

# Regulation der Proteolyse des Masterregulators der generellen Stressantwort RpoS ( $\sigma^S$ ) während des Wachstumszyklus von *Escherichia coli*

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Christine Kanow-Scheel, geb. Hirsch

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin Prof. Dr. Jan-H. Olbertz  
Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter\_innen:

1. Prof. Dr. Regine Hengge
2. Prof. Dr. Thomas Eitinger
3. Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.6.2016



*Auf der Leiter der Evolution haben jene Spezies überlebt und konnten gedeihen, die sich an die Veränderungen der Umwelt am besten anpassen konnten. Die Beweglichkeit des Geistes kann uns helfen, den Wandel in der Außenwelt zu akzeptieren.*

*Dalai Lama*





Der praktische Teil dieser Dissertation entstand in der Zeit von April 2008 bis Juni 2011 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin.



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf meinem beruflichen Weg begleitet haben. Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Regine Hengge, die mit solch ansteckender Begeisterung über das faszinierende Leben der Bakterien erzählen kann, dass sie mich als Studentin damit infiziert hat, sodass ich in ihrer Arbeitsgruppe mehr darüber lernen wollte - das hat meinen beruflichen Werdegang geprägt. Danke, dass ich in dieser Arbeitsgruppe meine Dissertation anfertigen durfte, für die Bereitstellung des überaus spannenden Themas und für das in mich gesetzte Vertrauen. Danke auch für inspirierende Gespräche, interessante Buchempfehlungen, für die Möglichkeit DESIGNER JEANS GENES aktiv mit zu gestalten und so Einblick in einen anderen, kreativen Bereich zu bekommen und für die Chance, in den Wissenschaftsmanagement-Bereich zu wechseln, all das hat mich gefördert und weitergebracht. Danke auch für kraftgebende Worte und einen großen Vertrauensvorschuss, als ich wegen einer Erkrankung lange ausfiel. Das war nicht selbstverständlich und ich hoffe, dass ich mit der vorliegenden Arbeit das in mich gesetzte Vertrauen rechtfertige.

Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich dafür, dass er sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat und sich die Zeit nimmt, diese Arbeit zu lesen und zu bewerten. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass er seit Studienbeginn immer ein offenes Ohr für mich hatte, sei es als mein Mentor als ich Erstsemestlerin war, sei es als ich Tutorin war oder auch später noch als Doktorandin. Prof. Dr. Kürşad Turgay danke ich für seine weiterbringenden Ideen und kritischen Anmerkungen zu meinen Postern und Vorträgen und für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten. Prof. Dr. Kornelius Zeth danke ich für den finanziellen Support zu Beginn meiner Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe. Eberhard möchte ich dafür danken, dass er mein Interesse an  $\sigma^s$  gefördert hat und außerdem für Austausch über diverse Themen. Es war schön, mit jemandem das Labor zu teilen, der Takashi Amano ebenso schätzt wie ich. Natalia, Sandra, Alex, Nicole und Anja danke ich für die lustigen und manchmal auch ernsthaften Gespräche im Labor, die oft dazu führten, dass ich länger blieb und die ich sehr geschätzt habe. Bedanken möchte ich mich auch bei Lydia, die mit großer Akribie lange Messreihen durchgeführt hat und mir damit eine echte Hilfe war. Außerdem danke ich Sandra, Johanna, Natalia und Anja für ihre hilfreichen Anmerkungen zu dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Sonja Greshake und Cornelia Leschke dafür, dass sie mich mit Verve begleitet und körperlich, geistig und seelisch wieder hergestellt haben, sodass ich diese Arbeit beenden konnte und nun vorlegen kann.

Ganz besonders danke ich Gabi dafür, dass sie mich in meiner Vision, das Abitur nachzuholen und Biologie zu studieren, so viele Jahre unterstützt hat. Vielen Dank für all deine Liebe, die du mir so überreich schenkst, deinen Glauben an mich, für deine Zeit, hilfreiche Coachingstunden, kreative mathematische Diskussionen, viele Gespräche, Debatten und manchmal auch Gedankenreisen über die erstaunlichen Lebenswelten von *E. coli* und über  $\sigma^s$  und seinen Henker RssB. Danke auch für dein Verständnis, wenn ich erst spät von der Uni kam und dann keine Energie mehr für unseren Haushalt und dich hatte, einfach dafür, dass du immer für mich da warst und bist. Und danke auch für schöne Tanzabende, elegante Bälle, manch herzerreißenden Opernbesuch, viele entspannende und häufiger auch arbeitsreiche Stunden in unserem Garten und andere Interessen, die wir zusammen teilen und die mich ausgleichen und in eine Welt weit weg von der Uni entführen. Seitdem wir verheiratet sind, habe ich erst studiert, dann promoviert und mein Studien- und Arbeitsleben hat sich immer wieder verändert. In dieser Zeit warst du stets der ruhende Pol in unserem Leben, der verlässlich da ist, der mich erdet und mir gut tut. Dafür danke ich dir von ganzem Herzen.

Danken möchte ich auch Emma, die es mit nur einem Blick, einem Geräusch oder einer Geste schafft, mich zum Lächeln zu bringen und die als perfekter Seperator mir nach getaner Arbeit spielend den Kopf freipustet von allen wissenschaftlichen und sonst wie arbeitsbehafteten Gedanken.

Als vorletztes danke ich meiner Mutter dafür, dass sie frühzeitig meine Liebe zur Biologie geweckt und gefördert hat. Danke für botanische Spaziergänge, Ausflüge ins Naturkundemuseum, in Botanische Gärten und Zoos und danke auch für die Möglichkeit, eine Vielzahl verschiedenster Lebewesen zu pflegen. All das hat mein Interesse an der Biologie gefördert und mündet nun, nach einigen Umwegen, in das Einreichen dieser Dissertation. Post mortem danke ich als letztes meinem Vater, dem ich die Fähigkeit zum analytischen Denken verdanke und der als promovierter Biologe (an der HU) mein Treten in seine Fußstapfen leider nie erfahren hat.

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
TABELLENVERZEICHNIS	XVII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIX
ZUSAMMENFASSUNG	XXI
SUMMARY	XXIII
 1. EINLEITUNG	 1
1.1. Struktur und Funktion der RNA-Polymerase und ihrer Sigmafaktoren	2
1.1.1. Struktur und Funktion der RNAP	2
1.1.2. Struktur und Funktion der bakteriellen Sigmafaktoren	3
1.1.3. Promotorselektivität und das $\sigma^s$ -Promotor-Selektivitäts-Paradoxon	5
1.2. Die $\sigma^s$ -abhängige generelle Stressantwort in <i>Escherichia coli</i>	8
1.2.1. Die zelluläre Adaption im Verlauf des Wachstumszyklus	9
1.3. Regulation des $\sigma^s$ -Gehalts	14
1.3.1. Transkriptionale und translationale Regulation	15
1.3.2. Posttranslationale Regulation durch Proteolyse	18
1.3.2.1. Der proteolytische $\sigma^s$ -Erkennungsfaktor RssB	19
1.3.2.2. Der Proteasekomplex ClpXP	20
1.3.2.3. Regulation der $\sigma^s$ -Proteolyse im Verlauf des Wachstumszyklus	23
1.4. Das $\sigma^s$ -Regulon am Beispiel des Biofilmnetzwerks	27
1.5. Die <i>E. coli</i> K12-Stämme MC4100 und W3110	29
1.5.1. Die <i>flhD5301</i> -Insertion des MC4100	32
1.5.2. Die <i>relA1</i> -Insertion des MC4100	32
1.5.3. Die <i>fimB</i> – <i>fimE</i> Deletion des MC4100	33
 2. ZIELSETZUNG	 35
 3. MATERIALIEN UND METHODEN	 37
3.1. Chemikalien und Materialien	37
3.2. Bakterienstämme und Plasmide	38
3.3. Medien und Medienzusätze	39

3.4. Mikrobiologische Methoden	40
3.4.1. Sterilisation	40
3.4.2. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	40
3.4.3. Wachstumsbedingungen	40
3.4.4. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	40
3.4.5. Bestimmung der Lebendzellzahl	41
3.4.5.1. Bestimmung der Lebendzellzahl bei einer bestimmten optischen Dichte	41
3.4.5.2. Bestimmung der Lebendzellzahl von Langzeitkulturen	41
3.4.6. Langzeitüberleben von Bakterien	41
3.4.7. P1-Lysat	42
3.4.8. P1-Transduktion	42
3.4.9. Motilitätsassay	42
3.5. Biochemische und molekularbiologische Methoden	43
3.5.1. TSS-Transformation mit pCP20	43
3.5.2. Kolonie-PCR	43
3.5.3. Agarosegelelektrophorese	43
3.5.4. Bestimmung des Proteingehalts in Flüssigkulturen	44
3.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.5.6. Immunoblot-Analyse (Western Blot)	45
3.5.7. Nicht-radioaktive Bestimmung der $\sigma^s$ -Halbwertszeit <i>in vivo</i>	45
3.5.8. Bestimmung des zellulären $\sigma^s$ -Gehalts <i>in vivo</i>	46
3.5.9. Erstellung eines definierten $\sigma^s$ -Standards	46
3.5.10. Bestimmung des zellulären Crl- und Rsd-Gehalts <i>in vivo</i>	47
3.5.11. Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts <i>in vivo</i>	47
3.5.11.1. Vorbereitende Arbeiten	48
3.5.11.2. ATP-Messung	48
3.5.11.3. Berechnung des ATP-Gehalts	49
3.6. Approximation von Parametern in Bereichen zwischen Messpunkten	49
3.6.1. Approximation von $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate	49
3.6.1.1. Interpolation der $\sigma^s$ -Halbwertszeiten	49
3.6.1.2. Interpolation des $\sigma^s$ -Gehalts	50
3.6.1.3. Interpolation der degradierten $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle	50
3.6.1.4. Interpolation der synthetisierten $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle	50
3.7. Computerprogramme und Datenbanken	50

4. ERGEBNISSE	53
4.1. Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ im Wachstumszyklus der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme MC4100 und W3110	53
4.1.1. Bei 37 °C wird $\sigma^s$ in MC4100 zweiphasig und in W3110 einphasig stabilisiert	54
4.1.2. Bei 28 °C wird $\sigma^s$ in beiden Stämmen zweiphasig stabilisiert	59
4.2. Zellulärer Crl- und Rsd-Gehalt in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100	66
4.2.1. In W3110 akkumuliert Rsd früher als in MC4100	66
4.3. Unterschiede im zellulären $\sigma^s$ -Gehalt in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen MC4100 und W3110	68
4.3.1. Der $\sigma^s$ -Gehalt ist in W3110 6–7-mal höher als in MC4100 und in der Übernachtskultur 12-mal höher	68
4.4. Der zelluläre $\sigma^s$ -Gehalt als Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts von Proteinbiosynthese und Proteolyse von $\sigma^s$ in den Stämmen W3110 und MC4100	72
4.4.1. Proteolyse und Synthese von $\sigma^s$ sind in W3110 bis zu 10-mal höher als in MC4100	72
4.4.2. Approximation der Dynamik des $\sigma^s$ -Pools im Verlauf des Wachstumszyklus	79
4.4.2.1. Approximation von $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate	79
4.4.2.2. Abschätzung der maximalen $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate im Verlauf des Wachstumszyklus	84
4.4.2.3. Berechnung der Zeitdauer eines RssB-Markierungszyklus	85
4.5. Zellulärer ATP-Gehalt in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen MC4100 und W3110	86
4.5.1. Lebendzellzahlbestimmung in den beiden Stämmen W3110 und MC4100	87
4.5.2. Bei 37 °C ist der ATP-Gehalt in W3110 bis zu 10-mal höher als in MC4110	89
4.5.3. Bei 28 °C ist der ATP-Gehalt in beiden Stämmen mindestens 10-mal niedriger als bei 37 °C	93
4.6. Langzeitüberleben der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme MC4100 und W3110	94
4.6.1. Die Lebendzellzahl ist in W3110-Langzeitkulturen 100–1000-fach höher als in MC4100	95
5. DISKUSSION	99
5.1. In ungestressten Zellen sichert der geringe RssB-P-Gehalt durch Limitierung der $\sigma^s$ -Proteolyserate den basalen $\sigma^s$ -Gehalt	100
5.2. Postexponentielle Phase: $\sigma^s$ titriert RssB-P aus; der Weg zur Stabilisierung von $\sigma^s$ wird bereitet	103

5.3. In der frühen Stationärphase wird $\sigma^s$ in W3110 stabilisiert, aber in MC4100 verstärkt degradiert	107
5.3.1. Austitrierung von RssB, Sequestrierung von $\sigma^{70}$ und Stärkung der $\sigma^s$ -Kompetition schaffen in W3110 die Grundlage zur Stabilisierung von $\sigma^s$	108
5.3.2. Der geringe $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt und der erhöhte ATP-Gehalt verhindern in MC4100 in der Übergangsphase die Stabilisierung von $\sigma^s$	113
5.4. Hoher $\sigma^s$ -Gehalt, Austitrierung von RssB und Limitierung von ATP führen in der Stationärphase zur vollständigen Stabilisierung von $\sigma^s$	115
5.5. In der Absterbephase ist die $\sigma^s$ -Proteolyse energetisch nicht möglich	119
5.6. Abschlussbetrachtung: Einordnung des Themas in den größeren Zusammenhang	121
6. LITERATURVERZEICHNIS	125
7. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	157



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Domänenorganisation und Struktur von Sigmafaktoren am Beispiel von $\sigma^{70}$ aus <i>Thermus thermophilus</i> .	4
Abb. 1.2: Signalinput und phänotypischer Output der generellen Stressantwort.	9
Abb. 1.3: Signalintegration durch Transkriptionsfaktoren, sRNAs und Proteolyse zur Kontrolle von $\sigma^s$ und $\sigma^s$ -abhängigen Genen in <i>E. coli</i> .	18
Abb. 1.4: Molekulare Mechanismen der $\sigma^s$ -Regulation.	23
Abb. 1.5: Masterregulatoren und sekundäre Botenstoffe bei der physiologischen Differenzierung von Biofilmen und Makrokolonien in <i>E. coli</i> .	29
Abb. 1.6: Entstehung der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme MG1655 (Derivat von MC4100) und W3110 aus dem K12-Ursprungsstamm.	31
Abb. 4.1: $\sigma^s$ wird in W3110 bei 37 °C sukzessive stabilisiert.	55
Abb. 4.2: $\sigma^s$ wird in MC4100 bei 37 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der frühen Stationärphase getrennt sind.	56
Abb. 4.3: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.	57
Abb. 4.4: In der nicht motilen Mutante W3110 <i>fliA::scar</i> wird $\sigma^s$ schwach zweiphasig stabilisiert.	58
Abb. 4.5: $\sigma^s$ wird in W3110 bei 28 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der späten postexponentiellen Wachstumsphase getrennt sind.	60
Abb. 4.6: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ in dem <i>E. coli</i> K12-Stamm W3110 bei 37 °C und 28 °C.	61
Abb. 4.7: $\sigma^s$ wird in MC4100 bei 28 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der frühen Stationärphase getrennt sind.	63
Abb. 4.8: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ in dem <i>E. coli</i> K12-Stamm MC4100 bei 37 °C und 28 °C.	64
Abb. 4.9: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 28 °C.	65
Abb. 4.10: Vergleich des zellulären Rsd- und Crl-Gehalts in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 28 °C und 37 °C.	67
Abb. 4.11: Der $\sigma^s$ -Gehalt beträgt in W3110 bei 37 °C zwischen 2400–9900 $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle bzw. $7,3 \times 10^9$ – $9,6 \times 10^{10}$ $\sigma^s$ -Moleküle/ $\mu\text{g GP}$ .	69
Abb. 4.12: In MC4100 beträgt der $\sigma^s$ -Gehalt bei 37 °C zwischen 430–1760 $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle bzw. $7,3 \times 10^8$ – $1,4 \times 10^{10}$ $\sigma^s$ -Moleküle/ $\mu\text{g GP}$ .	70
Abb. 4.13: Der $\sigma^s$ -Gehalt ist in W3110 bei 37 °C 6–7-mal höher und in der Übernachtskultur sogar 12-mal höher als in MC4100.	71

Abb. 4.14: Zusammensetzung des $\sigma^s$ -Gehalts in W3110 im Verlauf des Wachstumszyklus.	74
Abb. 4.15: Zusammensetzung des $\sigma^s$ -Gehalts in MC4100 im Verlauf des Wachstumszyklus	75
Abb. 4.16: Vergleich der Zusammensetzung des $\sigma^s$ -Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.	77
Abb. 4.17: Approximation der Halbwertszeiten der $\sigma^s$ -Degradierung und des $\sigma^s$ -Gehalts zur Interpolation unbekannter Daten zwischen zwei diskreten Messwerten.	81
Abb. 4.18: Zusammensetzung des $\sigma^s$ -Gehalts in W3110 und MC4100 im Verlauf des Wachstumszyklus (approximiert).	83
Abb. 4.19: Vergleich von diskreten und approximierten Daten zur Proteolyse und Biosynthese von $\sigma^s$ in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100.	84
Abb. 4.20: In W3110 werden im Verlauf des Wachstumszyklus geschätzt 8-mal mehr $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle synthetisiert und 6-mal mehr $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle degradiert.	85
Abb. 4.21: Lebendzellzahlbestimmung in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.	88
Abb. 4.22: Der ATP-Gehalt beträgt in W3110 bei 37 °C zwischen 63 und 0,5 mM und die Stabilisierung von $\sigma^s$ korreliert mit einer ATP-Konzentration von < 0,5 mM ATP.	90
Abb. 4.23: Der ATP-Gehalt beträgt in MC4100 bei 37 °C zwischen 23 und 0,01 mM und die Stabilisierung von $\sigma^s$ korreliert mit einer ATP-Konzentration von < 0,5 mM ATP.	91
Abb. 4.24: Vergleich des ATP-Gehalts in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.	92
Abb. 4.25: Der ATP-Gehalt liegt in W3110 und MC4100 bei 28 °C zwischen 0,03 und 1 mM.	93
Abb. 4.26: Vergleich des ATP-Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 37 °C und 28 °C.	94
Abb. 4.27: Langzeitüberlebenstest der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 37 °C.	96
Abb. 4.28: Langzeitüberlebenstest der beiden <i>E. coli</i> K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 28 °C.	97
Abb. 5.1: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der Logarithmischen Wachstumsphase.	102
Abb. 5.2: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der mittleren postexponentiellen Wachstumsphase.	104
Abb. 5.3: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der späten postexponentiellen Wachstumsphase.	107
Abb. 5.4: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der frühen Stationärphase in W3110.	112

