFG-Subfamilie, das ein gebundenes ATP-Molekül in der Kristallstruktur aufwies (Zarebinski *et al.*, 1998). Eine intrinsische biochemische Funktion konnte allerdings für MJ0577 nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollten im Zuge dieser Arbeit erstmalig mögliche posttranslationale Modifikationen an gereinigtem UspG bzw. eine mögliche ATP-Bindung untersucht werden.

3.3.2.1 Modifikation von 10His-UspG *in vitro*

Vorversuche mittels eindimensionaler SDS-PAGE (16 x 20 cm Gele) zeigten im Western-Blot bei steigender Proteinkonzentration an gereinigtem 10His-UspG, zusätzlich zu einer Proteinbande mit

einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa eine zweite Bande leicht höheren Molekulargewichts, die sich auf kleinen SDS-Gelen kaum auflösen ließ (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte die isoelektrische Fokussierung von gereinigtem 10His-UspG neben der unmodifizierten Form zwei weitere isomere Formen von 10His-UspG (siehe 3.3.2.3). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass eine posttranslationale Modifikation von 10His-UspG möglicherweise bereits im Laufe der Expression von 10His-UspG in *E. coli* stattfindet. Um die Art der Modifikation von 10His-UspG näher zu untersuchen, wurden zeitabhängige Markierungsversuche mittels radioaktiver Nukleotide durchgeführt um eine potentielle Modifikation von gereinigtem 10His-UspG *in vitro* zu testen.

Phosphorylierung: Um eine Autophosphorylierung von 10His-UspG nachzuweisen, wurde wie unter 2.5.8 beschrieben, gereinigtes 10His-UspG mit 1 mM radioaktivem [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (198,6 mCi/mmol) innerhalb eines Zeitfensters von 30s bis 10min inkubiert. Dabei zeigte sich, dass 10His-UspG innerhalb der ersten 30s bereits phosphoryliert vorlag (Abb. 3.7, A). Dabei stieg innerhalb eines Zeitintervalls von ca. 1,5min die Menge an phosphoryliertem 10His-UspG rasch an und nahm im weiteren zeitlichen Verlauf weiter zu. Die Initialgeschwindigkeit lag dabei bei $\sim 0,007$ pmol/min. Insgesamt betrug die Menge an phosphoryliertem Protein nach 10min 0,023 pmol und entspricht dabei einem Phosphorylierungsgrad von 10His-UspG von $\sim 0,04\%$ (Abb. 3.7, B). Eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von gereinigtem Protein konnte trotz Variationen in der Zusammensetzung des Markierungspuffers (100-500 mM NaCl; 2-10 mM DTT) sowie durch Veränderungen der Inkubationstemperatur (25-37°C) nicht erzielt werden. Der zeitlich aufgelöste Verlauf der Menge an phosphoryliertem Protein in Abb. 3.7 (B) lässt allerdings darauf schließen, dass die Phosphorylierung nach 10min noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Inwiefern eine Vergrößerung des Zeitfensters den Phosphorylierungsgrad beeinflusst kann zu dem jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht beurteilt werden, da dieses im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen quantitativ nicht weiter verfolgt wurde.

Adenylierung: Untersuchungen zur Autoadenylierung von gereinigtem 10His-UspG wurden wie unter 2.5.9 beschrieben durchgeführt. Durch den Einsatz variierender Mengen an radioaktivem [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP konnte ebenfalls wie für [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP eine rasche Zunahme von markiertem 10His-UspG nachgewiesen werden. Wie der zeitliche Verlauf der Markierung von 10His-UspG in Abb. 3.7 (C) zeigt, war dabei innerhalb der ersten 30s bereits markiertes Protein nachzuweisen, dessen Menge innerhalb des weiteren zeitlichen Verlaufs zunahm. Dabei betrug die Initialgeschwindigkeit von 10His-UspG bei dem Einsatz von 1 mM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (198,6 mCi/mmol) $\sim 0,003$ pmol/min (Abb. 3.7, D). Die Menge an markiertem Protein betrug nach 10min $\sim 0,011$ pmol, was sich in einer leichten Sättigung im Kurvenverlauf widerspiegelte. Nach 10min betrug der Adenylierungsgrad $\sim 0,02\%$ und lag damit etwa halb so hoch wie im Vergleich zur Phosphorylierung. Der weitere zeitliche Verlauf der Adenylierung von 10His-UspG wurde nicht weiter quantitativ verfolgt. Eine Verbesserung des

Adenylierungsgrades von 10His-UspG konnte trotz Veränderungen der bereits oben beschriebenen Inkubationsbedingungen nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

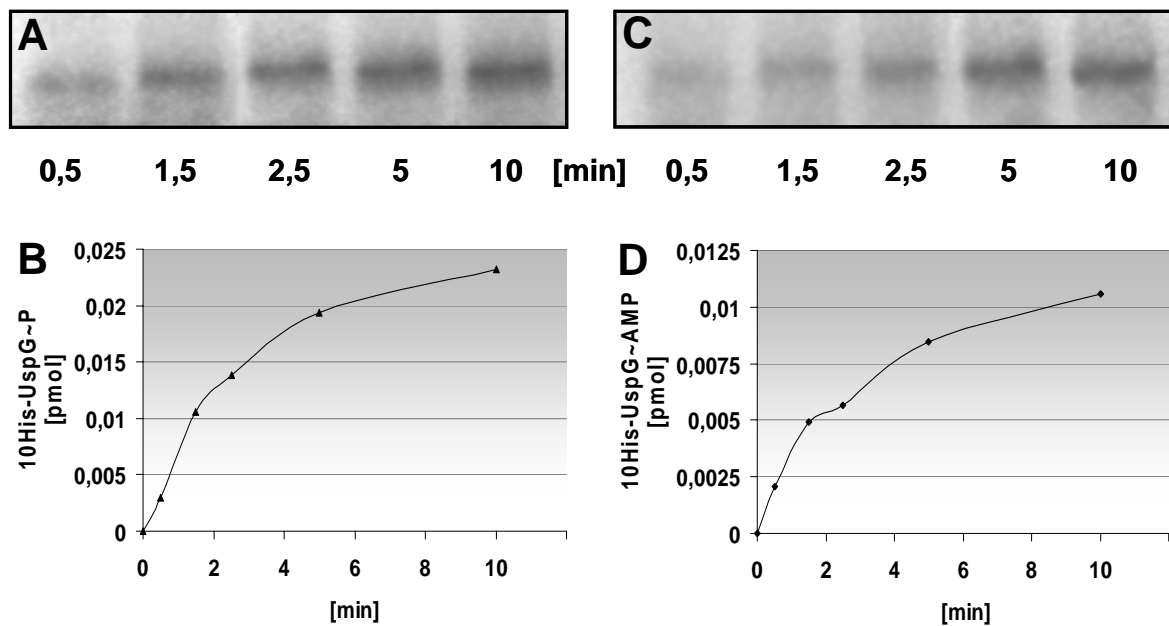


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der Adenylierung und Phosphorylierung von 10His-UspG *in vitro*. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Autoradiogramme von auf Nitrozellulose übertragenen SDS-Gelen. Dazu wurden je 1 μg gereinigtes 10His-UspG in PA-Puffer mit 1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (A) und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (C) (je 198,6 mCi/mmol), wie unter 2.5.8 bzw. 2.5.9 beschrieben, bei 37°C für 10min inkubiert. Die Reaktionen wurden zu entsprechenden Zeitpunkten (0,5-10min) durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt und anschließend auf einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung der Menge an phosphoryliertem 10His-UspG (B) und adenyliertem 10His-UspG (D) innerhalb des getesteten Zeitfensters erfolgte nach 24h Exposition mittels ImageQuant V5.0.

Modifikation oder ATP-Bindung: Obwohl es schwer vorstellbar ist, dass eine ATP-Bindung an einem Protein eine denaturierende SDS-PAGE übersteht - mittels 2% (w/v) SDS denaturiertes Protein zeigte keine signifikante Markierung von 10His-UspG und wurde somit vollständig denaturiert (Abb. 3.8., E) - wurde zur Unterscheidung, ob die gemessenen Markierungen von 10His-UspG auf eine kovalente Modifikation oder auf einer reinen ATP-Bindung beruhen, folgender Experimentalansatz gewählt:

Grundlage dieses Experiments ist, dass im Zuge eines hohen Überschusses an kaltem ATP bereits gebundenes heißes ATP aus der Bindetasche von 10His-UspG im Laufe der Zeit verdrängt wird, sofern es sich um eine ATP-Bindung handelt („Pulse-Chase“). Infolgedessen sollte es zu einer Erniedrigung der Menge an detektierbarem markierten Protein kommen; bei einer kovalenten Modifikation sollte dieses hingegen nicht zu beobachten sein. Die „Pulse-Chase“-Experimente wurden wie unter 2.5.11 beschrieben durchgeführt. Gereinigtes 10His-UspG wurde mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol) für 30-60min inkubiert (Abb. 3.8, A, D). Dabei wurden in Abb. 3.8 die direkt gemessenen Signalintensitäten als Maß an radioaktiv markiertem 10His-UspG, ohne Berücksichtigung der tatsächlich eingesetzten ATP-Konzentration, aufgetragen. Die gemessene

Signalintensität nach 60min Inkubation mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol) wurde jeweils auf 100% gesetzt, da sie der maximal detektierbaren Menge an radioaktiv markiertem 10His-UspG entsprach (Abb. 3.8, A). Dabei sei erwähnt, dass die gemessenen Signalintensitäten für $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -markiertes Protein um den Faktor ~ 2 höher lagen als bei $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -markiertem 10His-UspG. Wie aus Abb. 3.8 (B) hervorgeht führte eine 60min Inkubation von 10His-UspG mit 2 mM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (99,3 mCi/mmol) zu einer Reduktion der Menge an radioaktiv markiertem Protein um $\sim 85\text{-}90\%$ im Vergleich zu (A). Dieser hohe Überschuss an kaltem ATP sollte somit bei „Pulse-Chase“-Experimenten zu einer Reduktion der messbaren Signalintensitäten führen. Wie Abb. 3.8 (C) zeigt ist dies zu beobachten, sofern mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol) für 30min vorinkubiert wird und anschließend ein Überschuss (30.000fach) an kaltem ATP [2 mM] für weitere 30min zugegeben wird. Dort war eine Reduktion der Signalintensität von $\sim 35\%$ unabhängig vom verwendeten Isotop zu beobachten (C). Diese Reduktion des Signals fiel dabei im Vergleich zu (B) allerdings bei weitem nicht so stark aus wie es bei einer ATP-Bindung zu erwarten wäre. Vielmehr verblieb die Menge an radioaktiv detektierbarem Protein bei dem „Pulse-Chase“-Experiment auf etwa dem gleichen Niveau wie bei (D) ($\sim 63\%$ Signalintensität); die radioaktive Markierung blieb trotz des Überschusses an kaltem ATP erhalten.

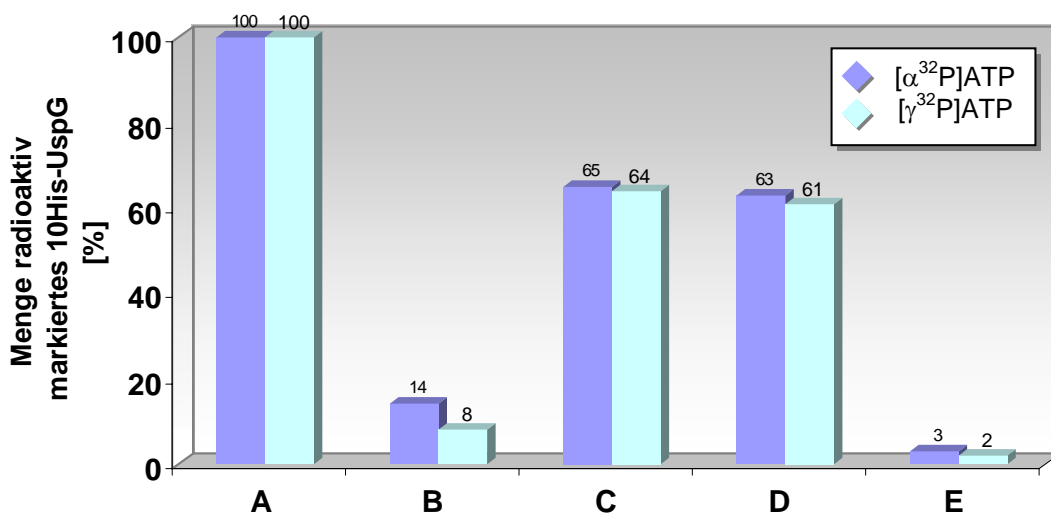


Abb. 3.8: „Pulse-Chase“-Experimente zum Nachweis der Modifikation von 10His-UspG. Je 1 μg gereinigtes 10His-UspG wurde wie unter 2.5.11 beschrieben, mit radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bei 37°C inkubiert. **Rubrik A:** 60min Inkubation mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol); **Rubrik B:** 60min Inkubation mit 2 mM radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (99,3 mCi/mmol); **Rubrik C:** 30min Vorinkubation mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol; „Pulse“) und 30min „Chase“ mit 2 mM kaltem ATP (die spezifische Radioaktivität von ATP betrug dabei nach Zugabe von kaltem ATP 99,3 mCi/mmol); **Rubrik D:** Inkubation für 30min mit 5 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol); **Rubrik E:** denaturiertes Protein (2% (w/v) SDS) für 60min radioaktiv markiert mit je 5 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol). Die Menge an radioaktiv markiertem 10His-UspG wurde für die 60minütige Inkubation mit 5 μCi radioaktivem $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol) (**Rubrik A**) auf 100% gesetzt und die anderen Signalintensitäten prozentual für diesen Wert bestimmt (siehe Text).

Im Falle einer ATP-Bindung wäre zu erwarten, dass im zeitlichen Verlauf die Menge an radioaktiv markiertem Protein im Zuge eines Überschusses an kaltem ATP deutlich unter das Niveau von (D) bzw. (B) fällt. Da dies nicht zu beobachten war, muss es sich bei den in Abb. 3.7 gezeigten Markierungen von 10His-UspG um kovalente Modifikationen handeln, bei dem der Umsatz von ATP zu einer Phosphorylierung und Adenylierung führt. Eine ATP-Bindung als Ursache der nachweisbaren radioaktiven Markierung von 10His-UspG ist somit auszuschließen.

3.3.2.2 Nachweis der *in vitro* Adenylierung von 10His-UspG mittels TLC

Der direkte Nachweis der Adenylierung von 10His-UspG sollte durch die Behandlung von [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP-markiertem Protein durch Inkubation mit 0,5 M Piperidin und anschließender Auftrennung der Piperidin-Hydrolysate, wie unter 2.5.10 beschrieben, erbracht werden. Dabei wird im Zuge der Piperidin-Behandlung radioaktiv markiertes AMP vom Protein~AMP Komplex entfernt, wobei anschließend freies radioaktives AMP mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt werden kann (Bradley *et al.*, 1984).

Das Autoradiogramm zeigte dabei eine deutliche radioaktive Bande bei Piperidin-behandeltem 10His-UspG (Abb. 3.9, Spur 1), die einem gleichzeitig aufgetragenen kalten AMP-Standard (25 nmol) zugeordnet werden konnte. Diese Zuordnung war aufgrund der Verwendung spezieller fluoreszierender TLC-PEI-Zellulose Platten unter einem UV-Schirm und anschließender radioaktiver Markierung des kalten AMP möglich. Der Anteil an freigesetztem radioaktiv markierten AMP durch die Piperidin-Behandlung betrug dabei ca. 13% der messbaren Gesamtradioaktivität in Spur 1. Eine signifikante Detektion an freiem AMP konnte in der unbehandelten Kontrolle nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.9, Spur 2).

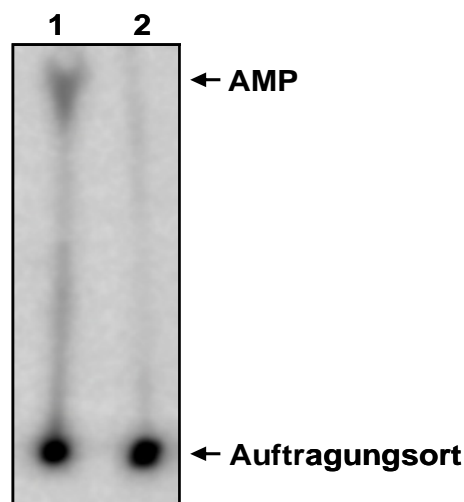


Abb. 3.9: Dünnschicht-Chromatographie von Piperidin-behandeltem 10His-UspG~AMP Komplex (Autoradiogramm). Die Auftrennung der Piperidin-Hydrolysate von behandeltem 10His-UspG erfolgte wie unter 2.5.10 beschrieben. 3 μg radioaktiv markiertes Protein, welches zuvor mit 10 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (79,48 Ci/mmol) für 1h bei 37°C inkubiert wurde, wurde mittels 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, isoliert und nach Präzipitation des 10His-UspG~AMP Komplexes mit 0,5 M Piperidin (2h, 37°C) behandelt. **Spur 1:** 10His-UspG~AMP nach Piperidin-Behandlung; **Spur 2:** 10His-UspG~AMP ohne Piperidin-Behandlung (Kontrolle). Laufbedingungen: 1. Lauf mit 0,5% (v/v) Ameisensäure, 2. Lauf mit 0,15 M Li^+ -Formiat pH 3,0 bei RT.

Vermutlich ist der Anteil an freigesetztem radioaktiven AMP in Spur 1 größer als 13%, da während des TLC-Laufs beobachtet werden konnte, dass der Laufpuffer um den aufgetragenen 10His-UspG(~AMP) Ansatz (siehe Auftragungsort, Abb. 3.9, Spur 1) regelrecht herumfließt und somit vermutlich nur ein Teil an freigesetztem radioaktiven AMP überhaupt in die PEI-Zellulose Platte einfließt. Aus diesem Grund kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht unterschieden werden, ob die Signale auf der Höhe des Auftragungsortes lediglich radioaktivem 10His-UspG~AMP Komplex entsprechen, oder ob dort ein Großteil an nicht eingelaufenem radioaktiven AMP zur Signalintensität beiträgt. Die Piperidinbehandlung führte jedoch eindeutig zur Freisetzung von zuvor kovalent am Protein gebundenem AMP und bestätigt damit eindeutig die Ergebnisse der „Pulse-Chase“ Experimente (siehe Abb. 3.8).

3.3.2.3 2D-PAGE von 10His-UspG und Markierung mittels radioaktivem ATP

Im Autoradiogramm konnte sowohl mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ eine radioaktive Markierung von 10His-UspG innerhalb kürzester Zeit detektiert werden. Diese ließ sich auf eine Autophosphorylierung und Autoadenylierung des Proteins zurückführen (3.3.2.1). Da derlei Modifikationen zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes (Ansäuerung) des Proteins führen, sollte durch den Einsatz der 2D-PAGE der Frage nachgegangen werden, ob sich eine solche Auftrennung von adenyliertem und phosphoryliertem 10His-UspG bestätigen würde. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob bereits 10His-UspG, ähnlich wie UspA (Freestone *et al.*, 1997), *in vivo* posttranslational modifiziert wird und ob auch dort der Grad an Modifizierung, der unter *in vitro*-Bedingungen bei <0,05% (siehe 3.3.2.1) lag, vergleichsweise gering ausfällt.

Die isoelektrische Fokussierung von gereinigtem 10His-UspG und anschließender 13% SDS-PAGE erfolgte wie unter 2.5.6.4 und 2.5.6.5 beschrieben und konnte zeigen, dass bereits während der Expression des *uspG*-Gens in *E. coli* 10His-UspG posttranslational modifiziert wird. So wiesen 2D-Analysen mit gereinigtem Protein im immunologischen Nachweis (2.5.7) drei deutliche Signale unterschiedlicher Intensitäten auf, die verschiedene Isoformen von 10His-UspG repräsentieren (Abb. 3.10, A). Eine Quantifizierung der im Western-Blot auftretenden isomeren Formen von 10His-UspG ergab ein relatives Verhältnis zur unmodifizierten Form von 2:1 für die Isoform Nr. 1 (50%) und 2:0,1 für die Isoform Nr. 2 (5%). Neben einer stärkeren Ansäuerung zeigten beide Isoformen ein Molekulargewicht, das geringfügig über dem von nicht modifiziertem 10His-UspG lag. Dabei entsprach dieses Molekulargewicht einer Proteinbande, die bereits im Vorfeld im Zuge steigender Proteinmengen an 10His-UspG auf eindimensionalen SDS-Gelen (16 x 20 cm) beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die beiden Isoformen von 10His-UspG phosphoryliertem bzw. adenyliertem 10His-UspG entsprechen, wurde 2,5 µg gereinigtes Protein für 1h bei 37°C mit 10 µM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 79,48 Ci/mmol) inkubiert und anschließend der gesamte Reaktionsansatz durch 2D-PAGE aufgetrennt. Dabei konnte eine eindeutige Zuordnung des durch $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ adenylierten

10His-UspG Proteins zur isomeren Form Nr. 2 gemacht werden (Abb. 3.10, A, B). Demnach handelt es sich bei der am schwächsten unter *in vivo*-Bedingungen repräsentierten Isoform um adenyliertes 10His-UspG Protein. Der Adenylierungsgrad unter *in vivo* Bedingungen entspricht dabei ~5% und liegt damit ~250fach höher als unter *in vitro*-Testbedingungen (siehe 3.3.2.1). Eine eindeutige Zuordnung für [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP-markiertes Protein war aufgrund der sehr geringen Signalintensitäten und des zudem relativ diffusen Signals nach der 2D-PAGE zu keiner der isomeren Formen möglich (Daten nicht gezeigt). Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass eine Inkubation (1h 37°C) von gereinigtem 10His-UspG unberücksichtigt von der Anwesenheit kalten ATPs (10 mM) zu keiner messbaren Verschiebung der Verhältnisse der Isoformen zu unmodifiziertem Protein führte (Daten nicht gezeigt). Dies ist jedoch möglicherweise auf den bereits oben angesprochenen geringen Markierungsgrad von 10His-UspG *in vitro* zurückzuführen, sodass dessen Nachweis hier vermutlich unter der Nachweisgrenze der eingesetzten Methode liegt.

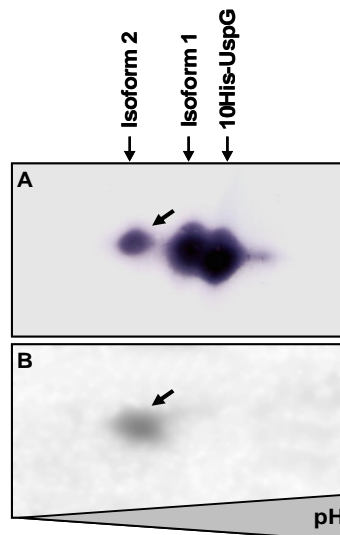


Abb. 3.10: 2D-PAGE von gereinigtem 10His-UspG und Identifikation der adenylierten Form von 10His-UspG. Die Abbildung zeigt den Immunoblot mit Antikörpern gegen den “His-Tag“ von 10His-UspG (A) sowie das entsprechende Autoradiogramm (B) von gereinigtem und mittels [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP markiertem 10His-UspG nach IEF (pH 3-10 NL, 2.5.6.4) und anschließender 13% SDS-PAGE (2.5.6.5). Dazu wurden 2,5 μg gereinigtes Protein (2.5.1) mit 10 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (79,48 Ci/mmol) in einem Reaktionsvolumen von 25 μl für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Die Identifizierung der adenylierten Isoform erfolgte anschließend durch Exposition der Membran und Vergleich zum Immunoblot.

3.3.2.4 Untersuchungen zur Identifikation der Adenylierungs- und Phosphorylierungsstellen mittels MALDI-MS-PMF

Um die Positionen der Phosphorylierung bzw. Adenylierung in gereinigtem 10His-UspG zu bestimmen, sollten die mittels tryptischen Verdau von 10His-UspG entstandenen Fragmente durch MALDI-MS Peptidmassen-Fingerprinting (PMF) analysiert werden. Dazu wurde das Protein zur Verbesserung des Reinheitsgrades zunächst wie unter 2.5.1 beschrieben, durch eine 35%ige

Ammoniumsulfat-Fällung von einem Großteil an Proteinen der zytoplasmatischen Fraktion getrennt und hinterher mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte 10His-UspG Protein für 1h mit 10 mM kaltem ATP bei 37°C inkubiert und im weiteren Verlauf wie unter 2.6.2 beschrieben tryptisch verdaut. Nach Entsalzung der entstandenen Peptide wurden diese, nach erfolgreicher Kristallisation auf einer DHBS-Matrix, im Reflektormodus im Bereich zwischen 700-4000 Dalton mit Hilfe eines Voyager-DE STR MALDI-MS (ABI) aufgetrennt (Auftragsarbeit bei der Firma TopLab, Martinsried). Dabei deckt in der Theorie der gewählte Bereich von 700-4000 Da ca. 87% der gesamten Aminosäuresequenz von 10His-UspG (ohne „His-Tag“ und „Linker“) ab. Eine tabellarische Darstellung der bei der Massenanalyse identifizierbaren Peptide von 10His-UspG zeigt Tab. 3.5 (siehe Spektrum Anhang Abb. IV).

Von den 8 theoretisch zu erwartenden Fragmenten (Ausschlussgrenze: <700 Da), die bei einem tryptischen Verdau von 10His-UspG entstehen, konnten 6 mittels MALDI-MS-PMF identifiziert werden. Bei den nicht identifizierbaren Fragmenten handelt es sich zum einen um den mit dem „His-Tag“ und „Linker“ versehenen N-terminalen Teil von 10His-UspG und um ein 3032 Da großes Peptid (28 AS), das ebenfalls nicht im Spektrum auftrat. Die Abweichung der gemessenen Peptidmassen von 10His-UspG betrug dabei 0,028-0,053 Dalton im Vergleich zu den errechneten Massen. Dabei liegen die Massenabweichungen in etwa im Bereich der Messgenauigkeit des verwendeten Gerätes von ~0,001% (Tab. 3.5). Neben den 6 Massenpeaks von 10His-UspG konnten weitere 66 Peptidmassen identifiziert werden (Anhang, Tab. III). 11 dieser Massen konnten als bekannte Autolysepeptide des Trypsins identifiziert werden und dienten der internen Kalibrierung. Ein massenanalytischer Datenbankvergleich der 6 identifizierten tryptischen Peptiden von 10His-UspG mit den restlichen 55 identifizierten Peptidmassen ergab keine Zuordnung, die einer möglichen Phosphorylierung bzw. Adenylierung eines Peptids von 10His-UspG entsprechen würde (<http://www.expasy.org/tools/findmod/>). Zu erwarten wären Massenunterschiede von ca. 330 Da bei einer Adenylierung, bzw. ca. 80 Da im Falle einer Phosphorylierung. Auch die Analysen von Massenunterschieden, die potentiell durch verschiedene Kombinationen von phosphorylierten bzw. adenylierten Aminosäureresten innerhalb eines Peptids auftreten könnten, ergab keine Zuordnung zu einer der aufgetretenen Massen. Desweiteren konnte keine der übrigen 55 Massen direkt aus der Sequenz von 10His-UspG erklärt werden. Somit stellen die übrigen im PMF-Spektrum aufgetauchten Massenpeaks vermutlich Produkte des tryptischen Verdau anderer Proteinspezies dar (vgl. 3.3.3.1), die im Zuge der Reinigung von 10His-UspG nicht entfernt werden konnten. Zudem sei an dieser Stelle bemerkt, dass die Signalintensitäten der 6 identifizierten unmodifizierten Peptide von 10His-UspG mit Intensitäten zwischen <15% und 100% sehr heterogen waren (siehe Anhang).

Masse (theor.)	Masse (experiment.)	Position	Peptidsequenz
3032,6064	n.b.	44-71	HAEFLAQDDGVIHLLHVLPGSASLSLHR
2401,0625	n.b.	1-20	MGHHHHHHHHHHSSGHIEGR
2114,0611	2114,1038	116-135	DEVNELAEELGADVIVIGSR
1866,9227	1866,9764	25-40	TIIMPVDVFEMELSDK
1852,9875	1853,0403	136-153	NPSISTHLLGSNASSVIR
1631,821	1631,8748	91-104	LQTMVSHFTIDPSR
1552,7139	1552,7614	79-90	FEEHLQHEAQR
1117,684	1117,7133	154-163	HANLPVLVVR
678,3569	n.b.	72-77	FAADVR
578,2755	n.b.	21-24	HMYK
565,3092	n.b.	111-115	FGSVR
539,3048	n.b.	107-110	QHVR

Tab. 3.5: Zuordnung der Peptidmassen zum theoretischen tryptischen Verdau von 10His-UspG. Dargestellt sind die mittels MALDI-TOF-PMF Analyse erhaltenen Massen der tryptischen Peptide von 10His-UspG (163 AS) im Vergleich der theoretisch zu erwartenden Fragmentmassen (2.6.2). **Grau hinterlegt** dargestellt sind Peptidfragmente, die nicht identifiziert werden konnten. Insgesamt konnten ~67% der gesamten Sequenz von nativem UspG-Protein abgedeckt werden. Die theoretischen monoisotopen Massen sind in Dalton angegeben. Die mittlere Massenabweichung zwischen theoretischer und experimenteller Masse betrug ~0,0467 Dalton. n.b., nicht bestimmt. Die Ausschlussgrenze betrug <700 Da. Die entsprechenden Positionen der Fragmente von 10His-UspG sind ebenfalls angegeben.

3.3.2.5 Untersuchungen zur pH-Stabilität der Adenylierung/Phosphorylierung

Um einen möglichen Hinweise bezüglich der Phosphobindungen von 10His-UspG zu bekommen, wurden Untersuchungen zur Phosphochemie durchgeführt. Dazu wurden wie unter 2.5.13 beschrieben, Experimente zur pH-Stabilität der entsprechenden Bindungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Signalintensitäten von [α - 32 P]ATP-markierten 10His-UspG bei anschließender Inkubation mit 3 M NaOH (1,5h, 43°C) deutlich im Vergleich zur Kontrolle reduziert wurden (~90%, Abb. 3.11, Spur 3). Die Inkubation mit 1 M HCl (1,5h 43°C) führte zwar auch zu einer Abnahme des radioaktiven Signals, diese fiel aber mit ~60% deutlich schwächer aus (Abb. 3.11, Spur 2). Dies könnte ein Indiz für eine mögliche Phosphoester-Bindung in adenyliertem 10His-UspG darstellen, die typischer Weise an einem Serin, Threonin und Tyrosin auftreten kann. Untersuchungen zur Säurestabilität der Phosphorylierung von 10His-UspG mit [γ - 32 P]ATP zeigten ein ähnliches Säurestabilitätsmuster. Auch dort war eine deutliche Abnahme von ~95% der gemessenen Signalintensität bei der Behandlung mit 3 M NaOH zu beobachten (Abb. 3.11, Spur 6), während Säure-behandeltes 10His-UspG Protein eine Restsignalintensität von ~40% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwies (Abb. 3.11, Spur 5) Es sei allerdings an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass diese Methode nur ein Indiz für eine Zuordnung möglicher Bindungspartner von AMP bzw. Phosphat darstellt. Ein wirklich eindeutiges Resultat konnte diese Methode nicht liefern, da eine relativ starke Abnahme der Signale im Vergleich

zu den Kontrollen (Abb. 3.11, Spur 1 & Spur 4) unter allen getesteten Bedingungen zu beobachten war.

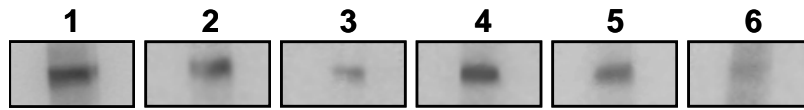


Abb. 3.11 pH-Stabilitäts-Untersuchungen der Modifikation von 10His-UspG. Gereinigtes 10His-UspG (1 μg) wurde mit 10 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (19,86 Ci/mmol) wie unter 2.5.8 und 2.5.9 beschrieben markiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Protein auf eine PVDF-Membran transferiert und durch Western-Blot-Entwicklung mittels monoklonaler Antikörper gegen den „His-Tag“ von 10His-UspG sichtbar gemacht. Die Säurebehandlung erfolgte für 1,5h bei 43°C in 1 M HCl. Die Alkalibehandlung erfolgte für 1,5h bei 43°C in 3 M NaOH. **Spur 1:** Referenzsignal von adenyliertem 10His-UspG in 100 mM Tris/HCl pH 7,5; **Spur 2:** Säurebehandlung von adenyliertem 10His-UspG; **Spur 3:** Alkalibehandlung von adenyliertem 10His-UspG; **Spur 4:** Referenzsignal von phosphoryliertem 10His-UspG in 100 mM Tris/HCl pH 7,5; **Spur 5:** Säurebehandlung von phosphoryliertem 10His-UspG; **Spur 6:** Alkalibehandlung von phosphoryliertem 10His-UspG.

3.3.2.6 Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG

Untersuchungen zur Substratspezifität wurden wie unter 2.5.12 beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle wurde 10His-UspG für 1h mit 5 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) inkubiert und die dabei gemessene Signalintensität als Maß für die Menge an radioaktiv markiertem Protein auf 100% angesetzt; eine Einbeziehung der tatsächlichen spezifischen Radioaktivitäten von [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, die durch die Konzentrationen von kaltem ATP-Kompetitor variieren, fand dabei nicht statt. Dabei sei auch hier erwähnt, dass wie bei den „Pulse-Chase“-Experimenten (3.3.2.1), die gemessenen Signalintensitäten für [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP-markiertes Protein um einen Faktor von ~ 2 höher lagen als bei [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP-markiertem 10His-UspG.

Wie Abb. 3.12 zeigt, führte bereits eine Zugabe von 100 μM kaltem ATP zu einer Reduktion der radioaktiv nachweisbaren Menge an phosphoryliertem bzw. adenyliertem 10His-UspG um $\sim 45\text{-}60\%$ im Vergleich zu den Kontrollen. Durch eine weitere Erhöhung der ATP-Konzentration auf 2 mM ATP nahm die Menge an radioaktiv markiertem Protein um ca. 85-90% ab. Dies war unabhängig vom verwendeten ATP-Isotop zu beobachten. Eine Kompetition von radioaktivem ATP und kaltem GTP erfolgte bei gleichen Konzentrationen [0,1-2 mM GTP] zu einem deutlich geringeren Umfang. Dabei nahm die Menge an radioaktiv detektierbarem 10His-UspG bei Zugabe von 100 μM kaltem GTP um rund 20% ab, während eine Erhöhung der GTP-Konzentration auf 2 mM eine Reduktion um lediglich 40-45% zur Folge hatte. Experimente mit dem Pyrimidin-Nukleotid CTP führte bei einer Endkonzentration von 2,5 mM zu keiner signifikanten Verringerung der durch [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP hervorgerufenen radioaktiven Markierung von 10His-UspG im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.12). Gereinigtes 10His-UspG zeigt also eine klare Diskriminierung zwischen den Purin-Nukleotiden ATP, GTP und dem Pyrimidin-Nukleotid CTP. Während ATP das bevorzugte Substrat ist - die gemessene Reduktion der Signalintensitäten bedeuten letztendlich einen erhöhten Substratumsatz an ATP -, wird durch den Zusatz von GTP, die durch den Einsatz von [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP bzw. [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP

hervorgerufene Phosphorylierung und Adenylierung reduziert. Dabei konkurriert GTP vermutlich in der Nukleotid-Bindetasche mit den radioaktiven ATP-Isotopen und verringert dadurch die Menge an detektierbarem radioaktivem 10His-UspG. Ob GTP ein natürliches Substrat von 10His-UspG darstellt, müsste allerdings direkt durch die radioaktive Markierung des Proteins mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ getestet werden. CTP indes zeigte keinen negativen Einfluss auf die radioaktive Markierung von 10His-UspG und scheint somit kein Substrat für 10His-UspG darzustellen.

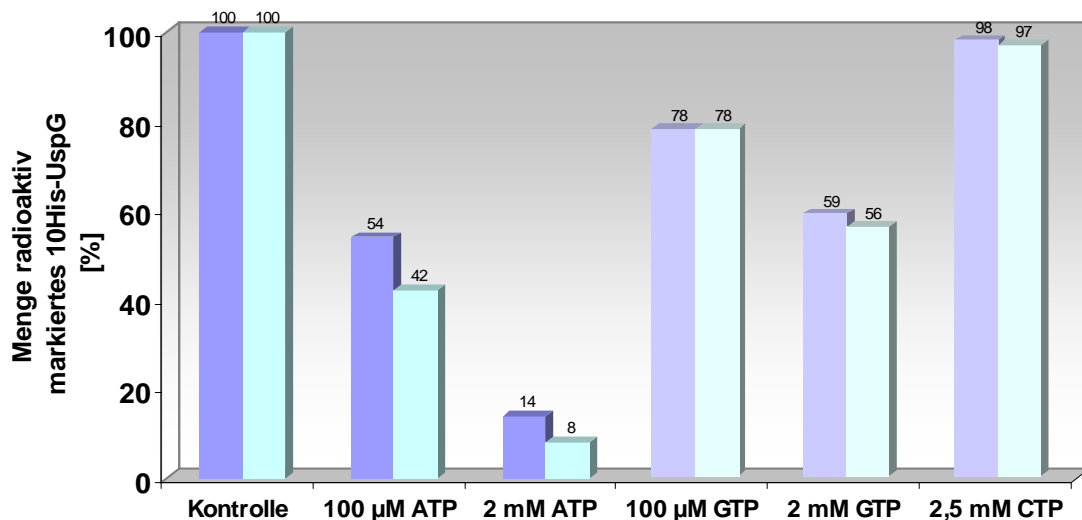


Abb. 3.12 Substratspezifität von 10His-UspG (Kompetitions-Experimente). Die Abbildung zeigt den Einfluss von ATP, GTP (Linienmuster), und CTP (schraffiert) auf die im Autoradiogramm nachweisbare Menge an radioaktiv markiertem 10His-UspG. Je 1 µg gereinigtes Protein wurde dazu wie unter 2.5.12 beschrieben, mit 5 µCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (**blau**) bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (**türkis**) (3000 Ci/mmol) und der in der Abbildung angegebenen Endkonzentrationen kalter Nukleotide für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt und mittels 12,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung der Menge an radioaktiv markiertem Protein erfolgte mittels ImageQuant 5.0. Die Kontrolle (ohne kaltes ATP) wurde auf 100% gesetzt (siehe Text).

3.3.3 Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von 10His-UspG

Strukturanalytische Untersuchungen von zwei Vertretern der Usp-Protein-Familie zeigten, dass diese als Dimere vorliegen. Dabei spielt der C-terminale Teil (Aminosäuren: V/MLVV) von UspA aus *H. influenzae* (Sousa & McKay, 2001) und von MJ0577 aus *M. jannaschii* (Zarembinski *et al.*, 1998), eine besondere Rolle bei der Dimerisierung.

Immunologische Untersuchungen mittels monoklonaler Antikörper gegen den „His-Tag“ von gereinigtem 10His-UspG zeigten neben der monomeren Form von 10His-UspG bei ca. 18,5 kDa ein zweites relativ schwaches Signal im Western-Blot bei ca. 37 kDa (Abb. 3.6, Spur 7). Um der Frage nachzugehen, ob 10His-UspG neben der monomeren Form auch dimere Zustände oder sogar höher oligomere Zustände einnehmen kann, sollte zunächst mittels MALDI-TOF-MS-Analysen das exakte Molekulargewicht von 10His-UspG bestimmt und mittels Quervernetzungsstudien und nativer Gelelektrophorese weitere Informationen über den Oligomerisierungszustand gewonnen werden.

Dabei sollte auch der Einfluss von ATP auf den Oligomerisierungszustand von 10His-UspG untersucht werden (3.3.3.1; 3.3.3.2). Zusätzlich sollte eine C-terminal verkürzte Form von 10His-UspG hinsichtlich ihrer Dimerisierung analysiert werden (3.3.3.3).

3.3.3.1 Molekulargewichtsbestimmung von 10His-UspG mittels MALDI-TOF-MS

10His-UspG wurde wie unter 2.5.1 beschrieben mittels vorgeschalteter Ammoniumsulfat-Fällung und anschließender Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte Protein mit, bzw. ohne 10 mM ATP für 1h bei 37°C inkubiert, entsalzt und hinterher wie unter 2.6.2 beschrieben, einer Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-TOF-MS unterzogen (Auftragsarbeit bei der Firma TopLab, Martinsried). Das resultierende Massenspektrum von 10His-UspG, das gegen die externen Massenstandards von Insulin, Thioredoxin, und Apomyoglobin kalibriert wurde, zeigt Abb. 3.13. Deutlich zu erkennen ist das einfach geladene Molekülion $[M+H]^+$ von 10His-UspG bei m/z von 18315, sowie das zweifach geladenen Ion $[M+2H]^{2+}$ bei m/z 9155. Das experimentell bestimmte Molekulargewicht von 10His-UspG entspricht demnach der theoretisch errechneten Masse des Proteins (18455 Da) ohne Formyl-Methionin (fMet, MW: 131 Da), das somit im Zuge der Synthese abgespalten wurde. Ein deutliches Massensignal ist zudem bei m/z von 36636 zu beobachten und entspricht damit der Masse von dimerisiertem 10His-UspG (Abb. 3.13). Durch den Einsatz von 10 mM ATP konnte eine stärkere Signalintensität von dimerem 10His-UspG im Vergleich zu nicht mit ATP inkubiertem Protein nachgewiesen werden. Dieses ließ allerdings nicht direkt Rückschlüsse eines positiven Einflusses von ATP auf den Oligomerisierungszustand zu, da bereits die Signalintensität von nicht mit ATP inkubiertem Protein deutlich in der Intensität des monomeren 10His-UspG Signals bei m/z 18315 reduziert war (ca. 15% der Signalintensität im Vergleich mit ATP-inkubiertem Protein, Daten nicht gezeigt). Die zusätzlich auftretenden signifikanten Peaks zwischen 4-16 kDa im MALDI-Spektrum sind möglicherweise auf weitere Proteinspezies, die während der Reinigung nicht entfernt werden konnten, zurückzuführen (vgl. 3.3.2.4), bzw. könnten auch Fragmente von 10His-UspG darstellen.

Ferner sollte im Rahmen dieser Massenbestimmung überprüft werden, ob die Massenunterschiede, wie sie bereits in der 2D-PAGE Untersuchung von gereinigtem 10His-UspG beobachtet werden konnten, sich in der MALDI-Analyse bestätigen würde, und ob möglicherweise Proteinpeaks auftauchen, die der Masse nach modifiziertem Protein entsprechen könnten.

Dabei zeigten vergleichende Untersuchungen mit/ohne vorgeschalteter ATP-Inkubation in der MALDI-TOF-MS Analyse unter beiden Bedingungen im Massenbereich von 10His-UspG um m/z 18315 einen recht breiten heterogenen Massenpeak (Daten nicht gezeigt, siehe exemplarisch Abb. 3.13), der infolgedessen eine Zuordnung von modifiziertem 10His-UspG nicht möglich machte und somit nur eine qualitative Aussage über das Auftreten isomerer Formen von 10His-UspG im Massenspektrometer zuließ.

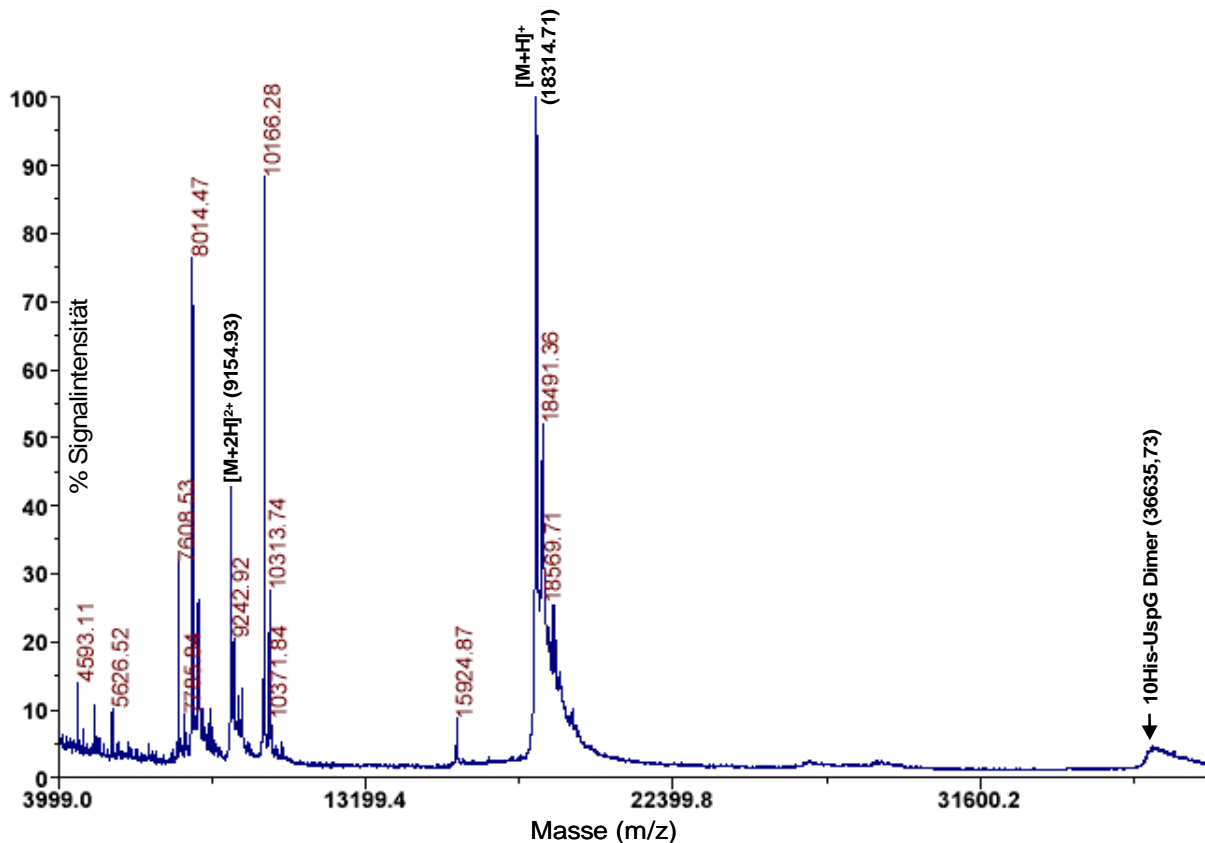


Abb. 3.13: Molekulargewichtsbestimmung von 10His-UspG mittels MALDI-TOF-MS. Zu sehen ist das gesamte Massenspektrum der gereinigten Fraktion von 10His-UspG im Bereich von 4-38,5 kDa. 10His-UspG wurde wie unter 2.5.1 beschrieben gereinigt und nach Entsalzung mittels MALDI-TOF-MS analysiert (2.6.2). $[M+H]^+$: einfach geladenes Molekülion von monomerem 10His-UspG; $[M+2H]^{2+}$: zweifach geladenes Molekülion von monomerem 10His-UspG. Rechts: Dimer von 10His-UspG. Die entsprechenden Massen und gemessenen Signalintensitäten der einzelnen Proteinspezies sind angegeben.

3.3.3.2 Quervernetzungsstudien von 10His-UspG

Gereinigtes 10His-UspG wurde mit Hilfe von Glutaraldehyd auf die Eigenschaft hin untersucht, ob sich höhere oligomere Formen von 10His-UspG ausbilden können. Dazu wurde 10His-UspG wie unter 2.5.14 beschrieben behandelt. Dabei zeigte bereits die unbehandelte Proteinprobe im immunologischen Nachweis von 10His-UspG neben der monomeren Form von 10His-UspG (~18,5 kDa) eine signifikante Proteinbande auf der Höhe von ca. 37 kDa (Abb. 3.14, Spur 1). Durch Zugabe höherer Konzentrationen an Glutaraldehyd (ab 0,05%) kam es zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils an Dimeren von 10His-UspG. Der Anteil an dimerem Protein konnte bei Erhöhung der Glutaraldehyd-Konzentration auf 0,1% um den Faktor 2 weiter verstärkt werden (Abb. 3.14). Zudem trat bei einigen Experimenten eine sehr schwache Bande auf der Höhe von 55 kDa bei Glutaraldehydkonzentrationen von 0,05%-0,1% auf, die trimerem 10His-UspG entsprechen könnte (Daten nicht gezeigt). Der Großteil an 10His-UspG verblieb allerdings in der monomeren Form. Der Zusatz von ATP [10 mM] zeigte keinen positiven Einfluss auf die Ausbildung dimerer Formen von 10His-UspG (Daten nicht gezeigt).

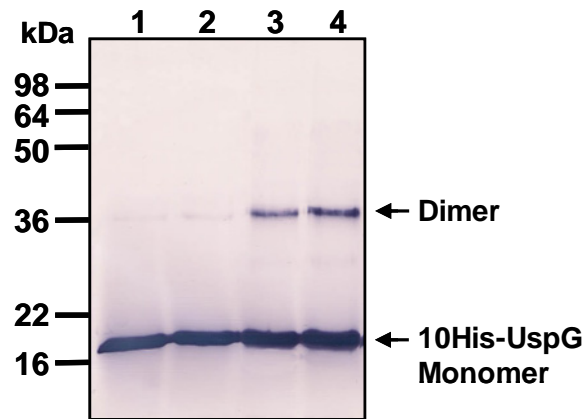


Abb. 3.14: Quervernetzung von gereinigtem 10His-UspG mit Glutaraldehyd. Die Abbildung zeigt einen Western-Blot von gereinigtem 10His-UspG (je 1,5 µg/Spur) nach Transfer auf eine PVDF-Membran und anschließender Detektion mittels monoklonaler Antikörper gegen den „His-Tag“ von 10His-UspG. **Spur 1-4:** Konzentration von Glutaraldehyd (0%, 0,001%, 0,05%, 0,1% (v/v)). Die Reaktionszeit betrug jeweils 10min. Links ist ein Molekulargewichtsmarker dargestellt.

3.3.3.3 Untersuchungen zu C-terminal verkürztem 10His-UspG: Reinigung und vergleichende Gelelektrophorese

Um eine mögliche Beteiligung der C-terminalen Domäne von 10His-UspG an der Dimerisierung zu untersuchen, sollte eine C-terminal um 6 Aminosäuren verkürzte Form des Proteins, wie unter 2.4.12 beschrieben, hergestellt werden. Dieser Bereich entspricht dabei den homologen β 5-Bereichen der Dimerisierungsdomänen in UspA aus *H. influenzae* und in MJ0577 aus *M. jannaschii* (Abb. 4.2). Nach Induktion konnte das C-terminal verkürzte Protein aus der zytosolischen Fraktion mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie, wie unter 2.5.1 beschrieben, gereinigt werden (Abb. 3.15). Die Menge an gereinigtem Protein betrug pro Liter Zellkultur etwa 0,05-0,1 mg.

Wie aus Abb. 3.15 (Spur 2) hervorgeht, lag in Gesamtzellextrakten von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG(1-136) das Protein, wie zu erwarten, mit einem Molekulargewicht von ca. 17,5 kDa vor. Nach der Reinigung zeigte sich jedoch, dass die verkürzte Form von 10His-UspG mit <16 kDa deutlich niedriger lief, als es nach dem theoretischen Molekulargewicht (17,792 kDa) zu erwarten war (vergleiche Abb. 3.15 Spur 2, 3). Daher ist anzunehmen, dass C-terminal verkürztes 10His-UspG im Zuge des Zellaufschlusses und anschließender Reinigung proteolytisch gespalten wurde; in Gesamtzellextrakten war dieses Phänomen nicht zu beobachten. Der Zusatz von Protease-Inhibitoren und ein striktes Arbeiten auf Eis während der gesamten Reinigung konnte zwar die Ausbeute an gereinigtem C-terminal verkürztem 10His-UspG erhöhen, ein proteolytischer Abbau konnte allerdings nicht verhindert werden (Daten nicht gezeigt).

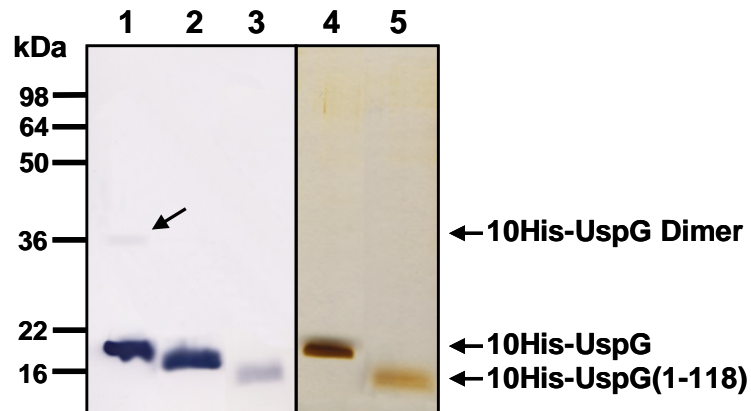


Abb. 3.15: Reinigung von 10His-UspG(1-118). Links ist ein Western-Blot mittels monoklonaler Antikörper gegen den „His-Tag“ von gereinigtem UspG-Protein dargestellt. **Spur 1:** 1,5 µg gereinigtes 10His-UspG (~18,5 kDa, Kontrolle); **Spur 2:** 25 µg Gesamtzellextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG(1-136) nach 3h Induktion bei 25°C; **Spur 3:** 0,5 µg gereinigtes 10His-UspG(1-118) nach vorgeschalteter Ammoniumsulfat-Fällung und Elution von der Ni²⁺-NTA-Agarose (250 mM Imidazol). Rechts dargestellt ist ein Vergleich der gereinigten Proteinfractionen von 1,5 µg 10His-UspG (**Spur 4**) und 0,5 µg 10His-UspG(1-118) (**Spur 5**), die mit Hilfe von Silber angefärbt wurden.

Mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen von C-terminal verkürztem 10His-UspG konnte das Molekulargewicht auf 15783 Dalton bestimmt werden (siehe Massenspektrum im Anhang Abb. II) und entspricht damit einem um insgesamt 24 Aminosäuren C-terminal verkürzten Proteinfragment von 10His-UspG, wobei auch hier das N-terminale Formyl-Methionin (fMet) abgespalten wurde. Dieses Protein wird daher im Folgenden als 10His-UspG(1-118) bezeichnet. Eine Abspaltung am N-Terminus kann ausgeschlossen werden, da diese nicht im Einklang zu dem experimentell bestimmten Molekulargewicht von 10His-UspG(1-118) stehen würde. Zudem war das gereinigte Protein mittels immunologischen Nachweises gegen den „His-Tag“ von 10His-UspG(1-118) nachzuweisen (Abb. 3.15, Spur 3). An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass im Gegensatz zu 10His-UspG eine dimere Form von 10His-UspG(1-118) weder in 10His-UspG(1-118)-Gesamtzellextrakten (vgl. Abb. 3.15 Spur 1, 2), noch bei gereinigtem 10His-UspG(1-118) mittels immunologischem Nachweis gegen den „His-Tag“ des Proteins nach einer SDS-PAGE zu detektieren war (vgl. Abb. 3.17 A, B).

Um dieses unter nativen Bedingungen zu verifizieren, wurde mittels nativer Gelelektrophorese sowohl gereinigtes 10His-UspG als auch 10His-UspG(1-118), wie unter 2.5.5 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.16). Dabei war bei der Auftrennung von gereinigtem 10His-UspG eine deutlich Bande zu beobachten, die mit einem Molekulargewicht von ~37 kDa der dimeren Form von 10His-UspG entspricht (Abb. 3.16, Spur 1). Die monomere Form von 10His-UspG, sowie andere oligomere Formen konnten nicht beobachtet werden. Gleiches zeigte sich mittels Western-Blot-Analysen bei denen Antikörper gegen den „His-Tag“ von 10His-UspG eingesetzt wurden. Auch dort tauchte nur eine einzige Proteinbande bei ca. 37 kDa auf (Daten nicht gezeigt). Vergleichsweise zeigte 10His-UspG(1-118) lediglich eine deutliche Bande, die im Vergleich mit entsprechenden Proteinstandards

einem apparenten Molekulargewicht von ca. 16 kDa zugeordnet werden konnte (Abb. 3.16, Spur 2). Diese Proteinbande, die mittels Western-Blot-Analysen identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), entspricht somit der monomeren Form von 10His-UspG(1-118). Dimere oder höher oligomere Formen von 10His-UspG(1-118) konnten weder im Silbergel (Abb. 3.16, Spur 2), noch mit Hilfe immunologischer Nachweismethoden gegen den „His-Tag“ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der C-terminale Teil von UspG (Aminosäuren: 119-142) ist somit essentiell für die Ausbildung von Dimeren.

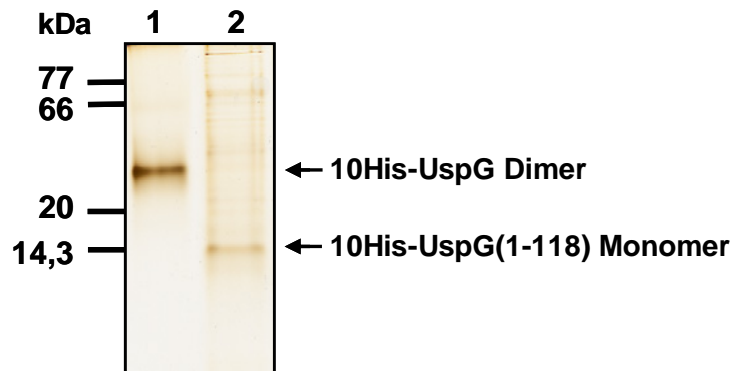


Abb. 3.16: Native Gelelektrophorese von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118). Die Abbildung zeigt ein mit Silber-gefärbtes natives 10% Gel. 3 μg gereinigtes 10His-UspG (**Spur 1**) und 2 μg 10His-UspG(1-118) (**Spur 2**) wurden, wie unter 2.5.5 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt und deren apparentes Molekulargewicht anhand nativer Proteinstandards (**links**) zugeordnet (Lysozym: 14,3 kDa; Trypsin-Inhibitor: 20 kDa; BSA: 66 kDa und Conalbumin: 77 kDa).

3.3.4 Untersuchungen zur Modifikation von 10His-UspG(1-118) *in vitro*

Um zu untersuchen, ob die C-terminal verkürzte Form von 10His-UspG in der Lage ist, *in vitro* ebenso wie 10His-UspG phosphoryliert und adenyliert zu werden, wurde gereinigtes 10His-UspG(1-118), wie unter 2.5.8 und 2.5.9 beschrieben, 30min mit 10 μM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (19,86 Ci/mmol) inkubiert (Abb. 3.17). Dabei zeigte sich, dass 10His-UspG(1-118) mit beiden radioaktiven ATP-Derivaten deutliche Signale nach Auftrennung der Reaktionsansätze mittels 12,5% SDS-PAGE aufwies. Diese Markierungen waren allerdings im Vergleich zu adenyliertem und phosphoryliertem 10His-UspG (Abb. 3.17 A1, B1) vergleichsweise gering und zeigten nach Quantifizierung der radioaktiven Signale eine Reduzierung des Phosphorylierungs- und Adenylierungsgrades von $\sim 80\%$, sofern die im Western-Blot detektierbare Menge an 10His-UspG(1-118) und 10His-UspG mit berücksichtigt und entsprechend in Relation gesetzt wurde (vgl. Abb. 3.17, A, B). Eine Denaturierung von 10His-UspG(1-118) mittels 2% (w/v) SDS und anschließender Inkubation mit 10 μM $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, führte im selben Zeitraum zu keiner signifikanten radioaktiven Markierung des Proteins (Daten nicht gezeigt). „Pulse-Chase“-Experimente (2.5.11), bei denen 1 μg 10His-UspG(1-118) zuvor für 30min mit 5 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (je 3000 Ci/mmol) inkubiert und anschließend für weiter 30min mit 2 mM kaltem ATP versetzt wurden, führten vergleichbar zu 10His-

UspG (3.3.2.1, Abb. 3.8) zu keiner Reduktion der radioaktiven Markierung des Proteins (Daten nicht gezeigt). Zudem konnten unabhängig vom verwendeten ATP-Isotop die radioaktiven Markierungen von 10His-UspG(1-118) nahezu vollständig durch Konkurrenz von 1 mM ATP (198,6 mCi/mmol) aufgehoben werden (Abb. 3.17).

Somit wird 10His-UspG(1-118) kovalent durch Adenylierung und Phosphorylierung modifiziert; eine ATP-Bindung als Ursache der gemessenen radioaktiven Markierung von 10His-UspG(1-118) ist somit auszuschließen. Dabei sei abschließend an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass 10His-UspG eine radioaktive Markierung der dimeren Form (Pfeile in Abb. 3.17 A1, B1) sowohl bei der Inkubation mit 10 μ M [α^{32} P]ATP als auch mit 10 μ M [γ^{32} P]ATP (je 19,86 Ci/mmol) zeigte (siehe Pfeile in Abb. 3.17 A1, B1). Dies war vergleichsweise bei 10His-UspG(1-118) nicht möglich (Spur A2, B2; vgl. 3.3.3.3).

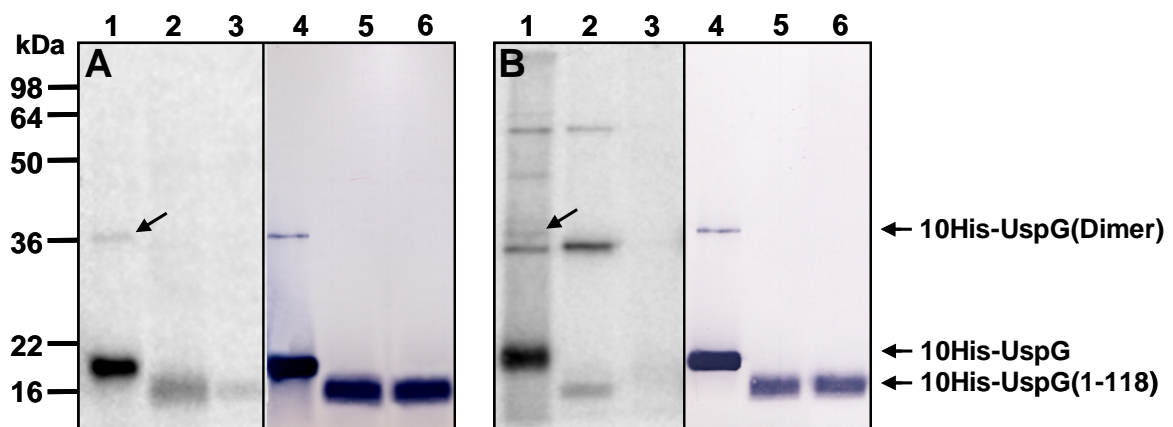


Abb. 3.17: Vergleich der Adenylierung (A) und Phosphorylierung (B) von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) *in vitro*. 1 μ g gereinigtes 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) wurden, wie unter 2.5.8 und 2.5.9 beschrieben, für 30min bei 37°C mit 10 μ M [α^{32} P]ATP (A1-3) bzw. [γ^{32} P]ATP (B1-3) (je 19,86 Ci/mmol) inkubiert. Jeweils links (A1-3, B1-3) in den Abbildungen dargestellt ist das jeweilige Autoradiogramm nach entsprechendem Transfer auf PVDF-Membran der mittels 12,5% SDS-PAGE aufgetrennten Reaktionsansätze. Jeweils rechts (A4-6, B4-6) ist der entsprechende Western-Blot nach Detektion von 10His-UspG und 10His-UspG(1-118) mittels immunologischem Nachweis gegen den „His-Tag“ der Proteine gezeigt. Spur A1, A4 und B1, B4: 10His-UspG; Spur A2, A5 und Spur B2, B5: 10His-UspG(1-118); Spur A3, A6 und B3, B6: Konkurrenz von 10His-UspG(1-118) mit 1 mM ATP (198,6 mCi/mmol). Die Pfeile geben die adenylierte bzw. phosphorylierte dimerisierte Form von 10His-UspG an (Spur A1, B1).

3.3.5 Untersuchungen zu den DNA-Bindungseigenschaften von 10His-UspG

Aufgrund von Sequenz-Übereinstimmungen des N-terminalen Bereichs von Usp-Proteinen zu eukaryontischen Transkriptionsregulatoren (MADS-BOX Proteinfamilie) (Pellegrini *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2000), wurde eine DNA-Bindung von Usp-Proteinen angenommen (Mushegian & Koonin, 1996). Bislang wurde allerdings weder eine DNA-Bindung von Usp-Proteinen experimentell untersucht, noch existieren Informationen über mögliche Sequenzspezifitäten oder über potentielle DNA-Bindungsorte der Usp-Proteine. Aus diesem Grund sollte erstmals experimentell untersucht werden, ob eine DNA-Bindung von 10His-UspG nachzuweisen ist.

Da keinerlei Informationen hinsichtlich der transkriptionalen Regulation von *uspG* existieren, sollte eine potentielle Autoregulation durch 10His-UspG untersucht werden, indem eine DNA-Bindung durch 10His-UspG in dem in Frage kommenden regulatorischen Bereich des *uspG*-Gens nachgewiesen werden sollte. Dazu wurde zunächst mittels PCR ein 443 bp großes DNA-Fragment aus chromosomaler DNA von *E. coli* MC4100, wie unter 2.5.3 beschrieben, amplifiziert und anschließend radioaktiv markiert (2.4.6). Dieses DNA-Fragment umfasste dabei einen Teil des *uspG* (*ybdQ*)-Gens (102 bp) sowie einen Teil (124 bp) des „stromabwärts“ liegenden *ybdR*-Gens (kodiert potentiell für eine Zn^{2+} -abhängige Alkohol-Dehydrogenase) inklusive des gesamten intergenen *uspG/ybdR*-Bereichs, um potentielle regulatorische Bereiche einzuschließen (Abb. 3.18)

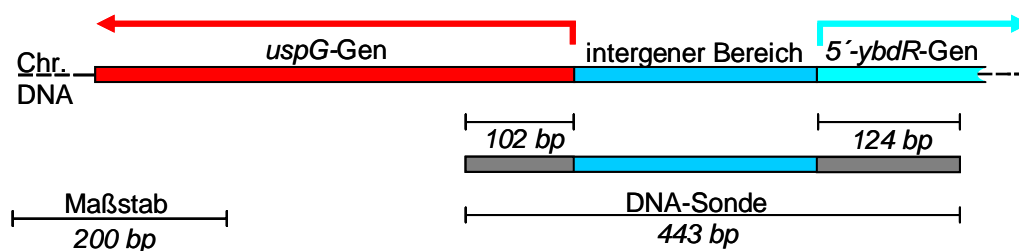


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der DNA-Sonde (443 bp) und die sie beinhaltenden Genabschnitte von *uspG* und *ybdR*, die mittels PCR von chromosomaler DNA (oben) erhalten wurde (2.5.3). **Blau:** intergener *uspG/ybdR*-Bereich. **Rot:** *uspG*-Gen (429 bp). **Türkis:** 5'-*ybdR*-Genbereich; **Blaugrau:** DNA Sonde, die für die Gelretardations-Experimente mit gereinigtem 10His-UspG eingesetzt wurde und die die angrenzenden Teilbereiche der Gene *uspG* (102 bp) und *ybdR* (124 bp) trägt. Der Maßstab ist links abgebildet.

In anschließenden Gelretardations-Experimenten mit gereinigtem 10His-UspG und radioaktiv markierter DNA-Sonde konnte kein DNA-Protein-Komplex nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Auch Variationen der Inkubationstemperatur (4-37°C) und der Ionenkonzentration [32-500 mM NaCl] führten zu keiner Bindung von 10His-UspG an die verwendete DNA-Sonde (Daten nicht gezeigt). Eine Verringerung der Lauftemperatur zeigte ebenfalls keinen positiven Einfluss auf die Bindung von 10His-UspG an den gewählten DNA-Bereich (Daten nicht gezeigt). Eine Veränderung im Protein:DNA-Verhältnis von 1:1 bis 1000:1 führte ebenfalls in keinem der Fälle zur Ausbildung eines spezifischen DNA-Protein-Komplexes (Abb. 3.19, Spur 2-7). Somit kann eine alleinige autoregulatorische Funktion von UspG bei der transkriptionalen Kontrolle von *uspG* ausgeschlossen werden. Ein Einfluss von ATP auf die DNA-Protein-Wechselwirkung wurde nicht untersucht, da mittels 2D-PAGE-Analysen bereits signifikante Mengen an isomeren Formen von 10His-UspG in der gereinigten Proteinfraktion identifiziert werden konnten (vgl. 3.3.2.3).

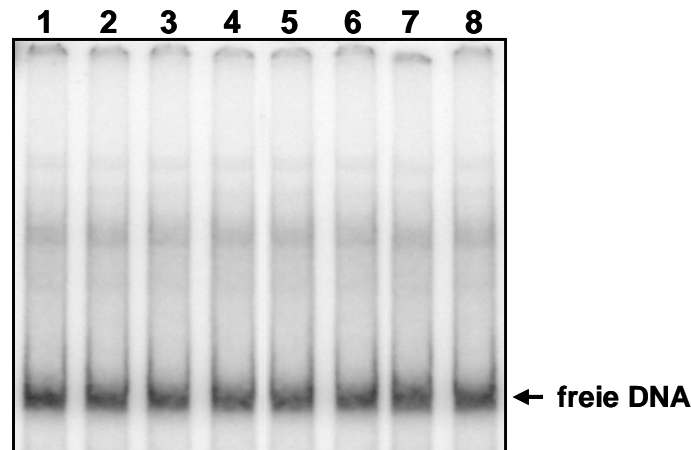


Abb. 3.19: Gelretardations-Experimente von 10His-UspG und eingesetzter DNA-Sonde. Dargestellt ist das Autoradiogramm eines nativen 5% (v/v) PAA-Gels. Die Reaktionsansätze wurden für jeweils 10min bei RT inkubiert. Die Trennung der DNA (je 15 ng; 60.000 cpm/Spur) erfolgte, wie unter 2.5.3 beschrieben, für 3,5h bei konstant 110V (4°C) in 1 x TBE-Puffer. **Spur 1:** freie DNA (443 bp); **Spur 2-7:** Menge an eingesetztem 10His-UspG (1 ng, 10 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 1 µg). Das Protein:DNA-Verhältnis betrug dabei 1:1 bis 1000:1. **Spur 8:** DNA-Sonde + 2 µg BSA.