Abb. 5.5: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^S$ ) in der frühen Stationärphase in MC4100.	115
Abb. 5.6: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^S$ ) in der späten Stationärphase.	118
Abb. 5.7: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^S$ ) in der Absterbephase.	121



## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien und Materialien und ihre Hersteller.	37
Tab. 3.2: Verwendete <i>E. coli</i> K12-Bakterienstämme.	38
Tab. 3.3: Medienzusätze, ihre Lösungsmittel und Endkonzentrationen.	39
Tab. 4.1: Approximation der dynamischen Veränderungen des $\sigma^s$ -Pools am Beispiel des <i>E. coli</i> K12-Stammes MC4100 zwischen OD 0,53 und OD 1,1.	79
Tab. 4.2: Approximation der $\sigma^s$ -Proteolyse- und Biosyntheserate in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.	81
Tab. 4.3: Lebendzellzahlbestimmung in den beiden <i>E. coli</i> K12-Stämmen MC4110 und W3110 bei 37 °C und 28 °C.	89



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AbP	Absterbephase
AcP	Acetylphosphat
AnP	Anlaufphase
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CD	C-terminale Domäne
ClpP	ClpP) <sub>14</sub>
ClpX	(ClpX) <sub>6</sub>
ClpXP	[(ClpP) <sub>14</sub> ][(ClpX) <sub>6</sub> ] <sub>2</sub>
E	RNA-Polymerase E
GP	Gesamtprotein
kDA	Kilodalton
LD	Linker
LP	Logarithmische Wachstumsphase
LZ	Lebendzellzahl
ND	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte bei 578 nm
PP	Postexponentielle Wachstumsphase
(p)ppGpp	Guanosintetraphosphat/ Guanosinpentphosphat
RNAP	RNA-Polymerase (total)
RNAPH	RNA-Polymerase-Holoenzym
RNAPK	RNA-Polymerase-Kernenzym
RR	Response-Regulator
SP	Stationärphase
TIR	Translations-Initiations-Region
UE	Untereinheit
ÜP	Übergangsphase der zweiphasigen $\sigma^s$ -Stabilisierung
ZKS	Zweikomponentensystem





## ZUSAMMENFASSUNG

Sigmafaktoren sind Untereinheiten der RNA-Polymerase (RNAP), die spezifische Promotorsequenzen auf der DNA binden und damit die Promotorerkennung der RNAP kontrollieren. *E. coli* hat neben dem vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  (RpoD) sechs alternative Sigmafaktoren, die unterschiedliche Klassen von Promotoren erkennen und so unterschiedliche Antworten auslösen.  $\sigma^s$  (RpoS) ist der Masterregulator der generellen Stressantwort und kontrolliert ein hochkomplexes Regulon, zu dem mehr als 500 Gene gehören.

In ungestressten Zellen ist die  $\sigma^s$ -Synthese gering und  $\sigma^s$  wird nach Bindung durch den Response-Regulator RssB, einen spezifischen  $\sigma^s$ -Erkennungsfaktor, durch die ClpXP-Protease unter ATP-Verbrauch degradiert. Dazu wird  $\sigma^s$  1 : 1 an phosphoryliertes RssB (RssB-P) gebunden, was zu einer  $\sigma^s$ -Konformationsänderung führt, die eine Bindung an ClpX erlaubt, welches  $\sigma^s$  entwindet und ins Innere der ClpP-Protease transloziert, wo es degradiert wird. RssB-P wird dabei nicht codegradiert, sondern abgelöst und kann, da es nicht dephosphoryliert wird, sofort das nächste  $\sigma^s$ -Molekül binden und dem Abbau zuführen. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, wie in gestressten Zellen die Synthese von  $\sigma^s$  zunimmt und die Proteolyse inhibiert wird. Dadurch steigt die  $\sigma^s$ -Konzentration stark an,  $\sigma^s$  kann sich in der Konkurrenz mit anderen Sigmafaktoren um Bindung an das RNAP-Kernenzym besser durchsetzen, wobei  $\sigma^s$  auch durch Bindung an die RNAP vor dem Zugriff durch RssB-P geschützt und dadurch stabilisiert wird.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, *wann* und *wodurch*  $\sigma^s$  im Verlauf des Wachstumszyklus in den beiden *E. coli* K12-Laborstämmen W3110 und MC4110 stabilisiert wird. Dafür wurden die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten und der  $\sigma^s$ -Gehalt gemessen. Zudem wurden der ATP-Gehalt sowie die zellulären Konzentrationen von Rsd und Crl, d.h. von Proteinen, die die Bildung von  $\sigma^s$ -RNAP unterstützen, bestimmt und untersucht, ob einer dieser Faktoren die  $\sigma^s$ -Proteolyse limitiert. Ergänzend wurde der Einfluss von Biosynthese und Proteolyse von  $\sigma^s$  auf den  $\sigma^s$ -Gehalt und auf die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  um das RNAP-Kernenzym untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verfügbarkeit von RssB-P und das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P die zentralen Schlüssel bei der Regulation des  $\sigma^s$ -Gehalts durch Proteolyse sind. In ungestressten Zellen sind die geringen Konzentrationen von  $\sigma^s$  und RssB-P fein aufeinander abgestimmt (die Expression von RssB ist selbst  $\sigma^s$ -abhängig und braucht daher ein Basalniveau von  $\sigma^s$ ), sodass trotz hohem ATP-Gehalt  $\sigma^s$  nicht komplett degradiert wird. In

der postexponentiellen Wachstumsphase steigt der  $\sigma^s$ -Gehalt stark an, der RssB-Gehalt folgt zunächst, kann aber nicht weiter Schritt halten, sobald die maximale Aktivierungsrate des *rssAB*-Promoters erreicht ist, sodass die Zellen schließlich mit  $\sigma^s$  „überschwemmt“ werden und RssB-P austitriert wird. Durch Phosphordonorentzug (die RssB-phosphorylierende Sensor kinase ArcB wird mit sinkendem Nährstoffgehalt inaktiviert) liegt RssB in der SP überwiegend nicht-phosphoryliert und damit inaktiv vor. Das resultiert, zusammen mit dem Absinken des ATP-Gehalts, in einer nahezu völligen Stabilisierung von  $\sigma^s$  und damit in der Akkumulation von freiem  $\sigma^s$  in der Zelle. Da parallel erstens die Bindung des vegetativen Sigmafaktors  $\sigma^{70}$  an das RNAP-Kernenzym durch den Anti- $\sigma^{70}$ -Faktor Rsd inhibiert wird, zweitens (p)ppGpp die Bindung alternativer Sigmafaktoren an die RNAP fördert und drittens Crl gezielt  $\sigma^s$  bei Bindung an die RNAP unterstützt, kann  $\sigma^s$  in der SP mit den anderen Sigmafaktoren erfolgreich um die Bindung an das RNAP-Kernenzym kompetitieren und die generelle Stressantwort initiieren.

Der Vergleich der *E. coli*-K12-Stämme W3110 und MC4100 deckte große Unterschiede zwischen beiden Stämmen auf. In W3110 wird  $\sigma^s$  bereits gegen Ende der postexponentiellen Phase stabilisiert. Der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt schafft in diesem Stamm die Basis für eine starke generelle Stressantwort, die in einer hohen Stressresistenz resultiert. In MC4100 hingegen wird  $\sigma^s$  nicht so früh stabilisiert, sondern geht zunächst in eine zwischengeschaltete Übergangsphase, in der  $\sigma^s$  sogar wieder instabiler wird. Die Bestimmung des Rsd-Gehalts zeigte, dass dieser im M4100 zu diesem Zeitpunkt so niedrig ist, dass  $\sigma^{70}$  sehr wahrscheinlich nicht sequestriert und so von der RNAP verdrängt werden kann. In Kombination mit dem geringeren (p)ppGpp-Gehalt (bedingt durch die *relA1*-Mutation) und dem geringeren  $\sigma^s$ -Gehalt ist die Sigmafaktorkompetitionseffizienz von  $\sigma^s$  in MC4100 zu Beginn der SP sehr wahrscheinlich zu gering, um  $\sigma^s$  effizient an die RNAP binden zu lassen. Das zeigt sich in einer geringeren Stressresistenz und Überlebensfähigkeit als bei W3110. Zusammen mit der erhöhten Wachstumsrate von MC4100, die zu Lasten der ATP-Ressourcen geht, belegt das die stärkere Degenerierung des MC4100 im Vergleich zum W3110.

Zusammengefasst führt diese Arbeit zum tieferen Verständnis der Regulation der Proteolyse von  $\sigma^s$  und zeigt erstmals quantitativ, wann und wodurch  $\sigma^s$  im Verlauf des Wachstumszyklus von *E. coli* stabilisiert wird. Durch vergleichende Untersuchung der beiden *E. coli* K12-Laborstämme W3110 und MC4100 konnten grundlegende neue Erkenntnisse zu zwei häufig benutzten Laborstämmen gewonnen werden, die für andere Arbeitsgruppen, die mit diesen Stämmen arbeiten, hochrelevant sind.

## SUMMARY

Sigma factors are subunits of RNA polymerase (RNAP), which recognize specific promoter sequences on the DNA, and thus control promoter recognition by RNAP. In addition to the vegetative sigma factor  $\sigma^{70}$  (RpoD), *E. coli* has six alternative sigma factors which recognize different classes of promoters and thus trigger different responses.  $\sigma^s$  (RpoS) is the master regulator of the general stress response and positively controls a highly complex regulon, which includes more than 500 genes.

In unstressed cells  $\sigma^s$  synthesis is very low and  $\sigma^s$ , after binding to the response regulator and specific  $\sigma^s$  recognition factor RssB, becomes degraded by the ATP-driven ClpXP protease.  $\sigma^s$  is directly bound in a 1 : 1 stoichiometry to phosphorylated RssB (RssB-P), which leads to a conformational change in  $\sigma^s$  and allows binding to ClpX, which unwinds and translocates  $\sigma^s$  into the ClpP protease, where it is degraded. RssB-P is not co-degraded but released and can, because it is not dephosphorylated, immediately bind the next  $\sigma^s$  molecule and promote its degradation. The present work investigates how the synthesis of  $\sigma^s$  increases and proteolysis is inhibited in stressed cells. Thereby the  $\sigma^s$  concentration increases strongly,  $\sigma^s$  efficiently competes with other sigmas for RNAP core enzyme and this binding to RNAP further stabilizes  $\sigma^s$ .

The central question of this study was *when* and *how*  $\sigma^s$  is stabilized along the growth cycle of the two *E. coli* K-12 laboratory strains W3110 and MC4110.  $\sigma^s$  half-lives and  $\sigma^s$  levels were determined. In addition, the cellular levels of ATP as well as of Rsd and Crl (i.e. two proteins that promote the formation of  $\sigma^s$ -RNAP) were measured, and it was investigated whether any of these factors limits the proteolysis of  $\sigma^s$ . Furthermore, the influence of  $\sigma^s$  biosynthesis and proteolysis for the  $\sigma^s$  level and for sigma competition for RNAP core enzyme were examined.

The results show that the availability of RssB-P and the ratio of  $\sigma^s$  : RssB-P are the central key in the regulation of  $\sigma^s$  levels by proteolysis. In unstressed cells the very low levels of  $\sigma^s$  and RssB-P level are finely balanced (since the expression of RssB itself depends on  $\sigma^s$  and therefore requires a basal level of  $\sigma^s$ ) and therefore  $\sigma^s$  is never completely degraded despite the high ATP level. During the postexponential growth phase the  $\sigma^s$  level strongly increases, with RssB initially following until the maximal rate of activation at the *rssAB* promoter is reached, so the cells are flooded with  $\sigma^s$  which titrates RssB. Due to reduced availability of the phosphodonor for RssB (the sensor kinase ArcB is inactivated

upon increasing nutrient limitation), RssB exists mainly in the non-phosphorylated and inactive form during stationary phase. This results, along with the lowering of the ATP level, in a nearly complete stabilization of  $\sigma^s$  and thus in the accumulation of free  $\sigma^s$  in the cell. Since in parallel (1) binding of the vegetative sigma factor  $\sigma^{70}$  to RNAP is inhibited by the anti- $\sigma^{70}$  factor Rsd, (2) (p)ppGpp promotes the binding of alternative sigma factors to the RNAP and (3) Crl supports  $\sigma^s$  binding to RNAP,  $\sigma^s$  can successfully compete with other sigma factors for RNAP core enzyme, bind to the RNAP and initiate the general stress response.

The comparison of the *E. coli* K12 strains W3110 and MC4100 revealed large differences between the two strains. In W3110  $\sigma^s$  is stabilized already during the end of the post-exponential phase. The high  $\sigma^s$  content in this strain creates the basis for a strong general stress response, which results in a pronounced stress resistance. In MC4100, however,  $\sigma^s$  is not stabilized so early, but an intermediary transition phase can be observed in which  $\sigma^s$  is even destabilized again. The Rsd content was found to be so low in M4100 at this point that  $\sigma^{70}$  very likely is not sequestered and cannot be displaced from the RNAP. In combination with the lower (p)ppGpp level (MC4100 carries the *relA1* mutation) and lower levels of  $\sigma^s$ , the sigma factor competition efficiency of  $\sigma^s$  most likely remains low at the beginning of the SP, so  $\sigma^s$  cannot successfully compete for binding to the RNAP in MC4100. This is reflected in reduced stress resistance and longterm survival compared with W3110. Along with the increased growth rate of the MC4100, which is at the expense of ATP resources, this shows the stronger degeneration of strain MC4100 compared to W3110.

In summary, this work will lead to a deeper understanding of the regulation of proteolysis of  $\sigma^s$  and, for the first time, it shows quantitatively when and how  $\sigma^s$  is stabilized during the growth cycle of *E. coli*. The comparative analyses of the two *E. coli* K-12 laboratory strains W3110 and MC4100 provided new insights about two frequently used laboratory strains that will be highly relevant to other groups who work with these strains.

# 1. EINLEITUNG

Mikroorganismen sind faszinierende Lebewesen, denen es als einzige Organismen gelungen ist, alle Lebensräume unserer Erde zu besiedeln. Selbst unter extremen Bedingungen, wie sie z. B. in Hydrothermalquellen, im polaren Ökosystem, in der tiefen Biosphäre der Erdkruste oder in Reaktorabklingbecken herrschen, können sie existieren (Battista, 1997; Krisko und Radman 2013; Madigan *et al.*, 2012; Slonczewski und Foster 2009). Bakterien haben aber nicht nur die Erde selbst, sondern auch sämtliche Organismen auf ihr besiedelt und leben in und auf ihnen (Blech, 2004; Lozupone *et al.* 2012).

Die Umwelt verändert sich permanent und abiotische Stressfaktoren sind ebenso wie die Fraß- und Infektionsgefahr allgegenwärtig. Mikroorganismen sind deshalb so erfolgreiche Besiedler, weil sie in der Lage sind, schnell und effizient an diese Stressfaktoren zu adaptieren. Das Darmbakterium *Escherichia coli* ist ein Generalist, das im Wasser, im Darm und im Boden leben kann und seinen Stoffwechsel entsprechend anpasst (Andersen *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 1995; Desmarais *et al.*, 2002; Munro *et al.*, 1995). Mikroorganismen wie *E. coli* können das, weil sie über eine sehr schnelle Signaltransduktion verfügen, die zu einer gezielten Regulation der Genexpression führt mit dem Ergebnis, dass funktionelle Gengruppen gezielt an- oder abgeschaltet werden, sodass Adaption möglich wird.

Die Signaltransduktion beginnt mit der Wahrnehmung eines Stimulus durch einen Sensor, welcher dadurch modifiziert wird. Signal kann z. B. die Synthese eines sekundären Botenstoffes sein oder die Phosphorylierung einer Sensorkinase. Anschließend wird das Signal an einen Regulator weitergegeben, der dann meist als Transkriptionsfaktor die Transkription einer oder mehrerer Operons aktiviert, sodass eine Antwort auf den Stimulus generiert wird. Klassische Signaltransduktionssysteme sind Zweikomponentensysteme (ZKS). Die erste Komponente besteht aus einem oder selten auch mehreren Sensorproteinen, die in der Membran lokalisiert sind und aus zwei Domänen bestehen. Mit der nach außen gerichteten Sensordomäne nehmen sie Umweltsignale wahr und leiten diese durch die Membran weiter an eine Kinasedomäne, die sich dadurch autophosphoryliert. Anschließend wird das Signal via Phosphotransfer an ein oder selten auch mehrere Response-Regulator-Proteine (die zweite Komponente der ZKS) weitergeleitet, die dadurch aktiviert werden und dann z. B. an die RNA-Polymerase (RNAP) binden und so als Transkriptionsaktivator oder -inhibitor die Genexpression regulieren (Goulian, 2010). Häufig werden die Regulator-Proteine oder die RNAP dabei zusätzlich selbst in ihrer Aktivität durch Inhibitoren oder

Aktivatoren reguliert. Neben dieser transkriptionalen Regulation kontrollieren Bakterien die Genexpression auch auf translationaler und posttranslationaler Ebene, z. B. durch kleine RNAs oder durch Proteolyse.

Insgesamt bietet die schnelle Informationsweiterleitung von Umweltreizen und die fein austarierte Regulation der Genexpression auf allen Ebenen Mikroorganismen hervorragende Bedingungen, um ganz gezielt Stoffwechsel-, Signal- oder Transportwege oder auch Schutz- oder Regulatorproteine zu aktivieren, die als Antwort auf die momentan vorhandene Umweltbedingung *nützlich* sind. Diese Fähigkeit zur schnellen Informationsverarbeitung und Adaption ist der entscheidende Grund, weshalb Mikroorganismen so erfolgreiche Besiedler sind und seit ca. 3.5 Milliarden Jahren auf unserer Erde existieren (Knoll, 2003; Madigan *et al.*, 2012).

## 1.1. Struktur und Funktion der RNA-Polymerase und ihrer Sigmafaktoren

Die Transkription und insbesondere die Initiation der Transkription gehören zu den wichtigsten Angriffspunkten der Regulation der Genexpression, da hier gezielt entschieden werden kann, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht (Feklistov, 2013; Saecker *et al.*, 2011).

### 1.1.1. Struktur und Funktion der RNAP

Die Transkription wird durch das Enzym DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) katalysiert. Das RNAP-Kernenzym (RNAPK) hat eine Größe von ca. 400 kDa (Vassylyev, 2002) und besteht aus den fünf Untereinheiten (UE)  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\omega$  (Lonetto *et al.*, 1992), die zusammen mit der sechsten UE  $\sigma$  das RNAP-Holoenzym (RNAPH) bilden. Das Kernenzym kann unspezifisch an die DNA binden, die Erkennung von Transkriptionsstartpunkten ist jedoch nur mit Hilfe von  $\sigma$  möglich (Burgess *et al.*, 1969; Travers und Burgess, 1969).

Die beiden  $\alpha$ -UE sind für die Stabilität des RNAP-Komplexes notwendig. Mit der N-terminalen Domäne (ND) ist die  $\alpha$ -UE mit der RNAP verankert, während die C-terminale Domäne (CD), die vorwiegend positiv geladene Aminosäuren (AS) enthält, nach außen ragt und mit der negativ geladenen DNA im Bereich eines UP-Elements interagiert. Dadurch wird die RNAP im Promotorbereich festgehalten und stabilisiert (Ross *et al.*, 1993). Die  $\beta$ - und  $\beta'$ -UE formen zusammen eine katalytische Tasche mit einem  $Mg^{2+}$ -Ion im Zentrum. Die

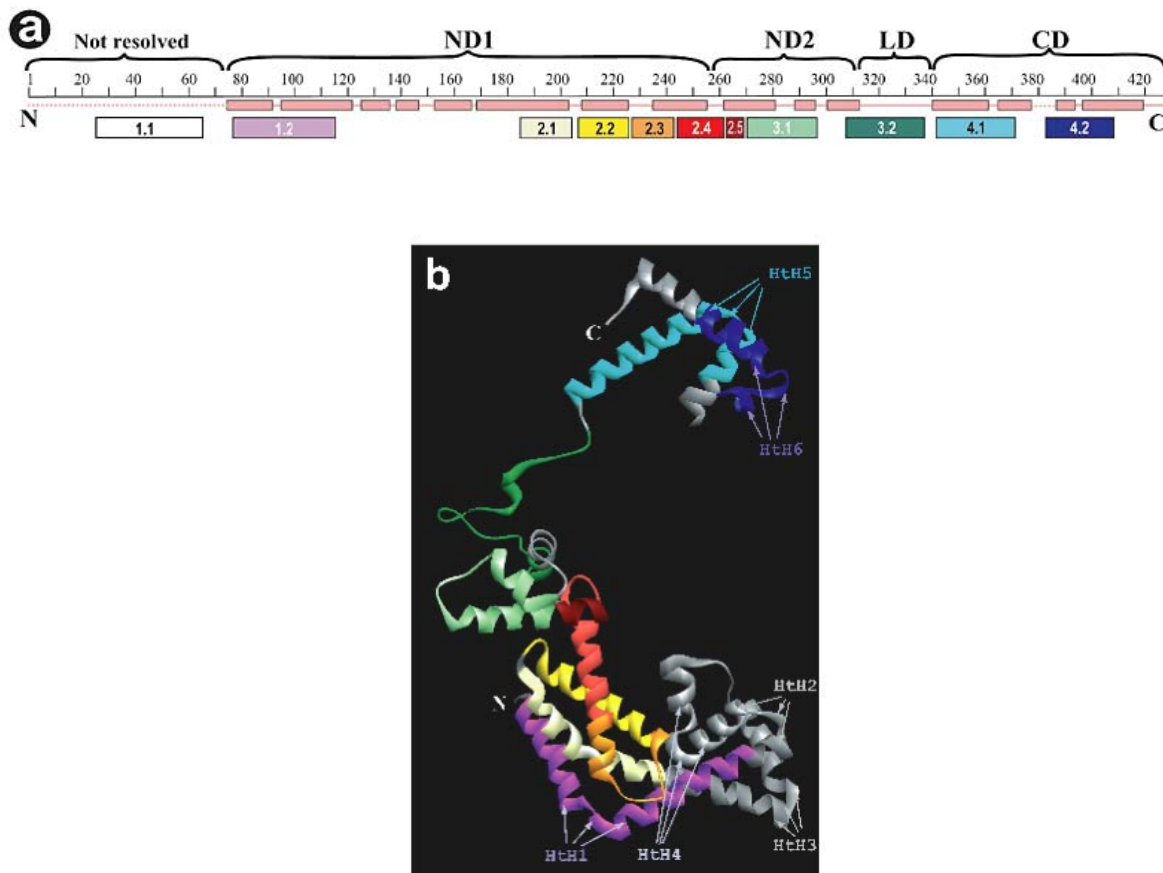
$\omega$ -UE spielt eine Rolle bei Hitzestress und fördert außerdem die Bindung des primären (vegetativen) Sigmafaktors an das RNAPK (Gunnellius *et al.*, 2014 und 2014a). Die  $\sigma$ -UE erkennt Promotoren und initiiert die Transkription.

Die RNAP katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen Ribonukleotiden während der Elongation der Transkription und ermöglicht so die RNA-Synthese. Dazu bindet das RNAPK zunächst unspezifisch an die DNA und wandert auf ihr entlang, bis es mit Hilfe der  $\sigma$ -UE Konsensussequenzen im Promotorbereich eines Gens erkennt. Dort wird es mit Hilfe der beiden  $\alpha$ -UE stabilisiert und so in Position gebracht, dass es die DNA umschlingt. Klassische Konsensussequenzen sind das  $-10$  und  $-35$ -Element, das sind hochkonservierte Hexamere mit definierter DNA-Sequenz (Gilbert, 1976; Maniatis *et al.*, 1975; Pribnow, 1975; Schaller *et al.*, 1975). Zur Initiation der Transkription wird im aktiven Zentrum des RNAPK die DNA im Bereich um das  $-10$ -Element aufgeschmolzen (Gries *et al.*, 2010), sodass ein offener Komplex entsteht und eine lineare DNA-Matrize für den Transkriptionsstart zur Verfügung steht. Dann wird die Transkription *de novo* gestartet. Während der nun folgenden Elongation wird die DNA schrittweise durch die RNAP hindurch geschoben und dabei in RNA umgeschrieben. Die Elongation kann durch das RNAPK allein realisiert werden, daher wird die  $\sigma$ -UE meist abgelöst (Mooney *et al.*, 2005). Die Elongation endet am Terminationspunkt. Dieser Punkt weist häufig auf einem kurzen DNA-Abschnitt inverted repeats auf, sodass die mRNA eine Haarnadelstruktur bildet, die von der RNAP erkannt wird und eine weitere Elongation unmöglich macht. Die RNA-Synthese endet und das RNAPK fällt ab. Alternativ kann die Termination durch das Protein Rho ausgelöst werden.

### 1.1.2. Struktur und Funktion der bakteriellen Sigmafaktoren

Die bakterielle Genregulation ist hochspezifisch und exzellent angepasst an die jeweiligen Umweltbedingungen. Diese Spezifität wird durch Sigmafaktoren vermittelt. Sigmafaktoren sind UE der RNAP, die Promotorsequenzen auf der DNA binden und damit die Promotorerkennung des RNAP kontrollieren (deHaseth *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1992; Gruber und Gross, 2003). Sie sind fast ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut und bestehen aus den vier Domänen: ND1 und ND2, einem ca. 300 bp langem Linker (LD) und der CD (Hermann *et al.*, 1988; Lonetto *et al.*, 1992; Vassylyev, 2002). Region 4.2 der CD vermittelt die Erkennung des  $-35$ -Elements und Region 2.4 vermittelt die Erkennung des  $-10$ -Elements

(Barne *et al.*, 1997). Das Aufschmelzen der DNA im Bereich des  $-10$ -Elements als initiiierender Schritt der Transkription wird von Region 2.3 der ND1 vermittelt (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Domänenorganisation und Struktur von Sigmafaktoren am Beispiel von  $\sigma^{70}$  aus *Thermus thermophilus*.** Kristallstruktur von  $\sigma^{70}$  in einer Auflösung von 2.6 Å. (A) Domänenorganisation der konservierten Regionen.  $\sigma^{70}$  besteht aus zwei N-terminalen Domänen (ND1 und ND2) und einer C-terminalen Domäne (CD), die durch einen Linker getrennt sind (LD). (B) Ribbon-Diagramm. Der verwendete Farbcode ist identisch mit dem Farbcode in Abbildung A. ND1 umfasst Region 1.2 bis 2.4 N-terminal und hat eine U-förmige Struktur, die aus acht  $\alpha$ -Helices und vier Helix-turn-Helix-Motiven (HTH) besteht. ND1 ist mit ND2 über einen Linker verbunden. ND2 umfasst die Regionen 2.4–2.5 und 3.1 und bildet eine Tasche aus drei  $\alpha$ -Helices. ND1 und ND2 sind mit der CD über einen 30 Aminosäure-langen Linker verbunden, der ungefalteter ist und in der Mitte eine Haarnadelstruktur bildet. Die CD umfasst die Regionen 4.1 und 4.2 und besteht aus vier  $\alpha$ -Helices und zwei HTH. (Vassilyev *et al.*, 2002)

Bakterien besitzen mehrere Sigmafaktoren, die unterschiedliche Klassen von Promotoren erkennen (Gruber und Gross, 2003; Wösten, 1998). Sie werden in zwei große Gruppen eingeteilt, die  $\sigma^{70}$ -Familie und die  $\sigma^{54}$ -Familie (Paget, 2015). Die  $\sigma^{70}$ -Familie umfasst eine Vielzahl von Sigmafaktoren und wird weiter untergliedert in vier Gruppen, wobei Gruppe 1 die vegetativen Sigmafaktoren repräsentiert und Gruppe 2–4 alternative Sigmafaktoren



(Paget, 2015). Die vier Gruppen werden nach dem Vorhandensein bzw. Fehlen der vier konservierten Regionen 1.1, 1.2–2.4, 3.0–3.2 und 4.1–4.2 unterschieden (Lonetto *et al.*, 1992; Paget und Helmann, 2003). Die vegetativen Sigmafaktoren der Gruppe 1 besitzen alle vier konservierten Regionen. Sigmafaktoren der Gruppe 2 fehlt, wie allen alternativen Sigmafaktoren, die Region 1.1. Sie sind funktionell in die Adaption an Stress, insbesondere bei Nährstoffmangel, sowie in andere Stressantworten, die mit der SP assoziiert sind, involviert (Paget, 2015). Alternative Sigmafaktoren der Gruppe 3 sind strukturell divers und funktionell in die Flagellensynthese, die Hitzeschock-Antwort und die Sporulation involviert (Paget, 2015; Paget und Helmann, 2003; Wösten, 1998). Zur Gruppe 4 gehören Sigmafaktoren, die auf extracytoplasmatische Signale reagieren (ECF). Die Sigmafaktoren der  $\sigma^{54}$ -Familie unterscheiden sich in Struktur und Funktion deutlich von der  $\sigma^{70}$ -Familie und sind u. a. am Aufschmelzen der DNA beteiligt (Zhang und Buck, 2015).

*E. coli*, mit dem in dieser Arbeit experimentiert wurde, besitzt sieben verschiedene Sigmafaktoren. Es verfügt wie alle gramnegativen Organismen über den vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^{70}$  ( $\sigma^D$ , RpoD). Vegetative Sigmafaktoren erkennen Promotoren mit den „Standard“- -10 und -35-Elementen und tolerieren darüber hinaus nur Spacerlängen von 17bp +/- 1 zwischen beiden Elementen (Devi *et al.*, 2010). Diese finden sich typischerweise im Promotorbereich von Genen, die für die Transkription von während des Wachstums benötigten Genen notwendig sind. Weiterhin gibt es in *E. coli* die sechs alternativen Sigmafaktoren  $\sigma^{19}$  ( $\sigma^{fecI}$ , FecI),  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ , RpoE),  $\sigma^{28}$  ( $\sigma^F$ , RpoF, FliA),  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ , RpoH),  $\sigma^{38}$  ( $\sigma^S$ , RpoS) und  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ , RpoN). Diese sind nicht essentiell, sondern vermitteln die Transkription von spezifischen Genen, die abhängig von Umweltbedingung, Wuchs- und Differenzierungsphase benötigt werden und lösen unterschiedliche physiologische Antworten aus.  $\sigma^S$ , der in dieser Arbeit untersucht wurde, gehört zur Gruppe 2 der  $\sigma^{70}$ -Familie.

### 1.1.3. Promotorselektivität und das $\sigma^S$ -Promotor-Selektivitäts-Paradoxon

Wie wird sichergestellt, dass die richtigen Gene exprimiert werden? Zum einen werden alternative Sigmafaktoren nur bei bestimmten Signalen aktiv und konkurrieren auch nur dann mit  $\sigma^{70}$  um das RNAPK. Weiterhin sind in der Zelle weniger RNAP-Moleküle vorhanden als Sigmafaktoren (Grigorova *et al.*, 2006; Gruber und Gross, 2003; Maeda *et al.*, 2000), sodass die Sigmafaktoren um das RNAPK konkurrieren und nur der Sigmafaktor mit der höchsten Konkurrenzkraft an das RNAPK binden kann und folglich nur die entsprechenden Gene

exprimiert werden. Die Konkurrenzeffizienz der Sigmafaktoren wird durch ihre Affinität an das RNAPK, durch ihre Konzentration und durch Aktivatoren oder Inhibitoren moduliert. So akkumuliert z. B.  $\sigma^s$  in der SP und wird gleichzeitig durch das Crl-Protein bei der Bindung an das RNAPK unterstützt (Typas *et al.*, 2007a), während parallel  $\sigma^{70}$  teilweise durch den Anti- $\sigma^{70}$ -Faktor Rsd (Ishihama, 1999; Mitchell *et al.*, 2007; Sharma und Chatterji, 2010) sequestriert wird und außerdem durch 6S-RNA inhibiert wird (Trotochaud und Wassarman, 2005), sodass seine Konkurrenzeffizienz sinkt. Zusätzlich bindet das Alarmon Guanosintetraphosphat bzw. Guanosinpentaphosphat ((p)ppGpp) an das RNAPK und verändert dessen Konformation so, dass  $\sigma^{70}$  schlechter daran binden kann, während alternative Sigmafaktoren von der Konformationsänderung profitieren (Sharma und Chatterji, 2010).

Ein weiterer Punkt ist, dass sich die Konsensussequenzen und die Spacerlängen von -10 und -35-Element sowie von -10-Element und +1-Transkriptionsstartpunkt verschiedener funktioneller Gengruppen geringfügig voneinander unterscheiden (Gruber *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 1999).  $\sigma^{70}$  erkennt sogenannte vegetative Promotorsequenzen, während alternative Sigmafaktoren jeweils unterschiedliche Promotoren-Sets mit alternativen Konsensussequenzen und teilweise anderen Spacerlängen erkennen. Abhängig von der Art des gebundenen Sigmafaktors werden dadurch vom RNAP unterschiedliche Promotorbereiche erkannt und folglich verschiedene funktionelle Gengruppen transkribiert. Promotoren sind also hochselektiv für Sigmafaktoren und nur wenige Promotoren werden von mehreren Sigmafaktoren erkannt. Weiterhin unterliegen die Sigmafaktoren selbst der Regulation und die Transkription wird außerdem durch Transkriptionsfaktoren reguliert.

$\sigma^s$  unterscheidet sich von anderen alternativen Sigmafaktoren dadurch, dass er sehr eng mit  $\sigma^{70}$  verwandt ist (Hengge, 2011; Typas, 2007). Insbesondere die Regionen 2.4 und 4.2, die die Erkennung der -10 und -35-Konsensussequenzen vermitteln, stimmen in den DNA-Sequenzen fast vollständig überein und die optimale -10-Region von  $\sigma^s$  und  $\sigma^{70}$  abhängigen Genen ist fast identisch (Gaal *et al.*, 2001). Daher erkennen  $\sigma^s$  und  $\sigma^{70}$  annähernd dieselben Konsensussequenzen (Hengge-Aronis, 1996a; Loewen und Hengge-Aronis, 1994; Tanaka *et al.*, 1995) und binden *in vitro* an nahezu identische -10 und -35-Elemente (Gaal *et al.*, 2001). Deshalb werden viele Promotoren *in vitro* und *in vivo* sowohl von  $\sigma^s$ -haltiger RNAP ( $E\sigma^s$ ) als auch von  $\sigma^{70}$ -haltiger RNAP ( $E\sigma^{70}$ ) erkannt (Altuvia *et al.*, 1994; Bordes *et al.*, 2000; Raffaele *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1993; Wade *et al.*, 2006). Dennoch kontrollieren beide Sigmafaktoren *in vivo* unterschiedliche Regulons (Checroun *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005) und haben unterschiedliche physiologische Funktion, sodass sich die Frage stellt, wie trotz

struktureller Übereinstimmung die unterschiedlichen Funktionen realisiert werden. Die Lösung für dieses als  $\sigma^s$ -Promotor-Selektivitäts-Paradoxon bekannte Phänomen (Hengge, 2011; Hengge-Aronis, 2002a; Typas *et al.*, 2007) besteht aus unterschiedlichen Kombinationen von cis-agierenden Promotoren und trans-agierenden Proteinen, die es erlauben zu unterscheiden, ob ein Promotor von  $E\sigma^s$  oder von  $E\sigma^{70}$  oder von beiden erkannt wird (Hengge, 2011; Hengge-Aronis, 2002a; Typas *et al.*, 2007; Landini *et al.*, 2014).