Um zu überprüfen, ob 10His-UspG womöglich spezielle DNA-Topologien für eine DNA-Bindung benötigt, sollte mit Hilfe synthetischer doppelsträngiger DNA-Fragmente (2.5.3), die zum einen eine gekrümmte DNA-Konformation (SOA-Fragment, 60 bp), bzw. eine nicht gekrümmte DNA-Konformation (SOB-DNA-Fragment, 64 bp) simulieren, eine mögliche DNA-Protein-Wechselwirkung von 10His-UspG getestet werden. Diese synthetischen doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden speziell für unspezifisch DNA-bindende Proteine entwickelt und in der Vergangenheit eingesetzt um die Bindung von Proteinen nachzuweisen, die bestimmte DNA-Topologien benötigen, um dort binden zu können (Azam & Ishihama, 1999).

Experimente zur Protein-DNA-Wechselwirkung mit gereinigtem 10His-UspG und den radioaktiv markierten synthetischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten SOA und SOB führten in Gelretardations-Experimenten unter keiner der getesteten Bedingungen, trotz Erhöhung des Protein-DNA-Verhältnisses auf 500:1, zu einer spezifischen Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes (Abb. 3.20). Des Weiteren zeigten Veränderungen der oben genannten Inkubations- und Laufbedingungen keinen positiven Einfluss auf die Protein-DNA-Interaktion (Daten nicht gezeigt). Somit scheint eine unspezifische DNA-Bindung von UspG, die alleine durch die Konformation der DNA bestimmt wird, ausgeschlossen zu sein.

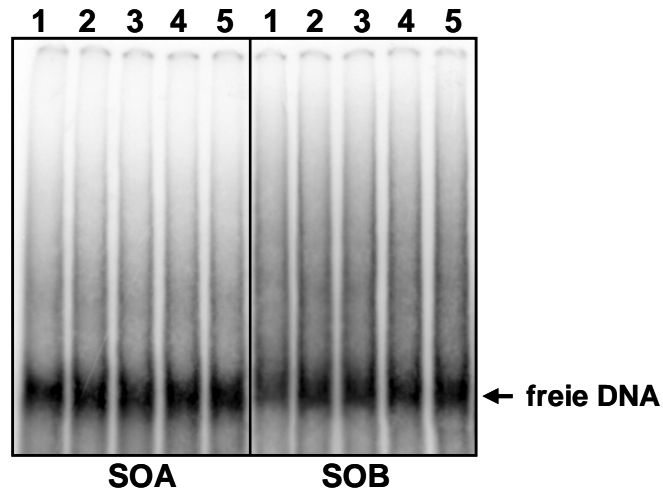


Abb. 3.20: Gelretardations-Experimente von 10His-UspG mit synthetischen DNA-Fragmenten SOA (links) und SOB (rechts). Dargestellt ist das Autoradiogramm eines nativen 5% (v/v) PAA-Gels. Die Reaktionsansätze wurden für jeweils 10min bei RT inkubiert. Die Trennung der DNA (je 2 ng; 60.000 cpm/Spur) erfolgte, wie unter 2.5.3 beschrieben, für 3,5h bei konstant 110V (4°C) in 1 x TBE-Puffer. **Links** dargestellt: **Spur 1:** freies SOA-DNA-Fragment (60 bp); **Spur 2-5:** Menge an eingesetztem 10His-UspG (125 ng, 250 ng, 375 ng, 500 ng). **Rechts** dargestellt: **Spur 1:** freies SOB-DNA-Fragment (64 bp); **Spur 2-5:** eingesetzte 10His-UspG-Mengen (125 ng, 250 ng, 375 ng, 500 ng). Das Protein:DNA-Verhältnis betrug dabei 125:1 bis 500:1.

3.3.6 Phänotypische Charakterisierung einer *uspG*-Mutante

Untersuchungen von Nyström & Neidhardt (1994) konnten zeigen, dass das Fehlen eines intakten *uspA*-Gens zu einer stark erniedrigten Überlebensrate von *E. coli* unter Bedingungen kompletter Wachstumsinhibierung führt. Zudem konnte für die Gene *uspA*, *uspC*, *uspD* und *uspE* nachgewiesen werden, dass deren Genprodukte eine kooperative Schutzfunktion gegenüber UV-Schäden ausüben (Gustavsson *et al.*, 2002). Da zu Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen keinerlei phänotypische Untersuchungen zu UspG existierten sollte untersucht werden, ob eine *E. coli uspG*-Mutante einen vergleichbaren Phänotyp zeigt.

3.3.6.1 Konstruktion von *E. coli* AW0607

Um Informationen über die physiologische Rolle von UspG *in vivo* zu bekommen, wurde eine *uspG*-Deletionsmutante in *E. coli*, wie unter 2.4.11 beschrieben, nach Datsenko & Wanner (2000) hergestellt. Dazu wurden parallel drei *E. coli* Stämme für die Herstellung einer *uspG*-Mutante verwendet: a) BW25113, b) MC4100 und c) MG1655. Der resultierende *E. coli* AW0607-Stamm entstand dabei durch Teildeletion des *uspG*-Gens (Δ UspG45-115) in *E. coli* BW25113 bei gleichzeitiger Insertion des Chloramphenicol-Resistenzgens (*cat*) in *uspG* mittels homologer Rekombination. Eine Deletion von *uspG* mit den eingesetzten Primern (Δ ybdQ(H2P2) sense, Δ ybdQ(H1P1) antisense) in *E. coli* MG1655 und *E. coli* MC4100 war nicht möglich.

Die Richtigkeit der Insertion des *cat*-Gens (~1,1 kb, inkl. flankierende *FRT*-Seiten und homologer *uspG*-Bereiche) in *uspG* ($\Delta uspG'::cm$) erfolgte durch Kolonie-PCR der entsprechenden DNA-Bereiche mit externen Primern (ybdQ-ext. sense, ybdQ-ext. antisense), die homolog zu chromosomalen Bereichen außerhalb des *uspG*-Gens von *E. coli* AW0607 waren (2.4.11). Als Kontrolle diente chromosomale DNA des isogenen *E. coli* BW25113-Stammes (Abb. 3.21). Dabei lagen die hierfür eingesetzten externen Primer je ca. 100 bp stromauf- bzw. stromabwärts des *uspG*-Gens (429 bp). Bei einer Insertion des ~1,1 kb DNA-Fragments in *uspG* und gleichzeitiger Deletion eines 216 bp großen DNA-Bereichs von *uspG* war somit eine PCR-Fragmentgröße von ca. 1,45 kb zu erwarten. Eine deutliche DNA-Bande entsprechender Größe zeigt Abb. 3.21 (Spur 3) und bestätigt damit die Richtigkeit des konstruierten *E. coli* AW0607-Stammes. Im Kontrollansatz, bei dem chromosomale DNA des isogenen *E. coli* BW25113 eingesetzt wurde, war lediglich ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 600 bp [*uspG*-Gen (429bp) + je 100 bp flankierender Bereich] zu beobachten (Abb. 3.21, Spur 2). Durch die Sequenzierung des mittels PCR-gewonnenen DNA-Fragmentes (~1,45 kb) konnte zudem die Richtigkeit des *E. coli* AW0607 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

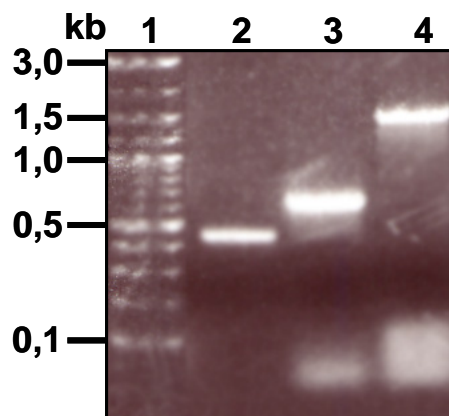


Abb. 3.21: Kontroll-PCR der Teildeletion von *uspG* in AW0607 ($\Delta uspG'::cm$). Dargestellt sind die mittels Kolonie-PCR aus BW25113 (isogener Mutterstamm) und AW0607 gewonnenen DNA-Fragmente nach Auftrennung auf einem 1% (w/v) Agarosegel (2.4.4). **Spur 1:** 2Log DNA-Standard; **Spur 2:** *uspG* (459 bp) aus BW25113 (eingesetzte Primer: ybdQ-NdeI sense, ybdQ-BamHI antisense); **Spur 3:** *uspG* aus BW25113 (Primer: ybdQ-ext. sense, ybdQ-ext. antisense, 632 bp) **Spur 4:** $\Delta uspG'::cm$ aus AW0607 (Primer: siehe 2, 1435 bp).

3.3.6.2 Phänotypische Charakterisierung von *E. coli* AW0607

Vergleichende Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung einer *E. coli* *uspG*-Mutante (AW0607, 3.3.6.1) und dem entsprechenden isogener *E. coli* BW25113-Mutterstamm, wurden wie unter 2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden zunächst Messungen zur entsprechenden Wachstumsrate der Stämme *E. coli* AW0607 und BW25113 in verschiedenen Minimalmedien (K10-MM, MOPS-MM und M9-MM; 2.3.1) bestimmt und verglichen. Dabei konnten keine signifikanten

Unterschiede in der Wachstumsrate der *uspG*-Mutante *E. coli* AW0607 zum isogenen BW25113-Stamm beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da wie bereits oben erwähnt *E. coli uspA*-Mutanten unter Bedingungen, die zu einer kompletten Wachstumsinhibierung führen (z.B. 1 M NaCl, 3 mM H₂O₂, 200 µM CCCP, 600 µM CdCl₂) eine deutlich reduzierte Überlebensrate von >90% im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Nyström & Neidhardt, 1994), sollte für die *uspG*-Mutante überprüft werden, ob ein vergleichbarer Phänotyp zu beobachten ist.

Dazu wurden *E. coli* AW0607 und BW25113 in Glukose-Minimal-MOPS Medium, wie bereits von Nyström & Neidhardt (1994) im Falle der phänotypischen Charakterisierung einer *uspA*-Mutante beschrieben, mit 1 M NaCl versetzt und nach verschiedenen Zeitpunkten die Überlebensrate von AW0607 im Vergleich zu BW25113 bestimmt (2.3.2). Dabei war zwar bei beiden Stämmen, wie zu erwarten, eine deutliche Reduktion der Überlebensrate zu beobachten, signifikante Unterschiede sind allerdings nicht in dem getesteten Zeitfenster von 7h aufgetreten (Daten nicht gezeigt). Gleiches galt auch bei Applikation eines oxidativem Stresses hervorgerufen durch 3 mM H₂O₂. Auch dort waren in dem untersuchten Zeitfenster von 0-60min keine messbaren Unterschiede in der Überlebensrate von AW0607 im Vergleich zu BW25113 zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigte auch *E. coli* TN3151 (*uspA::kan*-Mutante) unter keiner der getesteten Bedingungen die zu erwartende erhöhte Sensitivität gegenüber NaCl und H₂O₂ im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Nyström & Neidhardt, 1994, Daten nicht gezeigt).

Um eine mögliche Beteiligung von *uspG* bei dem Schutz gegenüber DNA-schädigenden Bedingungen (z.B. UV-Licht, Mitomycin C), wie es bereits für *uspA*, *uspC*, *uspD* und *uspE* gezeigt wurde (Gustavsson *et al.*, 2002; Diez *et al.*, 2000) zu untersuchen, wurden wie unter 2.3.2 beschrieben *E. coli* AW0607 und BW25113 für 0-4min mit UV-Licht bestrahlt. Dabei zeigte sich im Verlauf des getesteten Zeitintervalls wie zu erwarten war, eine deutliche Reduktion der Überlebensrate dieser beiden Stämme. Eine höhere Überlebensrate von BW25113 konnte allerdings im Vergleich zur *uspG*-Mutante nicht nachgewiesen werden; gleiches galt auch für den Stamm TN3151 (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte die zuvor von Diez *et al.*, 2000 beschriebene, um etwa 50% höhere Sensitivität einer *uspA*-Mutante gegenüber Mitomycin C (DNA-schädigendes Agens) nicht bestätigt werden. Weder die *uspA*-Mutante (TN3151) noch die *uspG*-Mutante (AW0607) zeigten eine höhere Sensitivität bei steigenden Konzentrationen an Mitomycin C [0-15 µg/ml] im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (2.3.2, Daten nicht gezeigt).

Auch durch den Einsatz von CCCP [0-40 µM], durch dessen Verwendung erst kürzlich einer *E. coli uspG*-Mutante eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde (Bochkareva *et al.*, 2002), konnte keine verringerte Sensitivität von *E. coli* AW0607 und TN3151 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. (Daten nicht gezeigt). Brochkareva *et al.* (2002) konnten zudem zeigen, dass die *uspG*-Mutante eine deutlich verzögerte Wiederaufnahme des Wachstums zeigte, wenn diese aus der stationären Phase in frisches Medium überführt wurde. Um dies zu verifizieren, wurde *E. coli*

AW0607 und BW25113 wie unter 2.3.2 beschrieben angezogen. Dabei konnten keinerlei Unterschiede bezüglich der Wiederaufnahme des Wachstums, noch betreffend die Wachstumsrate zwischen AW0607 und BW25113 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Die Adaptation von *Escherichia coli* an Veränderungen der Osmolalität beinhaltet ein sehr komplexes regulatorisches Netzwerk. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch weder der genaue Umfang des Osmostress-Stimulons, der exakte von der Zelle wahrgenommene Reiz, noch alle bei der Adaptation beteiligten Proteine (z.B. Regulatoren) identifiziert worden.

Die Anpassung von *E. coli* beinhaltet dabei eine Vielzahl primärer und sekundärer physiologischer Veränderungen, die einhergehen mit der Regulation einer ganzen Reihe von Genen, die in ihrer Transkription verändert werden und somit Variationen im Gesamtproteinmuster hervorrufen. Bis dato existieren eine Reihe physiologischer, genetischer und biochemischer Untersuchungen im Zuge der Osmostress-Adaptation von *E. coli*. Dabei konnten Untersuchungen zur Veränderung globaler Transkriptionsmuster zeigen, dass vermutlich ein enger Zusammenhang zwischen stationär wachsenden Zellen und hyperosmotisch gestressten Zellen besteht (Chuang *et al.*, 1993). Globale Analysen mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) und der Einsatz von Reporter-gen-Fusionsstudien zeigten eine verstärkte Synthese von ca. 40 Proteinen unter erhöhter Osmolalität; ca. 30 Proteine wurden reprimiert (Jenkins *et al.*, 1990; Botsford, 1990; Gutierrez *et al.*, 1987; Hengge-Aronis *et al.*, 1993). Alle diese Untersuchungen haben sich jedoch mit den späteren Adaptationsphasen beschäftigt (>25min), sodass für *E. coli* zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Informationen globaler transkriptionaler und translationaler Veränderungen hinsichtlich der frühen Adaptationsphase infolge von hyperosmotischem Stress existierten.

Aus diesem Grund sollten zunächst, durch den Einsatz der DNA-Microarray-Technologie, Veränderungen auf dem transkriptionalem Niveau in einem Zeitrahmen von 9 Minuten bestimmt werden. Zusätzlich sollte mittels der 2D-Gelelektrophorese ein besonderes Augenmerk auf die im Zuge der frühen Adaptationsprozesse neu synthetisierten Proteine gelegt werden und mögliche regulatorische Proteine identifiziert und biochemisch charakterisiert werden.

4.1 „Transcriptomics“: DNA-Microarray-Analysen von *E. coli* unter hyperosmotischem Stress

Durch die Entschlüsselung der Genomsequenz von *E. coli* MG1655 im Jahre 1997 (Blattner *et al.*, 1997) und der daraus resultierenden Entwicklung von DNA-Arrays ist es möglich, Genomumfassende transkriptionale Veränderungen im Zuge sich ändernder Umweltparameter, wie z.B. Osmolalität zu bestimmen und semi-quantitative Aussagen über den regulatorischen Trend einzelner Gene bzw. deren Transkripte zu fällen. Dazu wurde *E. coli* zunächst bei 37°C in Minimalmedium (10 mM K⁺) angezogen und anschließend in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol für 9min einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt. Die anschließenden

DNA-Microarray-Analysen ergaben, dass insgesamt mRNA-Transkriptmengen von 152 Genen verändert waren. Dabei zeigten 45 Gene signifikant erhöhte und 107 Gene signifikant erniedrigte mRNA-Mengen (Tab. 3.1). Diese Resultate wurden unabhängig vom verwendeten Osmolyt erhalten, da der Einsatz von NaCl oder dem Zucker Sorbitol zu vergleichbaren regulatorischen Trends der Gene führte. Somit sind die gemessenen Veränderungen in den Transkriptmengen nicht das Resultat der Zelle auf Variationen in der Ionenstärke des Mediums, sondern die Folge einer Erhöhung der Osmolalität.

Die Kriterien, die für die Signifikanz veränderter mRNA-Mengen bei der Auswertung angelegt wurden, wurden bereits im Ergebnisteil ausgiebig besprochen (3.3.1: Weber & Jung, 2002; Tusher *et al.*, 2001). Dabei lag in vielen Fällen der Induktions-/Repressionsfaktor der Gene mit $\pm 1,4$ unter dem vom Array-Hersteller angegebenen Schwellenwert von 2.0 (Sigma-Genosys). Arfin *et al.* (2000) haben bereits auf die fehlende Korrelation zwischen Induktions- und Repressionsfaktoren und der Signifikanz der Genexpression hingewiesen. Sie zeigten, dass nicht alleine die Höhe der Induktions-/Repressionsrate einzelner Gene ausreicht, um zwei verschiedene Expressionsbedingungen miteinander zu vergleichen. Vielmehr ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse unerlässlich, um falsch-positive oder falsch-negative Signalveränderungen zu eliminieren und signifikante Unterschiede hervorzuheben. Dies wurde in diesem Fall durch Setzen verschiedenster Parameter (siehe 3.3.1) und den Einsatz des statistischen Analyse-Programms „SAM“ („Significance analysis of microarrays“, Tusher *et al.*, 2001) erreicht. Dieses Programm wurde bereits mehrfach in der Vergangenheit eingesetzt, um signifikante Expressionsunterschiede unterhalb eines Schwellenwertes von 2.0 nachzuweisen (Tusher *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2002). Bestätigung fanden die erhaltenen Ergebnisse dadurch, dass für die Mehrzahl der mittels Northern-Blots getesteten Gene ein gleicher regulatorischer Trend im Vergleich zu den Microarray-Analysen beobachtet werden konnte, obwohl für einen Großteil der getesteten Gene die Induktions- und Repressionsfaktoren unter einem Schwellenwert von 2.0 lagen (Tab. 3.2). Auch zeigte die Auswertung der Array-Daten von Genen, deren Induktions- bzw. Repressionsfaktoren unterhalb des Schwellenwertes von 2.0 lagen, in vielen Fällen eine vergleichbar höhere Signifikanz (höhere „SAM“-Werte) als Gene jenseits des Wertes von 2.0. Somit konnte einerseits bewiesen werden, dass die Sensitivität der Arrays ausreicht, um geringste Unterschiede der mRNA-Transkriptmengen zu detektieren und das andererseits nicht der Induktions-/Repressionsfaktor das entscheidende Kriterium für signifikante Unterschiede bei vergleichenden Transkriptionsanalysen darstellt.

4.1.1 Geninduktion

Durch die DNA-Array-Untersuchungen konnten eine Reihe von Genen identifiziert werden, denen bereits verschiedene Funktionen bei der Adaptation von *E. coli* unter hyperosmotischen Stressbedingungen zugeordnet wurden; für viele der weiteren identifizierten Gene konnte erstmalig eine gesteigerte mRNA-Transkriptmenge im Zuge der frühen Osmostress-Adaptation für *E. coli*

nachgewiesen werden. Detektierte Gene, die eine erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu Kontrollkulturen zeigten, wurden in den folgenden Abschnitten der Übersicht wegen fett unterlegt.

4.1.1.1 Induktion von *proP* und Nachweis der Gene *ompC* und *ompF*

Das *proP*-Transkript konnte unter osmotischem Stress als signifikant erhöht identifiziert werden. Bei dem korrespondierenden Protein (ProP) handelt es sich um einen Substrat/H⁺-Symporter, der für den Import eines breiten Spektrums an osmotischen Schutzsubstanzen wie Glycinbetain, Prolinbetain, Prolin etc. im Zuge der Adaptation von *E. coli* verantwortlich ist und innerhalb kürzester Zeit exprimiert wird (Gowrishankar, 1986; Grothe *et al.*, 1986; MacMillan *et al.*, 1999; Bremer & Krämer, 2000). Dabei besitzt das *proP*-Gen zwei Promotoren P1 und P2. Ersterer ist für die Expression von *proP* während der exponentiellen Wachstumsphase und bei hyperosmotischem Stress verantwortlich, wohingegen der P2-Promotor für die σ^S -abhängige Expression bei Eintritt in die stationäre Phase essentiell ist (Mellies *et al.*, 1995).

Zudem zeichnen sich Zellen, die hyperosmolaren Bedingungen ausgesetzt werden, durch ein verändertes Verhältnis der Porine OmpF und OmpC aus, wobei die Expression von *ompC* induziert und die von *ompF* reprimiert wird (Pratt & Silhavy, 1995). Obwohl die durch die DNA-Array und Northern-Blots bestimmte Menge an *ompC*-mRNA innerhalb des getesteten Zeitfenster von 9 Minuten konstant blieb, war eine deutliche Reduktion in der mRNA-Menge von *ompF* mittels der gleichen Untersuchungsmethoden nachweisbar (siehe Tab. 3.2). Eine derartig verzögerte Expression des *ompC*-Gens konnte bereits mittels *ompC-lacZ*-Fusionsstudien durch Jovanovich *et al.* (1988) in früheren Arbeiten bestätigt werden. Dabei zeigten Untersuchungen von *ompC-lacZ*-Fusionsstudien eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität zu späteren als den hier verwendeten Zeitpunkten, wohingegen die Expression von *ompF-lacZ* bereits nach 2,5min reprimiert war.

4.1.1.2 σ^S -abhängige Gene: *otsBA*, *proVWX*, *dps*, *himD*, *osmC* und *osmY*

Eine ganze Reihe von Genen, deren Transkriptmengen mittels der Array-Analysen und Northern-Blot-Untersuchungen als erhöht identifiziert werden konnten, stehen unter der Kontrolle von σ^S (RpoS), einem alternativen Sigma-Faktor, der sowohl für die Expression einer Vielzahl von Genen während der stationären Phase, als auch unter osmotischem Stress verantwortlich ist (Hengge-Aronis, 1996a). Dazu zählt das mittels Macroarray-Analysen identifizierte *otsBA*-Operon, dessen Genprodukte (Trehalose-6-P-Synthase und Trehalose-6-P-Phosphatase) für die *de novo* Synthese der osmotischen Schutzsubstanz Trehalose wichtig sind (Csonka & Epstein, 1996; Hengge-Aronis *et al.*, 1991).

Zusätzlich konnte das teilweise unter der Kontrolle von RpoS stehende *proU*-Operon, bestehend aus den Genen *proVWX*, identifiziert werden. Die Gene des *proU*-Operons kodieren für einen ATP-getriebenen ABC-Transporter, der ähnlich wie ProP, neben Glycinbetain und Prolin, ebenfalls ein breites Spektrum an osmotischen Schutzsubstanzen aufnehmen kann. Für das *proU*-Operon, konnte

bereits in früheren Arbeiten durch *proU-lacZ*-Fusionsstudien eine Induktion der Expression unter hypertonen Bedingungen nachgewiesen werden (Mellies *et al.*, 1994; Barron *et al.*, 1986). Neben RpoS konnte durch *in vitro* Studien für die Expression des *proU*-Operons ein positiver Effekt durch K^+ -Glutamat nachgewiesen werden (Ramirez *et al.*, 1989; Mellies *et al.*, 1995). Vermutlich spielen aber weitere regulatorische Proteine, wie das Nukleoid-assoziierte DNA-bindende Protein H-NS, eine Rolle bei der Expression des *proU*-Operons (Lucht *et al.*, 1994). So wirkt H-NS als negativer Repressor im 5'-Bereich („silencer“) von *proV* und wird offensichtlich bei Erhöhung des intrazellulären K^+ -Glutamatgehalts im Zuge eines osmotischen Stresses von *proV* entfernt (Mellies *et al.*, 1994; Mellies *et al.*, 1995; Ueguchi & Mizuno, 1993).

Dps, einem unspezifisch an DNA bindenden Protein, wurde bislang eine Schutzfunktion der DNA gegenüber oxidativem Stress, Nukleasen und einer Reihe für die Zelle schädlichen Bedingungen (z.B. Säurestress) zugesprochen (Martinez & Kolter, 1997; Almirón *et al.*, 1992; Kirkpatrick *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002). Eine rasche transkriptionale Induktion des *dps*-Gens (*pexB*) konnte durch die DNA-Microarray- und Northern-Blot-Analysen unter osmotischem Stress identifiziert werden und bestätigen die bereits von Michán *et al.* (1999) gewonnenen Ergebnisse, bei denen innerhalb weniger Minuten eine deutliche Erhöhung der *dps*-Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte. Das *dps*-Gen ist Teil des OxyR-Regulons, das mindestens 8 Gene umfasst (Michán *et al.*, 1999). Die Transkription von *dps* wird zusätzlich in der stationären Phase über RpoS und den globalen Regulator „integration host faktor“ (IHF) aktiviert, der von den Genen *himA* und *himD* kodiert wird; *himD* konnte zudem ebenfalls induziert auf den Macroarrays identifiziert werden und steht zusammen mit *himA* unter der Kontrolle von RpoS (Altuvia *et al.*, 1994; Aviv *et al.*, 1994; Lomovskaya *et al.*, 1994). Das *osmC*-Gen ist ein osmotisch induzierbares Gen, das ebenfalls Teil des RpoS-Regulons ist (Bouvier *et al.*, 1998; Conter *et al.*, 2001; Gutierrez & Devedjian, 1991). Obwohl die exakte biochemische Funktion des Zellhüllproteins OsmC bislang unklar ist, wird dem Protein eine direkte bzw. indirekte Funktion bei Resistenz gegenüber oxidativen Verbindungen zugesprochen (Conter *et al.*, 2001). Zudem konnte unter hypertonen Bedingungen mittels DNA-Array- und Northern-Blot-Untersuchungen das Gen *yddX* (*bdm*, Blattner Nr. b1481), das bei 33,5min auf dem *E. coli*-Chromosom zwischen *ompC* und *rpsV* lokalisiert ist, als verstärkt exprimiert identifiziert werden (siehe 4.1.1.3). Obwohl die Expression von *rpsV* (S22; kodiert für ein kleines ribosomales Protein der 30S Untereinheit) unter den getesteten Bedingungen unverändert war, wird dieses RpoS- und IHF-abhängig während der stationären Phase induziert (Izutsu *et al.*, 2001). Eine rasche Induktion des *yddX*-Gens wurde erst kürzlich von Cheung *et al.* (2003) unter hyperosmotischen Bedingungen bestätigt.

Das unter osmotischem Stress induziert identifizierte *osmY*-Gen (*csi-5*) kodiert für ein periplasmatisches Protein, dessen Funktion bis dato unklar ist. Bekannt ist, dass der *osmY*-Promotor sowohl Wachstumsphasen-abhängig als auch durch Hungersignale und osmotischen Stress innerhalb

kürzester Zeit induziert werden kann (Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Weichart *et al.*, 1993; Yim & Villarejo, 1992).

4.1.1.3 Induktion von *rpoS*, *uspA* und weiterer Gene

Bislang wird durch Studien von chromosomalen *rpoS::lacZ*-Fusionsstudien angenommen, dass das transkriptionale Niveau der *rpoS*-mRNA innerhalb der ersten 90min nach Zugabe von 0,3 M NaCl nicht signifikant verändert wird (Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Muffler *et al.*, 1996). Mittels Macroarray-Analysen konnte im Gegensatz dazu innerhalb von bereits 9min sowohl durch Zusatz von NaCl, als auch durch Zuführung von 0,7 M Sorbitol eine erhöhte Transkriptmenge der *rpoS*-mRNA mit der höchsten Signifikanz [(*d(i)*)=43] nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte mittels Northern-Blot-Analysen bestätigt werden. Ursachen dieser Diskrepanz könnten neben lokalen Veränderungen der Topologie der DNA (s. u.) in dem gewählten Zeitrahmen (9min in diesen Experimenten; 15-90min bei den *rpoS::lacZ*-Fusionsstudien) liegen. Außerdem wurden für die Array/Northern-Blot-Analysen vergleichsweise höhere Konzentration an NaCl [0,4 M statt 0,3 M] eingesetzt. Zudem ist nicht auszuschließen, dass die Stabilität der *rpoS*-mRNA durch Anfügen des *lacZ*-Gens herabgesetzt wird. So ist es durchaus denkbar, dass eine Maskierung der *rpoS::lacZ*-mRNA durch die Kälteschockproteine CspC und CspE [beide Gene werden konstitutiv in *E. coli* exprimiert] gegenüber Degradation vergleichsweise geringer ausfällt, als beim unveränderten *rpoS*-Transkript (Phadtare & Inouye, 2001; Phadtare & Inouye, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit der *rpoS*-mRNA, die normalerweise bei 2,5min liegt, durch Überexpression von CspC und CspE um das 6fache erhöht ist (15min). Dies ist in sofern interessant, da eine Überexpression von CspC und CspE zu einer erhöhten Expression weiterer SigmaS-abhängiger Gene, wie *proP*, *osmY* und *dps* führt; vermutlich durch den positiven Effekt auf die Expression von *rpoS* selbst (Phadtare & Inouye, 2001). Somit scheint unter osmotischem Stress, neben der dominierenden posttranskriptionalen Regulation und der Regulation auf der Ebene der RpoS-Stabilität („turnover“) (Muffler *et al.*, 1996), auch eine transkriptionale Regulation existent zu sein. Eine direkte Korrelation zwischen *rpoS*-mRNA und RpoS-Protein zu sehen ist allerdings wegen der komplexen Regulation der Expression von *rpoS* schwierig (siehe Abb. 1.1).

Die DNA-Macroarray-Analyse zeigte eine reduzierte Menge an *uspA*-Transkript (1,3-1,9fach reprimiert), während unter Northern-Blot-Analysen eine Induktion diese Transkripts zu beobachten war (2,1fach induziert; Siehe Tab. 3.2). Eine Erklärung dieser Diskrepanz ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, zeigt aber, dass trotz Ansatz mehrerer Signifikanzkriterien durchaus falsch positive Gene im Zuge der Studien mittels der DNA-Array-Technologie auftreten können. Das *uspA*-Gen kodiert für das zytoplasmatische Protein UspA, einem Vertreter der Usp-Proteinfamilie, das verstärkt während längerer Phasen kompletter Wachstumsinhibierung exprimiert wird. Deletionen in *uspA* führten dabei zu einer Erniedrigung der Überlebensrate nach Behandlung von Zellen mit 1 M NaCl, CdCl₂, H₂O₂, DNP und CCCP (Nyström & Neidhardt, 1994). Obwohl der Einsatz von 0,4 M NaCl

nicht zu einer kompletten Wachstumsinhibierung führt, ist es wahrscheinlich, dass *uspA* bereits induziert vorliegt.

Neben den oben erwähnten Genen, konnten mit Hilfe der DNA-Array-Technologie eine ganze Reihe induzierter Gene identifiziert werden, denen bislang keine direkte Beteiligung bei der Adaptation von *E. coli*, hinsichtlich hyperosmotischer Bedingungen, zugesprochen wurde. Diese Gene (*aceK*, *arp*, *copA*, *crr*, *cynT*, *dfp*, *div*, *leuC*, *lpxA*, *metC*, *metF*, *moaC*, *moeA*, *ribE*, *rnt*, *sbcB*, *tmk* und *xerD*) gehören einer Vielzahl funktioneller Gruppen an (Tab. 3.1) und verteilen sich über das gesamte *E. coli*-Chromosom; 15 weitere Genprodukte sind bislang hypothetisch, nicht-klassifiziert oder gänzlich unbekannt (siehe Tab. 3.1). Eine Online-Datenbanksuche mittels RegulonDB (Salgado *et al.*, 2001), die eingesetzt wurde um gemeinsame transkriptionale Einheiten und deren Regulatoren zu identifizieren, ergab kein positives Resultat. Ein Sequenzvergleich mittels des BLAST-Servers ergab für das Gen *ymfS* (*b1155*) Homologien zu einer Domäne unbekannter Funktion (DUF144-Domäne). Dieses Gen ist vermutlich bei den Prozessen des „quorum sensing“ beteiligt; *ymfS* zeigt eine Induktion durch den Autoinduktor-2 bei *E. coli* (DeLisa *et al.*, 2001). Das Genprodukt von *yegW* (*b2101*) stellt möglicherweise einen Transkriptionsregulator dar. Sequenzvergleiche deuten auf ein potentiell „Helix-Turn-Helix“-Motiv (Aminosäurebereich: 50-69) DNA-bindender Proteine hin und ist der Familie der H-T-H-GNTR-Proteine („gluconat operon transkriptional repressor“) zuzuordnen. Dazu zählt zum Beispiel auch das FadR-Protein, ein Regulator des Fettsäurestoffwechsels in *E. coli* (Xu *et al.*, 2001). Die Funktion von YegW ist ebenso unbekannt wie die Funktion des Genprodukts von *ybgS* (*b0753*), das eine N-terminale Signalsequenz (AS 1-24) trägt.

Ein Aminosäure-Sequenzvergleich des YbdQ-Proteins (UspG, UP12), dessen Gen (*ybdQ*) ebenfalls unter hyperosmotischen Bedingungen induziert nachgewiesen werden konnte (Tab. 3.2), zeigte eine Zugehörigkeit zur Usp-Proteinfamilie, die unter einer Vielzahl von Stresssituationen bei *E. coli* induziert werden (Gustavsson *et al.*, 2002). Das *bax*-Gen (*b3570*), dessen Produkt für ein putatives ATP-bindendes Protein kodiert (www.expasy.org), unterliegt ähnlich wie das *otsBA*-Operon, *proU*-Operon, *dps* und *rpoS* der regulatorischen Kontrolle durch den „supercoil“-Status der DNA (Cheung *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 1988). Obwohl der negative „supercoil“ unter osmotischem Stress vorübergehend im Laufe der frühen Osmostress-Adaptation zunimmt (Hsieh *et al.*, 1991), waren die entsprechenden Gene der daran beteiligten Gyrase (Topoisomerase II, TopII, *gyrA*, *gyrB*) nicht auf den Arrays unter osmotischem Stress induziert (Daten nicht gezeigt). Es wird angenommen, dass die Gyrase-Aktivität [ATP-abhängiges Enzym] dabei direkt durch das ebenfalls im Zuge der frühen Osmostress-Adaptation gesteigerte Verhältnis ATP:ADP reguliert wird. Zudem ist das *topA*-Gen auf den Arrays unter hyperosmotischem Stress reprimiert [kodiert für die Topoisomerase I, TopI, TopA]. TopA besitzt eine der Gyrase antagonistisch wirkende Proteinfunktion indem es den negativen „Supercoil“ von DNA erniedrigt. Eine reduzierte Menge an gebildetem TopA-Protein könnte eine zumindest temporäre Relaxation der DNA unter osmotischem Stress verhindern und somit indirekt zur Erhöhung des negativen „Supercoils“ durch die Gyrase beitragen. Diese Repression von *topA* ist

vermutlich nur transient, da im Zuge der späteren Osmostress-Adaptation der DNA-„Supercoil“-Status auf das ursprüngliche Niveau zurückgebracht wird (Hsieh *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 2003).