Viele  $\sigma^s$ -abhängige Promotoren haben partielle UP-Elemente (Gourse *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1993). Das sind AT-reiche Elemente, die sich etwa an Position -40 bis -56 befinden (Hengge, 2011). Ein volles UP-Element (z. B. bei ribosomalen Promotoren) besteht aus zwei asymmetrischen sequenzspezifischen Halbseiten, die entgegengesetzt proximal und distal zum Transkriptionsstartpunkt liegen. Diese Halbseiten interagieren mit der  $\alpha$ -CD des RNAPK (Estrem *et al.*, 1999; Gourse *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1993), wodurch dieses im Promotorbereich stabilisiert wird, sodass die Transkriptionswahrscheinlichkeit steigt (Estrem *et al.*, 1998 und 1999). Sequenzunterschiede in Region 4 von  $\sigma^s$  und  $\sigma^{70}$  (Typas und Hengge 2005) führen dazu, dass  $E\sigma^s$  bevorzugt distale UP-Element-Halbseiten erkennt (Typas und Hengge, 2005 und 2006), während  $E\sigma^{70}$  eher proximale Halbseiten oder volle UP-Elemente erkennt (Estrem *et al.*, 1999; Typas und Hengge, 2005). Daher erhöhen distale UP-Element-Halbseiten die Selektivität für  $E\sigma^s$  (Typas und Hengge, 2005).

Daneben gibt es weitere minimale, aber wichtige Sequenzunterschiede im Promotorbereich von  $\sigma^s$  und  $\sigma^{70}$ -abhängigen Genen, die die Selektivität für  $E\sigma^s$  erhöhen (Hengge, 2011; Landini *et al.*, 2014; Typas *et al.*, 2007). Insbesondere steigert ein C(-13) eventuell gefolgt von einem T(-14) die Selektivität für  $E\sigma^s$  drastisch (Becker und Hengge-Aronis, 2001; Gaal *et al.*, 2001), da C(-13) direkt mit Lysin173 von  $\sigma^s$  interagiert, während  $E\sigma^{70}$  an dieser Stelle ein Glutamat hat, welches besser mit G(-13) interagiert (Becker und Hengge-Aronis, 2001; Hengge, 2011). C(-13) ist auch daran beteiligt, zu lange Spacerlängen zwischen dem -10 und -35-Element zu tolerieren (Typas *et al.*, 2006).  $E\sigma^s$  akzeptiert generell weniger optimale Spacerlängen von +/-2 bp zwischen dem -35 und dem -10-Element, während  $\sigma^{70}$  strukturell unflexibler ist und dies nicht tut (Singh *et al.*, 2011; Typas und Hengge, 2006). Daher erhöhen nicht optimale Spacerlängen die  $\sigma^s$ -Selektivität (Typas *et al.*, 2006). Weiterhin erleichtert AT-Reichtum zwischen dem -10-Element und +1 bei  $\sigma^s$ -abhängigen Promotoren die Bildung des offenen Komplexes, das stimuliert die Transkription (Lee und Gralla, 2001; Ojangu *et al.*, 2000; Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002; Typas *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2005).

Das  $\sigma^s$ -Selektivitäts-Paradoxon wird zusätzlich gelöst durch Effektoren wie z. B. DNA Supercoiling (Bordes *et al.*, 2003; Kusano *et al.*, 1996) oder Osmolarität (Ding *et al.*, 1995) und durch Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CRP, IHF oder H-NS (Colland *et al.*, 2000; Dorman, 2004; Fang und Rimsky, 2008; Germer *et al.*, 2001; Mangan *et al.*, 2006).

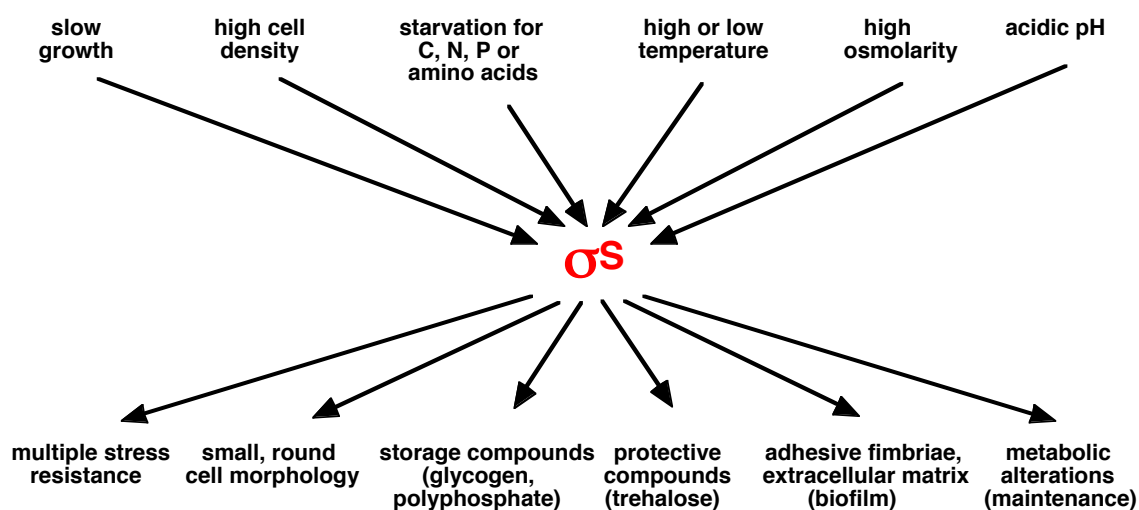
## 1.2. Die $\sigma^s$ -abhängige generelle Stressantwort in *Escherichia coli*

Grundsätzlich werden zwei Arten von Stressantworten unterschieden. Bei den spezifischen Stressantworten reagiert die Zelle gezielt auf einen einzelnen Stress z. B. durch Abbau des Stress-Agens, Flucht (erhöhte Motilität) oder Reparatur. Bei diesem Antworttyp unterscheidet sich die Reaktion je nach Stressfaktor. Die generelle Stressantwort (zur Übersicht Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2009 und 2011; Hengge-Aronis, 2002b; Klauck *et al.*, 2007) ist hingegen eine globale Stressantwort, die bei sehr vielen unterschiedlichen Stresssignalen einen bestimmten, sehr globalen Antworttyp hervorruft. Sie dient einerseits als schnelle Notfallreaktion (Hengge-Aronis, 1996a und 2000) und vermittelt andererseits der Zelle einen umfangreichen Langzeitschutz vor verschiedenen, auch unbekannten und momentan nicht vorhandenen Stressfaktoren durch Kreuzprotektion (Hengge-Aronis, 2000; Jenkins *et al.*, 1988 und 1990; Lange und Hengge-Aronis, 1991; McCann *et al.*, 1991). Hier wirkt sie protektiv, indem sie die Zelle durch Veränderungen der Zellmorphologie, Adaption der Stoffwechselwege und Aktivierung von Schutzsubstanzen multiresistent macht und so vor Schäden bewahrt (Givskov *et al.* 1994; Hengge, 2011; Hengge-Aronis, 1996; Lange und Hengge-Aronis, 1991 und 1991a; Martinez-Garcia *et al.*, 2001; McCann *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1999 und 2002).

Die generelle Stressantwort wird durch den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^s$  kontrolliert. Auf molekularer Ebene steigt unter verschiedenen Stressbedingungen wie hyperosmotischem Shift (Bearson *et al.*, 1996; Hengge-Aronis, 1996b; Heuveling *et al.*, 2008; Muffler *et al.*, 1996a), Hitzeschock (Muffler *et al.*, 1997), DNA-Schäden (Merrikh *et al.*, 2009) oder hoher Zelldichte (Lange und Hengge-Aronis, 1994) der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt in kurzer Zeit stark an. Dadurch steigt die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  im Wettbewerb mit den anderen Sigmafaktoren um Bindung an das RNAPK, sodass vermehrt  $E\sigma^s$ -Komplexe entstehen und die generelle Stressantwort generiert werden kann (Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2009 und 2011; Hengge-Aronis, 2002c). Physiologisch ändert sich durch diese Stressantwort der zelluläre Lebensstil, da die Zellen vom Wachstums- in den Überlebensmodus wechseln und

dort, ausgestattet mit einer Vielzahl von Resistenzen, auf bessere Umweltbedingungen warten (Abb. 1.2).

Die generelle Stressantwort stellt die Funktion des  $\sigma^S$ -Regulons dar, das mehr als 10 % des *E. coli*-Genoms repräsentiert (Lacour und Landini, 2004; Weber *et al.*, 2005). Zum  $\sigma^S$ -Regulon gehören nicht nur Gene, die als direkte Stressantwort exprimiert werden, sondern auch Gene, die für untergeordnete Regulatoren von Signaltransduktionswegen kodieren. Diese Regulatoren kontrollieren funktionale Module innerhalb der generellen Stressantwort wie z. B. die Biofilmbildung (Weber *et al.*, 2005).  $\sigma^S$  ist also der Masterregulator eines hochkomplexen Regulons. Dieses dient als Modellsystem für Signaltransduktion in großen zellulären Netzwerken (Hengge, 2009 und 2011; Hengge-Aronis, 2002b; Klauck *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2005).



**Abb. 1.2: Signalinput und phänotypischer Output der generellen Stressantwort.** Verschiedene Stressbedingungen führen zur Akkumulation des Masterregulators der generellen Stressantwort  $\sigma^S$  und in Folge davon zu umfangreichen phänotypischen Veränderungen. (Hengge, 2011)

### 1.2.1. Die zelluläre Adaption im Verlauf des Wachstumszyklus

Die generelle Stressantwort wurde als typische Reaktion in der Stationärphase entdeckt (Lange und Hengge-Aronis, 1991a). Daher stehen Stressantworten in engem Zusammenhang mit den zellulären Wachstumsphasen. Prinzipiell lassen sich in *E. coli* fünf Wachstumsphasen voneinander abgrenzen: Anlaufphase/ lag-Phase (AnP), Exponentielle Phase/ Log-Phase (LP), Postexponentielle Phase (PP), Stationäre Phase (SP) und Absterbephase (AbP). Die Masterregulatoren dieser Wachstumsphasen sind die Sigmafaktoren  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^F$  und  $\sigma^S$  (Chevance

und Hughes, 2008; Costanzo und Ades, 2006; Gruber und Bryant, 1997; Hengge, 2011; Hengge-Aronis, 2000 und 2002b) und jede Wachstumsphase wird durch einen dieser Masterregulatoren dominiert.

In der AnP sind die Zellen einer neuen Umwelt ausgesetzt und müssen daran adaptieren. Während vorher meist Hunger herrschte, ist das Nährstoffangebot nun gut. Das bedeutet, dass die Zellen vom Überlebens- in den Wachstumsmodus wechseln. Dazu wird die Genexpression von der Regulation durch alternative Sigmafaktoren auf die Regulation durch  $\sigma^{70}$  umgestellt und ist dann dafür optimiert, die vorhandenen Kohlenstoffquellen zu verwerten und Ribosomen- und Proteinbiosynthese zu betreiben. Diese Adaption dauert in *E. coli* in reichem Medium (LB-Medium) wenige Minuten, in dieser Zeit ist das Wachstum sehr gering.

In der LP ist die Adaption abgeschlossen und  $\sigma^{70}$  dominiert die Genexpression. Die Zellen befinden sich im Wachstumsmodus. Die Nährstoffsituation ist exzellent und die Wachstums- und Zellteilungsrate sind maximal (Hengge, 2011).

Mit der Zeit wird entweder die verwertete optimale Kohlenstoffquelle knapp oder eine andere Stresssituation tritt auf, sodass die Lebensbedingungen suboptimal werden, das Wachstum langsamer wird und die Zellen in die PP eintreten. In LB-Medium ist dies bei einer optischen Dichte (OD) von etwa 0,3 der Fall (Sezenov *et al.*, 2007). Mögliche Reaktionen darauf sind abhängig vom jeweiligen Stressauslöser. Allen gemeinsam ist, dass die durch  $\sigma^{70}$  kontrollierte Genexpression suboptimal wird. Charakteristisch in dieser Phase ist der Anstieg des sekundären Botenstoffes cAMP, das mit Hilfe des Effektors CRP nun die Genexpression moduliert. Das führt u. a. zur Aktivierung alternativer, energetisch ungünstigerer Stoffwechselwege (Ferenci, 2001; Hollands *et al.*, 2007) und zur Expression des flagellaren Masterregulators FlhDC, einem flagellaren Klasse 1-Genprodukt, der dann flagellare Klasse 2 Gene, wozu u. a.  $\sigma^F$  gehört, aktiviert, sodass  $\sigma^F$  akkumuliert und mit  $\sigma^{70}$  um Bindung an das RNAPK kompetitiert (Chevance und Hughes, 2008; Chilcott und Hughes, 2000; Soutourina *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005). Als Folge davon wird zeitlich abgestuft die Expression der flagellaren Struktur- und Regulatorproteine aktiviert, sodass Flagellen synthetisiert werden und die Zellen motil werden (Barembach und Hengge, 2007; Chevance und Hughes, 2008; Kalir und Alon, 2004; Smith und Hoover, 2009). Auf molekularer Ebene kommt zu  $\sigma^{70}$ - auch  $\sigma^F$ -abhängige Genexpression hinzu, was auf physiologischer Ebene zum motilen Lebensstil führt, der die Möglichkeit eröffnet, einen neuen Lebensraum aufzusuchen, um die Stresssituation, die zur Auslösung der PP geführt hat, zu beenden (Adler und Templeton, 1967; Amsler *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007). Neben  $\sigma^F$  beginnt auch  $\sigma^S$  zu

akkumulieren, kompetitiert aber noch nicht effizient um Bindung an das RNAPK, sodass  $\sigma^F$  sich im Wettstreit mit  $\sigma^S$  um das RNAPK behauptet. Gewährleistet wird das auch durch FlhDC, das nicht nur die flagellare Genkaskade aktiviert, sondern auch die Genexpression des Anti- $\sigma^S$ -Faktors FliZ aktiviert (Pesavento *et al.*, 2008; Pesavento und Hengge, 2012).

Im Verlauf der PP steigt der Gehalt an (p)ppGpp. (p)ppGpp ist ein zelluläres Signalmolekül (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008; Srivatsan und Wang, 2008), das u. a. bei Aminosäuremangel akkumuliert und dann die stringente Antwort auslöst, bei der durch Bindung von (p)ppGpp an die RNAP die Expression der rRNA und tRNA inhibiert wird, sodass eine Adaption an den Aminosäuremangel erreicht wird (Srivatsan und Wang, 2008; Stent und Brenner, 1961; Traxler *et al.*, 2008). Mechanistisch bleiben bei Aminosäuremangel die tRNAs während der Translation unbeladen. Das führt dazu, dass diese tRNAs an der A-site des Ribosoms binden. Diese Erkennung führt zum Abbruch der Translation und aktiviert parallel die (p)ppGpp-Synthase RelA, die an den Ribosomen lokalisiert ist (Haseltine und Block, 1973; Richter, 1976; Wendrich *et al.*, 2002). RelA überträgt Phosphatreste von ATP auf GTP oder GDP, sodass (p)ppGpp und AMP entstehen (Cashel *et al.*, 1996; Cashel und Gallant, 1969; Edlin und Broda, 1968; Gallant, 1979; Metzger *et al.*, 1988). (p)ppGpp akkumuliert daraufhin und bindet mit Hilfe des Transkriptionsfaktors DksA an die  $\beta$ -UE der RNAP (Chatterji *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1995) im Transkriptionsbereich von rRNA-kodierenden Genen (Artsimovitch *et al.*, 2004). Das verringert die Halbwertszeit der offenen Komplexe während der Transkriptionsinitiation, wodurch die Transkriptionsrate abnimmt und der zelluläre rRNA-Gehalt sinkt (Barker *et al.*, 2001; Cashel *et al.*, 1996; Maaloe und Kjeldgaard, 1966; Raghavan und Chatterji, 1998). Da die Expression vom rRNA-Gehalt abhängt, wird so die Translation inhibiert (Paul *et al.*, 2004).

SpoT ist eine zweite (p)ppGpp-Synthase (Hernandez und Bremer, 1991; Laffler und Gallant, 1974), die homolog zu RelA ist (Metzger *et al.*, 1989), jedoch durch Kohlenstoffmangel (Xiao *et al.*, 1991), Eisenmangel (Vinella *et al.*, 2005) oder Fettsäuremangel (Battesti und Bouveret, 2006) aktiviert wird. SpoT ist bifunktional und arbeitet als Synthase und Hydrolase von (p)ppGpp und reguliert so den zellulären (p)ppGpp-Gehalt (Xiao *et al.*, 1991).

Die (p)ppGpp-Synthase wird bei einer Vielzahl von Signalen aktiviert (Potrykus *et al.*, 2011) und führt beim Übergang von der PP zur SP zu umfassenden Veränderungen der Genexpression. So werden z. B. die DNA-Replikation, die Lipidsynthese und die Zellteilung

inhibiert (Åberg *et al.*, 2009; Durfee *et al.*, 2008; Magnusson *et al.*, 2005; Traxler *et al.*, 2008) und die generelle Stressantwort aktiviert (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008). Es ist bekannt, dass die regulatorischen Effekte durch (p)ppGpp dosisabhängig sind und zwei Gruppen von (p)ppGpp-abhängigen Genen existieren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden (Traxler *et al.*, 2011). Bei moderatem (p)ppGpp-Gehalt wird, bedingt durch die geringere ribosomale Genexpression, viel RNAPH frei, das nun für andere Promotoren mit geringerer Affinität für  $E\sigma^{70}$  wie den *rpoS*-Promotor  $P_{rpoS}$  zur Verfügung steht. Bei höherem (p)ppGpp-Gehalt haben dann praktisch alle RNAP-Moleküle (p)ppGpp gebunden. Das macht das RNAPH empfänglicher für alternative Sigmafaktoren (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008; Sharma und Chatterji, 2010), da (p)ppGpp mit der RNAP interagiert (Chatterji *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2009; Touloukhonov *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2013) und die Transkription von Genen mit GC-reichen Promotoren, wie sie typisch für  $\sigma^{70}$ -abhängige Gene sind, inhibiert, während gleichzeitig die Transkription von Genen mit AT-reichen Promotoren, wie sie für  $\sigma^s$  typisch sind, aktiviert wird.

Eine hohe (p)ppGpp-Konzentration aktiviert außerdem direkt die Expression von  $\sigma^s$ , sodass der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt und damit die Konkurrenz von  $\sigma^s$  um Bindung an das RNAPK steigen (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008). Gleichzeitig verringert sie die Affinität von  $\sigma^{70}$  an das RNAPK (Jishage *et al.*, 2002). Dadurch unterstützt (p)ppGpp die Akkumulation und Stabilisierung von  $\sigma^s$  (Gentry *et al.*, 1993; Jishage *et al.*, 2002) und schafft so die Grundlage für die Auslösung der generellen Stressantwort zu Beginn der SP. Der Anstieg von (p)ppGpp während der PP ist essentiell, damit die Zellen in die SP eintreten können (Potrykus und Cashel, 2008).

Wenn sich die Umweltbedingungen weiter verschlechtern, treten die Zellen in die SP ein (Kolter *et al.*, 1993). Meist ist massiver Nährstoffmangel die Ursache, möglich sind aber auch veränderte osmolare Bedingungen, Temperatur- oder pH-Änderung und andere Stressfaktoren. Charakteristisch in der SP (zur Übersicht: Battesti *et al.* 2011, Hengge, 2008; Navarro Llorens *et al.*, 2010) sind der sinkende Einfluss von FlhDC und  $\sigma^F$ , die nun degradiert werden (Barembuch und Hengge, 2007; Kitagawa *et al.*, 2011; Pesavento *et al.*, 2008; Tomoyasu *et al.*, 2002 und 2003), während parallel der  $\sigma^s$ -Gehalt weiter steigt, sodass es zum Sigmafaktorwechsel an der RNAP kommt und  $\sigma^s$  die Kontrolle über die Genregulation übernimmt. (Ergänzend soll erwähnt werden, dass in der SP nicht nur  $\sigma^s$  akkumuliert, sondern auch der Gehalt anderer alternativer Sigmafaktoren steigt. Insbesondere  $\sigma^E$  steigt zu Beginn der SP an (Constanzo *et al.*, 2008; Constanzo und Aedes, 2006; Gopalkrishnan *et al.*, 2014).



Der Sigmafaktorwechsel an der RNAP wird durch einen Anstieg des zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts zu Beginn der SP eingeleitet (Battesti *et al.*, 2011 und 2015; Hengge, 2008; Hengge-Aronis, 2002c), sodass  $\sigma^s$  mit  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^F$  um das RNAPK kompetitiert. Die  $\sigma^s$ -Molekülzahl beträgt jedoch maximal ein Drittel von  $\sigma^{70}$  (Jishage *et al.*, 1996) und  $\sigma^s$  hat darüber hinaus von allen Sigmafaktoren die geringste Bindungsaffinität an das RNAP *in vitro* (Colland *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993), sodass  $\sigma^s$  nur dann eine Chance hat, an das RNAPK zu binden, wenn die Bindungsaffinität von  $\sigma^{70}$  an das RNAPK reduziert und die Bindungsfähigkeit von  $\sigma^s$  erhöht wird. Neben (p)ppGpp (siehe PP) spielen die Proteine Crl und Rsd eine Schlüsselrolle (Österberg *et al.*, 2011; Sharma und Chatterji, 2010).

Der anti- $\sigma^{70}$ -Faktor Rsd (Jishage und Ishihama, 1998; Piper *et al.*, 2009) sequestriert  $\sigma^{70}$ , sodass sich das Verhältnis von  $\sigma^{70}$  zu den alternativen Sigmafaktoren verschiebt, mit der Folge, dass  $\sigma^s$  leichter an das RNAPK binden kann. Rsd bindet in einer Stöchiometrie von 1 : 1 an  $\sigma^{70}$  (Piper *et al.*, 2009; Westblade *et al.*, 2004). Die Bindung von  $\sigma^{70}$  an das RNAPK wird durch die Regionen 2 und 4 realisiert (Cambell *et al.*, 2002). Rsd interagiert mit Region 2 (Yuan *et al.*, 2008) und Region 4 von  $\sigma^{70}$  (Dove und Hochschild, 2001; Jishage und Ishihama, 1998; Sharma und Chatterji, 2008; Westblade *et al.*, 2004) und inhibiert so die Bindung von  $\sigma^{70}$  an das RNAPK (Jishage und Ishihama, 1998; Patikoglou *et al.*, 2007). Dadurch sequestriert Rsd  $\sigma^{70}$ , sodass alternative Sigmafaktoren wie  $\sigma^s$  leichter an das RNAPK binden können (Jishage und Ishihama, 1998; Mitchell *et al.*, 2007).

Crl wurde zuerst beschrieben als Faktor, der in die Expression des *csgBA*-Operons und damit in die Synthese der Curlstrukturgene involviert ist (Arnqvist *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1989). Später zeigte sich, dass Crl ein globaler Regulator ist, der am Sigmafaktorwechsel maßgeblich beteiligt ist (Bougdoor *et al.*, 2004). Crl bindet an  $\sigma^s$  und verändert dessen Konformation, sodass  $\sigma^s$  leichter an das RNAPK binden kann (Bougdoor *et al.*, 2004; England *et al.*, 2008; Pratt und Silhavy, 1998; Typas *et al.*, 2007a). Dadurch wird die  $\sigma^s$ -Proteolyse inhibiert (Typas *et al.*, 2007). Zusätzlich aktiviert Crl die  $\sigma^s$ -abhängige Expression von RssB, was zu einer erhöhten Proteolyse von  $\sigma^s$  führt. Diese scheinbar gegenteilig wirkenden Mechanismen führen beide dazu, dass der Gehalt an freiem  $\sigma^s$  sinkt (Typas *et al.*, 2007).

Durch den Einfluss von Rsd und Crl entstehen so vermehrt  $E\sigma^s$ -Komplexe, die die Kontrolle über die Genexpression übernehmen und die generelle Stressantwort auslösen. Als Folge davon werden Gene exprimiert, deren Genprodukte einerseits als schnelle Stressantwort

dienen und die andererseits umfangreiche Resistenzen auslösen. So abgesichert warten die Zellen ab, bis die Bedingungen besser werden.

Sollten die in der SP getroffenen Überlebensmaßnahmen nichts nützen, beginnt die AbP, in der die Zellen nach und nach durch Lyse sterben. In dieser Phase erhöht sich die Mutationsrate drastisch, um bestenfalls einen resistenten Genotyp zu generieren (Bjedov *et al.*, 2003; Tenaillon *et al.* 2004; Wick *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 1993; Zinser und Kolter, 2004). Wenn die AbP durch anhaltenden Nährstoffmangel ausgelöst wurde, sterben nicht alle Zellen gleichzeitig, sodass lebende Zellen bereits lysierte Zellen als Nährstoffquelle verwerten und so sehr lange in der SP verweilen können (Finkel, 2006; Kolter *et al.*, 1993). Dieses kryptische Wachstum kann zum periodischen An- und Abstieg der Populationsgröße führen (Navarro Llorens *et al.*, 2010; Zambrano und Kolter, 1996).

### 1.3. Regulation des $\sigma^S$ -Gehalts

$\sigma^S$  ist seit seiner Entdeckung als Masterregulator der generellen Stressantwort (Hengge-Aronis, 1993; Lange und Hengge-Aronis, 1991) und als alternativer Sigmafaktor gut charakterisiert (Battesti *et al.*, 2011; Hengge 2008, 2009 und 2011; Hengge-Aronis 2002b; Landini *et al.*, 2014; Majdalani *et al.*, 2005; Mika und Hengge, 2013; Peterson *et al.*, 2005; Repoila *et al.*, 2003; Schellhorn, 2014).

Der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt und die  $\sigma^S$ -Aktivität sind in den einzelnen Wachstumsphasen streng reguliert. In der LP sind die Transkriptions- und Translationsrate von *rpoS* gering und  $\sigma^S$  wird degradiert. Daher sind der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt und die  $\sigma^S$ -Aktivität gering. In der SP ändert sich das grundlegend. Die Transkriptions- und Translationsrate steigen stark an und die Proteolyse wird inhibiert. Das führt zu einem starken Anstieg des  $\sigma^S$ -Gehalts, sodass  $\sigma^S$  erfolgreich um das RNAPK kompetitieren und daran binden kann. Beides, die nachlassende Proteolyse und die Bindung an das RNAPK, stabilisieren  $\sigma^S$  und führen zur Erhöhung der  $\sigma^S$ -Aktivität. Der  $\sigma^S$ -Gehalt und die  $\sigma^S$ -Aktivität unterliegen also im Wachstumszyklus einer umfangreichen zeitlichen und hierarchischen Regulation auf allen Ebenen der Genexpression: *rpoS*-Transkription, *rpoS* mRNA-Degradierung und Translation, Aktivierung von  $\sigma^S$  durch Bindung an das RNAPK und  $\sigma^S$ -Proteolyse (Hengge, 2011; Hengge-Aronis, 2002a).

### 1.3.1. Transkriptionale und translationale Regulation

*rpoS* liegt in einem Operon mit *nlpD*, das für ein Lipoprotein kodiert. Das Operon wird durch mehrere Promotoren kontrolliert (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Mendoza-Vargas *et al.*, 2009; Takayanagi *et al.*, 1994). Von zwei benachbarten Promotoren upstream von *nlpD* wird in der LP eine bicistronische *nlpD-rpoS* mRNA auf basalem Niveau transkribiert (Lange und Hengge-Aronis, 1994a). Im offenen Leserasters des *nlpD*-Gens befindet sich 567 bp upstream vom *rpoS*-Transkriptionsstartpunkt der *rpoS*-Promotor  $P_{rpoS}$ , der bei Stress aktiviert wird (Lange *et al.*, 1995) und durch ArcA, CRP (Mika und Hengge, 2005) und MqsA (Wang *et al.*, 2011) reguliert wird. Als Antwort auf Stress wird von ihm eine monocistronische *rpoS* mRNA mit einer 567 bp langen 5'-untranslatierten Region (UTR) generiert, die bei der Translationsinitiation wichtig ist (Lange *et al.*, 1995; Takayanagi *et al.*, 1994). Daneben gibt es eventuell weitere Promotoren in diesem Operon (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009).

In der Log- und frühen postexponentiellen Phase wird die Transkription von *rpoS* vor allem durch das ArcBA-System und durch cAMP-CRP, die beide direkt  $P_{rpoS}$  kontrollieren, sowie ergänzend durch BarA/ UvrY und (p)ppGpp reguliert (Hengge, 2011; Landini *et al.*, 2014) (Abb. 1.3). Die Transkription wird zwar durch das ZKS BarA/ UvrY induziert (Mukhopadhy *et al.*, 2000) und außerdem durch (p)ppGpp unterstützt (Gentry *et al.*, 1993), bleibt aber trotzdem gering, da  $P_{rpoS}$  durch das ArcBA-ZKS inhibiert wird (Mika und Hengge, 2005). Das ArcBA-System nimmt den Energie- und Redoxzustand der Zelle wahr und wird bei Energiemangel in Anwesenheit von Sauerstoff durch oxidierte Quinone aktiviert (Georgellis *et al.*, 2001; Malpica *et al.*, 2004 und 2006; Mika und Hengge, 2005). Bei Nicht-Stress inhibiert es die *rpoS*-Transkription, indem durch ArcB phosphoryliertes ArcA an zwei Bindestellen direkt an  $P_{rpoS}$  bindet. Da diese Bindestelle mit der Bindestelle für den Transkriptionsaktivator CRP (Kolb *et al.*, 1993) überlappt, verhindert ArcA als Anti-Aktivator die Bindung von CRP und damit die Aktivierung der Transkription (Mika und Hengge, 2005). Weiterhin phosphoryliert ArcB auch den  $\sigma^S$ -Erkennungsfaktor RssB, der dann  $\sigma^S$  bindet und  $\sigma^S$  der Proteolyse durch ClpXP zuführt (siehe Kapitel 1.3.2.1). Das trägt zusätzlich zur Instabilität von  $\sigma^S$  bei (Abb. 1.3).

Die Translation der *rpoS* mRNA ist in der LP und PP ebenfalls gering, da die *rpoS* mRNA wie andere RNAs auch durch RNAsen wie RNase E (McCullen *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2008) und RNase III (Basineni *et al.*, 2009) degradiert wird und außerdem die Translations-Initiations-Region (TIR), die die Ribosomenbindestelle und das Startkodon

enthält, basengepaart ist, sodass die Ribosomen nicht daran binden können, um die Translation zu initiieren (Brown und Elliot, 1997; Cunning *et al.*, 1998; Hirsch und Elliott, 2005; Lange und Hengge-Aronis, 1994; Lease und Belfort, 2000; Lease und Woodson, 2004; Lease *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 1998; Muffler *et al.*, 1996a). Die Translation wird zwar durch das histonähnliche Protein HU (Balandina *et al.*, 2001) und durch Bindung von H-NS an die mRNA (Barth *et al.* 1995; Brescia *et al.*, 2004; Yamashino *et al.*, 1995) positiv reguliert, diese können die Basenpaarung jedoch nicht effizient aufheben.

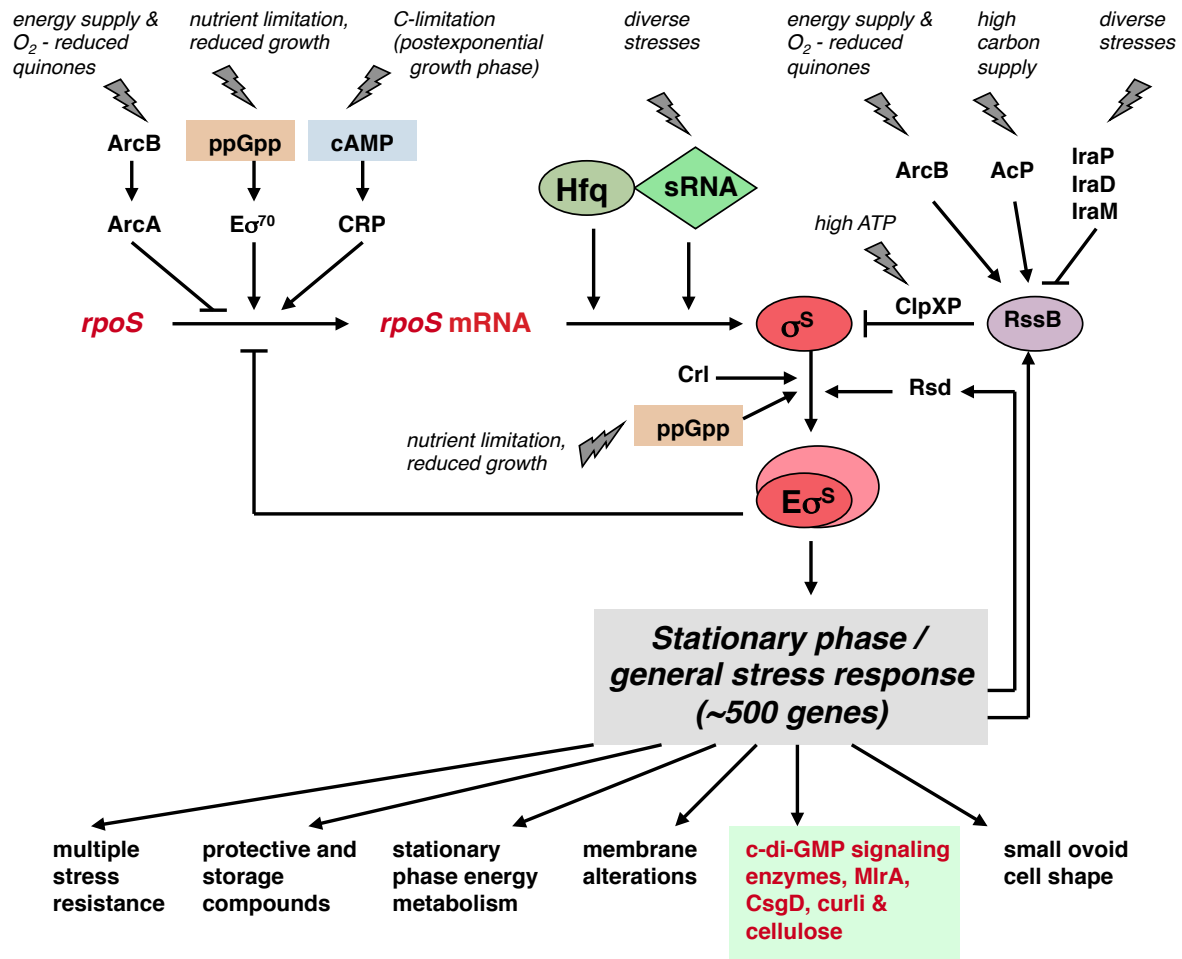
In der PP steigt die Transkriptionsrate sukzessive auf das 5–10-fache (Lange und Hengge-Aronis, 1994), weil erstens die Repression von  $P_{rpoS}$  durch das ArcBA-System aufgehoben wird, da ArcA bei Energiemangel oder oxidierten Chinonen durch ArcB mit Hilfe der sRNA ArcZ dephosphoryliert wird, sodass es von  $P_{rpoS}$  abfällt und die Transkription initiiert wird (Georgellis *et al.* 1998; Malpica *et al.*, 2006; Mika und Hengge, 2014; Peña-Sandoval *et al.*, 2005). Zweitens wird die Expression von  $\sigma^s$  durch cAMP/CRP und (p)ppGpp aktiviert, die beide bei Nährstoffmangel akkumulieren und die Transkriptionselongation wird durch (p)ppGpp und den Cofaktor DksA gefördert (Hirsch und Elliott, 2002) (Abb. 1.3).