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass nicht alle Gene eines gemeinsamen Operons (z.B. *cynTSX*, *leuABCD*, *moaABCDE* und *moeAB*) induziert wurden, bzw. teilweise scheinbar in unterschiedliche Richtungen induziert waren (z. B. *leuC* und *leuD* des *leuABCD*-Operons). Dies ist offenbar durch den Einsatz der ORF-spezifischen *E. coli* Primer zu erklären. Arfin *et al.* (2000) konnten zeigen, dass der Einsatz so genannter „random“ Hexamere bei der reversen Transkription verlässlichere Ergebnisse liefert, da diese nicht so stark durch mögliche Degradation der mRNAs beeinflusst werden.

4.1.1.4 Identifikation des *kdpFABC*-Operons

Für das *kdpFABC*-Operon, das für das hoch affine K⁺-Aufnahmesystem KdpFABC kodiert, konnte bereits in früheren Arbeiten eine rasche transkriptionale Induktion unter den hier getesteten Bedingungen nachgewiesen werden (Jung *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass in einigen Fällen die Induktions-/Repressionsfaktoren einzelner Gene der Northern-Blot-Analysen höher lagen als die der Macroarray-Untersuchungen. Obwohl eine exakte Begründung zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden kann, ist dieses Phänomen wahrscheinlich durch Probleme während der reversen Transkription der mRNA in cDNA zu erklären. Vermutlich verhindern Sekundärstrukturen in den entsprechenden Transkripten eine effiziente und vollständige reverse Transkription. Dies traf insbesondere auf die Gene des *kdpFABC*-Operons zu (siehe Tab. 3.2). Nur mittels der Northern-Blot-Analysen war eine deutliche Induktion von *kdpABC* zu bestimmen. Die Array-Analysen hingegen, zeigten keine erhöhten Transkriptmengen von *kdpFABC*. Nicht auszuschließen ist zudem eine zumindest teilweise Degradation des *kdpFABC*-Operons (in Jung *et al.*, 2001 ersichtlich). So könnte bei entsprechendem Fehlen komplementärer 3'-Regionen des *kdp*-Transkripts ein Binden der ORF-spezifischen Primer an den Messenger verhindert werden (Arfin *et al.*, 2000). Desweiteren scheinen Kreuz-Hybridisierungen mit cDNA-Transkripten bei den DNA-Array-Analysen relevant zu sein. So konnten in einigen Fällen, besonders für *kdpA*, hohe Signalintensitäten beobachtet werden, obwohl die für *E. coli* verwendeten Kulturbedingungen (M63-Minimalmedium [100 mM K⁺]; LB-Glukose Vollmedium) eine Induktion des *kdp*-Systems ausschließen (Barbosa & Levy, 2000; Tao *et al.*, 1999).

4.1.2 Genrepression

Die Adaptation von *E. coli* auf Erhöhungen der Osmolalität erfolgt schrittweise. Frühe Phasen sind durch eine rasche Reduktion/Inhibierung des Zellwachstums charakterisiert, das erst im späteren Verlauf (~1h, je nach Höhe des Stresses) wieder aufgenommen wird (Wood, 1999). Die Array-Analysen ergaben, dass innerhalb kürzester Zeit eine ganze Reihe von Genen reprimiert wird. Darin beinhaltet sind Gene, deren Produkte wichtige Funktionen zentraler metabolischer Stoffwechselwege übernehmen. Zudem wird ein Großteil der für die Proteinbiosynthese-Maschinerie kodierenden Gene reprimiert. Dazu zählen vorwiegend ribosomale Proteine (r-Proteine) der 30S- und 50S-Untereinheit

(siehe Tab. 3.1). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei vergleichenden Transkriptom-Analysen von *E. coli* bei Wachstum in Minimalmedium und Vollmedium gemacht werden (Tao *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass die Menge synthetisierter Ribosomen eng an die Zellwachstumsrate gekoppelt ist, so dass innerhalb kürzester Zeit, die für das Zellwachstum benötigten Proteinkomponenten synthetisiert werden können (Grunberg-Manago, 1996; Keener & Nomura, 1996). Es wird heute allgemein anerkannt, dass die Regulation der 21 ribosomalen Protein-Operons nicht transkriptional induziert werden, sondern vielmehr über autoregulatorische translationale Kontrollmechanismen und über die mRNA-Stabilitäten reguliert werden (Gausing, 1977; Keener & Nomura, 1996). So wird bei der Hefe *Saccharomyces* bereits durch einen milden Hitzeschock und unter osmotischem Schock der mRNA-„turnover“ der r-Proteine drastisch erhöht (Mager & Varela, 1993). Wachstumsbedingungen, die wie im Falle eines hyperosmotischen Stresses zu einer reduzierten Ribosomen-Synthese führen, resultieren in einem Überschuss an r-Proteinen, die dann als Autoregulatoren fungieren und durch Bindung an die eigene mRNA eine Destabilisierung bewirken (Keener & Nomura, 1996). Dies kann die Reduktion vieler r-mRNA-Transkripte, wie sie in diesen Array-Studien gemessen wurden, erklären. Veränderungen von Transkriptmengen, die durch DNA-Array-Untersuchungen gemessen werden, bedeuten somit nicht zwangsläufig eine Regulation auf der Ebene der Transkriptionsinitiation. Sie können auch das Resultat einer veränderten mRNA-Stabilität im Zuge sich verändernder Umweltbedingungen sein.

Es ist bekannt, dass der intrazelluläre Gehalt an RpoS im Zuge von Aminosäuremangel in *E. coli* ansteigt (Hengge-Aronis, 1996b). Es ist demnach anzunehmen, dass die unter osmotischem Stress gemessene Repression vieler Gene (11% sämtlicher reprimierter Gene), die für Proteine der Aminosäurebiosynthese kodieren, zu einer Verstärkung der *rpoS*-Expression bei gleichzeitiger Verringerung der Wachstumsrate führt. Reduzierte mRNA-Transkriptmengen wurden für Gene der Aminosäurebiosynthese für Methionin (*metE*), Leucin (*leuD*), Prolin (*proA*), Threonin (*thrC*), Tryptophan (*trpB*), Lysin (*asd* und *dapB*), Cystein (*cysK* und *cysM*), Glutamat (*gdhA*) und Histidin (*hisC*) identifiziert. Die Tatsache, dass die Transkription einiger tRNA-Synthasen (*ileS* und *thrS*) signifikant unter osmotischem Stress reduziert wird, stimmt mit der Vorstellung überein, dass die Synthese von tRNA-Synthasen eng gekoppelt an die Synthese anderer ribosomaler Komponenten ist (Grunberg-Manago, 1996). Des Weiteren zeigte eine ganze Reihe von Genen, deren Produkte bei der Zellteilung und der Mureinbiosynthese beteiligt sind, eine deutliche Reduktion der Transkriptmengen und tragen dabei vermutlich ebenfalls zur Reduktion der Wachstumsrate von *E. coli* unter hyperosmotischem Stress bei. Hierzu zählen Gene des Zellteilungsapparates (*ftsZ*, *ftsN* und *ftsK*). Gene, deren Produkte für die Zellwandbiosynthese zuständig sind, beinhalten die Peptidoglycan-Synthetase (*mrda* und *mrcA*) sowie das Gen *murA*, das für die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase kodiert. Letzteres Enzym, das essentiell für *E. coli* ist, katalysiert den Transfer des Enolpyruvats von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf UDP-N-Acetylglucosamin und stellt somit den ersten Schritt bei der Peptidoglycan-Biosynthese dar (Brown *et al.*, 1995; Baum *et al.*,

2001). Zudem wird vermutlich die vorübergehende Einstellung der Respiration unter hyperosmotischen Bedingungen (Meury, 1994) durch eine Reduktion der Expression der Gene, die für die F_1/F_0 -ATP Synthase kodieren bewirkt, da einige Gene des Synthase-Operons (*atpC*, *atpF*, *atpH* und *atpI*) im Zuge des hyperosmotischen Schocks als reprimiert auf den DNA-Macroarrays detektiert werden konnten.

4.2 „Proteomics“: 2D-PAGE-Analysen von *E. coli* unter hyperosmotischem Stress

Globale adaptive Antworten sind dynamisch. Dabei spiegeln die Messungen des mRNA-Gehaltes zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht zwangsläufig korrelierende Proteinmuster wider. mRNAs unterliegen vielfach einem hohen „turnover“ (Bernstein *et al.*, 2002; Selinger *et al.*, 2003), sodass eine gemessene Induktion/Repression eines Transkripts nicht notwendigerweise eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der entsprechenden Proteinmenge bedeuten muss. Zudem sind vielfach eine Reihe weiterer Regulatoren bei der Translation der entsprechenden mRNA beteiligt, die wiederum unterschiedlichsten regulatorischen Prinzipien unterliegen und dadurch eine adäquate Vorhersage tatsächlicher für eine Proteinneusynthese benötigter Transkriptmengen erschweren (Loewen *et al.*, 1998; Hengge-Aronis, 2002). Aus diesen Gründen wurde durch den Einsatz der 2D-Gelelektrophorese besonderes Augenmerk auf die Neusynthese von Proteinen im Zuge der frühen Adaptation bei *E. coli* gelegt und diese mit den Ergebnissen der Macroarray-Analysen verglichen.

4.2.1 Proteinbiosynthese: Induktion

Erste Versuche zeigten, dass innerhalb des untersuchten Zeitfensters, die Proteinmuster hyperosmotisch gestresster Zellen im Vergleich zur Kontrolle, nicht signifikant verändert waren. Daher kann für die mittels 2D-PAGE auflösbaren Proteine angenommen werden, dass eine größere Proteindegradation zumindest zu diesem Zeitpunkt eine untergeordnete Rolle spielt.

Indes konnte durch die 2D-Analyse [^{35}S]Methionin-markierter Gesamtzellextrakte unabhängig vom eingesetzten Osmolyt (NaCl, Sorbitol) eine rasche Neusynthese von 30 Proteinen im Zuge der frühen Adaptation (14min) beobachtet werden. Mittels MALDI-Analysen, N-terminaler Sequenzierung, sowie durch den Vergleich bekannter 2D-Gele von *E. coli* wurden im Rahmen dieser Arbeit 11 Proteine identifiziert. Dabei zeigten die identifizierten Proteine ProX, OsmY, Dps, und UspA im Vergleich zu der DNA-Array- bzw. den Northern-Blot-Analysen identische regulatorische Trends. Die möglichen Funktionen dieser Proteine bei der Adaptation von *E. coli* wurden bereits oben ausgiebig beschrieben. Dem Protein NifU (IscU) konnte durch Hoff *et al.* (2003) eine Beteiligung bei der Regulation der Aktivitäten des Hitzeschock-verwandten Hsc66-Hsc20-Chaperonsystems, dessen physiologische Funktion bislang unklar ist, nachgewiesen werden. Dabei stimuliert NifU durch eine

direkte Interaktion mit Hsc66 (DnaK-verwandtes Protein) dessen ATPase-Aktivität. Eine Beteiligung der Hsc66/Hsc20-Proteine bei der Osmostress-Adaptation ist allerdings bislang völlig unbekannt. Dem identifizierten Protein OmpX kann bislang keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden. Es wird aber bei pH-Veränderungen, ebenso wie zwei weitere identifizierte Proteine, das periplasmatische Protein Tpx (Thiol-Peroxidase) und SodB (Superoxid-Dismutase), verstärkt produziert (Stancik *et al.*, 2002; Vogt & Schulz, 1999). Tpx wird zudem ebenso wie SodB unter oxidativem Stress verstärkt synthetisiert (Cha *et al.*, 1995; Dubrac & Touati, 2000). Für das *tpx*-Gen wurde allerdings ein erniedrigter mRNA-Spiegel mittels der Macroarrays detektiert. Entweder es handelt sich dabei, wie im Fall von *uspA*, um ein falsch negatives Signal der Array-Analysen, oder die *tpx*-mRNA unterliegt einer besseren Translationsinitiation bei der infolgedessen die RNA schnell degradiert wird.

Des Weiteren konnte eine signifikante Neusynthese der Chaperon-Proteine DnaK, GroEL und GroES unter osmotischem Stress innerhalb des hier getesteten Zeitfensters mittels der 2D-PAGE-Analysen beobachtet werden. Alle drei Proteine stellen Komponenten des Hitzeschock-Regulons dar. Reguliert wird die Expression der entsprechenden Gene *dnaK*, *mopA* (*groEL*) und *mopB* (*groES*) neben weiteren Genen durch den alternativen Sigma-Faktor σ^{32} (RpoH) (Yura *et al.*, 1993; Gross, 1996). Aufgrund früherer 2D-Untersuchungen wurde angenommen, dass das Hitzeschock-Regulon während der Osmostress-Adaptation in Mikroorganismen wie *E. coli* und *B. subtilis* zumindest innerhalb getesteter Zeitfenster nicht beteiligt ist (Clark & Parker, 1984; Hecker *et al.*, 1988). Dabei handelte es sich jedoch um Untersuchungen, die die frühe Adaptation von *E. coli* im Zuge eines osmotischen Stresses nicht berücksichtigten. Bianchi & Baneyx (1999) konnten mittels *rpoH::lacZ*-Fusionsstudien zeigen, dass *rpoH* posttranskriptional reguliert wird, da durch Gabe von Saccharose, trotz der Anwesenheit von Rifampicin, eine transiente β -Galaktosidase-Aktivität des Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte. Diese transient gesteigerte Translation der *rpoH::lacZ*-mRNA ging dabei Hand in Hand mit einer vorübergehend gesteigerten Expression von *dnaK*. Es ist demzufolge anzunehmen, dass das *rpoH*-Regulon in enger Kooperation zum *rpoS*-Regulon unter hyperosmotischen Bedingungen arbeitet. Vermutlich helfen die induziert gefundenen Proteine DnaK, GroEL und GroES als Notfallsystem, um falsch gefaltete Proteine, die rasch im Zuge des osmotischen Stresses neu synthetisiert werden, in ihre native Konformation zurückzuführen. Da im Zuge der späteren Osmostress-Adaptation verstärkt Schutzsubstanzen wie Glycinbetain und Trehalose als chemische Chaperone von *E. coli* akkumuliert werden, ist die transiente Stimulation von DnaK, und vermutlich auch von GroEL und GroES durchaus nachvollziehbar. Zudem konnte dem Protein DnaK eine positive Funktion bei der posttranskriptionalen Regulation von *rpoS* zugesprochen werden, indem es die Degradation von RpoS verhindert (Muffler *et al.*, 1997). Dadurch kann die intrazelluläre Menge an RpoS innerhalb kürzester Zeit erhöht und die Transkription von *rpoS*-abhängigen Promotoren der hier mittels DNA-Array-Analysen identifizierten Gene/Operone *otsBA*, *proVWX*, *dps*, *himD*, *osmC* und *osmY* indirekt durch DnaK positiv beeinflusst werden.

Die Funktion und Identifikation der weiteren 19 unter hyperosmotischem Stress induzierten Proteine (Oip1-19) steht in der Zukunft noch aus. Experimentaldaten von Oip16 und computergestützte Untersuchungen ergaben, dass es sich bei diesem Protein um das UspG (YbdQ, UP12)-Protein (pI: 6,04; MW: 16 kDa) handeln könnte, da der theoretische pI und das Molekulargewicht in etwa den experimentell gewonnenen Werten entsprechen. Bei Oip6 könnte es sich um die ATPase ProV (pI: 5,3 MW: 44 kDa) des Glycinbetain/Prolin-Transportsystem ProU handeln. Allerdings konnte dies für Oip16 und Oip6, sowie für viele weitere induzierte und reprimierte Proteine bislang aufgrund der limitierenden Sequenzierungsmöglichkeiten, die im Zuge dieser Untersuchungen zur Verfügung standen, nicht abschließend bestätigt werden. Es konnte beobachtet werden, dass zumindest ein Teil der unter osmotischen Stressbedingungen neu synthetisierten Proteine mittels der 2D-PAGE nicht aufgelöst werden konnten. Andernfalls ist die um ca. 20% reduzierte Gesamtsignalintensität aller aufgetrennten Proteine auf den 2D-Gelen im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht zu erklären, da in beiden Fällen die gleiche Gesamtradioaktivität aufgetragen wurde. Obwohl eine endgültige Erklärung dieser Beobachtung zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgegeben werden kann, liegen mögliche Ursachen vermutlich in der Wahl des pH-Bereichs und dem Einsatz des verwendeten Detergenz (CHAPS). Es ist durchaus denkbar, dass z.B. die hydrophoben Komponenten des KdpFABC-Komplexes (insbesondere KdpB; siehe 3.2.2), das induzierte ProW-Protein des ProU-Systems sowie das ProP-Protein schlecht solubilisiert werden und dementsprechend nicht aufgelöst werden können.

4.2.2 Proteinbiosynthese: Repression

Eine Reduktion der Proteinneusynthese konnte für die identifizierten Proteine CysK [Cystein-Synthase A], RS1 [r-Protein S1 der 30 S Untereinheit] und RS6 [r-Protein S6 der 30 S Untereinheit] unter osmotischen Stressbedingungen beobachtet werden. Während CysK eine wichtige Funktion bei der Bereitstellung von Cystein übernimmt, spielt das RS1-Protein eine essentielle Rolle bei der Initiation der Translation der meisten mRNAs in *E. coli* (Boni *et al.*, 2001). Eine Reduktion der RS1-Neusynthese könnte daher in einer geringeren Effizienz der Translation einer Vielzahl von Messengern im Zuge des osmotischen Stresses münden und somit die um ca. 20% reduzierte Inkorporation an [³⁵S]Methionin in Proteine unter hyperosmotischem Stress erklären. So zeigten vergleichende 2D-Analysen [³⁵S]Methionin-markierter Gesamtzellextrakte von *E. coli*, dass neben CysK, RS1 und RS6 eine Vielzahl an weiteren bislang nicht identifizierten Proteinen unter hyperosmotischen Stressbedingungen im Vergleich zu Kontrollkulturen nicht oder stark vermindert neu synthetisiert werden (siehe Abb. 3.3). Einen zusätzlichen Beitrag könnte dabei das RS6-Protein leisten. Während unter Kontrollbedingungen beide isomeren Formen von RS6 deutlich vorhanden waren, war unter osmotischem Stress keine signifikante Detektion der modifizierten Form von RS6 (pI: 5,2), im Gegensatz zum unmodifizierten Protein (pI: 5,3), möglich (siehe Abb. 3.3; Tab. 3.4). Verantwortlich für die posttranslationale Modifikation von RS6 ist das Protein RimK, das sukzessiv Glutamatreste an den C-Terminus von RS6 anfügt und damit zu einer Ansäuerung von RS6 führt

(Kang *et al.*, 1989). Demzufolge lässt sich vermuten, dass RimK (*rimK*) unter osmotischem Stress direkt in seiner Aktivität beeinflusst wird, bzw. die Synthese des RimK-Proteins selbst verhindert wird und demzufolge die Proteinbiosynthese beeinflusst. Inwieweit eine stringente Antwort die Neusynthese von Proteinen unter osmotischem Stress beeinflusst, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht. Sicher ist, dass erhöhte Mengen des intrazellulären Alarmons ppGpp die Proteinbiosynthese, z.B. im Falle von Aminosäuremangel, inhibieren kann (Svitil *et al.*, 1993). Zudem benötigen RpoS-abhängige Promotoren ppGpp um mittels RpoS transkribiert zu werden (Kvint *et al.*, 2000). Gleiches gilt für eine ganze Reihe von σ^{70} -Promotoren. So wird für alle bislang untersuchten *usp*-Promotoren ppGpp benötigt (Gustavsson *et al.*, 2002). Da die ppGpp-Degradation unter osmotischem Stress verhindert wird und durch eine Vielzahl von Stressen eine Akkumulation von ppGpp in der Zelle erfolgt (VanBogelen *et al.*, 1987; Cashel *et al.*, 1996; Harshman & Yamazaki, 1972; Aviv *et al.*, 1994), ist eine regulatorische Funktion von ppGpp bei der Proteinbiosynthese anzunehmen.

Neben einer direkten Beeinflussung der Proteinbiosynthese (z.B. Translations-Initiation durch RS1), spielt zudem eine Regulation auf der Ebene der Bereitstellung entsprechender mRNA-Transkripte eine wichtige Rolle. Dies konnte zumindest für die bislang identifizierten Gene *cysK* und *rpsA* und deren Genprodukte CysK und RS1 durch den Vergleich der DNA-Array-Untersuchungen und 2D-Analysen bestätigt werden. Beide Gene/Proteine zeigten den gleichen negativen regulatorischen Trend. Inwiefern das Fehlen weiterer mRNA-Transkripte, wie sie im Falle der DNA-Array-Untersuchungen für 105 weitere Transkripte gemessen wurden (siehe 4.1) direkt an der Repression der Neusynthese korrespondierender Proteine beteiligt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt werden, da hierfür weitere Proteine der 2D-Untersuchungen identifiziert werden müssten.

In der Vergangenheit wurden bislang solch drastische Veränderungen wie sie hier im Verlauf der frühen Osmostress-Adaptation von *E. coli* beobachtet wurden nicht beschrieben. So konnte von Botsford (1990) lediglich eine Reduktion von 31 Proteinen mittels [³⁵S]Methionin-Markierung in *E. coli* beobachtet werden. Diese Untersuchungen erfolgten allerdings unter „Steady-State“-Bedingungen, sodass demnach anzunehmen ist, dass die hier gemachten Beobachtungen der verminderten Proteinneusynthese einer Vielzahl von Proteinen innerhalb des getesteten Zeitfensters größtenteils transientser Natur sind und im Zuge der späteren Osmostress-Adaptation korrigiert werden und somit der Zelle erlauben, vegetative Zellprozesse (Zellteilung, etc.) wieder aufzunehmen.

4.2.3 Schlussfolgerungen

Die frühe Adaptation von *E. coli* auf erhöhte Osmolalitäten beinhaltet eine komplexe und umfassende Regulation der Proteinbiosynthese, die sich in einer Veränderung der Proteinmuster widerspiegelt. Vergleichende Studien zur [³⁵S]Methionin-Inkorporation und zum Proteingehalt konnten zeigen, dass diese Veränderungen nicht auf einer Proteindegradation sondern auf einer differentiellen Proteinneusynthese beruhen, die während der frühen Phase der Osmostress-Adaptation für *E. coli* von

Bedeutung ist und in einer Produktion von für die Zellen wichtigen Proteine mündet. So konnten im Zuge der Osmostress-Adaptation mittels der 2D-Analysen 30 Proteine nachgewiesen werden, die eine verstärkte Proteinneusynthese aufwiesen. 11 identifizierte Proteine sind Teil des Osmostress-Stimulons bzw. stellen Proteine sich überlappender Stimulons (oxidativer Stress, Hitze- und Säurestress etc.) dar, die teilweise unter der Kontrolle des alternativen Sigma-Faktors RpoS stehen (Hengge-Aronis, 1996a). Eine Vielzahl von Proteinen wird in ihrer Neusynthese inhibiert bzw. reduziert. Ob dies an einer Reduktion der Translationseffizienz oder an fehlenden mRNA-Transkripten liegt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig festzustellen; auch wenn letztere Möglichkeit in einigen Fällen zutrifft (Bsp. CysK, RS1).

Die 2D-Analysen zeigten, dass zum jetzigen Stand der Untersuchungen in vielen Fällen die Experimentaldaten der Transkriptom-Untersuchungen mit denen der 2D-Untersuchungen korrelieren (ProX, OsmY, Dps, UspA, CysK, RS1). Dies ist allerdings nicht zwangsläufig in allen Fällen zutreffend. So zeigten die Gene *uspA* und *tpx* eine negative transkriptionale Regulation, obwohl diese tatsächlich unter osmotischem Stress auf der Proteinebene verstärkt neu synthetisiert werden. Andere Gene wie *ompX*, *sodB*, *groEL*, *groES*, *dnaK*, etc. zeigten keine Veränderungen auf transkriptionalem Niveau, wurden aber trotzdem verstärkt synthetisiert; vermutlich durch posttranskriptionale Regulation. mRNAs unterliegen einem starkem „turnover“, der zudem durch regulatorische Komponenten beeinflusst wird. Transkriptom- und Proteom-Analysen müssen somit auch in Zukunft kombinatorisch eingesetzt werden, will man die Signifikanz von mRNA-Messungen bewerten und die Komplexität des Osmostress-Stimulons verstehen.

4.3 Transkriptom- und Proteom-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen

Globale Transkriptom-Untersuchungen, die durch DNA-Microarray-Analysen unter Kalium-limitierenden Bedingungen (0,1 mM K⁺) in einem Zeitfenster von 5min durchgeführt wurden, ergaben insgesamt für 24 Transkripte der entsprechend Gene signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollbedingungen (10 mM K⁺). Unter den 12 Genen, die eine erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zu Kontrollkulturen zeigten waren 4 Gene (*b1957*, *b2629*, *ycaJ*, *yjbC*) deren Produkte bis dato hypothetisch, nicht klassifiziert, bzw. unbekannt sind. Mit Ausnahme der Gene *kdpC* und *kdpE*, die für Komponenten des *kdpFABCDE*-Regulons kodieren, kann trotz intensiver Literaturrecherche keinem der weiteren 6 induzierten Gene (*lpp*, *rfM*, *minD*, *minE*, *dps* und *himD*), bzw. deren Genprodukten eine Funktion unter Kalium-limitierenden Bedingungen zugesprochen werden. Dass die anderen Komponenten des *kdpFABCDE*-Regulons im Gegensatz zu Northern-Blot-Untersuchungen nicht signifikant mittels der DNA-Array-Methode nachgewiesen werden können, wurde bereits diskutiert (siehe 4.1.1.4). Die Induktion der Gene *dps* und *himD* ist zudem nicht Kalium-limitations-

spezifisch, da diese Gene unter anderem ebenfalls unter hyperosmotischen Stressbedingungen induziert werden (siehe 4.1.1.2). Gleiches gilt auch für die unter Kaliumlimitation reprimierten Gene *ompF*, *carA*, *carB*, *metE*, *prlA*, *rplE*, *rplX* und *ysgA*. Auch diese werden im Zuge der frühen Osmostress-Adaptation reprimiert (siehe Tab. 3.1).

2D-Analysen ergaben, mit Ausnahme des detektierten KdpC-Proteins, keine signifikanten Unterschiede sowohl auf der Gesamtproteinebene (Zeitfenster 3h bzw. 5min Kaliumlimitation) als auch mittels [³⁵S]Methionin-markierter Zellen (Zeitfenster 10min Kaliumlimitation). Es ist demnach anzunehmen, dass in *E. coli* die Neusynthese des Kdp-Systems eine zumindest dominierende Rolle während der Adaptation unter Kalium-limitierenden Bedingungen übernimmt. Inwieweit das Dps-Protein bzw. der „integration host factor“ (HimD und HimA) eine Rolle bei möglichen regulatorischen Prozessen unter Kaliumlimitation spielt, ist bislang unbekannt. Verstärkt induziert konnte Dps auf den 2D-Gelen nicht identifiziert werden; möglicherweise reicht die unter Kalium-limitierenden Bedingungen gebildete Menge an *dps*-mRNA nicht aus, um ausreichende Mengen an Dps detektieren zu können. Ebenso ist die Beteiligung der Zellteilungsproteine MinD und MinE, die eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisation der Septum-Ausbildung (Z-Ring) in *E. coli* spielen (Zhou & Lutkenhaus, 2003), unter Kalium-limitierenden Bedingungen völlig unklar.

Einige der durch Macroarray-Analysen nachgewiesenen Gene kodieren für Proteine, deren pI jenseits des eingesetzten pH-Bereichs (pH: 4-7) liegen, und konnten somit nicht auf der 2D-PAGE identifiziert werden. Dies trifft beispielhaft für die basischen Proteine Lpp, RffM und HimD zu, sodass eine direkte Aussage hinsichtlich der Korrelation zwischen den entsprechenden mRNA-Transkripten und deren Produkten zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestätigt werden kann. Die Detektion der Komponenten des KdpFABC-Operons durch die 2D-PAGE erwies sich als ausgesprochen schwierig. Grund hierfür liegt vermutlich in der unzureichenden Solubilisierung des Kdp-Komplexes, insbesondere von KdpB. So konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu KdpC, KdpB mittels eingesetztem Detergenz (CHAPS) unzureichend solubilisiert wird. Gleiche Beobachtungen wurden bereits von Ferro-Luzzi & Nikaido 1981 gemacht. Zudem konnte selbst bei der Fokussierung des gereinigten KdpFABC-Komplexes kein distinktes Proteinsignal für KdpB erzielt werden. Dabei wird deutlich, dass im Falle der Auflösungen von Membranproteinen mittels 2D-PAGE ein besonderes Augenmerk auf verwendete Detergenzien gelegt werden muss, bzw. für die Identifikation entsprechender hydrophober Membranproteine zusätzlich auf andere Methoden zurückgegriffen werden sollte.

4.4 Biochemische Charakterisierung von UspG (YbdQ, UP12)

Durch DNA-Microarray-Analysen und Northern-Blot-Untersuchungen konnte eine signifikant erhöhte Menge an mRNA-Transkript für das Gen *ybdQ* (*uspG*) unter hyperosmotischen Bedingungen detektiert werden. Zudem weisen experimentelle Daten wie der isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht des mittels 2D-PAGE-Analysen nachgewiesenen Proteins Oip16 darauf hin, dass es sich dabei um das entsprechende Genprodukt UspG handeln könnte. Da dieses Protein der UspFG-Subfamilie zuzuordnen ist (Gustavsson *et al.*, 2002), war es von Interesse UspG erstmalig biochemisch zu charakterisieren und zu überprüfen, ob es ebenfalls wie bereits für das Protein MJ0577 aus *Methanococcus jannaschii* beschrieben (Zarembinski *et al.*, 1998) ATP bindet und/oder ob ATP von UspG als Substrat für mögliche posttranslationalen Modifikationen benutzt werden kann.

4.4.1 Modifikation und Dimerisierung von UspG und UspG(1-118)

Um eine erste biochemische Charakterisierung von UspG zu ermöglichen, wurde das WT-UspG Protein aus *E. coli* MC4100 mit 10 Histidinresten und mit einem 9 Aminosäuren umfassenden „Linker“ am N-Terminus versehen und dieses anschließend nach Induktion durch Affinitätschromatographie aus der zytosolischen Fraktion von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-UspG erfolgreich und mit hoher Reinheit isoliert. Dies konnte sowohl durch Silbergele als auch durch MALDI-TOF-MS-Analysen bestätigt werden; der Reinheitsgrad betrug dabei mehr als 95%. Zudem war es durch die massenspektrometrische Analyse möglich, das genaue Molekulargewicht von gereinigtem 10His-UspG zu bestimmen. Es beträgt 18315 Dalton und weist auf eine Abspaltung des ersten Methionins im Zuge der Expression des Proteins in *E. coli* hin. Untersuchungen hinsichtlich des Laufverhaltens von gereinigtem 10His-UspG mittels ein- und zweidimensionaler SDS-Gelelektrophorese zeigten erste Hinweise auf mögliche posttranslationale Modifikationen von 10His-UspG *in vivo*. Auf eindimensionalen großen SDS-Gelen war ein leicht verzögertes Laufverhalten von modifiziertem 10His-UspG, wie es bereits für phosphoryliertes IIA^{Glc} beschrieben wurde (Takahashi *et al.*, 1998; Hogema *et al.*, 1998), im Vergleich zu nicht modifiziertem 10His-UspG zu erkennen. Durch 2D-Analysen und anschließendem immunologischen Nachweis konnten neben dem 10His-UspG zwei weitere isomere Formen des Proteins nachgewiesen werden, die sich zum einen in ihrem Laufverhalten in der 2. Dimension unterschieden, zum anderen zusätzlich eine unterschiedliche Ansäuerung zeigten. Dies war unabhängig von der Anwesenheit von ATP zu beobachten. Da vor allem letztere Untersuchungen unter stark denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden, war eine ATP-Bindung als Ursache für das Auftreten der isomeren Formen unwahrscheinlich und gaben somit Anlass dazu, Experimente bezüglich der Natur der Modifikation durchzuführen.

Um eine Modifikation von gereinigtem 10His-UspG *in vitro* nachzuweisen, wurde dieses mit radioaktivem ATP inkubiert und dessen Markierungsgrad bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Protein sowohl mittels [α ³²P]ATP, als auch mit [γ ³²P]ATP innerhalb kürzester Zeit (<1,5min) markiert

wurde. Durch Vorinkubation mit radioaktivem [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP beziehungsweise [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, gefolgt von einem Überschuss an kaltem ATP (30.000fach) konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei den gemessenen radioaktiven Markierungen nicht um eine ATP-Bindung handelt, da sich trotz eines Überschusses an kaltem ATP, die Menge an zu diesem Zeitpunkt bereits radioaktiv markiertem 10His-UspG, nicht mindern ließ („Pulse-Chase“-Experiment). 10His-UspG besitzt somit sowohl Autoadenylierungs- als auch Autophosphorylierungs-Aktivität. Die Adenylierung von 10His-UspG konnte direkt mittels Piperidin-Behandlung, einer Methode, die bereits mehrfach in der Vergangenheit zum Nachweis von Adenylat-Resten an Proteinen Verwendung fand (Bradley *et al.*, 1984; Oda *et al.*, 1993), und anschließender Dünnschichtchromatographie der dabei entstehenden Hydrolysate bestätigt werden. So führte die Piperidin-Behandlung zu einer deutlichen Abspaltung des kovalent gebundenen radioaktiven Adenylat-Restes (AMP) von gereinigtem 10His-UspG, welches zuvor mit [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP inkubiert wurde.

Die enzymatischen Aktivitäten von 10His-UspG waren jedoch relativ gering, was sich in einem Markierungsgrad von 0,04% im Zuge der Phosphorylierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP bzw. 0,02% im Zuge der Adenylierung durch den Einsatz von [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP, äußerte. Mögliche Ursachen könnten vielfältiger Natur sein. So ist es durchaus denkbar, dass die Zusammensetzung des verwendeten Adenylierungs- und Phosphorylierungspuffers suboptimal für die jeweiligen Enzymreaktionen war. Getestet wurden zwar erhöhte Salzkonzentrationen und unterschiedliche Inkubationstemperaturen, diese konnten jedoch keine Verbesserung des Markierungsgrades bewirken. Zudem ist nicht auszuschließen, dass gereinigtem 10His-UspG unter *in vitro* Bedingungen ein bislang unbekannter wichtiger Kofaktor für die Steigerung der intrinsischen Enzymaktivitäten fehlt. Im Falle des MJ0577 Proteins, einem weiteren Vertreter der UspFG-Subfamilie (Sousa & McKay, 2001) aus *Methanococcus jannaschii* konnte dieses direkt gezeigt werden. Nur bei Zugabe von *M. jannaschii* Gesamtzellextrakten und entsprechender Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 80°C wurde die ATPase-Aktivität des Proteins angeschaltet (Zarebinski *et al.*, 1998).