In der SP steigt die Translationsrate der *rpoS* mRNA durch Stressfaktoren wie z. B. hohe Osmolarität (Lange und Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996), geringer pH-Wert (Bearson *et al.*, 1996; Heuveling *et al.*, 2008), hohe Zelldichte (Lange und Hengge-Aronis, 1994), niedrige Temperaturen (Repoila *et al.*, 2003; Sledjeski *et al.*, 1996) und weitere mehr (Abb. 1.3). Maßgeblich daran beteiligt sind die kleinen RNAs DsrA, RprA und ArcZ. ArcZ ist negativ durch das ArcBA-System reguliert und akkumuliert bei niedrigem Energiegehalt (Mandin und Gottesman, 2010), DsrA akkumuliert bei niedrigen Temperaturen (Majdalani *et al.*, 1998; Sledjeski und Gottesman, 1995; Sledjeski *et al.*, 1996) und Säurestress (Bak *et al.*, 2014; Lease *et al.*, 2004) und RprA akkumuliert via Rcs-System bei Zelloberflächenstress (Ferrières und Clarke, 2003; Majdalani *et al.*, 2001 und 2002), bei hoher Osmolarität (Henderson *et al.*, 2013; Madhugiri *et al.*, 2010; McCullen *et al.*, 2010) und bei Säurestress (Bak *et al.*, 2014; Lease *et al.*, 2004).

DsrA und RprA binden an die 5'UTR der *rpoS* mRNA, dies führt zur Konformationsänderung, sodass die RNase E-Schnittstelle auf der *rpoS* mRNA umklappt und die *rpoS* mRNA nicht länger durch RNase E degradiert wird (McCullen *et al.*, 2010; Resch *et al.*, 2008). Außerdem lösen DsrA und RprA zusammen mit ArcZ durch Bindung an die 5'UTR die Basenpaarung der TIR auf, sodass die Translation initiiert wird

(Arluison *et al.*, 2007; Lease und Belfort, 2000; Majdalani *et al.*, 1998 und 2002; Mandin und Gottesman, 2010; Updegrove *et al.*, 2008; Wassarman *et al.*, 2001). Die Ausbildung von sRNA *rpoS* mRNA Komplexen wird zusätzlich durch das RNA-Bindeprotein Hfq unterstützt, dass in der SP akkumuliert (Brown und Elliott, 1996 und 1997; Muffler, 1996a; Muffler *et al.*, 1997a; Sledjeski *et al.*, 2001; Sobrero und Valverde, 2012). Hfq erkennt Sequenzen auf der *rpoS* mRNA, die für die Translationsaktivierung durch RprA und ArcZ essentiell sind und bindet in deren Nähe, wodurch die mRNA strukturell variiert wird, sodass RprA und ArcZ besser binden können (Soper und Woodson, 2008; Soper *et al.*, 2010; Soper *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2002). Gleichzeitig interagiert es mit den 3'-Enden der sRNAs und erkennt dort Uridin-reiche Sequenzen (Ishikawa *et al.*, 2012; Otaka *et al.*, 2011; Sauer, 2013; Sauer und Weichenrieder, 2011) und unterstützt so die Ausbildung von sRNA *rpoS* mRNA-Komplexen (Mika und Hengge, 2014; Möller *et al.*, 2002; Sauter *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2002; Soper *et al.*, 2010; Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003).

In der Absterbephase wird die *rpoS*-Transkription durch MqsA inhibiert (Landini *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011). MqsA ist Teil des MqsA/ MqsR Toxin-Antitoxin-Systems, das zur Zelllyse führt. Gleichzeitig wird, ausgelöst durch den massivem Nährstoffmangel, die Mutationsrate drastisch erhöht, sodass die Chance, dass überlebensfähige Mutanten entstehen, steigt (Wick *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 1993). Zusätzlich werden etwa 1 % der Zellen mit Hilfe von  $\sigma^S$  und MqsA zu Persisterzellen und befinden sich dann in einem schlafähnlichen Zustand, in dem sie u. a. gegen Antibiotika tolerant sind (Hong *et al.*, 2012) und auf bessere Bedingungen warten können.



**Abb. 1.3: Signalintegration durch Transkriptionsfaktoren, sRNAs und Proteolyse zur Kontrolle von  $\sigma^S$  und  $\sigma^S$ -abhängigen Genen in *E. coli*.**  $\sigma^S$  wird auf den vier Ebenen Transkription, Translation, Aktivierung durch Bindung an die RNA-Polymerase und durch Proteolyse reguliert. Verschiedene Umweltsignale werden mit Hilfe mehrerer Schlüssel-Signalsysteme, wie z. B. das Alarmon (p)ppGpp oder das ArcBA/ RssB-Phosphorelay-System, auf allen vier Ebenen integriert. Da  $\sigma^S$  mehr als 500 Gene kontrolliert, führt die Aktivierung von  $\sigma^S$  zu umfangreichen Veränderungen der Genexpression. (Mika und Hengge, 2014)

### 1.3.2. Posttranslationale Regulation durch Proteolyse

Der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt und die  $\sigma^S$ -Aktivität werden ganz entscheidend durch regulierte Proteolyse kontrolliert (Hengge, 2009 und 2011; Klauck *et al.*, 2007; Lange und Hengge-Aronis, 1994). In der LP ist  $\sigma^S$  instabil mit einer Halbwertszeit  $< 2$  min, weil es durch RssB gebunden wird und anschließend an das ClpXP-Proteasesystem abgegeben wird, wo es unter ATP-Verbrauch entfaltet und degradiert wird (Becker *et al.*, 1999; Klauck *et al.*, 2001; Muffler *et al.*, 1996b). Daher ist  $\sigma^S$  in dieser Zeit kaum nachweisbar. In der PP steigt die Halbwertszeit von  $\sigma^S$  und in der SP wird  $\sigma^S$  stabil. Diese Stabilisierung ist zwingende Voraussetzung für die Erhöhung der  $\sigma^S$ -Aktivität, sodass die generelle Stressantwort ausgelöst

und die Zellen an die SP-Bedingungen adaptieren können.  $\sigma^S$  kann dazu auf drei Wegen stabilisiert werden. Erstens durch Überschwemmung der Zelle mit  $\sigma^S$ , zweitens durch Inhibierung der Proteolyse und drittens durch Bindung von  $\sigma^S$  an das RNAPK.

#### 1.3.2.1. Der proteolytische $\sigma^S$ -Erkennungsfaktor RssB

RssB (SpreE, YchL) wurde 1996 als  $\sigma^S$ -Regulatorprotein, das als Erkennungsprotein in die Proteolyse von  $\sigma^S$  involviert ist, identifiziert (Bearson *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1999; Muffler *et al.*, 1996b; Pratt und Silhavy, 1996; Zhou und Gottesman, 1998). RssB ist ein Response-Regulator (RR) mit einer N-terminalen Receiverdomäne, die ein phosphorylierbares Aspartat 58 (Bouché *et al.*, 1998) und eine C-terminale Outputdomäne ohne DNA-Bindemotiv besitzt, wobei die Phosphorylierung der Receiverdomäne die Aktivität der Outputdomäne reguliert (Becker *et al.* 1999, Klauck *et al.*, 2001). Anders als in typischen ZKS, die aus Histidinkinase und RR bestehen und in denen der RR durch die Kinase phosphoryliert und so aktiviert wird, ist RssB ein sogenannter “orphan” RR ohne Histidinkinase. Daher benötigt RssB alternative Phosphodonoren wie Acetylphosphat (AcP) (Bouché *et al.*, 1998) oder ArcB, das neben ArcA auch RssB phosphoryliert, jedoch *in vitro* mit langsamerer Kinetik (Mika und Hengge, 2005; Yamamoto, 2005). Daneben gibt es vermutlich weitere Phosphodonoren, da AcP- und ArcB-freie Mutanten eine gewisse  $\sigma^S$ -Degradierung zeigen (Mika und Hengge, 2005).

Während unphosphoryliertes RssB nur eine geringe Affinität an  $\sigma^S$  hat (Klauck *et al.*, 2001), bindet an Aspartat in Position 58 phosphoryliertes RssB (RssB-P) hochaffin an  $\sigma^S$  und initiiert dessen Proteolyse (Becker *et al.*, 1999; Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). RssB-P bindet dazu in einer Stöchiometrie von 1 : 1 (Becker *et al.*, 1999 und 2000; Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001) an  $\sigma^S$  in Region 3.0 (früher 2.5) mit Lysin 173 als für die Bindung essentieller Aminosäure (Becker *et al.*, 1999). Dadurch kommt es zur Konformationsänderung von  $\sigma^S$ , durch die das zuvor geschlossene  $\sigma^S$ -Protein geöffnet wird und die N-terminale ClpX-Bindestelle mit den essentiellen Aminosäuren Histidin 9, Valin 8 und Lysin 28 exponiert wird (Abele, 2005; Stüdemann *et al.*, 2003). RssB-P bindet also nicht nur  $\sigma^S$ , sondern moduliert auch seine Eigenschaften als Proteolysesubstrat (Hengge, 2009; Hengge und Turgay, 2009) und  $\sigma^S$  hat distinkte Bindestellen für RssB-P und ClpX, wobei beide Bindungen für die  $\sigma^S$ -Proteolyse essentiell sind (Becker *et al.*, 1999; Stüdemann *et al.*, 2003). Dann bindet der  $\sigma^S$ -RssB-P-Komplex an ClpXP und ein großer, ternärer

$\sigma^s$ -RssB-P-ClpXP-Komplex entsteht (Stüdemann *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2001). Dort gibt RssB-P  $\sigma^s$  zur Degradierung an ClpXP ab (Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). RssB selbst wird nicht codegradiert, sondern wird wieder frei (Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

RssB ist ein spezifisches  $\sigma^s$ -Regulatorprotein, das keine weiteren ClpXP-Substrate bindet (Zhou *et al.*, 2001; Zhou und Gottesman, 1998) und die Interaktion von RssB-P mit  $\sigma^s$  ist für die Initiation der  $\sigma^s$ -Proteolyse zwingend notwendig. Die Regulation der Expression von RssB, des zellulären RssB-Gehalts und der RssB-Aktivität sowie der Gehalt an verfügbaren Phosphordonoren und das Verhältnis von RssB-P zu  $\sigma^s$  spielen deshalb eine zentrale Rolle bei der Regulation der Proteolyse von  $\sigma^s$ .

#### 1.3.2.2. Der Proteasekomplex ClpXP

Der Proteasekomplex  $[(\text{ClpP})_{14}][(\text{ClpX})_6]_2$  (ClpXP) (zur Übersicht Baker und Sauer, 2012) besteht aus zwei ClpX-Hexameren, die ein zentrales ClpP-Tetradekamer oben und unten bedecken. Beide ClpX-Hexamere sind funktional (Ortega *et al.*, 2002).

Strukturell besteht jedes ClpX-Monomer aus einer N-terminalen Zinkbindedomäne und einer  $\text{AAA}^+$ -ATP-Bindedomäne. Das Hexamer bildet eine Pore mit drei Loops, die sich am Eingang der Pore (RKH-Loop), in ihrer Mitte (Pore-1-Loop) und am Ende (Pore-2-Loop) befinden und die die Erkennung, Bindung und den Transport des Substrats vermitteln (Martin *et al.*, 2008). Weiterhin befindet sich auf jedem Monomer ein Ar- $\Phi$ -Loop aus konservierten aromatisch-hydrophoben Dipeptiden (Martin *et al.*, 2008a), der in die ClpX-Pore hineinragt und die Substratbindung und den Weitertransport unterstützt (Martin *et al.*, 2008a).

Funktionell gehört ClpX zur  $\text{AAA}^+$ -Familie von ATPasen (Hanson und Whiteheart, 2005; Neuwald *et al.*, 1999). Es nutzt die Energie aus ATP-Bindung und -Hydrolyse, um Proteolysesubstrate zu erkennen, zu binden und zu entfalten (Baker und Sauer, 2012). ClpXP degradiert nicht nur  $\sigma^s$ , sondern viele Proteine (Schweder *et al.*, 1996; Stephani *et al.*, 2003). Bei vielen dieser Substrate, jedoch nicht bei  $\sigma^s$ , ist das Erkennungssignal ein 11 AS langer C-terminaler ssrA-ähnlicher tag (Bohn *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 2001; Gottesman *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Keiler *et al.*, 1996; Komine *et al.*, 1994; Tu *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1999) und die meisten Erkenntnisse zur Substratentfaltung und Degradierung wurden mit ssrA-getaggten Substraten gewonnen. Daneben spielt ClpX eine bedeutende Rolle als ATP-abhängiges Chaperon bei der Proteinqualitätskontrolle nach Hitzeschock (Wawrzynow *et al.*, 1995) und schützt die Proteine vor Denaturierung.



Die Substraterkennung erfolgt entweder über einen Degradierungstag wie den *ssrA*-tag oder über ein Adaptorprotein wie bei  $\sigma^S$ . Die anschließende Substratbindung ist thermodynamisch an die Bindung von ATP und zweiwertigem Magnesium geknüpft (Hersch *et al.*, 2005) und verläuft zweistufig (Martin *et al.*, 2008). Der RKH-Loop am Poreneingang interagiert mit negativ geladenen oder hydrophoben Sequenzen des Substrats und wirkt wahrscheinlich als Substratfilter (Farrell *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008; Thibault *et al.*, 2006 und 2006a). Zusätzlich interagieren die Ar- $\Phi$ -Loops mit dem Substrat über hydrophobe Wechselwirkungen. Es wird vermutet, dass ATP-Hydrolyse zur Bewegung der Ar- $\Phi$ -Loops führt, sodass das Substrat von den Loops in die ClpX-Pore hineintransportiert wird (Martin *et al.*, 2008a). Nach der Substratbindung formen in einem zweiten Schritt Pore-1- und Pore-2-Loop eine Bindetasche, an die die durch RKH-Loop gefilterten Substrate binden können (Martin *et al.*, 2008). Durch die abgestufte Bindung zunächst an RKH-Loop am Poreneingang und dann an Pore-1-Loop in der Mitte der Pore und anschließend an Pore 2-Loop am Ende der Pore wird das Substrat ins Innere von ClpX hineingezogen und dabei entfaltet (Martin *et al.*, 2008). Die Substratentfaltung benötigt ATP (Singh *et al.*, 2000; Thibault *et al.*, 2006 und 2006a) und es wird vermutet, dass auch die Bewegung der Loops ATP verbraucht (Martin *et al.*, 2008). Die Halbwertszeit von Substraterkennung, Bindung, Transport und Entfaltung des Proteins beträgt  $\geq 1,4$  min (Lies und Maurizi, 2008). Es wird vermutet, dass die Entfaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Kenniston *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2000).

ClpX kann unterschiedliche Substrate binden und entfalten, weil sich die Pore flexibel ausdehnt und zusammenzieht (Baker und Sauer, 2012; Barkow *et al.*, 2009; Glynn *et al.*, 2009). Das liegt daran, dass nicht alle ClpX-Monomere Substrat binden. Man unterscheidet ungeladene U-Monomere und substratbindende L-Monomere (Glynn *et al.*, 2009; Hersch *et al.*, 2005). Die Anordnung der Monomere ist L/U/L/L/U/L (Glynn *et al.*, 2009), wobei kürzlich gezeigt wurde, dass die Anordnung der Monomere asymmetrisch ist (Stinson *et al.*, 2015). Dieser Aufbau begünstigt das flexible Öffnen und Schließen der Pore, da die U-Monomere sich gegenüber stehen und als Scharnier wirken (Baker und Sauer, 2012; Glynn *et al.*, 2009). Die Anordnung der Monomere ist dynamisch und hat Einfluss auf ATP-Hydrolyse und Substratbindung, Substratentfaltung und -translokation (Nyquist und Martin, 2014; Stinson *et al.*, 2013 und 2015).

Die Degradierung des entfalteten Substrats setzt die Interaktion von ClpX mit ClpP voraus. ClpX ist ein Hexamer und ClpP ein Heptamer, sodass lange Zeit fraglich war, wie beide trotz offensichtlicher Asymmetrie aneinander binden können. Inzwischen weiß man,

dass die Bindung ATP benötigt (Grimaud *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004) und sowohl durch Interaktionen der Loops nahe der Pore jedes Rings als auch durch periphere Strukturelemente in den ClpX- und ClpP-Monomeren stabilisiert wird (Martin *et al.*, 2007). Zusätzlich befinden sich auf den ClpX-Loops konservierte Tripeptide (IGF in *E. coli*), die an hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche von ClpP binden und für die Bindung an ClpX essentiell sind (Bewley *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2001). Die IGFs erhöhen wahrscheinlich die strukturelle Flexibilität der ClpX-Loops und tragen so dazu bei, die Asymmetrie zwischen ClpX und ClpP zu überwinden (Glynn *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2001). Außerdem induzieren die IGFs in ClpP wahrscheinlich eine Ausdehnung der Pore, sodass das Substrat von ClpX übernommen werden kann und die ClpP-Pore passieren kann (Kirstein *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2007).