Darüber hinaus zeigte sich im Rahmen der 2D-PAGE-Analysen der Reinigungsfraction von 10His-UspG, dass dort der Adenylierungsgrad von 10His-UspG (Isomer Nr. 2) bereits ~5% betrug. Eine Zuordnung dieses am schwächsten repräsentierten Isomers war mittels [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP-markiertem 10His-UspG und anschließender Auftrennung durch 2D-Analysen eindeutig. Durch die schwachen und diffusen Signale von [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP-markierten 10His-UspG war keine eindeutige Zuordnung mittels 2D-PAGE möglich. Sicher ist jedoch, dass die [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP-markierte Form einer der beiden isomeren Formen (Isomer Nr.1, bzw. Isomer Nr.2) entspricht.

Eine Erhöhung des Anteils an adenyliertem 10His-UspG konnte trotz Zugabe von 10 mM ATP im Zuge der 2D-Analysen immunologisch nicht nachgewiesen werden. Es ist demnach anzunehmen, dass der Großteil von 10His-UspG bereits intrazellulär während der Expression von *uspG* posttranslational modifiziert wurde. Legt man diesen Adenylierungsgrad (~5%) von 10His-UspG für *in vitro* Bedingungen (~0,02% Adenylierungsgrad) zu Grunde, so zeigt sich eine etwa 250fach gesteigerte

Adenylierungsrate von 10His-UspG im Zuge der Expression. Ob der anteilige Adenylierungsgrad von 10His-UspG unter nicht induzierenden Bedingungen ein vergleichbares Niveau besitzt, wurde allerdings nicht untersucht. Für UspA, ein Serin/Threonin Phosphoprotein der UspA-Subfamilie, konnte unter *in vitro* Bedingungen beobachtet werden dass dort nur eins von 10.000 UspA-Molekülen im Vergleich zu *in vivo* Bedingungen phosphoryliert wird (Freestone *et al.*, 1997). Der *in vitro* Phosphorylierungsgrad lag dort somit bei 0,01%. Für 10His-UspG konnte ein Phosphorylierungsgrad von 0,04% *in vitro* bestimmt werden (siehe oben). Unter *in vivo* Bedingungen wird eine deutliche Steigerung des Phosphorylierungsgrades durch die TypA (Tyrosin-Phosphoprotein)-vermittelte Phosphorylierung von UspA unter Kohlenstoff- und Phosphatlimitation bewirkt (Freestone *et al.*, 1997; Freestone *et al.*, 1998). Zudem konnte für UspA, UspC, UspD und UspE in *E. coli* beobachtet werden, dass diese nicht nur koordiniert im Zuge verschiedenster Wachstums-inhibierender Bedingungen produziert werden, es werden auch alle 4 bislang untersuchten Usp Proteine benötigt, um gemeinsam an der Protektion von *E. coli* bezüglich DNA-Schäden mitzuwirken. Eine Deletion in nur einem der 4 *usp*-Gene führte zu einer starken UV-Sensibilität der entsprechenden Mutante, im Vergleich zum Wildtyp (Gustavsson *et al.*, 2002). Obwohl bislang nicht nachgewiesen, ist es denkbar, dass die Usp Proteine interagieren (z.B. Ausbildung von Heterodimeren, Gustavsson *et al.*, 2002) und demzufolge die einzelnen Aktivitäten der Usp Proteine untereinander beeinflusst werden (Abb. 4.3). Durch jüngste Untersuchungen von Bochkareva *et al.* (2002) konnte nachgewiesen werden, dass UspG in *E. coli* ein natürliches *in vivo* Substrat von GroEL (Bukau & Horwich, 1998) darstellt. So konnten rund 35% der zytosolischen Menge an UspG im Zuge einer Koimmunopräzipitation von GroEL, welches zuvor verstärkt synthetisiert wurde, gebunden nachgewiesen werden. Sofern GroEL nicht verstärkt produziert wurde, betrug der Anteil ~4-5% und lag damit im Rahmen anderer *in vivo* Substrate von GroEL (Bochkareva *et al.*, 2002). Diese Bindung war zudem spezifisch, da durch die Zugabe von ATP diese Interaktion aufgehoben werden konnte (Bochkareva *et al.*, 2002). Es wird demnach angenommen, dass UspG möglicherweise kontinuierlich von GroEL erkannt wird, wobei GroEL bei der Aufrechterhaltung, bzw. beim Erreichen der nativen Konformation von UspG, unterstützend wirkt (Bochkareva *et al.*, 2002). Nicht auszuschließen ist zudem eine kooperative Funktion von UspG und GroEL unter bestimmten bislang unbekanntem Stresssituationen (Bochkareva *et al.*, 2002). Ob dabei die Enzymaktivitäten von UspG *in vivo* positiv beeinflusst werden, oder ob noch weitere Proteine (z.B. andere Usp-Proteine) beteiligt sind, ist bislang unklar (siehe Modell, Abb. 4.3).

Neben der Phosphorylierung von Proteinen, stellt die Modifizierung durch Adenylierung ein von der Natur angewandtes Funktionsprinzip dar, um Proteine in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Ein klassisches Beispiel stellt die Glutamin-Synthetase (GlnA) in *E. coli* dar (Shapiro & Stadtman, 1968; Reitzer.L.J., 1996). Dieses aus 12 Untereinheiten bestehende Enzym ist verantwortlich für die Synthese von Glutamin aus Glutamat, NH_4^+ und ATP. Die Aktivität der Glutamin-Synthetase unterliegt neben der kumulativen Endprodukt-Kontrolle durch die Stoffwechselendprodukte des

Glutaminstoffwechsels zusätzlich einer reversiblen kovalenten Modifikation. Durch die Ausbildung einer Phosphoester-Bindung wird AMP auf die Hydroxylgruppe eines hoch konservierten Tyrosinrestes übertragen. Diese enzymatische Aktivität wird allerdings nicht von GlnA selber vermittelt, sondern benötigt ein weiteres Protein (Adenyltransferase), welches den Adenylatrest auf GlnA überträgt, wodurch dieses in seiner Aktivität erniedrigt wird. Zudem gibt es eine Reihe weiterer Proteine, bei denen eine direkte Adenylierung/Guanylierung nachgewiesen wurde. So konnte für das Simian Virus 40 „large tumor antigen“-Protein (SV40-T) *in vitro* eine Adenylierung gezeigt werden; die Adenylierung erfolgt dabei über eine Phosphoester-Bindung an einem Serin-Rest. Das Protein ist bei der viralen DNA-Replikation beteiligt und zeigt als enzymatische Aktivität ATPase-, Autokinase- und Proteinkinase-Aktivität (Bradley *et al.*, 1984; Tjian & Robbins, 1979). Für ein weiteres Protein MAFP („major acidic fibroblast growth factor (aFGF)-stimulated phosphoprotein“), ein Glykoprotein das in Rinderleberzellen vorkommt, konnte sowohl eine Autoadenylierung als auch Autophosphorylierung nachgewiesen werden (Oda *et al.*, 1993). Als Substrat dienen entweder ATP oder GTP. Dabei erfolgt sowohl die Autoadenylierung als auch die Autophosphorylierung an einem identischen Threonin-Rest. Neben einer Phosphodiesterase-Aktivität besitzt das MAFP-Protein eine ATP-abhängige Kinaseaktivität, die es dem Protein ermöglicht, weitere Proteine (z.B. Histone) zu phosphorylieren. Zudem werden sämtliche intrinsische Enzymaktivitäten von MAFP durch ein weiteres Protein aFGF („acid fibroblast growth factor“) stimuliert (Oda *et al.*, 1993). Ein weiteres Beispiel ist das ICP4-Protein („infected cell protein 4“), ein Hauptregulatorprotein des Herpes Simplex Virus. Auch dort konnte für das Protein eine Adenylierung und Guanylierung durch ATP und GTP nachgewiesen werden (Blaho & Roizman, 1991).

Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG ergaben eine deutliche Diskriminierung zwischen den Purin-Nukleotiden ATP, GTP und dem Pyrimidin-Nukleotid CTP. Während ATP als Substrat bevorzugt umgesetzt wird um 10His-UspG zu modifizieren, wird CTP vermutlich nicht als Substrat verwendet, da die Zugabe von CTP zu keiner Reduktion der radioaktiven Markierung des gereinigten Proteins führte. Ob GTP neben ATP ebenfalls als natürliches Substrat, wie es z.B. für das MAFP-Protein gezeigt werden konnte (Oda *et al.*, 1993) dient, kann zum jetzigen Stand der Forschung nicht abschließend beurteilt werden, da eine direkte Markierung mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bzw. $[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$ nicht untersucht wurde. Zu beobachten war allerdings eine Reduktion der $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bzw. $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -markierten Menge an 10His-UspG durch die Zugabe von GTP. Diese fiel zwar im Vergleich zur Konkurrenz mit kaltem ATP deutlich schwächer aus, diese Ergebnisse lassen aber darauf schließen, dass auch GTP mit den radioaktiven ATP-Isotopen um die Nukleotid-Bindestelle konkurrieren kann. Die Säurestabilität der Adenylat- und Phosphatbindung an modifiziertem 10His-UspG deutet auf eine Phosphoester-Bindung an einem Serin, Threonin oder Thyrosin hin. Vergleichbare Säurestabilitätsprofile wurden vielfach in der Literatur beschrieben und in der Vergangenheit für den Nachweis von phosphorylierten Serin- und Threonin-Resten (Freestone *et al.*, 1997) und für den Nachweis von Seryl/Threonyl-Adenylaten herangezogen (Bradley *et al.*, 1984; Oda *et al.*, 1993). Um

den modifizierten Aminosäure-Rest und dessen Position in 10His-UspG direkt nachzuweisen, wurden MALDI-TOF-PMF-Analysen von 10His-UspG durchgeführt. Zwar konnten nach entsprechendem tryptischen Verdau 6 der 8 theoretisch zu erwartenden Fragmenten von 10His-UspG in der Masse identifiziert werden, die Heterogenität der Signalintensitäten dieser Fragmente – diese lagen zum Teil unter 15% - ließ jedoch, berücksichtigt man den geringen Modifizierungsgrades von 10His-UspG, keine Identifizierung entsprechender modifizierter Peptide zu. Möglich ist zudem, dass modifizierte Peptide nicht in die Masse eingetreten sind, beziehungsweise die Stabilität der Modifizierung durch die leicht basischen Bedingungen im Rahmen des tryptischen Verdau negativ beeinflusst wurde.

Aufgrund ausreichender Identitäten in der Aminosäuresequenz von UspG und MJ0577 von *M. jannaschii* (28%) war es möglich, die bekannte Struktur von MJ0577 (Zarembinski *et al.*, 1998) heranzuziehen und mit Hilfe des „Swiss-Model“-Programms (<http://www.expasy.org>) eine Strukturvorhersage von UspG zu erhalten (Abb. 4.1).

Die bekannte Kristallstruktur von MJ0577 (Zarembinski *et al.*, 1998) zeigt trotz geringer Sequenzidentitäten (23%) eine Tertiärstruktur, die in ihrer Kernstruktur ähnlich ist zu UspA aus *H. influenzae* (Sousa & McKay, 2001). Die beiden Protomere von MJ0577 und UspA besitzen eine α/β -Struktur, wobei 5 β -Faltblätter in einer charakteristischen und konservierten 3-2-1-4-5-Reihenfolge nebeneinander angeordnet sind und von je 2 α -Helices zu beiden Seiten umlagert werden (Abb. 4.1, unten). Eine solche konservierte Anordnung der α/β -Struktur ist auch für das Modell von UspG aus *E. coli* zutreffend, welches aufgrund der sehr ähnlichen Tertiärstruktur auf die Struktur von MJ0577 gefittet werden konnte (Abb. 4.1 oben); auch in UspG werden insgesamt 5 β -Faltblätter von je 2 α -Helices eingefasst, wobei die $\alpha 2$ -Helix von 6 Aminosäuren kurz unterbrochen wird ($\alpha 2'$, Abb. 4.1, Abb. 4.2).

Im Gegensatz zum UspA aus *H. influenzae*, zeigt das MJ0577-Protein in seiner Kristallstruktur ein gebundenes, tief in eine Bindetasche eingebettetes ATP-Molekül in relativer Nähe zur Dimerisierungsdomäne (Abb. 4.1). Dabei wird die ATP-Bindung von Aminosäuren der Faltblätter $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ und der Helix $\alpha 4$ gebildet (Abb. 4.2); die Bindung erfolgt dabei nicht über die Seitengruppen der beteiligten Aminosäuren, sondern vornehmlich über die Hauptatome der beteiligten Aminosäuren (Sousa & McKay, 2001). Neben einigen Abweichungen in der Kristallstruktur der beiden Proteine – UspA zeigt eine verkürzte $\alpha 2$ -Helix, die näher zur Kernstruktur angeordnet ist (Abb. 4.1) – sind einige Sequenzunterschiede im Bereich der Tri-Phosphat-Bindestelle von UspA zum MJ0577-Protein zu finden. Es wird vermutet, dass gerade die vergleichsweise großen Aminosäuren Glutamin112 (Gln112) und Methionin119 (Met119) in UspA von *H. influenzae*, an deren Stelle im MJ0577 kleine Glycinreste sitzen, dafür verantwortlich sind, dass ATP von UspA nicht gebunden werden kann (Zarembinski *et al.*, 1998). Von Sousa & McKay (2001) wird daher aufgrund struktureller und sequenzanalytischer Vergleiche eine G-2X-G-9X-G(S/T) Consensus-Sequenz für die Tri-Phosphatbindung ATP-bindender Usp-Proteine postuliert (Abb. 4.2).

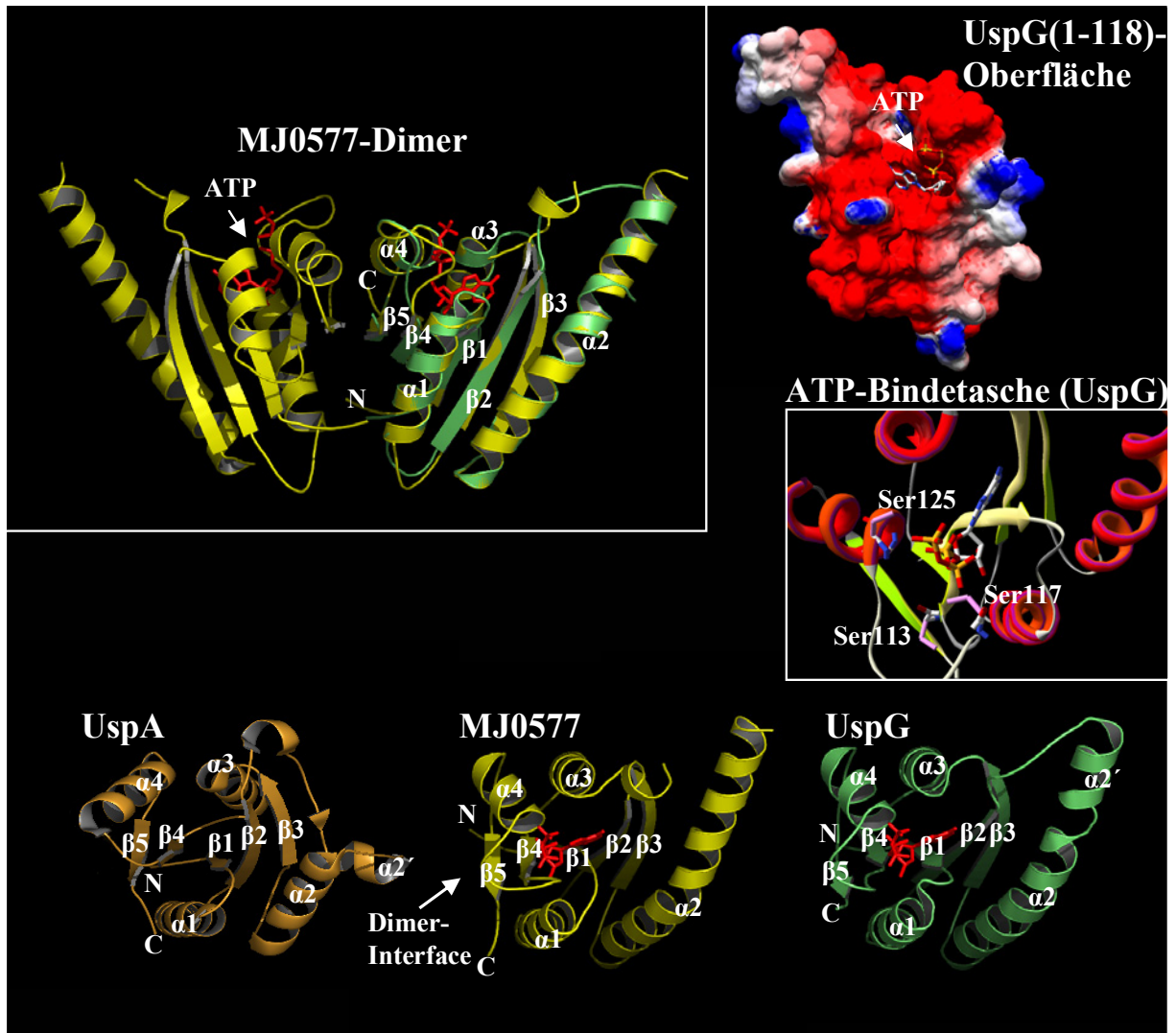


Abb. 4.1 Tertiärstrukturen der Usp-Proteine MJ0577 (*M. jannaschii*), UspA (*H. influenzae*) und UspG (*E. coli*, Modell). **Oben links** ist das Dimer von MJ0577 (gelb) dargestellt; darüber gefittet wurde rechts das UspG-Modell (Monomer) (grün). Oben rechts ist die Oberflächenstruktur der C-terminal verkürzten Form von UspG samt ATP-Bindetasche, dargestellt. Unten sind die einzelnen Tertiärstrukturen der Usp-Proteine als Monomere in ihrer Draufsicht dargestellt. Für MJ0577 und UspG wurde ATP (rot) in die Struktur bzw. ins Modell modelliert. Rechts mittig sind die für die Modifizierung in Frage kommenden Serin-Reste (Ser113, Ser117, Ser125) von UspG vergrößert in der ATP-Bindetasche angedeutet (magenta: reaktive Seitengruppen). Die Strukturen wurden mit SwissPDB-Viewer bzw. PyMol erstellt.

Wie allerdings der Sequenzvergleich von UspG, UspF und MJ0577 zeigt, ist diese Consensus-Sequenz nicht vollständig in UspF und UspG vorhanden. Beide Proteine besitzen zwar ein Glycin an der Stelle, wo die UspA-Proteine aus *H. influenzae* und *E. coli* ein Methionin (Met119) besitzen, an der Stelle an der beide UspA-Proteine jedoch das Glutamin112 tragen, ist auch in den Proteinen UspG und UspF aus *E. coli* kein Glycin vorhanden (Abb. 4.2). Da ebenfalls Experimentaldaten von UspF auf eine ATP-Bindung hindeuten – dieses konnte mittels Blue Sepharose über Affinitätschromatographie gereinigt werden (Saveanu *et al.*, 2002) – ist diese Consensus-Sequenz als Voraussetzung für eine Bindung von ATP anzuzweifeln. Dabei sind weitere konservierte Reste, die im MJ0577-Protein für

die Bindung der Ribose (R) und des Adenins (A) wichtig sind, in UspG und UspF gut konserviert (Abb. 4.2). Hierzu zählen vor allem Aminosäurereste im β 1- und β 2-Faltblatt, die für die Adenin-Bindung in MJ0577 benötigt werden, sowie weitere Aminosäure-Reste im β 4-Faltblattbereich, die an der Bindung der Ribose in MJ0577 beteiligt sind (Abb. 4.2). Die Modellierung von ATP in der Strukturvorhersage von UspG zeigt Abb. 4.1.

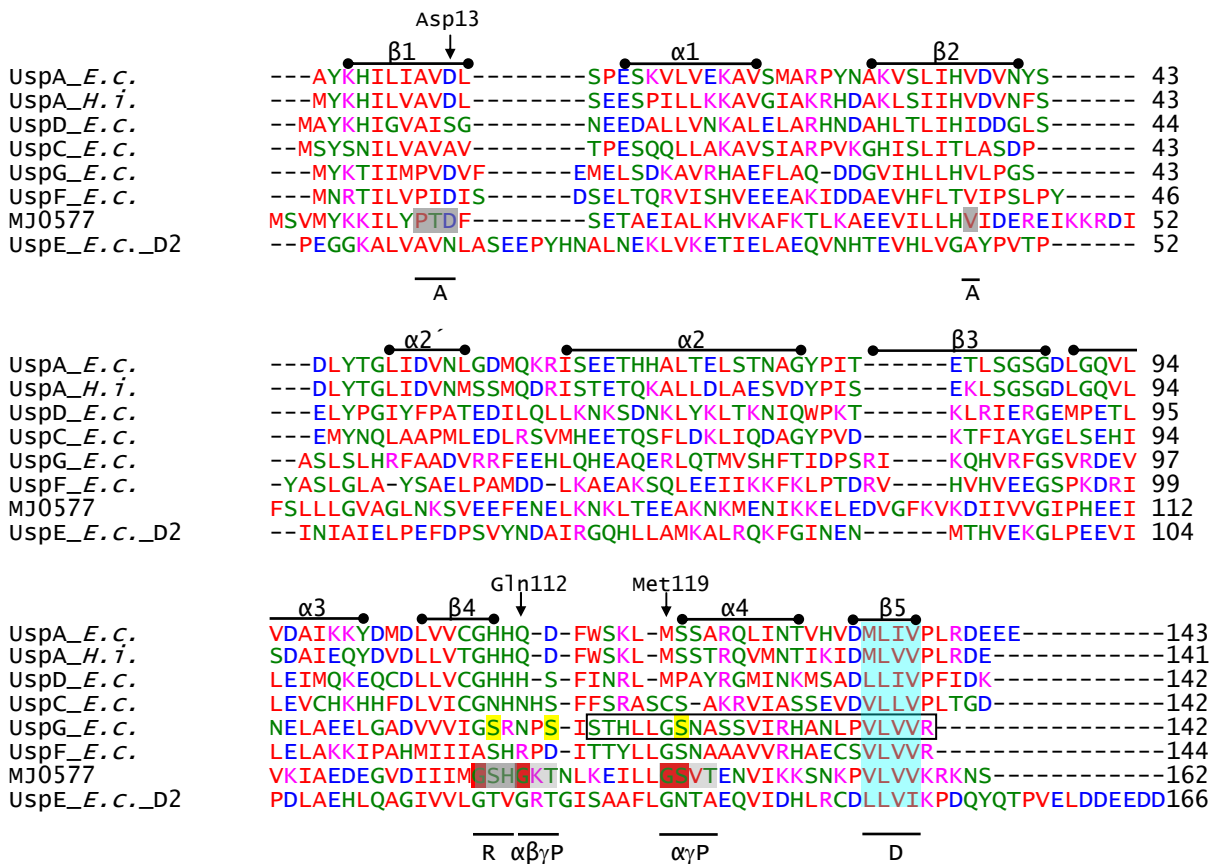


Abb. 4.2 Sequenzvergleich der 6 Usp-Proteine aus *E. coli* (*E.c.*) und den Usp-Proteinen MJ0577 aus *M. jannaschii* und UspA aus *H. influenzae* (*H.i.*). D2: zweite Domäne des „tandem-type“-Proteins von UspE. Die Bereiche der an der Nukleosidbindung beteiligten Aminosäuren in MJ0577 sind dunkelgrau hinterlegt; die beteiligten Aminosäuren, die bei der Tri-Phosphatbindung in MJ0577 von Bedeutung sind, sind hellgrau hinterlegt. A: Adenin-; R: Ribose-; P: $\alpha\beta\gamma$ -Tri-Phosphat-Bindestelle; D: Dimerisierungs-Domäne (türkis hinterlegt). Angegeben sind zudem die β -Faltblatt- und α -Helix-Bereiche in UspG, die anhand der modellierten Struktur dem SwissPDB-Viewer entnommen wurden. Gelb: Serin-Reste, die in UspG dem Modell (Abb. 4.1) zufolge, für eine potentielle Modifizierung in Frage kommen (Ser113, Ser117, Ser125). Schwarz umrandet sind die 24 C-terminal lokalisierte Aminosäuren, die in UspG(1-118) fehlen. Rot hinterlegt ist die von Sousa & McKay (2001) postulierte Consensus-Sequenz (G-2X-G-9X-G(S/T)) der Tri-Phosphatbindung. Gln112, Met119: Aminosäurereste die in UspA (*H. influenzae*) eine Bindung von ATP verhindern (siehe Text). Asp13, siehe Text. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW 1.8 durchgeführt.

Die Proteine UspA (*H. influenzae*) und MJ0577 (*M. jannaschii*) wurden als Homodimere kristallisiert (Zarembinski *et al.*, 1998, Sousa & McKay, 2001). Die Dimerisierung der beiden Usp-Monomere erfolgt dabei bei beiden Proteinen über benachbarte, gut konservierte C-terminal lokalisierte Aminosäurereste (M/VLTV; Abb. 4.2) des β 5-Faltblatts, die ebenfalls in UspG hoch konserviert sind.

Diese liegen, wie es die jeweiligen Kristallstrukturen von UspA und MJ0577 zeigen konnten, antiparallel zueinander und werden über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten (Abb. 4.1). Die Ausbildung dieser Dimere wurde für UspA aus *H. influenzae* über Gelfiltration bestätigt. Die monomere Form von UspA trat im Zuge der Gelfiltration nicht auf (Sousa & McKay, 2001). Da einige Usp-Proteine bereits zwei Usp-Domänen auf einer Polypeptidkette - wie im Falle von UspE aus *E. coli* - tragen (Gustavsson *et al.*, 2002), wird angenommen, dass die Dimerisierung der Usp-Proteine von wichtiger funktioneller Bedeutung ist (Zarembinski *et al.*, 1998). So konnte auch für gereinigtes 10His-UspG mittels nativer Gelelektrophorese die dimere Form des Proteins immunologisch nachgewiesen werden. Monomere oder höhere oligomere Formen von gereinigtem Protein waren nicht zu identifizieren. Zudem zeigte der immunologische Nachweis von 10His-UspG auf SDS-Gelen eine deutliche Proteinbande, die dimerisiertem 10His-UspG entsprach. Durch Zugabe von Glutaraldehyd konnte durch Quervernetzung der Monomere, eine deutliche Erhöhung der Menge an gebildetem Dimer von 10His-UspG *in vitro* erzielt werden. Eine vergleichende native Gelelektrophorese von 10His-UspG und von C-terminal verkürztem 10His-UspG(1-118), dem unter anderem die Dimerisierungs-Domäne fehlt (Abb. 4.2), ergab, dass letzteres nicht mehr in der Lage war Dimere auszubilden; lediglich monomeres 10His-UspG(1-118) war mittels Silber-Färbung und immunologisch nachzuweisen. Eine dimere Bande von C-terminal verkürztem 10His-UspG war weder in BL21(DE3)pLysS/pET-UspG(1-136)-Gesamtzellextrakten (Abb. 3.15), noch bei gereinigtem 10His-UspG(1-118) immunologisch nachweisbar (Abb. 3.17). Somit ist der C-terminale Bereich von UspG essentiell für die Ausbildung von Homodimeren.

Uneingeschränkt dessen zeigte sich, dass das um 24 Aminosäuren verkürzte 10His-UspG(1-118) bei Inkubation mit [γ ³²P]ATP bzw. [α ³²P]ATP radioaktiv markiert werden kann. Durch Kompetitions- und „Pulse-Chase“-Experimente mit kaltem ATP konnte gezeigt werden, dass die radioaktive Markierung nicht das Resultat einer reinen ATP Bindung darstellt, sondern auf eine Modifikation von 10His-UspG(1-118) zurückzuführen war. Die verkürzte Form zeigte somit ebenfalls wie 10His-UspG Autophosphorylierungs- und Autoadenylierungs-Aktivität. Die Markierungsgrade von 10His-UspG(1-118) waren aber im Vergleich zu 10His-UspG um ~80 reduziert. Ob nun die fehlende Dimerisierung letztendlich zu einer Reduktion des Phosphorylierungs- und Adenylierungsgrades in 10His-UspG(1-118) führt, oder ob direkte strukturelle Veränderungen in der ATP-Bindetasche für diese Reduktion verantwortlich sind, lässt sich zum jetzigen Stand der Untersuchungen nicht abschließend klären. Sicher ist jedoch, dass die Anwesenheit der gesamten Consensus-Sequenz der Tri-Phosphatbindung nicht essentiell für die Bindung von ATP ist. Vielmehr scheinen die konservierten Aminosäurereste, die bei der Bindung der Ribose und des Adenins beteiligt sind, ausreichend zu sein, um ATP binden zu können. Zudem konnte in der Kristallstruktur von MJ0577 gezeigt werden, dass der Aspartat-Rest Nr. 13 (Abb. 4.2), der in der verkürzten Form von 10His-UspG ebenfalls vorhanden ist, eine wichtige Funktion bei der Koordination des Mn²⁺-Atoms im ATP-Molekül übernimmt (Zarembinski *et al.*, 1998). Die beobachteten Enzymaktivitäten von 10His-UspG(1-118) setzten jedoch – neben einer

weitgehend intakten ATP-Bindestelle (Abb. 4.1 oben rechts) – voraus, dass potentielle Aminosäuren für die Modifizierung vorhanden sind und wie im WT-UspG zugänglich sind. Möglicherweise kommen jedoch auch andere Aminosäuren als im WT-UspG für eine Modifizierung in Frage, da nicht auszuschließen ist, dass bestimmte vorher unzugängliche Aminosäurereste durch die strukturellen Veränderungen in UspG(1-118) zugänglich werden. Die Tatsache, dass C-terminal verkürztes UspG(1-118) strukturellen Veränderungen unterliegt, wird anhand der gesteigerten Sensitivität hinsichtlich eines proteolytischen Abbaus untermauert. So führte eine Deletion der letzten 6 C-terminal lokalisierten Aminosäuren in UspG (Dimerisierungs-Domäne, Abb. 4.2) letztendlich zu einer ungewollten Abspaltung von weiteren 18 Aminosäuren im Zuge des Zellausschlusses und der anschließenden Reinigung. Dies konnte einwandfrei durch die Bestimmung des Molekulargewichts von 10His-UspG(1-118) (15,783 kDa) mittels MALDI-TOF-MS ermittelt werden. Erste strukturanalytische Untersuchungen des modellierten UspG-Proteins deuten auf eine mögliche Modifizierung der mehr oder weniger stark in den Usp-Proteinen konservierten Aminosäuren Ser113, Ser117 und/oder Ser125 in WT-UspG hin (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Die Modifizierung einer oder mehrerer dieser Reste würde mit dem beobachteten Säurestabilitätsmuster von modifiziertem 10His-UspG korrelieren. Vermutlich würde jedoch die Zugänglichkeit von Ser113 dem Modell nach größere konformative Veränderung voraussetzen, da die reaktive Seitengruppe des Serins dem ATP abgewandt ist (Abb. 4.2). Diese läge aber in unmittelbarer Nachbarschaft zur α -Phosphatgruppe des ATPs. In UspG(1-118) könnte Ser117 die Funktion des fehlenden Ser125 übernehmen, die im WT-UspG beide dem Modell zufolge bei der Bindung der β - und γ -Phosphatgruppe des ATPs beteiligt sein könnten. In wieweit diese Aminosäuren in Wirklichkeit zugänglich sind, bzw. welche Veränderungen in der Konformation für die Zugänglichkeit ablaufen müssen, ist durch die *in silico* Strukturvorhersage schwer einzuschätzen. Bei dem computergenerierten Rohmodell von UspG handelt es sich um keine energieminierte Struktur, bei der zu erwarten ist, dass entsprechende Seitengruppen in ihrer korrekten Position zueinander liegen. Das Modell kann dementsprechend nur einen groben Eindruck vermitteln, um zukünftige Experimente planen zu können.

4.4.2 Modell zur Wirkungsweise von UspG

Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht gesagt werden, ob die Abwesenheit der Dimerisierungs-Domäne oder eine direkte strukturelle Veränderung in der ATP-Bindetasche zu einer Reduktion der gemessenen Autoadenylierungs- und Autophosphorylierungs-Aktivitäten der C-terminal verkürzten Form führte. Tatsache ist jedoch, dass die Dimerisierungs-Domäne nicht essentiell für die Modifikation von UspG ist, da die C-terminal verkürzte Form von 10His-UspG Enzymaktivitäten aufwies. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Modifikation an der monomeren Form von nativem UspG erfolgt. Nach erfolgter Modifizierung könnte es zu einer Konformationsänderung kommen, die letztlich eine Dimerisierung von UspG begünstigt (Abb. 4.3). Möglicherweise spielt dabei die Nähe der ATP-Bindetasche in enger Nachbarschaft zur Dimerisierungs-Domäne eine

entscheidende Rolle. Für viele Antwortregulatoren prokaryotischer Signaltransduktionssysteme wurde bereits eine Modifizierung (Phosphorylierung) von Proteinen als Grundvoraussetzung für die anschließende Dimerisierung beschrieben (Jeon *et al.*, 2001; Fiedler & Weiss, 1995). Warum letztendlich das gesamte 10His-UspG unter nativen Bedingungen als Dimer lief, ist bis dato unklar, da auszuschließen ist, dass sämtliches 10His-UspG modifiziert vorliegt. Es ist allerdings möglich, dass hydrophobe Wechselwirkungen, die bereits auf SDS-Gelen vermutlich zur Dimerisierung von 10His-UspG führten, ebenso unter nativen Laufbedingungen auftreten. Dadurch wäre unmodifiziertes dimerisiertes UspG vom Laufverhalten nicht von der modifizierten dimerisierten Form zu unterscheiden.

Wie bereits oben diskutiert wurde, besitzt 10His-UspG *in vitro* eine geringe Enzymaktivität, was sich in einem niedrigen Adenylierungs- und Phosphorylierungsgrad äußerte. Bei der Expression von *uspG* und anschließender Auftrennung der Reinigungsfraction von 10His-UspG war eine deutlich höhere Menge an adenyliertem Protein identifiziert worden. Somit ist anzunehmen, dass UspG *in vitro* ein wichtiger Kofaktor fehlt, der einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivitäten von UspG hat. Mögliche Kandidaten wären, wie bereits oben erwähnt, das GroEL Protein, das falsch gefaltetes UspG möglicherweise in seine native und damit funktionelle Konformation überführt (Abb. 4.3). Zudem sind mögliche Interaktionen von UspG mit anderen (Usp)-Proteinen *in vivo* durchaus vorstellbar (Modulation). So zeigen bislang nicht veröffentlichte Daten von UspA aus *E. coli*, dass dieses mit Proteinkomplexen (>50 Kda) assoziiert ist (Gustavsson *et al.*, 2002, siehe oben). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass eine ganze Reihe so genannter „Hybridproteine“ eine UspFG-Domäne tragen (Kvint *et al.*, 2003). Dabei scheint auch in der N-terminalen Domäne von KdpD aus *E. coli* (KdpD₂₅₁₋₃₇₂) eine Usp-Domäne existent zu sein (Strahl, 2003). Ob KdpD und UspG (oder andere Usp-Proteine) in ihren Aktivitäten gegenseitig beeinflussbar sind, und ob diese Proteine interagieren, ist allerdings ungeklärt.

Welche exakte physiologische Funktion das UspG-Protein *in vivo* bei *E. coli* einnimmt, ist, wie für alle anderen Usp-Proteine, bislang unklar. Untersuchungen von UspA, UspC, UspD und UspE zeigten, dass alle diese Proteine koordiniert unter verschiedensten Stresssituationen (C-, N-, P-, S-Limitation, NaCl-Stress, CdCl₂-Stress, CCCP-Stress, H₂O₂ etc.) verstärkt synthetisiert werden und zudem kooperativ gegen DNA-Schäden wirken (Gustavsson *et al.*, 2002; Nyström & Neidhardt, 1992). Dabei zeigte sich, dass die Transkription der entsprechenden Gene ppGpp abhängig ist (Gustavsson *et al.*, 2002). Außerdem konnte für das *uspA*-Transkript nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von CspC und CspE zu einer Erhöhung der *uspA*-Transkriptmenge führt, indem die Halbwertszeit des *uspA*-Transkripts durch die Csp's drastisch erhöht wird (Phadtare & Inouye, 2001). Ob dies auch für die anderen *usp*-Transkripte gilt, bleibt abzuwarten.

Durch eigene phänotypische Untersuchungen einer Teildeletionsmutante von *uspG* in *E. coli* AW0607 ($\Delta uspG'::cm$) konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit des Proteins zu keiner nachweisbaren phänotypischen Veränderung im Vergleich zum Wildtyp geführt hatte. Dabei ist allerdings

anzunehmen, dass sich im Rahmen der Untersuchungen Suppressor-Mutanten gebildet haben. Grund zu dieser Annahme liegt darin begründet, dass bereits für *uspA*-Mutanten mehrfach beobachtet werden konnte, dass sich innerhalb kürzester Zeit Suppressor-Mutanten ausbilden (Nyström, persönliche Mitteilung). Dies konnte auch für eine gleichzeitig untersuchte *uspA*-Mutante von *E. coli* (TN3151) bestätigt werden. Ursache dieses Phänomens ist möglicherweise darin zu suchen, dass einige Usp-Proteine die Funktion von anderen Usp-Proteinen in *E. coli* übernehmen könnten („Backup-System“; Bochkareva *et al.*, 2002). Zudem zeigten jüngste phänotypische Untersuchungen für UspG, dass dieses verstärkt synthetisiert wird, wenn wachstumslimitierende Bedingungen vorherrschen (stationäre Phase, P-, C-Limitation, 0,1 mM CCCP, 4 mM DNP, Hitzeschock (44°C), Bochkareva *et al.*, 2002). Dabei korreliert die von Bochkareva *et al.* (2002) beschriebene verstärkte Produktion von UspG mit den hier gewonnenen Daten der Transkriptom-Analysen unter osmotischem Stress (4.1.1.3). Wie es jedoch zu der verstärkten Synthese von UspG kommt, und ob dieses auf der Ebene der Transkriptionsinitiation - zum Beispiel ppGpp-abhängig - erfolgt, oder ob Veränderungen auf der Ebene der RNA-Stabilitäten von *uspG* dafür verantwortlich sind, ist allerdings unbekannt. *uspG* scheint allerdings unter der Kontrolle des Histidinkinase/Antwortregulatorsystems NtrB/NtrC zu stehen. *E. coli*-Deletionsmutanten dieses Systems, zeigten eine verringerte Menge an *uspG*-Transkript (Oshima *et al.*, 2002). Bei einer kürzlich veröffentlichten phänotypische Untersuchung einer *E. coli* Δ *uspG*-Mutante wurde beobachtet, dass diese Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängerte Regenerationsphase nach Phosphatlimitation (20h) zeigte (Bochkareva *et al.*, 2002). Es wird daher angenommen, dass UspG in *E. coli* eine wichtige Funktion bei der Regeneration aus der stationären Phase übernimmt (Bochkareva *et al.*, 2002). Ob dabei eine kooperative Funktion mit GroEL von Bedeutung ist, ist nicht geklärt (Bochkareva *et al.*, 2002). Das abschließende, aus den gewonnenen Daten abgeleitete Modell für UspG, zeigt Abb. 4.3.

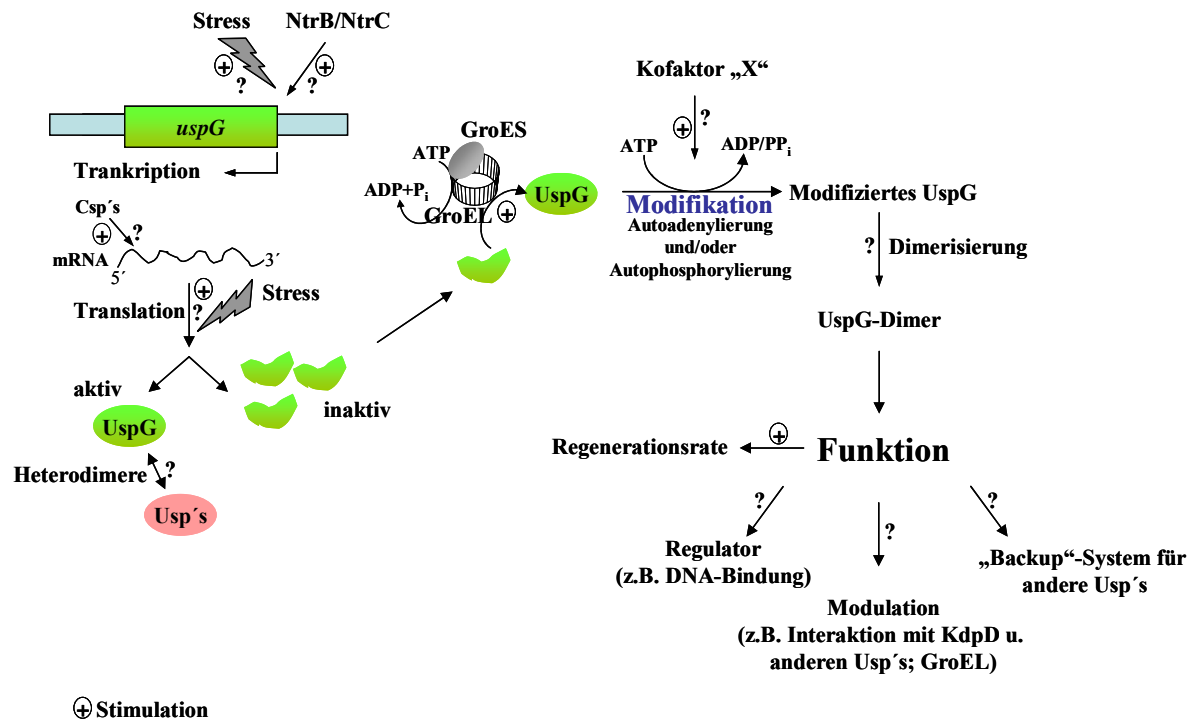


Abb. 4.3: Modell der Funktionsweise von UspG.

Denkbare, aber unbewiesene Hypothesen sind durch ein “?” gekennzeichnet.

4.5 Ausblick

mRNA-Transkripte unterliegen in *E. coli* und anderen Mikroorganismen einem hohen „turnover“, der vielfach durch eine Reihe regulatorische Komponenten beeinflusst wird. Zum jetzigen Zeitpunkt kann für eine Reihe von Genen - dies betrifft vorwiegend Gene unbekannter Funktion – anhand der globalen Transkriptom-Untersuchungen nicht abschließend beurteilt werden, ob die gemessenen Veränderungen der entsprechenden Transkriptmengen auf eine direkte Beeinflussung der Transkriptionsinitiation zurückzuführen sind, oder ob hierfür veränderte mRNA-Stabilitäten verantwortlich sind. Bis dato existieren keinerlei Genom-umfassende Untersuchungen diesbezüglich. Es wäre daher wichtig zu überprüfen, welchen Einfluss eine Inhibierung der RNA-Polymerase durch Rifampicin auf das globale Transkriptionsmuster von *E. coli* unter osmotischem Stress hat. Eine Detektion gesteigerter Transkriptmengen könnte dabei eine direkte Aussage über eine mögliche posttranskriptionale Regulation entsprechender Gene liefern und somit weitere nützliche Informationen hinsichtlich des komplexen Adaptationsprozesses in *E. coli* hervorbringen.

Zudem wäre zu untersuchen, welche Funktion die bislang unbekanntenen Gene im Zuge der Osmostress-Adaptation übernehmen. Untersuchungen entsprechender Deletionsstämme und der Einsatz der 2D-Gelelektrophorese könnten dabei ein sinnvoller Ansatz sein, um einen möglichen Einfluss dieser Gene/Proteine auf das globale Proteinmuster von *E. coli* unter osmotischem Stress zu untersuchen.

Die Ergebnisse der 2D-PAGE-Analysen machen eine weitere Identifikation der bislang nicht zugeordneten Proteine notwendig, um weitere Korrelationen zwischen den DNA-Array-Untersuchungen und den 2D-PAGE-Analysen ziehen zu können. Dabei ist insbesondere die Identifizierung der Proteine Oip1-Oip19 nötig, um eventuell neue Proteine nachzuweisen, die an der frühen Osmostress-Adaptation beteiligt sind.

Des Weiteren würden Untersuchungen von *E. coli* unter Osmostress und gleichzeitig anaeroben Bedingungen möglicherweise neue Erkenntnisse über die Osmostress-Adaptation liefern. Grund hierfür liegt darin, dass im natürlichen Habitat von *E. coli* (Darmbereich) mikroaerophile-, bzw. strikt anaerobe Bedingungen, existieren. Die gleichzeitige, bzw. hintereinandergeschaltete Applikation von verschiedenen Stressen könnte dabei näher an natürliche Bedingungen heranzuführen und bislang unbekannte Regulationsprinzipien in *E. coli* aufdecken.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu gereinigtem 10His-UspG machen weitere Untersuchungen zur Funktionsweise notwendig. Dabei deuten die beobachteten Ergebnisse darauf hin, dass das UspG-Protein in *E. coli*, Interaktionen mit weiteren bislang unbekannt Proteinen eingehen kann. Die Identifikation entsprechender Interaktionspartner von UspG könnte entweder über Koelutionsexperimente mit Streptavidin-versehenem UspG (liegt bereits vor, Daten nicht gezeigt) oder durch *in vivo*-Quervernetzungsstudien (z. B. Formaldehyd) erfolgen. Zudem wäre experimentell zu zeigen, ob UspG in der Lage ist stabile Heterodimere mit anderen Usp-Proteinen auszubilden. Untersuchungen bezüglich einer möglichen Interaktion von UspG mit KdpD, bzw. KdpD/1-395 könnte *in vitro* über Quervernetzungsstudien oder durch SPR-Studien (BIAcore) erfolgen.

Die Strukturvorhersage von modelliertem UspG sowie das Säurestabilitätsmuster von modifiziertem 10His-UspG lassen darauf schließen, dass eine Modifizierung von UspG an den Serin-Resten Ser113, Ser117 bzw. Ser125 erfolgen könnte. Dieses wäre anhand entsprechender Mutanten dieser Aminosäuren zu zeigen. Zudem könnten entsprechende Mutanten wertvolle Informationen bezüglich des Dimerisierungszustandes von UspG liefern.

Aufgrund sequenzanalytischer Vergleiche der Aminosäuresequenz von Usp-Proteinen mit eukaryotischen Transkriptionsfaktoren wird von Mushegian & Koonin (1996) angenommen, dass diese möglicherweise an DNA binden können. Bis heute existieren allerdings weder Informationen der Usp-Proteine hinsichtlich bestimmter Bindungsorte noch hinsichtlich möglicher Sequenzspezifitäten. Aus diesem Grund wurden DNA-Bindungsstudien mit gereinigtem 10His-UspG durchgeführt. Dabei konnte allerdings weder eine Bindung mit dem potentiellen regulatorischen DNA-Bereich von *uspG*, noch beim Einsatz von synthetischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten, die eine unterschiedliche Topologie einnehmen, gezeigt werden. Eine Untersuchung hinsichtlich der Bindung an andere DNA-Abschnitte erscheint allerdings trotz dieser Resultate weiterhin sinnvoll, da hier nur bestimmte DNA-Bereiche gewählt wurden. In Zukunft könnten der Einsatz der „Solid-Phase-DNA-Bindungs“-Methode

(SPDB-Methode, Roth & Messer, 1995) und der Einsatz von restringierter chromosomaler DNA bzw. Plasmiden mögliche UspG-DNA-Bindungsgebiete identifizieren.

Inwieweit die 4 bislang unbekanntes Gene (*b1957*, *b2629*, *ycaJ*, *yjbC*), das Dps-Protein und der „integration host factor“ (HimD und HimA) eine Rolle bei Prozessen unter Kaliumlimitation spielen, ist bislang unbekannt. Ebenso ist die Beteiligung der Zellteilungsproteine MinD und MinE unter Kalium-limitierenden Bedingungen nicht erforscht. In Zukunft könnten Untersuchungen zum Einfluss von KdpFABC/KdpDE auf die Expression und Funktion dieser Gene/Proteine durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Zellen müssen innerhalb kürzester Zeit Veränderungen externer Osmolaritäten wahrnehmen und entsprechend reagieren. Dabei erfordert die frühe Adaptation zum Teil kurzfristig agierende Mechanismen, durch die in der Zelle erste grundlegende regulatorische Netzwerke angesprochen werden, die eine spätere Restauration wichtiger zellphysiologischer Zustände erst ermöglichen.

Da in der Vergangenheit wenige Untersuchungen hinsichtlich des frühen Adaptationsprozesses von *E. coli* im Zuge erhöhter Osmolalitäten existierten, wurden Methoden eingesetzt, die erstmals einen Einblick in globale transkriptionale und translationale Veränderungen erlaubten:

- Im Zuge hyperosmotischer Stressbedingungen konnten durch die DNA-Microarray-Analysen für 152 Gene veränderte mRNA-Transkriptmengen in *E. coli* nachgewiesen werden. 45 Gene wiesen signifikant erhöhte und 107 Gene signifikant erniedrigte Menge an mRNA-Transkripten auf.
- Eine erhöhte Expression konnte für Gene gezeigt werden, die vornehmlich bei Zellprozessen (inkl. Adaptation und Protektion, 7 Gene) und bei Transportprozessen (5 Gene) eine Rolle spielen. Hierzu zählen Genprodukte, die Transporter (ProP, ProU) und anabolische Enzyme (OtsBA) beinhalten, die verantwortlich sind für die Akkumulation verschiedener organischer Osmolyte (Schutzsubstanzen) wie Trehalose, Glycinbetain, Prolin, Prolinbetain, Carnitin, Ectoin, etc. Neben der transkriptionalen Induktion des alternativen Sigma-Faktors σ^S konnten eine ganze Reihe weiterer Gene identifiziert werden, die unter direkter bzw. indirekter Kontrolle von σ^S stehen. Hierzu zählen das *proU*- und *otsBA*-Operon, sowie die Gene *dps*, *himD*, *osmC* und *osmY*. 33% der induzierten Gene kodieren für bis dato potentielle Regulatoren (YbgS, YegW), bzw. hypothetische, nicht-klassifizierte oder unbekannte Proteine.
- Gene, die eine reduzierte Menge an mRNA-Transkripten zeigten, sind verschiedensten funktionellen Gruppen zuzuordnen. Vornehmlich betroffen sind Gene (48%), die eine Rolle bei der Translation und posttranslationalen Modifikation (21 Gene), dem Energie-Metabolismus (18 Gene) und Aminosäure-Biosynthese/Metabolismus (12 Gene) spielen.
- Durch 2D-Analysen konnten im Zuge der frühen Osmostress-Adaptation 30 Proteine nachgewiesen werden, die eine verstärkte Proteinneusynthese aufwiesen. 11 identifizierte Proteine sind Teil des Osmostress-Stimulons, bzw. stellen Proteine sich überlappender Stimulons dar, deren Gene teilweise unter der Kontrolle von σ^S stehen. In vielen Fällen korrelierten dabei die Experimentaldaten der Transkriptom-Untersuchungen mit denen der 2D-Untersuchungen. Dies betraf die identifizierten Proteine ProX, OsmY, Dps und UspA.
- Eine Vielzahl von Proteinen wird unter hyperosmotischem Stress in ihrer Neusynthese inhibiert bzw. reduziert. Ob dabei regulatorische Elemente eine Rolle spielen, die die Translationsinitiation entsprechender Transkripte verringern, oder ob entsprechende Transkripte fehlen, ist zum jetzigen

Zeitpunkt nicht endgültig festzustellen. Letzteres trifft aber aufgrund der Macroarray-Untersuchungen zumindest für die Proteine CysK und RS1 (RpsA) zu.

- Aufgrund ausreichender Sequenzidentitäten konnte UspG anhand von Strukturinformationen des MJ0577 Proteins aus *M. jannaschii* computergestützt modelliert werden. Beide Usp-Proteine besitzen demzufolge eine hoch konservierte α/β -Struktur, wobei 5 β -Faltblätter in einer charakteristischen und hoch konservierten 3-2-1-4-5-Reihenfolge nebeneinander angeordnet sind und von je 2 α -Helices zu beiden Seiten umlagert werden.
- Das 10His-UspG konnte über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie erstmalig gereinigt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass UspG bereits während der Expression in *E. coli* modifiziert wird. Durch Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von 10His-UspG konnten diesem sowohl eine intrinsische Autoadenylierungs- als auch Autophosphorylierungs-Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Der Phosphorylierungsgrad von 10His-UspG betrug dabei 0,04%. Der Adenylierungsgrad betrug 0,02%. Einen deutlich höheren Anteil an adenyliertem Protein konnte nachgewiesenermaßen während der Expression des *uspG*-Gens in *E. coli* beobachtet werden. Der Adenylierungsgrad betrug dort ~5%. Vermutlich spielen somit weitere Kofaktoren bei der Aktivität von UspG *in vivo* eine Rolle. Ein direkter Nachweis der Adenylierung konnte erfolgreich über Piperidinbehandlung und anschließender Dünnschichtchromatographie erbracht werden. Dabei ist aufgrund der beobachteten Säurestabilitätsprofile anzunehmen, dass beide Modifizierungen über eine Phosphoester-Bindung an UspG erfolgt. Untersuchungen zur Substratspezifität von 10His-UspG ergaben, dass ATP das bevorzugte Substrat des Proteins darstellt.
- Durch Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von gereinigtem 10His-UspG konnte durch *in vitro*-Quervernetzungsstudien und nativer Gelelektrophorese gezeigt werden, dass 10His-UspG in der Lage ist, stabile Dimere auszubilden. Dabei ist, wie eine um 24 Aminosäuren verkürzte Form (10His-UspG(1-118)) von 10His-UspG zeigen konnte, die C-terminale Domäne von 10His-UspG essentiell für die Ausbildung dimerer Formen. Die C-terminale Domäne von 10His-UspG ist allerdings nicht essentiell für die Modifikation des Proteins, da 10His-UspG(1-118) sowohl Autoadenylierungs- als auch Autophosphorylierungs-Aktivität *in vitro* zeigte.
- Die Expression des *kdp*-Operons scheint innerhalb getesteter Zeitintervalle für eine Adaptation von *E. coli* unter Kalium-limitierenden Bedingungen eine zumindest dominierende Funktion zu übernehmen. Obwohl insgesamt 24 Gene veränderte Transkriptmengen zeigten, konnte durch Experimente zur Proteinneusynthese mittels 2D-PAGE lediglich eine signifikante Produktion von KdpC beobachtet werden. Globale Veränderungen der Proteinstabilitäten konnten nicht nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe. 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* 256:11905-11910.

Almirón, U., A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter. 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6:2646-2654.

Altendorf, K. and W. Epstein. 1996. The Kdp-ATPase of *Escherichia coli*, p. 403-420. In A. G. Lee (ed.), JAI Press Inc., London.

Altuvia, S., M. Almiron, G. Huisman, R. Kolter, and G. Storz. 1994. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol.Microbiol.* 13:265-272.

Amersham Biosciences. 1998. 2D Electrophoresis manual.

Arfin, S. M., A. D. Long, E. T. Ito, L. Toller, M. M. Riehle, E. S. Paegle, and G. W. Hatfield. 2000. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J.Biol.Chem.* 275:29672-29684.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. (1987, updated 1991). Current Protocols in Molecular Biology. *Green Publishing Associates and Wiley Interscience*, John Wiley and Sons, New York.

Aviv, M., H. Giladi, G. Schreiber, A. B. Oppenheim, and G. Glaser. 1994. Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, ppGpp and by autoregulation. *Mol.Microbiol.* 14:1021-1031.

Azam, T. A. and A. Ishihama. 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem.* 274:33105-33113.

Bachmann, B. J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* 54:130-197.

Barbosa, T. M. and S. B. Levy. 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J.Bacteriol.* 182:3467-3474.

Barron, A., G. May, E. Bremer, and M. Villarejo. 1986. Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 167:433-438.

Bateman, A., E. Birney, R. Durbin, S. R. Eddy, K. L. Howe, and E. L. Sonnhammer. 2000. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 28:263-266.

Baum, E. Z., D. A. Montenegro, L. Licata, I. Turchi, G. C. Webb, B. D. Folen, and K. Bush. 2001. Identification and characterization of new inhibitors of the *Escherichia coli* MurA enzyme. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45:3182-3188.

Bearson, S. M., W. H. Benjamin, Jr., W. E. Swords, and J. W. Foster. 1996. Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178:2572-2579.

Bernhardt, J., K. Buttner, C. Scharf, and M. Hecker. 1999. Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 20:2225-2240.

- Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 99:9697-9702.
- Bianchi, A. A. and F. Baneyx.** 1999. Hyperosmotic shock induces the *sigma32* and *sigmaE* stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* 34:1029-1038.
- BioRad** 1999. A guide to native PAGE
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier, and W. Postel.** 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys.Methods* 6:317-339.
- Bjellqvist, B., G. J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J. C. Sanchez, S. Frutiger, and D. Hochstrasser.** 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.
- Blaho, J. A. and B. Roizman.** 1991. ICP4, the major regulatory protein of *herpes simplex* virus, shares features common to GTP-binding proteins and is adenylated and guanylated. *J Virol.* 65:3759-3769.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Blum, H., H. Beier, and H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Bochkareva, E. S., A. S. Girshovich, and E. Bibi.** 2002. Identification and characterization of the *Escherichia coli* stress protein UP12, a putative in vivo substrate of GroEL. *Eur.J Biochem* 269:3032-3040.
- Boni, I. V., V. S. Artamonova, N. V. Tzareva, and M. Dreyfus.** 2001. Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J* 20:4222-4232.
- Boos, W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, and P. Postma.** 1990. Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172:3450-3461.
- Booth, I. R.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* 49:359-378.
- Bossemeyer, D., A. Schlosser, and E. P. Bakker.** 1989. Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. *J Bacteriol* 171:2219-2221.
- Botsford, J. L.** 1990. Analysis of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 60:355-360.
- Bourret, R. B., K. A. Borkovich, and M. I. Simon.** 1991. - Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. - *Annu Rev Biochem* 1991;60:401-41. -Annu.
- Bouvier, J., S. Gordia, G. Kampmann, R. Lange, R. Hengge-Aronis, and C. Gutierrez.** 1998. Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, Lrp and H-NS on transcription of the gene *osmC*. *Mol.Microbiol.* 28:971-980.
- 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.

- Bradley, M. K., J. Hudson, M. S. Villanueva, and D. M. Livingston.** 1984. Specific in vitro adenylation of the simian virus 40 large tumor antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 81:6574-6578.
- Bremer, E. and R. Krämer.** 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, p. 79-97. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Brown, E. D., E. I. Vivas, C. T. Walsh, and R. Kolter.** 1995. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:4194-4197.
- Bukau, B. and A. L. Horwich.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
- Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J.Mol.Biol.* 104:541-555.
- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez, and D. Vinella.** 1996. The stringent response, p. 1458-1496. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Cha, M. K., H. K. Kim, and I. H. Kim.** 1995. Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 270:28635-28641.
- Cheung, K. J., V. Badarinarayana, D. W. Selinger, D. Janse, and G. M. Church.** 2003. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Res.* 13:206-215.
- Chuang, S. E., D. L. Daniels, and F. R. Blattner.** 1993. Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 175:2026-2036.
- Clark, D. and J. Parker.** 1984. Proteins induced by high osmotic pressure in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 25:81-83.
- Conter, A., C. Gangneux, M. Suzanne, and C. Gutierrez.** 2001. Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Res.Microbiol.* 152:17-26.
- Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol.Rev.* 53:121-147.
- Csonka, L. N. and W. Epstein.** 1996. Osmoregulation, p. 1210-1223. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Csonka, L. N. and A. D. Hanson.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu.Rev.Microbiol.* 45:569-606.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 97:6640-6645.
- Delamarche, C., D. Thomas, J. P. Rolland, A. Froger, J. Gouranton, M. Svelto, P. Agre, and G. Calamita.** 1999. Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J Bacteriol* 181:4193-4197.

- DeLisa, M. P., C. F. Wu, L. Wang, J. J. Valdes, and W. E. Bentley.** 2001. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 183:5239-5247.
- Dennis, P. P. and L. C. Shimmin.** 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:90-104.
- Diez, A., N. Gustavsson, and T. Nyström.** 2000. The universal stress protein A of *Escherichia coli* is required for resistance to DNA damaging agents and is regulated by a RecA/FtsK-dependent regulatory pathway. *Mol Microbiol* 36:1494-1503.
- Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid, and E. P. Bakker.** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch.Microbiol.* 150:348-357.
- Dosch, D. C., G. L. Helmer, S. H. Sutton, F. F. Salvacion, and W. Epstein.** 1991. Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: evidence for three constitutive systems mediating uptake potassium. *J.Bacteriol.* 173:687-696.
- Dubrac, S. and D. Touati.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* 182:3802-3808.
- Echols, H., A. Garen, S. Garen, and A. Torriani.** 1961. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *J Mol Biol* 3:425-438.
- Elcock, A. H. and J. A. McCammon.** 1998. Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J Mol Biol* 280:731-748.
- Epstein, W.** 1985. The Kdp-system: A bacterial K⁺-transport ATPase. *Curr.Top.Membr.Transp.* 23:153-175.
- Epstein, W. and B. S. Kim.** 1971. Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* 108:639-644.
- Epstein, W. and S. G. Schultz.** 1965. Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content. *J.Gen.Physiol.* 49:221-234.
- Farewell, A., A. A. Diez, C. C. DiRusso, and T. Nyström.** 1996. Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of the *uspA*, *fad*, and *fab* genes. *J Bacteriol* 178:6443-6450.
- Ferro-Luzzi, A. G. and K. Nikaido.** 1981. Phosphate-containing proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Analysis by a new two-dimensional gel system. *Eur.J Biochem* 115:525-531.
- Fiedler, U. and V. Weiss.** 1995. A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J* 14:3696-3705.
- Fisher, M. A., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick.** 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* 184:4025-4032.
- Forst, S. A., J. Delgado, and M. Inouye.** 1989. DNA-binding properties of the transcription activator (OmpR) for the upstream sequences of *ompF* in *Escherichia coli* are altered by *envZ* mutations and medium osmolarity. *J.Bacteriol.* 171:2949-2955.
- Freestone, P., T. Nyström, M. Trinei, and V. Norris.** 1997. The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *J.Mol.Biol.* 274:318-324.

- Freestone, P., M. Trinei, S. C. Clarke, T. Nyström, and V. Norris.** 1998. Tyrosine phosphorylation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 279:1045-1051.
- Gaßel, M.** 1999. Charakterisierung, Reinigung und Rekonstitution des Kdp-Komplexes aus *Escherichia coli* unter besonderer Berücksichtigung der Untereinheiten KdpC und KdpF sowie Untersuchungen zur Identifikation der Plekomakrolidbindestelle von P- und V-ATPasen. *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Gaßel, M., T. Möllenkamp, W. Puppe, and K. Altendorf.** 1999. The KdpF subunit is part of the K(+)-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro. *J Biol Chem.* 274:37901-37907.
- Gaßel, M., A. Siebers, W. Epstein, and K. Altendorf.** 1998. Assembly of the Kdp complex, the multi-subunit K⁺-transport ATPase of *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys.Acta* 1415:77-84.
- Gausing, K.** 1977. Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J Mol Biol* 115:335-354.
- Gowrishankar, J.** 1985. Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J.Bacteriol.* 164:434-445.
- Gowrishankar, J.** 1986. *proP*-mediated proline transport also plays a role in *Escherichia coli* osmoregulation. *J.Bacteriol.* 166:331-333.
- Gowrishankar, J. and D. Manna.** 1996. How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. *Genetica* 97:363-378.
- Gross, C. A.** 1996. Function and regulation of the heat shock proteins, p. 1382-1399. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Grothe, S., R. L. Krogsrud, D. J. McClellan, J. L. Milner, and J. M. Wood.** 1986. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* 166:253-259.
- Grunberg-Manago, M.** 1996. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors, p. 1432-1457. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
- Gustavsson, N., A. Diez, and T. Nyström.** 2002. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Mol.Microbiol.* 43:107-117.
- Gutierrez, C., M. Ardourel, E. Bremer, A. Middendorf, W. Boos, and U. Ehmman.** 1989. Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen.Genet.* 217:347-354.
- Gutierrez, C., J. Barondess, C. Manoil, and J. Beckwith.** 1987. The use of transposon TnphoA to detect genes for cell envelope proteins subject to a common regulatory stimulus. Analysis of osmotically regulated genes in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 195:289-297.
- Gutierrez, C. and J. C. Devedjian.** 1991. Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12. *J.Mol.Biol.* 220:959-973.
- Harlocker, S. L., L. Bergstrom, and M. Inouye.** 1995. Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 270:26849-26856.

- Harshman, R. B. and H. Yamazaki.** 1972. MSI accumulation induced by sodium chloride. *Biochemistry* 11:615-618.
- Hasemeier, B.** 1999. Zur Natur des Reizes für die Sensorkinase KdpD aus *Escherichia coli*. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Head, C. G., A. Tardy, and L. J. Kenney.** 1998. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. *J.Mol.Biol.* 281:857-870.
- Hecker, M., C. Heim, U. Völker, and L. Wolfel.** 1988. Induction of stress proteins by sodium chloride treatment in *Bacillus subtilis*. *Arch.Microbiol* 150:564-566.
- Hecker, M., W. Schumann, and U. Völker.** 1996. - Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. - *Mol Microbiol* 1996 Feb;19(3):417-28. :417-28.:28.
- Hecker, M. and U. Völker.** 1998. - Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the *sigmaB* regulon. - *Mol Microbiol* 1998 Sep;29(5):1129-36. :1129-36.:36.
- Hengge-Aronis, R.** 1996a. 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.
- Hengge-Aronis, R.** 1996b. Regulation of gene expression during entry into stationary phase, p. 1497-1512. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
- Hengge-Aronis, R.** 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Microbiol* 2:148-152.
- Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:373-95, table.
- 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.* 173:7918-7924.
- 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.
- Hesse, J. E., L. Wiczorek, K. Altendorf, A. S. Reicin, E. Dorus, and W. Epstein.** 1984. Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 81:4746-4750.
- Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 52:569-584.
- Hoff, K. G., J. R. Cupp-Vickery, and L. E. Vickery.** 2003. Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J Biol Chem.*
- Hogema, B. M., J. C. Arents, R. Bader, K. Eijkemans, H. Yoshida, H. Takahashi, H. Aiba, and P. W. Postma.** 1998. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Mol Microbiol* 30:487-498.

- Hsieh, L. S., J. Rouviere-Yaniv, and K. Drlica.** 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J Bacteriol* 173:3914-3917.
- Huang, K., J. M. Louis, L. Donaldson, F. L. Lim, A. D. Sharrocks, and G. M. Clore.** 2000. Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors. *EMBO J* 19:2615-2628.
- Izutsu, K., C. Wada, Y. Komine, T. Sako, C. Ueguchi, S. Nakura, and A. Wada.** 2001. *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *J.Bacteriol.* 183:2765-2773.
- Jenkins, D. E., S. A. Chaisson, and A. Matin.** 1990. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 172:2779-2781.
- Jenkins, D. E., J. E. Schultz, and A. Matin.** 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ Challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:3910-3914.
- Jeon, Y., Y. S. Lee, J. S. Han, J. B. Kim, and D. S. Hwang.** 2001. Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem.* 276:40873-40879.
- Jiang, P., J. A. Peliska, and A. J. Ninfa.** 2000. Asymmetry in the autophosphorylation of the two-component regulatory system transmitter protein nitrogen regulator II of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 39:5057-5065.
- Jovanovich, S. B., M. Martinell, M. T. Record, Jr., and R. R. Burgess.** 1988. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* 170:534-539.
- Jung, K., K. Hamann, and A. Revermann.** 2001a. K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 276:40896-40902.
- Jung, K., M. Krabusch, and K. Altendorf.** 2001b. Cs(+) Induces the *kdp* Operon of *Escherichia coli* by Lowering the Intracellular K(+) Concentration. *J.Bacteriol.* 183:3800-3803.
- Kang, W. K., T. Icho, S. Isono, M. Kitakawa, and K. Isono.** 1989. Characterization of the gene *rimK* responsible for the addition of glutamic acid residues to the C-terminus of ribosomal protein S6 in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen.Genet.* 217:281-288.
- Kaushik, J. K. and R. Bhat.** 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer?: An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem.* 278:26458-26465.
- Keener, J. and M. Nomura.** 1996. Regulation of ribosome synthesis, p. 1417-1431. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
- 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.
- Kennedy, S. P., W. V. Ng, S. L. Salzberg, L. Hood, and S. DasSarma.** 2001. Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.* 11:1641-1650.
- Kiley, P. J. and H. Beinert.** 1998. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* 22:341-352.