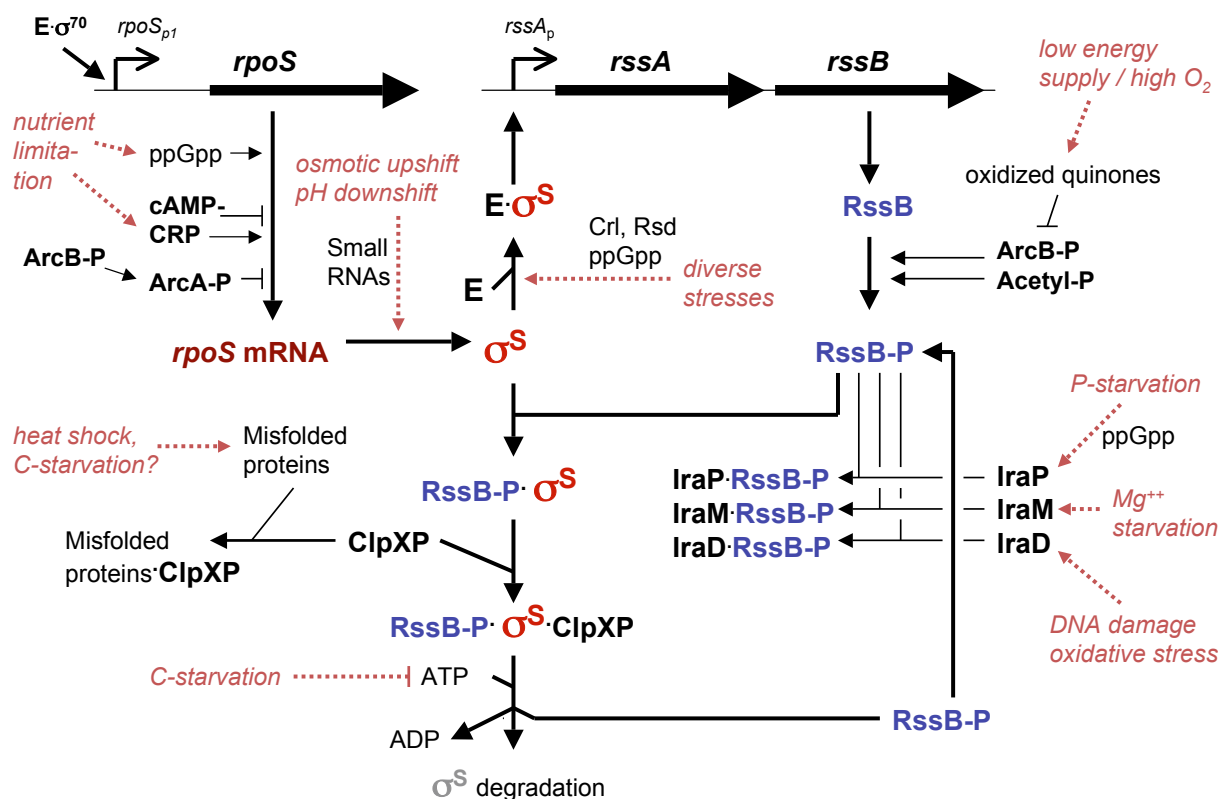
ClpP wird als Pro-Enzym exprimiert (Maurizi *et al.*, 1990), von dem anschließend autoproteolytisch ein 14 AS-langes N-terminales Peptid entfernt wird, sodass ClpP entsteht. Strukturell besteht ClpP aus zwei ringförmigen ClpP-Heptamer-Untereinheiten, die übereinander gelagert sind und deren Monomere eine Pore formen (Flanagan *et al.*, 1995; Kessel *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1996). Der Poreneingang wird aus 21 AS gebildet, von denen größere Loops ins Poreninnere ragen (Bewley *et al.*, 2006; Gribun *et al.*, 2005; Ingvarsson *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2004; Kim und Kim, 2008; Szyk und Maurizi, 2006; Wang *et al.*, 1997 und 1998). Dadurch ist der Poreneingang sehr eng, was absichert, dass nur vollständig entfaltete Substrate aufgenommen werden (Bewley *et al.* 2009; Lee *et al.*, 2010). Im Inneren von ClpP erweitert sich die Pore zu einer proteolytischen Kammer.

Funktionell ist ClpP eine Serinprotease, die Peptide unter ATP-Verbrauch transloziert und degradiert, indem die Peptidbindungen hydrolysiert werden (Arribas und Castano, 1993; Gottesman *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Wojtkowiak *et al.*, 1993). Die Translokation kann sowohl vom C- als auch vom N-Terminus des Substrats starten (Aubin-Tam *et al.*, 2011; Gonciarz-Swiatek *et al.*, 1999; Gottesman *et al.*, 1998; Kenniston *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001) und setzt keine spezifischen Erkennungssequenzen oder Ladungen voraus (Barkow *et al.*, 2009). Die Translokation erfolgt ruckartig in 5 bis 8 AS-Schritten ( $\sim 10$  Å-Schritte) mit einer Geschwindigkeit von ca. 1800 AS/ min, wobei sich Bewegung und Stillstand abwechseln (Aubin-Tam *et al.*, 2011; Maillard *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2008b; Sen *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2009). So treten die Peptide in die proteolytische Kammer ein. Diese ist mit 50 Å relativ groß und kann theoretisch einige hundert AS Substrat aufnehmen (Wang *et al.*, 1997), jedoch wird durch die hohe Dichte der aktiven Zentren mit nur  $\sim 25$  Å-Abstand

erreicht, dass dazwischen nur maximal 8 AS Substrat passen. Daher wird ein Peptid sofort automatisch von mehreren aktiven Zentren gebunden und in der Zeit von ca. 1/10.000 min degradiert (Thompson und Maurizi, 1994). Anschließend werden die degradierten Fragmente durch Konformationsänderung von ClpP entlassen (Sprangers *et al.*, 2005).

### 1.3.2.3. Regulation der $\sigma^S$ -Proteolyse im Verlauf des Wachstumszyklus

Der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt und die  $\sigma^S$ -Proteolyseaktivität verändern sich im Verlauf des Wachstumszyklus stark. Während  $\sigma^S$  in der LP zügig degradiert wird, erfordert die Induktion der generellen Stressantwort in der SP eine schnelle Akkumulation von  $\sigma^S$ , die neben einer erhöhten Transkription und Translation vor allem durch Inhibierung der Proteolyse realisiert wird. Durch die basale Expression von  $\sigma^S$  ist prinzipiell stets  $\sigma^S$  vorhanden. Es wird in ungestressten Zellen rasch abgebaut, während unter verschiedenen Stressbedingungen der Abbau inhibiert wird (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Molekulare Mechanismen der  $\sigma^S$ -Regulation.** Die RssB/ClpXP-abhängige  $\sigma^S$ -Proteolyse wird bei Integration verschiedener Stress-Signale durch die drei Mechanismen Konkurrenz, Titrierung und Sequestrierung reguliert. (Hengge, 2011)

Die  $\sigma^s$ -Proteolyserate wird durch folgende Faktoren beeinflusst: Stress, Substratverfügbarkeit,  $\sigma^s$  : RssB-Verhältnis, RssB-Aktivität, ATP-Angebot, Verhältnis von  $\sigma^s$  zu anderen ClpXP-Substraten und Geschwindigkeit des ClpXP-Systems.

Physiologisch wird die  $\sigma^s$ -Proteolyse in nicht pathogenen *E. coli*-Stämmen bei Eintritt in die SP und bei anderen Stressbedingungen inhibiert. Dies wurde für sehr viele Stressarten gezeigt (Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2009 und 2011; Landini *et al.*, 2014). Wie wird diese Inhibierung realisiert?

Die  $\sigma^s$ -Proteolyserate ist abhängig von der Substratverfügbarkeit und an das Vorhandensein von freiem  $\sigma^s$  geknüpft, da  $E\sigma^s$  nicht degradiert wird (Typas und Hengge, 2006). RssB-P und RNAPK konkurrieren also um  $\sigma^s$  (Zhou *et al.*, 2001). Die Bindung von  $\sigma^s$  an das RNAPK unterliegt wiederum der Konkurrenz von  $\sigma^s$  mit den anderen Sigmafaktoren. In der LP ist die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  sehr gering, daher dominiert RssB-P über das RNAPK. In der SP steigt die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$ , da der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt steigt, Rsd (Jishage und Ishihama, 1999) und 6S-RNA (Trotochaud und Wassarman, 2005)  $\sigma^{70}$  sequestrieren und Crl (Bougourd *et al.*, 2004; Typas *et al.*, 2007a) und (p)ppGpp gezielt die Bildung von  $E\sigma^s$  forcieren. Daher steht nun zunehmend weniger freies  $\sigma^s$  als Proteolysesubstrat zur Verfügung. Allerdings wird  $\sigma^s$  während der Transkription aus dem  $E\sigma^s$ -Komplex gelöst und muss für jeden Transkriptionszyklus erneut an das RNAPK binden. Dadurch ist der Prozess hochdynamisch und RssB-P kann immer wieder neu mit dem RNAPK um  $\sigma^s$  konkurrieren.

Weiterhin wird die Proteolyserate durch das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB moduliert, weil RssB der limitierende Faktor der Proteolyse ist (Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002) und die Bindung an  $\sigma^s$  in einer Stöchiometrie von 1 : 1 erfolgt (Becker *et al.*, 1999 und 2000; Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001), sodass ein hoher  $\sigma^s$ -Gehalt RssB ausbittet. Außerdem ist die Expression von RssB  $\sigma^s$ -abhängig (homöostatischer Feedbackzyklus) (Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002). In der LP beträgt das zelluläre Verhältnis von  $\sigma^s$  zu RssB ca. 20 : 1 (Becker *et al.*, 2000). Da der proteolytische Zyklus von  $\sigma^s$  sehr schnell ist und gezeigt wurde, dass RssB zwischen den einzelnen Proteolysezyklen nicht rephosphoryliert werden muss (Kanow-Scheel, 2008), reicht der geringe RssB-P-Gehalt aus, um  $\sigma^s$  effizient der Proteolyse zuzuführen. In der SP hingegen steigt der  $\sigma^s$ -Gehalt durch Erhöhung der Transkriptions- und Translationsrate stark an, während der RssB-Gehalt zwar auch ansteigt, jedoch RssB wahrscheinlich nicht mehr ausreichend phosphoryliert wird. Zwar wird die Expression von RssB durch  $\sigma^s$  positiv reguliert (Backfisch *et al.*, 2005; Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002),

sodass ein hoher  $\sigma^s$ -Gehalt zum Anstieg von RssB führt, aber trotzdem kommt es in der SP zur Verschiebung des Verhältnisses von  $\sigma^s$  : RssB auf ca. 85 : 1 (Becker *et al.*, 2000). Weil außerdem nur ca. 25 % des RssB-Pools phosphoryliert werden (Klauck, 1999) und ArcB und AcP nicht mehr als Phosphordonoren zur Verfügung stehen, ist das Verhältnis von RssB-P zu  $\sigma^s$  in der SP real deutlich niedriger, was zeigt, dass RssB-P durch den hohen  $\sigma^s$ -Gehalt austitriert wird (Becker *et al.*, 2000; Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002), während nicht phosphoryliertes RssB akkumuliert und für schnellen Abbau von  $\sigma^s$  zur Verfügung steht, sobald die Ernährungslage besser wird (Pruteanu und Hengge, 2002).

Die Aktivität von RssB wird, wie bei anderen RR auch, durch Phosphorylierung reguliert. Bereits identifizierte Phosphordonoren sind AcP (Bouché *et al.*, 1998) und ArcB (Mika und Hengge, 2005; Yamamoto, 2005), weitere sind wahrscheinlich vorhanden (Mika und Hengge, 2005). AcP ist energiereich. Es wird aus überschüssigem Acetyl-CoA gewonnen und entsteht außerdem als Zwischenprodukt bei der Gärung einiger Zucker. In der Zelle wird AcP u. a. zur Generierung von ATP genutzt, indem die Acetatkinase die Phosphorylgruppe von AcP auf ADP überträgt (Fuchs, 2014). RssB konkurriert also mit der Acetatkinase um AcP und die AcP-Konzentration korreliert außerdem mit dem ATP-Gehalt. Weiterhin phosphoryliert die Sensorkinase ArcB nicht nur ArcA, sondern auch RssB (Mika und Hengge, 2005), allerdings mit 10-fach langsamerer Kinetik und nur solange das ArcBA-System nicht durch Energiemangel oder oxidierte Quinone inaktiviert wird (Mika und Hengge, 2005).

Das Angebot an Phosphordonoren für RssB ändert sich im Wachstumszyklus. Während in der LP RssB durch AcP und ArcB phosphoryliert wird, sinkt in der SP der AcP-Gehalt (Klein *et al.*, 2007; McCleary und Stock, 1994) und ArcB wird durch oxidierte Quinone sukzessive inaktiviert (Mika und Hengge, 2005), sodass wegen der ungünstigen Kinetik ArcA als Kompetitor von RssB wirkt und RssB nicht länger durch ArcB phosphoryliert wird. Folglich kann neu exprimiertes RssB in der SP nicht mehr phosphoryliert werden. Da schon vorhandenes RssB-P im proteolytischen Zyklus nicht rephosphoryliert werden muss (Kanow-Scheel, 2008) und außerdem RssB-P *in vitro* nur etwa 5-mal erneut in den proteolytischen Zyklus eingehen kann (Kanow-Scheel, 2008), verliert auch dieses RssB-P schnell an Aktivität, sodass kein aktives RssB-P mehr vorhanden ist.

In der SP wird die Aktivität von RssB weiterhin durch die Anti-RssB-Faktoren IraD, IraM und IraP moduliert, die bei spezifischen Signalen akkumulieren, dann RssB binden und es so sequestrieren und dadurch die Proteolyse inhibieren (Battesti *et al.*, 2012 und 2013; Bougdour *et al.*, 2006 und 2008). IraM, IraD und IraP gehören weder zu einer Proteinfamilie

noch weisen sie Sequenzähnlichkeit auf, außerdem unterscheiden sich die RssB-Bindestellen (Micevski *et al.*, 2015). Trotzdem ist die physiologische Wirkung bei allen drei Proteinen dieselbe. Das weist darauf hin, dass die Bindung an RssB mehrfach unabhängig voneinander evolviert wurde. IraP wird bei Phosphatmangel induziert (Bougdour *et al.*, 2006) und bindet C-terminal an RssB-P (Micevski *et al.*, 2015). Die Phosphorylierung der N-terminalen Receiverdomäne von RssB führt dabei wahrscheinlich zum Konformationswechsel der C-terminalen Outputdomäne, sodass IraP dort binden und RssB-P sequestrieren kann (Micevski *et al.*, 2015). IraM wird bei Magnesiummangel aktiviert und IraD bei DNA-Schäden und bei Eintritt in die SP (Bougdour *et al.*, 2008; Merrikh *et al.*, 2009). Beide Proteine binden bevorzugt an RssB, wobei IraD N-terminal und IraM an beide Domänen bindet (Micevski *et al.*, 2015). Auch IraM und IraD sequestrieren RssB, wobei IraD zusätzlich in die Ablösung von  $\sigma^S$  involviert ist (Micevski *et al.*, 2015).

ATP ist für die Proteolyse von  $\sigma^S$  essentiell (Peterson *et al.*, 2012), da ClpXP durch ATP angetrieben wird. ClpX ist eine AAA<sup>+</sup>-ATPase (Hanson und Whiteheart, 2005; Neuwald *et al.*, 1999), die die Energie von ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse nutzt für die Oligomerisierung zum Hexamer (Grimaud *et al.*, 1998), die Interaktion mit ClpP (Donaldson *et al.*, 2003; Gottesman *et al.*, 1993; Grimaud *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2004; Wojtyra *et al.*, 2003), die Substratbindung (Hersch *et al.*, 2005), für Substratentfaltung und Verhinderung der Rückfaltung (Singh *et al.*, 2000; Thibault *et al.*, 2006) und wahrscheinlich auch zum Transport des entfalteten Substrats (Martin *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2008a). Der ATP-Bedarf von ClpX ist daher sehr hoch und liegt pro ClpX je nach Substrat bei ca. 100–600 ATP/ min (Burton *et al.*, 2003; Kenniston *et al.*, 2003). ClpP benötigt ATP für die Translokation des Substrats.

In der LP gewinnt die Zelle ATP hauptsächlich durch Elektronentransport-phosphorylierung (Fuchs, 2014), bei der ATP durch die membranständige ATP-Synthase, die durch den Protonengradienten über der Membran angetrieben wird, generiert wird. Da das Nährstoffangebot optimal ist, werden reichlich Elektronen gewonnen, sodass ein stabiler Protonengradient entsteht, der die ATP-Synthase antreibt. In der SP hingegen ist der ATP-Gehalt niedriger (Becker *et al.*, 2000; Buckstein *et al.*, 2008), weil das Nährstoffangebot limitiert ist, sodass weniger Elektronen für den Protonengradienten gewonnen werden und folglich weniger ATP durch die ATP-Synthase generiert werden kann.

Weiterhin ist die  $\sigma^s$ -Proteolyserate abhängig vom Verhältnis von  $\sigma^s$  zu anderen ClpXP-Substraten, da der  $\sigma^s$ -RssB-P-Komplex mit diesen um die Bindung an ClpXP konkurriert.

Auch die Geschwindigkeit des ClpXP-Systems beeinflusst die  $\sigma^s$ -Proteolyserate. In der LP ist die Substratentfaltung durch ClpX wahrscheinlich der limitierende Faktor von ClpXP (Martin *et al.*, 2007 und 2008), während in der SP vermutlich der hohe ATP-Verbrauch limitierend wirkt und ClpXP daher weniger aktiv ist.