- Kirkpatrick, C., L. M. Maurer, N. E. Oyelakin, Y. N. Yoncheva, R. Maurer, and J. L. Slonczewski.** 2001. Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 183:6466-6477.
- Kolter, R., D. A. Siegele, and A. Tormo.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47:855-874.
- Koo, S. P., C. F. Higgins, and I. R. Booth.** 1991. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J Gen.Microbiol* 137 (Pt 11):2617-2625.
- Kusano, S., Q. Ding, N. Fujita, and A. Ishihama.** 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J Biol Chem.* 271:1998-2004.
- Kvint, K., A. Farewell, and T. Nyström.** 2000a. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigmaS. *J.Biol.Chem.* %19;275:14795-14798.
- Kvint, K., C. Hosbond, A. Farewell, O. Nybroe, and T. Nyström.** 2000b. Emergency derepression: stringency allows RNA polymerase to override negative control by an active repressor. *Mol Microbiol* 35:435-443.
- Kvint, K., L. Nachin, A. Diez, and T. Nyström.** 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr.Opin.Microbiol* 6:140-145.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157:105-132.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laimins, L. A., D. B. Rhoads, and W. Epstein.** 1981. Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78:464-468.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis.** 1994. The cellular concentration of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8:1600-1612.
- Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky, and R. Sparling.** 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can.J Microbiol* 44:707-717.
- Lomovskaya, O. L., J. P. Kidwell, and A. Matin.** 1994. Characterization of the sigma-38-dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB*. *J.Bacteriol.* 176:3928-3935.
- Lucht, J. M., P. Dersch, B. Kempf, and E. Bremer.** 1994. Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 269:6578.
- MacMillan, S. V., D. A. Alexander, D. E. Culham, H. J. Kunte, E. V. Marshall, D. Rochon, and J. M. Wood.** 1999. The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys.Acta* 1420:30-44.
- Mager, W. H. and J. C. Varela.** 1993. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol Microbiol* 10:253-258.

- Manna, D. and J. Gowrishankar.** 1994. Evidence for involvement of proteins HU and RpoS in transcription of the osmoreponsive *proU* operon in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 176:5378-5384.
- Martinez, A. and R. Kolter.** 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J.Bacteriol.* 179:5188-5194.
- 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* 1991 Jul;173(13):4188-94. :4188-94.:4188-94.:94.
- McLaggan, D., J. Naprstek, E. T. Buurman, and W. Epstein.** 1994. Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 269:1911-1917.
- Mellies, J., R. Brems, and M. Villarejo.** 1994. The *Escherichia coli proU* promoter element and its contribution to osmotically signaled transcription activation. *J.Bacteriol.* 176:3638-3645.
- Mellies, J., A. Wise, and M. Villarejo.** 1995. Two different *Escherichia coli proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J.Bacteriol.* 177:144-151.
- Meury, J.** 1994. Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock. *FEMS Microbiol.Lett.* 121:281-286.
- Meury, J., A. Robin, and P. Monnier-Champeix.** 1985. Turgor-controlled K⁺ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 151:613-619.
- Michán, C., M. Manchado, G. Dorado, and C. Pueyo.** 1999. In vivo transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J.Bacteriol.* 181:2759-2764.
- Milner, J. L., S. Grothe, and J. M. Wood.** 1988. Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. *J.Biol.Chem.* 263:14900-14905.
- Mizuno, T. and S. Mizushima.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol.Microbiol.* 4:1077-1082.
- Muffler, A., M. Barth, C. Marschall, and R. Hengge-Aronis.** 1997. Heat shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:445-452.
- Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange, and R. Hengge-Aronis.** 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 178:1607-1613.
- Mushegian, A. R. and E. V. Koonin.** 1996. Sequence analysis of eukaryotic developmental proteins: ancient and novel domains. *Genetics* 144:817-828.
- Neidhardt, F. C., P. L. Bloch, and D. F. Smith.** 1974. Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* 119:736-747.
- Nikaido, H.** 1996. Outer Membrane, p. 29-47. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Nikaido, H. and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol.Rev.* 49:1-32.

- Norris, V. and B. Manners.** 1993. Deformations in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* direct the synthesis of peptidoglycan. The hernia model. *Biophys.J* 64:1691-1700.
- Nyström, T. and F. C. Neidhardt.** 1992. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6:3187-3198.
- Nyström, T. and F. C. Neidhardt.** 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol.Microbiol.* 11:537-544.
- Nyström, T. and F. C. Neidhardt.** 1996. Effects of overproducing the universal stress protein, UspA, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 178:927-930.
- Oda, Y., M. D. Kuo, S. S. Huang, and J. S. Huang.** 1993. The major acidic fibroblast growth factor (aFGF)-stimulated phosphoprotein from bovine liver plasma membranes has aFGF-stimulated kinase, autoadenylation, and alkaline nucleotide phosphodiesterase activities. *J Biol Chem.* 268:27318-27326.
- Ohwada, T. and S. Sagisaka.** 1987. An immediate and steep increase in ATP concentration in response to reduced turgor pressure in *Escherichia coli* B. *Arch.Biochem.Biophys.* 259:157-163.
- Oren, A.** 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:334-348.
- Ornstein, L. and B. J. Davis.** 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 121:321-349.
- Oshima, T., H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, B. L. Wanner, H. Mori, and T. Mizuno.** 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 46:281-291.
- O'Toole, R., M. J. Smeulders, M. C. Blokpoel, E. J. Kay, K. Lougheed, and H. D. Williams.** 2003. A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 185:1543-1554.
- Parkinson, J. S.** 1993. - Signal transduction schemes of bacteria. - *Cell* 1993 Jun 4;73(5):857-71. :857-71.:71.
- Parkinson, J. S. and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu.Rev.Genet.* 26:71-112.
- Pasquali, C., S. Frutiger, M. R. Wilkins, G. J. Hughes, R. D. Appel, A. Bairoch, D. Schaller, J. C. Sanchez, and D. F. Hochstrasser.** 1996. Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates: the *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* 17:547-555.
- Pellegrini, L., S. Tan, and T. J. Richmond.** 1995. Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376:490-498.
- Phadtare, S. and M. Inouye.** 1999. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33:1004-1014.
- Phadtare, S. and M. Inouye.** 2001. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 183:1205-1214.
- Pieper, U., G. Kapadia, M. Mevarech, and O. Herzberg.** 1998. Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure.* 6:75-88.

- Polarek, J. W., G. Williams, and W. Epstein.** 1992. The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 174:2145-2151.
- Pratt, L. A. and T. J. Silhavy.** 1995. Porin regulation of *Escherichia coli*, p. 105-127. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (eds.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
- Promega.** 1994. Technical manual: Altered sites II in vitro mutagenesis systems.
- Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi.** 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18:307-316.
- Racher, K. I., R. T. Voegelé, E. V. Marshall, D. E. Culham, J. M. Wood, H. Jung, M. Bacon, M. T. Cairns, S. M. Ferguson, W. J. Liang, P. J. Henderson, G. White, and F. R. Hallett.** 1999. Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* 38:1676-1684.
- Ramirez, R. M., W. S. Prince, E. Bremer, and M. Villarejo.** 1989. In vitro reconstitution of osmoregulated expression of *proU* of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 86:1153-1157.
- Randerath, K. and E. Randerath.** 1965. Ion-exchange thin-layer chromatography. XIV. Separation of nucleotide sugars and nucleoside monophosphates on PEI-cellulose. *Anal.Biochem* 13:575-579.
- Record, M. T. J., E. S. Courtenay, D. S. Cayley, and H. J. Guttman.** 1998. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends.Biochem.Sci.* 23:143-148.
- Reitzer, L.J.** 1996. Biosynthesis of amino acids and nucleotides: Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine, p. 391-407. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Rhoads, D. B. and W. Epstein.** 1978. Cation transport in *Escherichia coli*. IX. Regulation of K transport. *J.Gen.Physiol* 72:283-295.
- Rhoads, D. B., L. Laimins, and W. Epstein.** 1978. Functional organization of the *kdp* genes of *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.* 135:445-452.
- Rhoads, D. B., F. B. Waters, and W. Epstein.** 1976. Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J.Gen.Physiol* 67:325-341.
- Riley, M.** 1998. Genes and proteins of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 26:54.
- Rimmele, M. and W. Boos.** 1994. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:5654-5664.
- Roth, A. and W. Messer.** 1995. The DNA binding domain of the initiator protein DnaA. *EMBO J* 14:2106-2111.
- Rübenhagen, R., H. Ronsch, H. Jung, R. Kramer, and S. Morbach.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J.Biol.Chem.* 275:735-741.
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.

- Salgado, H., A. Santos-Zavaleta, S. Gama-Castro, D. Millan-Zarate, E. Diaz-Peredo, F. Sanchez-Solano, E. Perez-Rueda, C. Bonavides-Martinez, and J. Collado-Vides.** 2001. RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 29:72-74.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 74:5463-5467.
- Saveanu, C., S. Miron, T. Borza, C. T. Craescu, G. Labesse, C. Gagy, A. Popescu, F. Schaeffer, A. Namane, C. Laurent-Winter, O. Barzu, and A. M. Gilles.** 2002. Structural and nucleotide-binding properties of YajQ and YnaF, two *Escherichia coli* proteins of unknown function. *Protein Sci* 11:2551-2560.
- Schiller, D., D. Kruse, H. Kneifel, R. Kramer, and A. Burkovski.** 2000. Polyamine transport and role of *potE* in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 182:6247-6249.
- Schlösser, A., A. Hamann, M. Schleyer, and E. P. Bakker.** 1992. The K⁺-uptake systems TrkG and TrkH from *Escherichia coli*: A pair of unusual transport systems involved in osmoregulation, p. 51-58. In F. Palmieri and E. Quagliariello (eds.), Molecular mechanism of transport. Elsevier, Amsterdam.
- Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, and C. Rosenow.** 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* 13:216-223.
- Shapiro, B. M. and E. R. Stadtman.** 1968. 5'-adenylyl-O-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 243:3769-3771.
- Siebers, A.** 1988. Kalium-Transport bei *Escherichia coli*. Funktionelle, immunologische und topographische Untersuchungen der Kdp-ATPase. *Dissertation*, Universität Osnabrück.
- Siebers, A. and K. Altendorf.** 1988. The K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*. Purification, enzymatic properties and production of complex- and subunit-specific antisera. *Eur.J.Biochem.* 178:131-140.
- Siebers, A. and K. Altendorf.** 1989. Characterization of the phosphorylated intermediate of the K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 264:5831-5838.
- Siebers, A. and K. Altendorf.** 1993. K⁺-translocating Kdp-ATPases and other bacterial P-type ATPases, p. 225-252. In E. P. Bakker (ed.), Alkali cation transport systems in prokaryotes. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Sousa, M. C. and D. B. McKay.** 2001. Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure.(Camb.)* 9:1135-1141.
- Stancik, L. M., D. M. Stancik, B. Schmidt, D. M. Barnhart, Y. N. Yoncheva, and J. L. Slonczewski.** 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:4246-4258.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69:183-215.
- Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. - Signal transduction in bacteria. - *Nature* 1990 Mar 29;344(6265):395-400. :395-400.:400.

- Strahl, H.** 2003. Klonierung und Charakterisierung des *kdp*-Operons aus *Halobacterium salinarum*. *Diplomarbeit*, Universität Osnabrück.
- Strausak, D. and M. Solioz.** 1997. CopY is a copper-inducible repressor of the *Enterococcus hirae* copper ATPases. *J Biol Chem.* 272:8932-8936.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.
- Stumpe, S., A. Schlösser, M. Schleyer, and E. P. Bakker.** 1996. K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺ uptake systems, p. 473-499. In W. N. Konings, H. R. Kaback, and J. S. Lolkema (eds.), *Handbook of Biological Physics*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Svitil, A. L., M. Cashel, and J. W. Zyskind.** 1993. Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 268:2307-2311.
- Takahashi, H., T. Inada, P. Postma, and H. Aiba.** 1998. CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA^{Glc}, the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol Gen.Genet.* 259:317-326.
- Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner, and T. Conway.** 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J.Bacteriol.* 181:6425-6440.
- Tjian, R. and A. Robbins.** 1979. Enzymatic activities associated with a purified simian virus 40 T antigen-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 76:610-614.
- Tonella, L., C. Hoogland, P. A. Binz, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, and J. C. Sanchez.** 2001. New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics.* 1:409-423.
- Tonella, L., B. J. Walsh, J. C. Sanchez, K. Ou, M. R. Wilkins, M. Tyler, S. Frutiger, A. A. Gooley, I. Pescaru, R. D. Appel, J. X. Yan, A. Bairoch, C. Hoogland, F. S. Morch, G. J. Hughes, K. L. Williams, and D. F. Hochstrasser.** 1998. '98 *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database update. *Electrophoresis* 19:1960-1971.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, and G. Chu.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:5116-5121.
- Ueguchi, C. and T. Mizuno.** 1993. The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor. *EMBO J* 12:1039-1046.
- VanBogelen, R. A., P. M. Kelley, and F. C. Neidhardt.** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:26-32.
- Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:504-544.
- Vogt, J. and G. E. Schulz.** 1999. The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure.Fold.Des* 7:1301-1309.
- Volckaert, G. and W. Fiers.** 1977. A micromethod for base analysis of ³²P-labeled oligoribonucleotides. *Anal.Biochem* 83:222-227.

- Walderhaug, M. O., J. W. Polarek, P. Voelkner, J. M. Daniel, J. E. Hesse, K. Altendorf, and W. Epstein.** 1992. KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J.Bacteriol.* 174:2152-2159.
- Weber, A. and K. Jung.** 2002. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J Bacteriol* 184:5502-5507.
- Weber, K. and M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 244:4406-4412.
- Weichart, D., R. Lange, N. Henneberg, and R. Hengge-Aronis.** 1993. Identification and characterization of stationary phase-inducible genes in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* 10:407-420.
- West, A. H. and A. M. Stock.** 2001. - Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. - *Trends Biochem Sci* 2001 Jun;26(6):369-76. :369-76.:76.
- Whatmore, A. M., J. A. Chudek, and R. H. Reed.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen.Microbiol* 136:2527-2535.
- Wood, J. M.** 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63:230-262.
- Wood, Z. A., L. B. Poole, and P. A. Karplus.** 2001. Structure of intact AhpF reveals a mirrored thioredoxin-like active site and implies large domain rotations during catalysis. *Biochemistry* 40:3900-3911.
- Xu, J. and R. C. Johnson.** 1997. Activation of RpoS-dependent *proP* P2 transcription by the Fis protein in vitro. *J Mol Biol* 270:346-359.
- Xu, Y., R. J. Heath, Z. Li, C. O. Rock, and S. W. White.** 2001. The FadR.DNA complex. Transcriptional control of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276:17373-17379.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Yim, H. H. and M. Villarejo.** 1992. *osmY*, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 174:3637-3644.
- Yura, T., H. Nagai, and H. Mori.** 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321-350.
- Zarembinski, T. I., L. W. Hung, H. J. Mueller-Dieckmann, K. K. Kim, H. Yokota, R. Kim, and S. H. Kim.** 1998. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:15189-15193.
- Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone, and N. D. Chasteen.** 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 277:27689-27696.
- Zhou, H. and J. Lutkenhaus.** 2003. Membrane binding by MinD involves insertion of hydrophobic residues within the C-terminal amphipathic helix into the bilayer. *J Bacteriol* 185:4326-4335.
- Zimmann, P.** 1995. Molekulare Analyse des Regulationsproteins KdpD des Kdp-Systems von *Escherichia coli*. *Dissertation*, Universität Osnabrück.

Anhang

Tab. I: Liste der induzierten und reprimierten Gene unter hyperosmotischem Stress.

Gene (<i>i</i>)	Genprodukte ^a	Mittelwerte ^b		S.D. ^c		Induktions-Faktor ^d		„SAM“-Wert <i>d(i)</i> ^e
		Kontrolle	Experiment	Kontrolle	Experiment	NaCl	Sorbitol	
Erhöhte Expression								
<i>aceK</i>	Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	3,67E-02	5,51E-02	5,18E-03	2,80E-03	1,6/1,4	1,3/1,4	4
<i>arp</i>	Regulator of acetyl CoA synthetase	4,19E-02	6,21E-02	6,07E-03	3,23E-03	1,6/1,4	1,3/1,5	4
<i>bax</i>	Putative ATP-binding protein	6,61E-03	9,12E-03	2,23E-04	1,49E-04	1,4/1,4	1,7/1,8	10
<i>copA</i>	Cu(I)-translocating P-type ATPase	3,63E-03	5,60E-03	4,46E-04	3,05E-04	1,5/1,6	1,2/1,5	5
<i>crr</i>	PTS system, glucose-specific IIA component	1,42E-02	2,11E-02	1,25E-04	1,52E-03	1,4/1,6	1,3/1,4	6
<i>cynT</i>	Cyanate permease	1,48E-02	2,13E-02	5,34E-04	2,27E-03	1,4/1,6	1,3/1,5	4
<i>dfp</i>	Flavoprotein affecting synthesis of DNA and pantothenate metabolism	1,24E-02	1,71E-02	9,02E-04	6,54E-04	1,4/1,4	1,2/1,4	6
<i>div</i>	Div protein	7,20E-03	9,72E-03	6,11E-04	1,09E-04	1,4/1,4	1,3/1,4	5
<i>dps</i>	DNA protection during starvation protein	4,21E-03	7,49E-03	1,49E-04	1,72E-04	1,8/1,8	1,4/1,5	16
<i>himD</i>	Integration host factor beta-subunit (IHF-beta)	6,57E-03	1,02E-02	9,81E-04	3,53E-04	1,8/1,4	1,3/1,4	5
<i>leuC</i>	3-Isopropylmalate dehydratase	1,80E-02	2,64E-02	5,06E-04	2,12E-03	1,4/1,5	1,3/1,3	5
<i>lpxA</i>	Acyl-[acyl-carrier-protein]:UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	9,03E-03	1,29E-02	1,28E-03	1,78E-04	1,6/1,4	1,4/1,4	4
<i>metC</i>	Beta-cystathionase	1,12E-02	1,78E-02	1,10E-03	8,29E-04	1,6/1,5	1,4/1,3	6
<i>metF</i>	5,10 Methylene tetrahydrofolate reductase	9,11E-03	1,43E-02	7,71E-04	1,63E-03	1,6/1,5	1,5/1,6	4
<i>moaC</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C	6,88E-03	9,76E-03	4,86E-04	6,06E-04	1,4/1,4	1,3/1,4	5
<i>moeA</i>	Molybdopterin biosynthesis MoeA protein	6,45E-02	8,83E-02	2,78E-03	3,73E-03	1,4/1,4	1,3/1,5	7
<i>osmC</i>	Osmotically inducible protein	4,19E-03	5,78E-03	1,85E-05	1,28E-04	1,4/1,4	1,7/1,7	11
<i>osmY</i>	Periplasmic protein	5,51E-03	1,60E-02	2,44E-04	4,61E-04	2,8/3,1	5,5/5,8	25
<i>otsA</i>	Alpha trehalose phosphate synthase	5,66E-03	8,36E-03	6,20E-05	4,68E-04	1,5/1,4	1,4/1,4	7
<i>otsB</i>	Trehalose phosphatase	4,58E-03	6,42E-03	9,65E-05	2,18E-04	1,4/1,5	1,4/1,5	8
<i>proP</i>	Proline/betaine transporter (proline porter II)	1,46E-02	2,37E-02	4,13E-04	1,91E-03	1,7/1,6	1,7/2,1	6

Fortsetzung Tab. I

<i>proV</i>	Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein ProV	1,88E-02	4,12E-02	6,61E-03	1,98E-03	1,7/2,4	4,0,4,8	5
<i>proW</i>	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein P	2,37E-02	4,12E-02	3,79E-04	1,20E-03	1,7/1,8	2,0/2,1	19
<i>proX</i>	Glycine betaine-binding periplasmic protein precursor	6,25E-03	2,27E-02	6,48E-04	7,92E-04	3,8/3,5	3,6/3,8	21
<i>ribE</i>	Riboflavin synthase alpha chain	1,81E-02	2,53E-02	1,25E-03	1,84E-04	1,5/1,4	1,2/1,5	8
<i>mt</i>	Ribonuclease T	1,29E-02	1,83E-02	1,09E-04	1,30E-03	1,5/1,4	1,3/1,4	6
<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma subunit RpoS (sigma-38)	1,15E-02	1,58E-02	4,55E-05	5,39E-05	1,4/1,4	1,6/1,7	43
<i>sbcB</i>	Exodeoxyribonuclease I	6,57E-03	9,79E-03	8,47E-04	1,21E-04	1,6/1,4	1,4/1,5	5
<i>tmk</i>	Thymidylate kinase	8,77E-02	1,20E-01	5,09E-04	1,00E-02	1,4/1,4	1,3/1,4	5
<i>xerD</i>	Site-specific integrase/recombinase, with XerC	1,04E-02	1,45E-02	2,63E-05	1,34E-03	1,5/1,4	1,5/1,4	4
<i>ybaD</i>	ORF ^f , hypothetical protein	7,69E-03	1,05E-02	3,97E-04	5,20E-04	1,4/1,5	1,3/1,4	6
<i>ybcC</i>	Putative exonuclease similar to lambda	1,23E-02	1,92E-02	1,03E-03	1,41E-03	1,7/1,4	1,5/1,6	5
<i>ybdM</i>	ORF, hypothetical protein	8,96E-03	1,30E-02	6,20E-05	2,79E-04	1,4/1,5	1,4/1,4	16
<i>ybdQ</i>	ORF, hypothetical protein	8,40E-03	1,15E-02	8,12E-04	3,61E-04	1,5/1,4	1,5/1,5	5
<i>ybgS</i>	Putative homeobox protein	6,31E-03	8,93E-03	4,43E-05	1,20E-04	1,4/1,4	1,6/1,8	19
<i>yciA</i>	ORF, hypothetical protein	1,54E-02	2,16E-02	1,38E-03	7,54E-04	1,5/1,4	1,2/1,5	5
<i>yddX</i>	ORF, hypothetical protein	1,02E-02	1,51E-02	7,14E-04	1,66E-03	1,3/1,7	1,8/1,9	4
<i>ydfS</i>	ORF, hypothetical protein	1,05E-02	1,47E-02	4,39E-05	1,14E-04	1,4/1,4	1,4/1,4	31
<i>ydiH</i>	ORF, hypothetical protein	1,29E-02	1,82E-02	2,50E-04	1,40E-03	1,5/1,4	1,4/1,5	5
<i>yegW</i>	Putative transcriptional regulator	1,65E-02	2,30E-02	1,89E-03	1,27E-03	1,5/1,4	1,4/1,5	4
<i>yfhJ</i>	ORF, hypothetical protein	7,82E-03	1,06E-02	1,50E-04	6,65E-04	1,4/1,4	1,4/1,4	5
<i>ygaY</i>	ORF, hypothetical protein	1,25E-02	1,78E-02	1,02E-03	4,67E-04	1,5/1,4	1,4/1,4	6
<i>yjbM</i>	ORF, hypothetical protein	8,76E-03	1,29E-02	7,28E-04	3,43E-04	1,6/1,4	1,4/1,4	7
<i>yjgH</i>	ORF, hypothetical protein	7,58E-02	1,05E-01	1,48E-03	3,07E-03	1,4/1,4	1,4/1,3	12
<i>ymfS</i>	ORF, hypothetical protein	2,20E-02	3,39E-02	1,99E-03	3,08E-03	1,5/1,5	1,3/1,4	5

Fortsetzung Tab. I

Gene (i)	Genprodukte	Mittelwerte		S.D.		Repressions-Faktor		„SAM“-Wert d(i)
		Kontrolle	Experiment	Kontrolle	Experiment	NaCl	Sorbitol	
Erniedrigte Expression								
<i>acrB</i>	Acriflavin resistance protein B	6,08E-03	4,47E-03	2,61E-04	2,42E-04	-1,4/-1,4	-1,8/-1,7	-5
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase c22 protein	7,81E-03	3,59E-03	9,70E-04	4,42E-04	-2,6/-1,8	-1,5/-1,6	-5
<i>aldA</i>	Lactaldehyde dehydrogenase A	1,46E-02	1,05E-02	1,02E-03	2,16E-04	-1,4/-1,5	-1,4/-1,4	-5
<i>appC</i>	Probable cytochrome oxidase subunit I	2,06E-02	1,17E-02	7,25E-04	1,04E-03	-1,9/-1,6	-1,6/-1,4	-9
<i>aroD</i>	3-Dehydroquinone dehydratase	5,85E-03	3,88E-03	4,64E-04	2,65E-04	-1,5/-1,5	-1,7/-1,5	-4
<i>asd</i>	Aspartate semialdehyde dehydrogenase	8,89E-03	4,61E-03	7,41E-05	2,35E-04	-1,9/-2,0	-1,4/-1,5	-17
<i>atpC</i>	ATP synthase F1 epsilon subunit	7,72E-03	5,18E-03	1,48E-04	1,37E-04	-1,5/-1,4	-1,6/-1,6	-12
<i>atpF</i>	ATP synthase F0 subunit b	9,23E-03	3,83E-03	1,11E-03	3,47E-04	-2,8/-2,1	-2,0/-2,1	-6
<i>atpH</i>	ATP synthase F1 delta subunit	5,39E-03	3,24E-03	6,13E-04	1,54E-04	-1,9/-1,5	-1,9/-1,7	-4
<i>atpI</i>	ATP synthase subunit	8,68E-03	5,00E-03	1,15E-05	4,90E-04	-1,9/-1,6	-1,9/-1,8	-9
<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	1,54E-02	1,10E-02	4,61E-04	5,81E-04	-1,4/-1,4	-1,4/-1,4	-7
<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	8,08E-03	4,62E-03	3,96E-04	2,10E-04	-1,9/-1,6	-1,8/-1,7	-9
<i>cspA</i>	Cold shock protein, transcriptional activator of hns	7,51E-03	4,11E-03	1,03E-03	2,93E-05	-2,0/-1,7	-2,9/-2,2	-4
<i>cyoC</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	5,72E-03	3,99E-03	4,49E-04	1,87E-04	-1,6/-1,3	-1,4/-1,5	-4
<i>cysD</i>	ATP sulfurylase (ATP:sulfate adenylyltransferase)	8,88E-03	4,03E-03	1,10E-03	2,96E-04	-2,5/-1,9	-2,7/-2,3	-6
<i>cysH</i>	3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase	1,03E-02	7,20E-03	1,20E-04	2,49E-04	-1,4/-1,4	-1,5/-1,6	-11
<i>cysI</i>	Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein alpha subunit	1,56E-02	1,15E-02	6,71E-04	1,33E-03	-1,5/-1,4	-1,4/-1,6	-4
<i>cysJ</i>	Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein beta subunit	1,33E-02	7,91E-03	1,29E-03	4,72E-04	-1,6/-1,7	-1,8/-1,9	-5
<i>cysK</i>	Cysteine synthase A	2,40E-02	1,55E-02	2,95E-04	7,76E-04	-1,6/-1,5	-1,8/-2,0	-13
<i>cysM</i>	Cysteine synthase B	1,58E-02	1,16E-02	1,09E-03	2,11E-04	-1,4/-1,4	-1,5/-1,4	-5
<i>cysW</i>	Sulfate transport system permease protein CysW	1,98E-02	1,35E-02	1,99E-03	1,02E-03	-1,7/-1,4	-1,4/-1,3	-4
<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinate reductase	5,11E-03	3,46E-03	8,60E-05	2,17E-04	-1,5/-1,4	-1,4/-1,5	-7
<i>fdol</i>	Formate dehydrogenase-O gamma subunit	8,08E-03	4,59E-03	8,13E-04	4,75E-04	-2,0/-1,5	-1,5/-1,6	-5
<i>fnr</i>	Fumarate and nitrate reduction regulatory protein	6,33E-03	4,00E-03	1,00E-04	2,54E-05	-1,6/-1,6	-1,4/-1,5	-16

Fortsetzung Tab. I

<i>folE</i>	GTP cyclohydrolase I	7,51E-03	5,36E-03	1,81E-04	1,42E-05	-1,4/-1,4	-1,4/-1,4	-11
<i>fruB</i>	PTS system, fructose-specific IIA/FPR component	9,01E-03	5,75E-03	5,45E-04	1,42E-04	-1,5/-1,6	-1,6/-1,6	-7
<i>ftsK</i>	Cell division protein FtsK	8,39E-03	5,75E-03	5,52E-04	1,94E-04	-1,4/-1,5	-1,5/-1,5	-5
<i>ftsN</i>	Cell division protein FtsN	6,88E-03	4,80E-03	2,00E-04	8,39E-05	-1,4/-1,4	-1,3/-1,4	-9
<i>ftsZ</i>	Cell division protein FtsZ	5,09E-03	3,73E-03	3,52E-04	2,40E-04	-1,5/-1,3	-1,3/-1,6	-4
<i>fumB</i>	Fumarate hydratase class i, anaerobic (fumarase)	1,37E-02	9,19E-03	7,73E-04	4,15E-04	-1,5/-1,5	-1,3/-1,4	-6
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A	1,86E-02	1,19E-02	1,15E-03	1,41E-03	-1,8/-1,4	-1,7/-1,9	-5
<i>gatY</i>	Tagatose-bisphosphate aldolase GatY	1,26E-02	8,57E-03	3,72E-04	7,68E-04	-1,6/-1,4	-1,3/-1,5	-6
<i>gcvP</i>	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	8,61E-03	5,17E-03	9,96E-04	3,61E-04	-1,9/-1,5	-1,6/-1,7	-4
<i>gdhA</i>	NADP-specific glutamate dehydrogenase	1,27E-02	8,97E-03	1,52E-04	3,87E-04	-1,4/-1,5	-1,4/-1,4	-10
<i>glgA</i>	Glycogen synthase	5,09E-03	3,69E-03	3,40E-04	1,52E-05	-1,4/-1,3	-1,5/-1,5	-4
<i>gltB</i>	Glutamate synthase (NADPH) large chain precursor	6,70E-03	3,15E-03	2,76E-04	3,51E-04	-2,2/-2,0	-1,8/-1,6	-9
<i>gltD</i>	Glutamate synthase (NADPH) small chain	1,79E-02	1,25E-02	9,48E-04	1,02E-03	-1,4/-1,6	-1,3/-1,4	-5
<i>gpmA</i>	Ghosphoglycerate mutase 1	9,81E-03	6,78E-03	2,64E-04	2,36E-04	-1,5/-1,4	-1,4/-1,3	-9
<i>hisC</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase (imidazole)	7,13E-03	5,21E-03	4,27E-04	6,51E-05	-1,4/-1,3	-1,9/-1,8	-5
<i>hupA</i>	Histonelike DNA-binding protein HU-alpha (NS2) (HU-2)	1,05E-02	5,84E-03	1,33E-03	4,41E-04	-2,1/-1,5	-1,7/-1,8	-4
<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU-beta	9,32E-03	4,94E-03	1,76E-04	1,63E-04	-1,8/-2,0	-2,0/-2,0	-18
<i>hyaF</i>	Hydrogenase-1 operon protein HyaF	2,18E-02	1,35E-02	4,31E-04	9,14E-04	-1,7/-1,6	-1,4/-1,3	-10
<i>ileS</i>	Isoleucyl-tRNA synthetase	6,33E-03	4,58E-03	4,01E-04	4,70E-05	-1,5/-1,3	-1,4/-1,5	-5
<i>kdsB</i>	3-Deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	6,56E-03	4,08E-03	5,76E-04	5,04E-05	-1,5/-1,7	-1,4/-1,4	-5
<i>leuD</i>	3-Isopropylmalate dehydratase	7,51E-03	5,47E-03	8,64E-05	3,57E-04	-1,3/-1,4	-1,3/-1,3	-6
<i>lpp</i>	Major outer membrane lipoprotein precursor	5,89E-03	3,98E-03	2,74E-04	2,40E-05	-1,5/-1,4	-1,4/-1,5	-7
<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine methyltransferase	3,51E-02	6,95E-03	3,06E-03	5,56E-04	-5,1/-5,0	-2,4/-2,1	-12
<i>mrcA</i>	Peptidoglycan synthetase; penicillin-binding protein 1A	6,42E-03	4,16E-03	1,44E-04	4,13E-04	-1,7/-1,4	-1,4/-1,3	-6
<i>mrdA</i>	Cell elongation, e phase; peptidoglycan synthetase; penicillin-binding protein 2	9,91E-03	6,80E-03	3,27E-04	4,95E-04	-1,6/-1,4	-1,3/-1,4	-6
<i>murA</i>	UDP-n-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	5,51E-03	3,66E-03	4,74E-04	1,25E-04	-1,6/-1,4	-1,4/-1,4	-4
<i>nfrB</i>	Bacteriophage N4 adsorption protein B precursor	5,15E-03	2,58E-03	7,22E-04	3,31E-04	-2,4/-1,9	-1,4/-1,5	-4

Fortsetzung Tab. I

<i>nuoF</i>	NADH dehydrogenase I chain F	1,01E-02	6,15E-03	4,47E-04	4,41E-04	-1,8/-1,7	-1,3/-1,4	-8
<i>ompF</i>	Outer membrane protein F precursor	2,58E-02	3,79E-03	8,62E-04	3,17E-04	-7,4/-6,3	-2,2/-2,4	-30
<i>ompT</i>	Protease VII precursor	1,32E-02	4,31E-03	1,76E-03	1,38E-04	-3,4/-2,7	-1,6/-2,0	-7
<i>phoU</i>	Peripheral membrane protein U	8,57E-02	5,05E-02	9,34E-03	9,51E-03	-1,8/-1,6	-1,2/-1,4	-4
<i>prfB</i>	Peptide chain release factor 2 (RF-2)	6,53E-03	4,69E-03	4,77E-04	2,51E-04	-1,5/-1,4	-1,5/-1,3	-4
<i>priB</i>	Primosomal replication protein n	8,29E-03	5,74E-03	2,21E-04	7,98E-05	-1,4/-1,5	-1,3/-1,4	-11
<i>priA</i>	Preprotein translocase secY subunit	1,02E-02	5,65E-03	1,03E-03	1,83E-04	-2,0/-1,6	-1,5/-1,2	-6
<i>proA</i>	Gamma-glutamylphosphate reductase	5,84E-03	3,72E-03	1,47E-04	1,33E-05	-1,6/-1,5	-1,5/-1,5	-12
<i>pspB</i>	Phage shock protein B	1,28E-02	7,17E-03	3,87E-05	3,92E-04	-1,9/-1,7	-1,2/-1,4	-16
<i>ptsN</i>	Enzyme IIANtr	2,82E-01	1,41E-01	2,24E-02	3,90E-03	-2,1/-1,9	-1,3/-1,6	-9
<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	1,03E-02	7,66E-03	5,27E-04	1,20E-04	-1,3/-1,4	-1,4/-1,4	-6
<i>pyrB</i>	Aspartate carbomoyltransferase catalytic subunit	1,69E-02	1,18E-02	1,49E-04	8,66E-04	-1,4/-1,5	-1,5/-1,4	-7
<i>rbtB</i>	Periplasmic ribose-binding protein precursor	8,99E-03	6,03E-03	4,52E-04	3,62E-04	-1,6/-1,4	-1,6/-1,7	-6
<i>relB</i>	Negative regulator of translation	1,52E-02	9,80E-03	8,32E-05	6,27E-04	-1,6/-1,5	-1,4/-1,3	-10
<i>rplC</i>	50S ribosomal subunit protein L3	1,90E-02	1,39E-02	7,79E-04	1,34E-04	-1,3/-1,4	-1,3/-1,6	-8
<i>rplD</i>	50S ribosomal subunit protein L4	1,66E-02	9,40E-03	2,46E-04	3,72E-04	-1,7/-1,8	-1,4/-1,5	-19
<i>rplE</i>	50S ribosomal subunit protein L5	1,31E-02	7,79E-03	1,52E-03	1,91E-04	-1,8/-1,6	-1,3/-1,3	-5
<i>rplF</i>	50S ribosomal subunit protein L6	2,19E-02	1,56E-02	1,84E-03	9,17E-04	-1,4/-1,4	-1,4/-1,4	-4
<i>rplI</i>	50S ribosomal subunit protein L9	7,60E-03	4,53E-03	6,72E-04	3,24E-04	-1,9/-1,5	-1,2/-1,7	-5
<i>rplU</i>	50S ribosomal subunit protein L21	7,00E-03	3,53E-03	1,28E-03	1,62E-04	-2,3/-1,7	-1,6/-1,8	-4
<i>rplW</i>	50S ribosomal subunit protein L23	5,83E-03	3,90E-03	6,08E-05	3,43E-04	-1,6/-1,4	-1,4/-1,4	-6
<i>rplX</i>	50S ribosomal subunit protein L24	8,64E-03	5,32E-03	7,59E-06	3,07E-04	-1,7/-1,6	-1,3/-1,3	-11
<i>rpmI</i>	50S ribosomal subunit protein L35	9,11E-03	6,40E-03	6,28E-04	4,75E-04	-1,6/-1,4	-1,5/-1,4	-4
<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	2,27E-02	1,44E-02	8,23E-04	1,76E-04	-1,6/-1,6	-1,3/-1,6	-13
<i>rpsI</i>	30S ribosomal subunit protein S9	1,09E-02	6,81E-03	2,42E-04	3,81E-04	-1,6/-1,6	-1,5/-1,5	-11
<i>rpsJ</i>	30S ribosomal subunit protein S10	8,34E-03	5,42E-03	6,01E-04	2,01E-04	-1,6/-1,5	-1,4/-1,4	-6
<i>rpsN</i>	30S ribosomal subunit protein S14	5,87E-03	4,13E-03	4,19E-04	4,93E-05	-1,5/-1,3	-1,4/-1,6	-5
<i>rpsR</i>	30S ribosomal subunit protein S18	8,03E-03	5,62E-03	1,48E-04	6,15E-05	-1,5/-1,4	-1,4/-1,4	-13
<i>rpsS</i>	30S ribosomal subunit protein S19	1,39E-02	8,08E-03	1,20E-03	7,50E-05	-1,8/-1,6	-1,5/-1,3	-6
<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	1,32E-02	8,56E-03	8,02E-04	3,74E-04	-1,7/-1,4	-1,3/-1,7	-7
<i>sdhC</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit	7,64E-03	5,39E-03	2,20E-04	3,52E-04	-1,5/-1,3	-1,4/-1,4	-6

Fortsetzung Tab. I

<i>sdhD</i>	Succinate dehydrogenase 13 kD hydrophobic protein	5,61E-03	3,09E-03	6,17E-04	5,59E-04	-2,2/-1,5	-1,5/-1,9	-4
<i>slyD</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	6,75E-03	4,48E-03	5,69E-04	5,03E-04	-1,7/-1,4	-1,8/-1,7	-4
<i>sucD</i>	Succinyl-coA synthetase alpha chain	1,21E-02	7,07E-03	5,43E-04	1,06E-04	-1,8/-1,7	-1,4/-1,4	-11
<i>sufI</i>	SufI protein precursor	7,45E-03	5,52E-03	4,36E-05	5,85E-04	-1,4/-1,3	-1,3/-1,5	-4
<i>thrC</i>	Threonine synthase	7,87E-03	4,87E-03	9,31E-05	1,91E-04	-1,6/-1,6	-1,4/-1,4	-13
<i>thrS</i>	Threonine tRNA synthetase	1,49E-02	9,87E-03	1,06E-03	8,37E-04	-1,7/-1,4	-1,3/-1,7	-5
<i>tig</i>	Trigger factor	8,05E-03	4,97E-03	2,67E-04	6,20E-04	-1,8/-1,5	-1,7/-1,6	-6
<i>topA</i>	DNA topoisomerase I, omega protein I	8,52E-03	5,34E-03	6,24E-04	5,93E-05	-1,5/-1,7	-1,5/-2,0	-6
<i>tpx</i>	Thiol peroxidase	6,16E-03	3,63E-03	9,98E-05	5,80E-04	-1,9/-1,5	-1,4/-1,6	-5
<i>trmD</i>	tRNA(guanine-7)methyltransferase	2,94E-02	2,10E-02	2,55E-03	1,09E-03	-1,5/-1,3	-1,2/-1,7	-4
<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta chain	5,29E-03	3,44E-03	5,57E-04	9,88E-05	-1,7/-1,4	-1,9/-1,5	-4
<i>uspA</i>	Universal stress protein a	6,70E-03	3,53E-03	4,05E-04	3,80E-04	-2,1/-1,7	-1,4/-1,6	-7
<i>ycdN</i>	Putative cytochrome	5,94E-03	4,37E-03	2,98E-04	4,03E-04	-1,4/-1,4	-1,4/-1,5	-4
<i>ycgO</i>	ORF, hypothetical protein	1,72E-01	1,12E-01	6,64E-03	9,07E-03	-1,5/-1,6	-1,6/-1,4	-8
<i>lomR</i>	ORF, hypothetical protein	7,64E-03	5,48E-03	6,03E-04	1,05E-04	-1,5/-1,4	-1,3/-1,3	-4
<i>yfhN</i>	ORF, hypothetical protein	8,35E-03	6,06E-03	7,45E-04	5,65E-05	-1,5/-1,4	-1,4/-1,3	-4
<i>ybfN</i>	ORF, hypothetical protein	1,22E-02	8,67E-03	1,23E-03	4,68E-04	-1,4/-1,5	-1,3/-1,7	-4
<i>ycbF</i>	Hypothetical fimbrial chaperone	6,27E-03	4,59E-03	4,46E-04	3,16E-04	-1,5/-1,2	-1,3/-1,5	-4
<i>yccZ</i>	Putative function in exopolysaccharide production	5,20E-03	3,50E-03	4,30E-04	4,40E-05	-1,4/-1,6	-2,0/-1,5	-4
<i>ydiD</i>	Putative ligase/synthetase	6,07E-03	4,28E-03	2,10E-04	2,52E-04	-1,5/-1,3	-1,6/1,7	-6
<i>yhcB</i>	ORF, hypothetical protein	5,66E-03	4,15E-03	1,94E-04	2,68E-04	-1,5/-1,3	-1,4/-1,6	-5
<i>yiaT</i>	Putative outer membrane protein	2,60E-02	1,83E-02	2,11E-03	8,73E-04	-1,4/-1,5	-1,3/-1,4	-5
<i>yjcU</i>	Putative epimerase	4,27E-02	2,38E-02	2,02E-03	2,34E-03	-1,9/-1,7	-1,5/-1,3	-8
<i>yohl</i>	Putative regulator protein	6,39E-03	4,05E-03	9,38E-05	1,43E-04	-1,6/-1,5	-1,5/-1,5	-12
<i>ysgA</i>	Putative enzyme	1,45E-02	8,21E-03	6,98E-04	3,52E-04	-1,9/-1,7	-1,8/-1,4	-10

^{a)}Genproduktbezeichnung nach dem *E. coli* K-12 Genomprojekt (<http://www.genome.wisc.edu/>); ^{b)}Mittelwerte der prozentualen Signalintensitäten der Kontrolle bzw. des Experiments (0,4 M NaCl) aus zwei unabhängigen Experimenten; ^{c)}Standardabweichung der unter NaCl gemessenen Signalintensitätsveränderungen der Kontrolle bzw. des Experiments; ^{d)}Induktions- und Repressionsfaktoren der beiden Experimente unter 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol im Vergleich zur Kontrolle; ^{e)}Signifikanzliste der unter NaCl-Stress veränderten Transkripte ("SAM"-Werte $d(i)$), die mittels "SAM" ermittelt wurde (siehe Text). Je positiver/negativer $d(i)$, desto höher ist die Signifikanz der Veränderungen ($d(i) = 4 \cong p \leq 0,05$) (siehe Text); ^{f)}Offenes Leseraster.

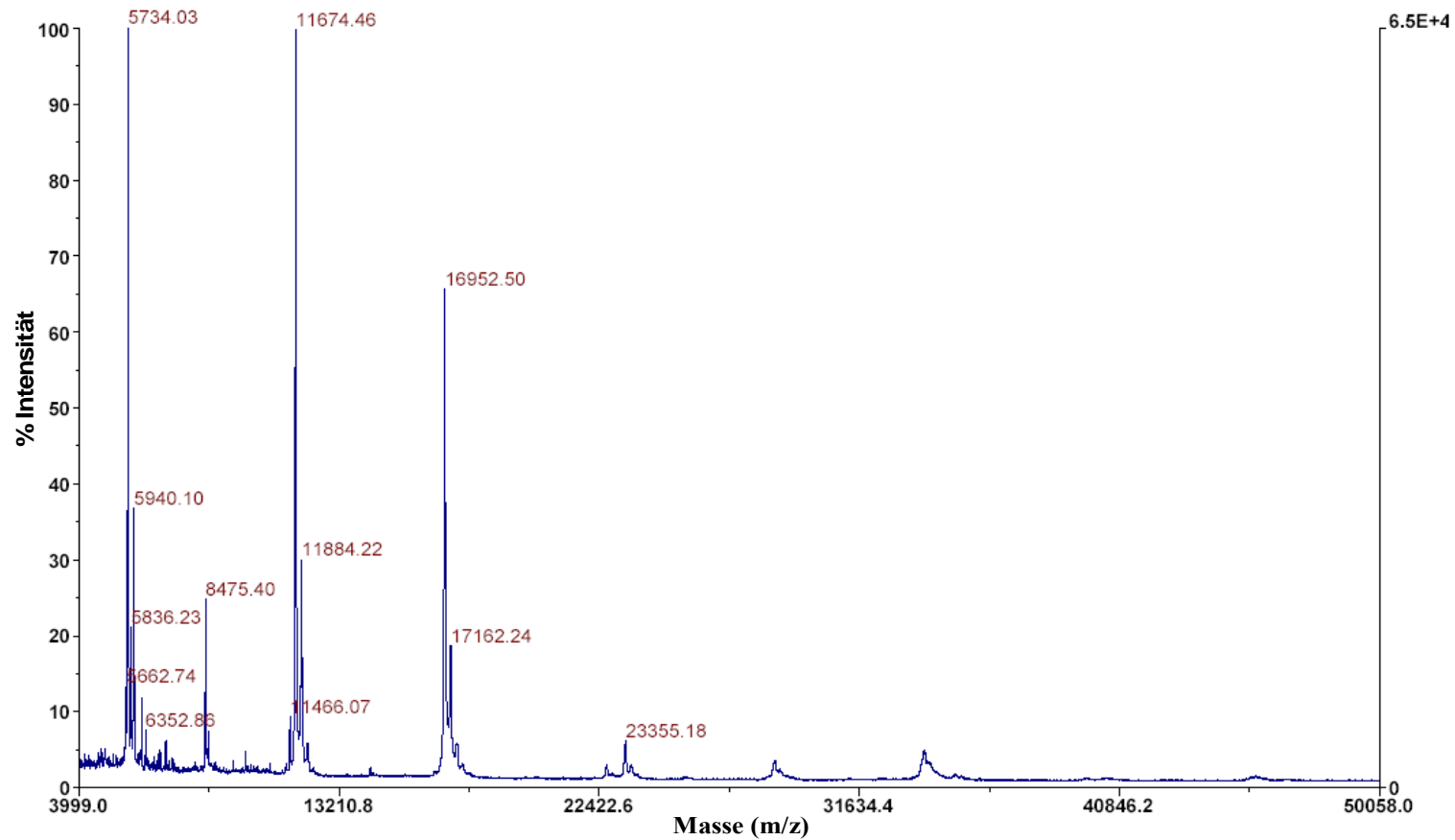
Tab. II: Liste der induzierten und reprimierten Gene unter Kaliumlimitation.

Gene (i)	Genprodukte ^a	Mittelwerte ^b		S.D. ^c		Induktions-Faktor ^d
		Kontrolle	Experiment	Kontrolle	Experiment	
Erhöhte Expression						
<i>b1957 (f60)</i>	f60	1,11E-01	1,68E-01	6,20E-03	1,05E-03	1,6/1,5
<i>b2629 (f87)</i>	f87; This 87 aa ORF is 31 pct identical (6 gaps) to 58 residues of an approx. 128 aa protein YHIK_ECOLI SW: P37628	6,66E-03	9,20E-03	5,63E-04	8,99E-04	1,4/1,4
<i>dps</i>	DNA protection during starvation protein	4,21E-03	6,58E-03	1,49E-04	1,30E-05	1,5/1,6
<i>himD</i>	integration host factor beta-subunit (IHF-beta)	5,97E-03	8,20E-03	1,33E-04	1,38E-04	1,4/1,4
<i>kdpC</i>	potassium-transporting ATPase C chain	1,04E-02	1,46E-02	5,95E-04	2,93E-04	1,5/1,3
<i>kdpE</i>	F225; 92 pct identical to KDPE_ECOLI SW: P21866	4,60E-03	6,50E-03	2,04E-04	1,41E-04	1,4/1,4
<i>lpp</i>	major outer membrane lipoprotein precursor	5,89E-03	1,12E-02	2,74E-04	2,96E-04	1,9/1,9
<i>minD</i>	cell division inhibitor MinD	1,01E-02	1,46E-02	4,75E-05	3,32E-05	1,5/1,5
<i>minE</i>	cell division topological specificity factor	1,47E-02	2,04E-02	5,42E-04	2,65E-04	1,4/1,4
<i>rffM</i>	probable UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid transferase	7,04E-03	1,07E-02	7,09E-04	3,33E-05	1,4/1,6
<i>ycaJ</i>	hypothetical protein in serS 5'region	9,34E-03	1,34E-02	1,90E-04	3,77E-04	1,4/1,4
<i>yjbC</i>	hypothetical 32.5 kD protein in pepe-lysc intergenic region	1,93E-02	3,27E-02	3,29E-04	1,76E-04	1,7/1,7

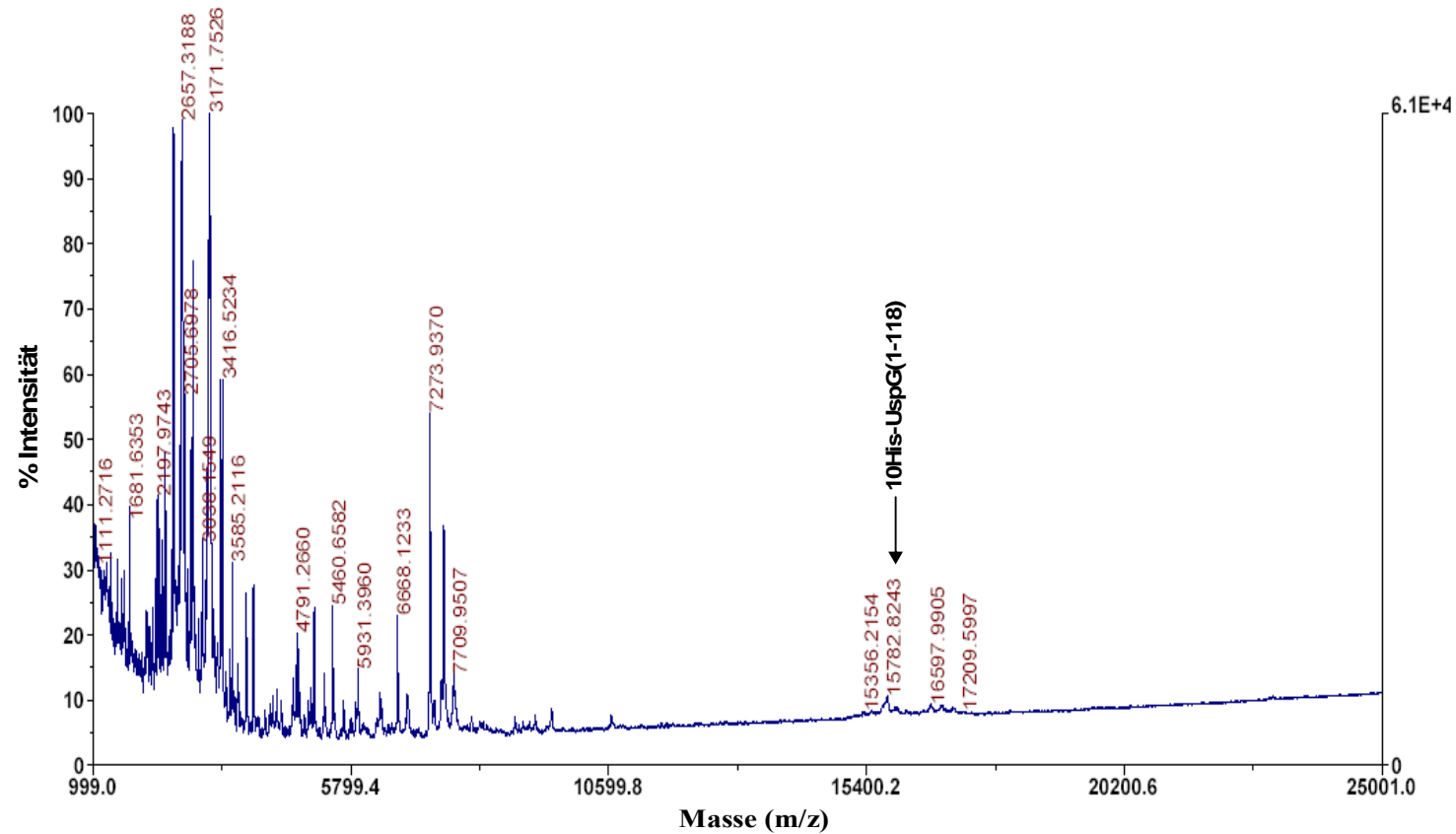
Fortsetzung Tab. II

Gene (i)	Genprodukte	Mittelwerte		S.D.		Repressionsfaktor
		Kontrolle	Experiment	Kontrolle	Experiment	
Erniedrigte Expression						
<i>aceK</i>	isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	3,51E-02	2,23E-02	9,19E-04	1,94E-04	-1,4/-1,4
<i>ackA</i>	acetate kinase	3,21E-02	2,32E-02	6,29E-04	7,14E-04	-1,4/-1,4
<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small chain	1,54E-02	1,05E-02	4,61E-04	2,61E-04	-1,4/-1,5
<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large chain	8,54E-03	5,54E-03	2,52E-04	3,60E-04	-1,6/-1,5
<i>glnA</i>	glutamine synthetase	9,34E-03	5,29E-03	6,76E-04	4,10E-04	-2,0/-1,6
<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate- homocysteine methyltransferase	3,51E-02	1,72E-02	3,06E-03	5,80E-04	-2,1/-1,9
<i>ompF</i>	outer membrane protein F precursor	2,68E-02	1,87E-02	6,15E-04	1,38E-03	-1,6/-1,5
<i>prlA</i>	preprotein translocase secY subunit	1,07E-02	7,19E-03	3,45E-04	4,20E-04	-1,6/-1,4
<i>rplE</i>	50S ribosomal subunit protein L5	1,37E-02	9,89E-03	6,54E-04	1,15E-04	-1,4/-1,4
<i>rplX</i>	50S ribosomal subunit protein L24	9,15E-03	6,39E-03	7,17E-04	6,27E-04	-1,4/-1,5
<i>rpsM</i>	30S ribosomal subunit protein S13	1,89E-02	1,32E-02	1,88E-03	1,72E-05	-1,4/-1,5
<i>ysgA</i>	f332; revealed by sequence change relative to earlier version; similar to <i>Methylobacterium extorquens</i> orf2, GB: U72662	1,47E-02	1,08E-02	3,44E-04	1,93E-05	-1,4/-1,4

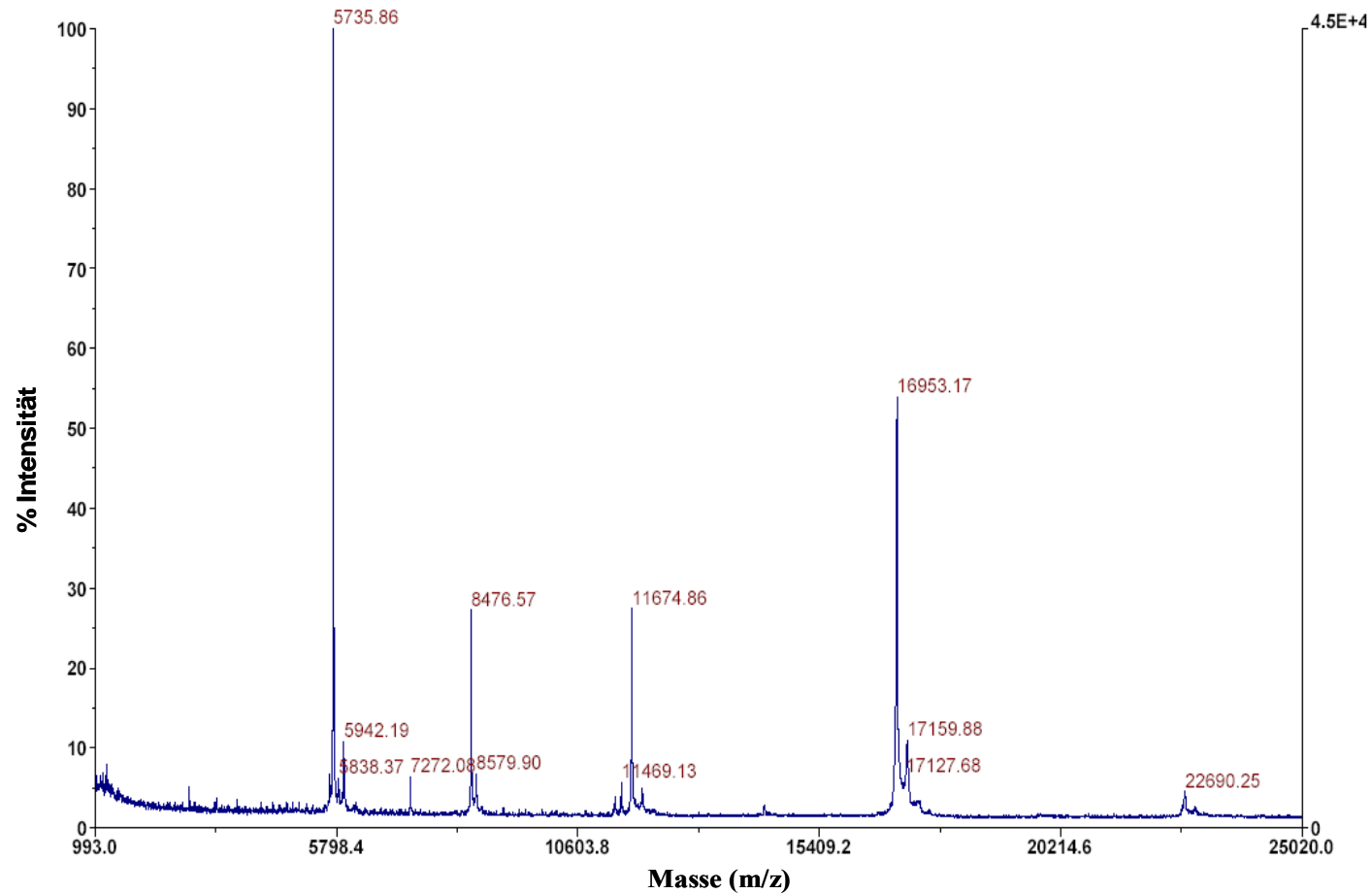
^{a)}Genproduktbezeichnung nach dem *E. coli* K-12 Genomprojekt (<http://www.genome.wisc.edu/>); ^{b)}Mittelwerte der prozentualen Signalintensitäten der Kontrolle (10 mM K⁺) bzw. des Experiments (0,1 mM K⁺) aus zwei unabhängigen Experimenten; ^{c)}Standardabweichung der entsprechenden Signalintensitätsveränderungen der Kontrolle bzw. des Experiments; ^{d)}Induktions- und Repressionsfaktoren zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente im Vergleich zur Kontrolle.

Abb. I: C3-Kalibrierspektrum zur Massenbestimmung von 10His-UspG.

Für die Massenbestimmung von 10His-UspG wurde dieses extern auf den Standard C3 (Applied Biosystems) mit Insulin ($[M+H]^+$ 5734 Da), Thioredoxin ($[M+H]^+$ 11674 sowie $[M+2H]^{2+}$ 8475 Da) und Apomyoglobin ($[M+H]^+$ 16952 Da) kalibriert. Links ist die Signalintensität der einzelnen Proteine angegeben, unten die entsprechende Massenskala (m/z).

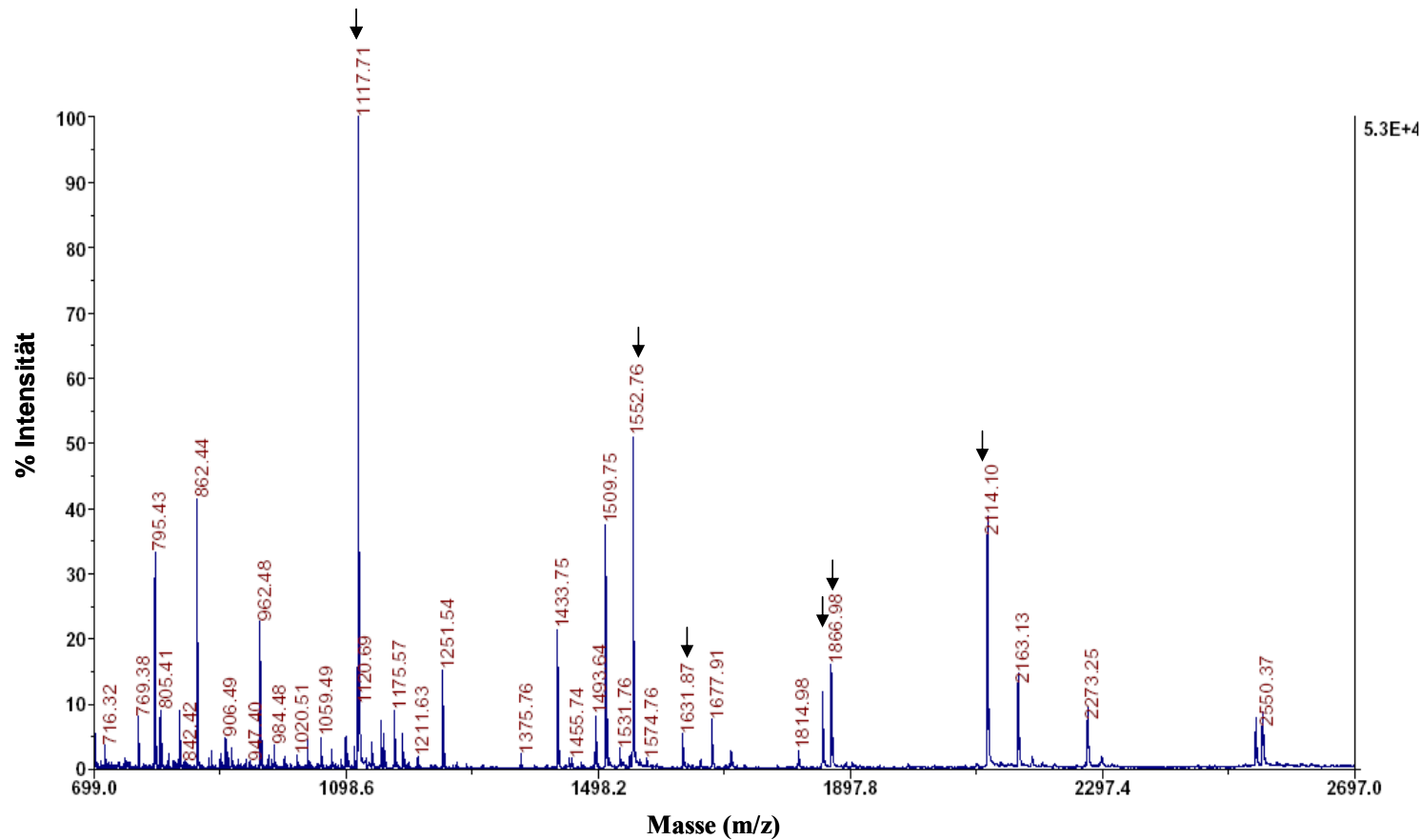
Abb. II: Molekulargewichtsbestimmung von 10His-UspG(1-118) mittels MALDI-TOF-MS.

Gesamtes Massenspektrum der gereinigten Fraktion von 10His-UspG(1-118) im Bereich von 1-25 kDa. 10His-UspG(1-118) wurde wie unter 2.5.1 beschrieben gereinigt und nach Entsalzung mittels MALDI-TOF-MS analysiert (2.6.2). Zu sehen ist das monomere einfach geladene Molekulion von 10His-UspG(1-118) bei m/z von 15783 Da.

Abb. III: C3-Kalibrierspektrum zur Massenbestimmung von 10His-UspG(1-118).

C3-Standard (Applied Biosystems) mit Insulin ($[M+H]^+$ 5734 Da) Thioredoxin ($[M+H]^+$ 11674 sowie $[M+2H]^{2+}$ 8475 Da) und Apomyoglobin ($[M+H]^+$ 16952 Da).

Abb. IV: MALDI-MS-PMF Spektrum von gereinigtem und tryptisch verdauten 10His-UspG.



Die durch Pfeile markierten Peaks stellen die im Rahmen der MALDI-MS-PMF-Analysen identifizierten 6 Peptide von 10His-UspG dar. Peptidmassen von links nach rechts: 1117,71; 1552,76; 1631,87; 1853,04; 1866,98 und 2114,10 Da (siehe Tab. 3.5). Die Kalibrierung erfolgte intern gegen bekannte Autolyseprodukte von Trypsin.

Tab. III: Peptidmassen aus dem Trypsin-Verdau von 10His-UspG und die Autolyseprodukte des Trypsins

m/z Identifizierung	m/z Identifizierung	m/z Identifizierung	m/z Identifizierung
701,3450	912,3907	1175,5718	1631,8748 AS 91-104
710,3364	916,4554	1187,5684	1659,9319
716,3165	962,4763	1197,5839	1677,9066
748,3391	975,5118	1211,6323	1706,8376
749,3605	984,4822	1251,5417	1708,8627
750,3865	1000,4512	1254,5542	1814,9807
755,3477	1020,5053 Trypsin	1273,5659	1853,0403 AS 136-153
769,3785	1022,4965	1375,7588	1866,9764 AS 25-40
795,4294	1037,4738	1433,7458 Trypsin	2114,1038 AS 116-135
802,4131	1042,5117	1451,7290	2163,1252 Trypsin
805,4143 Trypsin	1059,4926	1455,7401	2185,1721 Trypsin
817,4221	1075,4713	1471,7646	2273,2542 Trypsin
835,4252	1090,5386	1493,6407	2295,2183 Trypsin
862,4366 Trypsin	1099,5313	1509,7538	2539,4497
880,4745	1117,7133 AS 154-163	1515,6674	2550,3689 Trypsin
884,4287	1120,6929	1531,7554	
900,4272	1153,5829 Trypsin	1547,7390	
906,4929 Trypsin	1158,6041	1552,7614 AS 79-90	
909,4187	1174,6638	1574,7559	

Angegeben sind die jeweiligen Massen (m/z) der detektierbaren Peptide der MALDI-MS-PMF-Analyse von gereinigtem 10His-UspG (vgl. 3.3.2.4, Tab. 3.5). Angegeben sind die bekannten Autolyseprodukte des Trypsins, sowie die 6 Peptide des tryptischen Verdau von 10His-UspG.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die an der Entstehung und Durchführung dieser Arbeit Anteil hatten, meinen Dank aussprechen:

- Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Karlheinz Altendorf für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Austausches mit anderen Wissenschaftlern im Rahmen diverser Meetings. Besonders danken möchte ich für die finanzielle Unterstützung insbesondere im Rahmen der DNA-Microarray-Untersuchungen.
- An dieser Stelle möchte ich ganz besonders herzlich Prof. Dr. Kirsten Jung für die Bereitstellung des außerordentlich interessanten Themas, für die außergewöhnlich gute Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, stetige Unterstützung und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in Ihrem Labor danken. Besonders herzlich möchte ich für die finanzielle Unterstützung und Betreuung im Verlauf des letzten Jahres danken, und dafür das ich die Möglichkeit hatte an diversen Tagungen teilzunehmen.
- Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern von Labor 116 für die stetige Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima bedanken. Dabei geht an dieser Stelle ein besonderer Dank an Anne Revermann, die es mit mir nicht immer leicht hatte. Insbesondere möchte ich mich bei Melanie Timmen für Ihre Unterstützung besonders an schweren Tagen bedanken, sowie für das Korrekturlesen☺.
- Außerdem bedanke ich mich bei den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern von Labor „115“ für die freundliche „Nachbarschaft“. Ganz besonders möchte ich meinen Freund Torsten Pirch an dieser Stelle erwähnen. Er ist mir seit ich denken kann ein sehr guter und lieber Freund.
- Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie sei für die gute Zusammenarbeit, die vielen kleinen Tips & Tricks und das sehr gute Arbeitsklima gedankt. Mein besonderer Dank geht dabei an Dr. Roland Schmid für die N-terminale Sequenzierung der Proteinproben.
- Herrn Prof. Dr. Karlheinz Altendorf möchte ich für die Annahme des Koreferates danken.
- Dr. Haike Henkel (Universität Greifswald) sei ebenfalls an dieser Stelle für die massenspektrometrische Analyse der Proteinproben gedankt.
- Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Nyström für die Bereitstellung der *uspA*-Mutante aus *E. coli* bedanken.
- Ein herzlichster Dank geht auch an meine Freunde Torsten Pirch und Christian Celik, die beide u. a. nette computerisierte Abende mit mir verbrachten.
- Besonders möchte ich mich noch bei Nancy, Iris, Ralf, Torsten und Jens für die netten Cocktail-Abende bedanken.
- Meinem Bruder danke ich für die stetige Unterstützung während der Arbeit und dafür, dass er immer für mich da ist.
- Silke danke ich für die besondere Unterstützung während der letzten 3 Monate.
- Zu guter letzt gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Vielen Dank.

Lebenslauf

Name: Arnim Weber
Geburtsdatum: 01.02.1972
Geburtsort: Georgsmarienhütte
Familienstand: ledig
Bildungsgang:

1979-1983 Grundschule „Heinrich-Schüren Schule“, Osnabrück

1983-1985 Orientierungsstufe „In der Wüste“, Osnabrück

1985-1992 Gymnasium „In der Wüste“, Osnabrück

1992 Abitur

01.10.1992-14.10.1999 Universität Osnabrück, Studiengang Diplom-Biologie

1994 Vordiplom (Prüfungsfächer: Botanik, Physik, Chemie und Genetik)

1999 Diplom (Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Genetik und Botanik)

01.12.1999-14.11.2003 Promotion an der Universität Osnabrück, Arbeitsgruppe
Mikrobiologie

seit 2001 assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs der Universität Osnabrück

Publikationsliste

Schlösser, A., A. Weber, and H. Schrempf. 2001. Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. *FEMS Microbiol Lett.* 196:77-83.

Weber, A. and K. Jung. 2002. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J Bacteriol* 184:5502-5507.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Osnabrück, Oktober 2003

.....