#### 1.4. Das $\sigma^s$ -Regulon am Beispiel des Biofilmnetzwerks

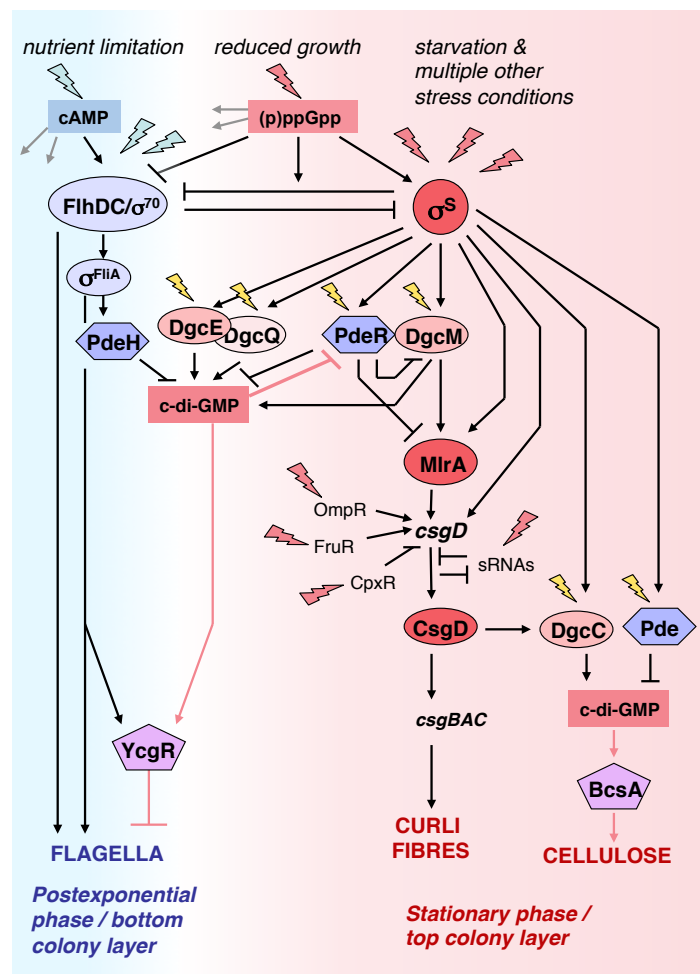
Mehr als 10 % des Genoms werden durch  $\sigma^s$  positiv reguliert, das sind über 500 Gene (Patten *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005). Auf molekularer Ebene haben die meisten Gene, die durch  $\sigma^s$  positiv kontrolliert werden, einen Promotorbereich, der nur von  $E\sigma^s$  erkannt wird. Es gibt aber auch einige Gene, die von  $E\sigma^{70}$  und  $E\sigma^s$  erkannt werden.  $\sigma^s$ -abhängige Promotoren haben besondere Merkmale, die sie von Promotoren, die von anderen Sigmafaktoren erkannt werden, unterscheiden (siehe Kapitel 1.1.3). Auf physiologischer Ebene lassen sich  $\sigma^s$ -abhängige Gene wie folgt einteilen (Weber *et al.*, 2005): 19 % sind Gene, die den Stoffwechsel modulieren, die meisten davon sind in den Energiestoffwechsel involviert. 14 % kodieren für Membranproteine, 11 % sind an bekannten Stressantworten beteiligt, 8 % sind regulatorische Gene und 5 % sind an der Prozessierung von Proteinen beteiligt. Die restlichen 43 % waren zunächst Gene unbekannter Funktion. Von einigen weiß man inzwischen, dass sie in die Biofilmbildung involviert sind (Povolotsky und Hengge, 2012; Weber *et al.*, 2005). Das  $\sigma^s$ -Regulon umfasst also Gene verschiedenster physiologischer Funktionen und diese Gene sind häufig selbst in Netzwerken organisiert, wie z. B. dem Biofilm-Netzwerk (Abb. 1.5). Dadurch entsteht in der Zelle ein hierarchisches Regulationsnetzwerk mit  $\sigma^s$  als Masterregulator und sekundären Regulatoren, die  $\sigma^s$ -abhängig eigene, kleinere Netzwerke kontrollieren.

Einer dieser sekundären Regulatoren ist CsgD, der bei Temperaturen unter 30 °C die Biofilmbildung kontrolliert (Brombacher *et al.*, 2003 und 2006; Prigent-Combaret *et al.*, 2001) (Abb. 1.5). Ein Biofilm ist ein hochstrukturierter Zellverband auf einer Oberfläche, an die sich die Zellen heften und mit einer schützenden Matrix aus extrazellulären Substanzen wie z. B. Curlifasern und Zellulose umgeben (Costerton *et al.*, 1995). Im Biofilm finden sich dieselben Wachstumsphasen wie in Flüssigkultur, allerdings nicht in temporaler, sondern in

räumlicher Anordnung (Serra *et al.*, 2013; Serra und Hengge, 2014) (Abb. 1.5) und es ist wahrscheinlich, dass die Ergebnisse dieser Arbeit, die in Flüssigkultur erhoben wurden, auf die Schichtung im Biofilm übertragbar sind. Langzeitkultivierung von Zellen auf Agarplatten führt zu dreidimensionalen Makrokolonien. In diesen befinden sich die agarnahen Zellen in der PP, synthetisieren keine Matrixkomponenten und bilden Flagellen, die sich wegen der hohen Zelldichte miteinander verknäulen, während sich die agarfernen Zellen in der SP befinden, keine Flagellen synthetisieren und stattdessen Matrixkomponenten produzieren (Serra und Hengge, 2014; Serra *et al.*, 2013 und 2013a). Beim Wachstum der Makrokolonie werden die Zellen vom agarnahen in den agarfernen Bereich geschoben und wechseln dabei ihren physiologischen Zustand. Das ist assoziiert mit der Induktion der  $\sigma^s$ -abhängigen Matrixsynthese (Abb. 1.5).

Die räumliche Regulation des physiologischen Zustands im Biofilm wird entscheidend durch einen unterschiedlichen Gehalt des sekundären Botenstoffes zyklisches di-GMP (c-di-GMP) realisiert, der in hohen Konzentrationen das flagellare Netzwerk inhibiert und die Zellulose- und Curlisynthese aktiviert (Hengge, 2009a, 2010 und 2011; Povolotsky und Hengge, 2012; Römling *et al.*, 2013; Sondermann *et al.*, 2012). Der zelluläre c-di-GMP-Gehalt wird durch Diguanylatzyklasen (DGC) und Phosphodiesterasen (PDE) kontrolliert, die zur Familie der GGDEF/ EAL-Proteine gehören und die zu mehr als 60 % unter  $\sigma^s$ -Kontrolle stehen. In *E. coli* gibt es 29 solcher Proteine (Hengge, 2009a; Sommerfeldt *et al.*, 2009), die entweder als DGC c-di-GMP aus 2 GTP verknüpfen oder es als PDE spalten (sowie einige Proteine mit degenerierter Funktion) und so den c-di-GMP-Gehalt kontrollieren (Hengge, 2009a, 2010 und 2011; Jenal, 2004; Jenal und Malone, 2006; Römling und Amikam, 2006; Römling *et al.*, 2005).





**Abb. 1.5: Masterregulatoren und sekundäre Botenstoffe bei der physiologischen Differenzierung von Biofilmen und Makrokolonien in *E. coli*.** Die zweilagige Schichtung von Makrokolonien (oben und unten, symbolisiert blau und rot) unterliegt derselben Nährstofflimitierung, die den Wechsel von postexponentieller Phase (PP) zu stationärer Phase (SP) auslöst. Der Wechsel wird durch Sigmafaktorkompetition um das RNAPK (vor allem  $\sigma^{70}/\sigma^{\text{FlhA}}$  und  $\sigma^{\text{S}}$ ) und die inverse Koordination zweier Transkriptionskaskaden reguliert. Die erste Kaskade kontrolliert die Flagellensynthese ( $\text{cAMP-CRP/FlhDC}/\sigma^{70}/\sigma^{\text{FlhA}}$ ; links, Transkriptionsfaktoren: blau oval). Die zweite Kaskade kontrolliert die Curli- und Zellulosesynthese ( $\sigma^{\text{S}}/\text{MlrA}/\text{CsgD}$ ; rechts, Transkriptionsfaktoren: rot oval). c-di-GMP-synthetisierende Diguanylatzyklasen (DGC) werden durch hellrote Ovale symbolisiert, c-di-GMP-abbauende Phosphodiesterasen (PDE) durch blaue Sechsecke und c-di-GMP-bindende PilZ-ähnliche Effektorproteine durch violette Fünfecke. Blaue und rote Pfeile zeigen typische Stresssignale für PP und SP. Gelbe Pfeile symbolisieren zusätzliche, noch unbekannte Signale, die von der N-terminalen Sensordomäne vieler DGCs und PDEs wahrgenommen werden. (Hengge *et al.*, 2015)

### 1.5. Die *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110

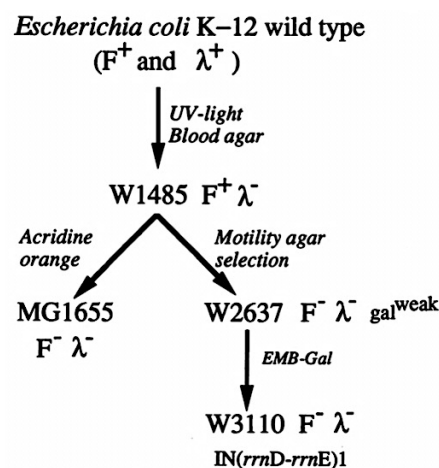
Vor Beginn dieser Arbeit wurde bereits viele Jahre lang an der  $\sigma^{\text{S}}$ -Proteolyse in *E. coli* geforscht und viele zentrale Fragestellungen wurden mit dem *E. coli* K12-Stamm MC4100 bearbeitet (Becker *et al.*, 1999; Kolmsee und Hengge, 2011; Lange und Hengge-Aronis, 1994;

Mika und Hengge, 2005; Muffler *et al.*, 1996a und 1996b; Stüdemann *et al.*, 2003). MC4100 war gemeinsam mit dem *E. coli* K12-Stamm MG1655 jahrelang ein klassischer Laborstamm bei der Bearbeitung genetischer und molekularbiologischer Fragestellungen. Für die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Biofilmbildung ist der MC4100 jedoch ungeeignet, da er keine Flagellen bildet und diese bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen, da Zellen im Biofilm in einem räumlichen Gradienten beides zeigen, d. h. Bereiche in denen Flagellen oder Matrix gebildet werden (Serra *et al.*, 2013 und 2014). Deshalb wird für Arbeiten zur Biofilmbildung häufig der motile *E. coli* K12-Stamm W3110 verwendet. Die Biofilmbildung und ihr Regulator CsgD sind Teil des  $\sigma^S$ -Regulons und  $\sigma^S$  ist entscheidend an der Regulation der Biofilmbildung beteiligt. Da bekannt war, dass sich MC4100 und W3110 in einigen Mutationen unterscheiden und der Sigmafaktor-Gehalt inklusive  $\sigma^S$  in W3110 höher ist als in MC4100 (Jishage *et al.*, 1996), wurde es nötig, die Erkenntnisse zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^S$ , die in MC4100 gewonnen wurden, auf den W3110 zu übertragen. Deshalb wurde in dieser Arbeit die  $\sigma^S$ -Proteolyse in W3110 untersucht und mit der Proteolyse in MC4100 verglichen.

Das *E. coli* K-12 Genom wurde erstmalig 1997 sequenziert (Blattner *et al.*, 1997) und besteht aus 4288 proteinkodierenden Genen, 7 rRNA-Operons und 86 tRNA-kodierenden Genen. Inzwischen wurden die Ergebnisse mehrfach aktualisiert, unter anderem von Hayashi *et al.*, 2006; Riley *et al.*, 2006 und Serres *et al.*, 2001. Der Ursprungs-*E. coli*-Laborstamm wurde 1922 aus dem Stuhl eines Diphtheriepatienten isoliert (Lederberg, 1951) und danach einige Jahre lang standardmäßig verwendet (Tatum und Lederberg, 1947), bis sich zeigte, dass dieser Ursprungsstamm pathogen ist, da er die menschliche Fruchtbarkeit verändert (Lederberg, 1951a). Anschließend wurde der Ursprungsstamm mit Röntgenstrahlen mutagenisiert und auf Nicht-Pathogenität selektiert und es entstand 1944 der ursprüngliche *E. coli* K12-Stamm (Gray und Tatum, 1944), aus dem im Laufe der Jahre tausende Mutanten generiert wurden.

Der Stamm W3110 entstand in mehreren Schritten (Abb. 1.6). Zunächst wurde aus dem Ursprungs-*E. coli* K12-Stamm mit dem Genotyp  $\lambda F^+$  durch UV-Bestrahlung und Selektion auf Blutagar der Stamm W1485 mit dem Genotyp  $F^+ \lambda^-$  generiert. Dann wurde durch weitere Selektion auf Motilitätsagar der motile Stamm W2637 mit dem Genotyp  $F \lambda \text{Gal}^{\text{gering}}$  isoliert und anschließend durch Selektion auf EMB-Gal-Agar der motile,  $\beta$ -Galactosidasepositive Klon W3110 mit dem Genotyp  $F^- \lambda^-$  isoliert (Bachmann, 1972). Der heutige Laborstamm W3110 hat sich seitdem weiter genetisch verändert zum

Genotyp  $F^- \lambda^- IN(rrnD-rrnE)I rph-1$  (Bachmann, 1996 und 1972; Hill und Harnish, 1981; Jensen, 1993; CGSC, Yale). Er trägt eine Inversion zwischen den Genen *rrnD* und *rrnE*, die für zwei ribosomale RNAs kodieren, die an der Ribosomensynthese beteiligt sind (Hill und Harnish, 1981). Außerdem hat er eine 1 bp-lange Deletion im *rph*-Gen, das für RNase PH kodiert. Diese Deletion führt zur Verschiebung des Leserasters über 15 Codons und hat in Minimalmedium einen polaren Effekt auf *pyrE*, das für ein Enzym kodiert, dass in die Pyrimidinbiosynthese involviert ist (Jensen *et al.*, 1993).



**Abb. 1.6:** Entstehung der beiden *E. coli* K12-Stämme MG1655 (Derivat von MC4100) und W3110 aus dem K12-Ursprungstamm. Aus dem K12-Ursprungstamm wurde durch UV-Bestrahlung und anschließende Selektion auf Blutagar der Stamm W1485 generiert, der eine Deletion durch den λ-Phagen trägt. Dann wurde durch weitere Selektion auf Motilitätsagar der motile Stamm W2637 isoliert und durch Selektion auf EMB-Gal-Agar der motile, β-Galactosidasepositive Klon W3110 isoliert. Außerdem wurde aus dem Stamm W1485 durch Behandlung mit Acridinorange der Stamm MG1655, ein Derivat des Stammes MC4100, erzeugt. (Jensen, 1993)

Da bis Mitte der 1980er Jahre Stämme bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, war die genetische Stabilität nicht gewährleistet und mobile genetische Elemente konnten Mutationen einfügen (Naas *et al.*, 1994 und 1995; Rodriguez *et al.*, 1992). Erst danach setzte sich die Aufbewahrung in Glyzerinstocks bei -80 °C durch, sodass die Stämme genetisch stabil blieben. Von dem heutigen Stamm W3110 mit dem Genotyp  $F^- \lambda^- IN(rrnD-rrnE)I rph-1$  existieren unzählige Klone, die weltweit in den Laboren aufbewahrt werden. So existieren z. B. in Japan mindestens 11 verschiedene W3110-Linien, die sich genetisch in fünf Gruppen untergliedern (Jishage und Ishihama, 1997). Die A-Gruppe entspricht dem Wildtyp. Die B-Gruppe hat ein trunkiertes *rpoS*-Gen, Gruppe C fehlt  $\sigma^S$ , Gruppe D fehlt  $\sigma^F$  und Gruppe E

fehlen  $\sigma^S$  und  $\sigma^F$ . Deshalb sind Ergebnisse zur  $\sigma^S$ -Proteolyse, die mit der B- und D-Gruppe des W3110 erzielt wurden, nur bedingt mit Arbeiten aus der A-Gruppe vergleichbar.

Der in dieser Arbeit verwendete W3110-Stamm ist ein Originalstamm der A-Gruppe von Barbara Bachmann, der seit seiner Ankunft in den späten 1980er-Jahren stets bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt wurde, sodass weitere Mutationen ausgeschlossen werden können.

Der Stamm MC4100 ist ein Derivat des *E. coli* K12-Stammes MG1655, der aus dem Stamm W1485 durch Behandlung mit Acridinorange entstand (Jensen, 1993). Durch weitere Mutationen wurde daraus der Stamm MC4100 konstruiert, der heute 11 Mutationen trägt und folgenden Genotyp aufweist: *F*-, [*araD139*]*B/r*, *Del(argF-lac)169*,  $\lambda$ , *e14*, *flhD5301*, *Δ(fruK-yeiR)725(fruA25)*, *relA1*, *rpsL150(strR)*, *rbsR22*, *Del(fimB fimE)632(::IS1)*, *deoC1* (Casadaban, 1976; Casadaban und Cohen, 1979; Komeda und Iino, 1979; Peters *et al.*, 2003; CGSC, Yale). Auch von diesem Stamm existieren weltweit mehrere Varianten, die sich u. a. in ihrem (p)ppGpp-Gehalt, ihrer Wachstumsrate und dem  $\sigma^S$ -Gehalt unterscheiden (Spira *et al.*, 2008). Bei genauerer Betrachtung fallen im Kontext dieser Arbeit vor allem die *flhD5301*-, *relA1*- und *fimB-fimE*-Mutationen des Stammes MC4100 auf, da diese Gene Einfluss auf die Motilität, die (p)ppGpp-Synthese und auf fimbriale Adhäsine haben.

### 1.5.1. Die *flhD5301*-Insertion des MC4100

Der Stamm MC4100 ist eine *flhD5301*-Mutante. Er hat ein IS-Element stromaufwärts von *flhDC*, das zu einer Leserasterverschiebung in *flhDC* führt (Ferenci *et al.*, 2009; Komeda und Iino, 1979). FlhD formt zusammen mit FlhC den Masterregulator der flagellaren Genkaskade FlhDC, der als transkriptionaler Aktivator flagellare Klasse 2 Gene aktiviert (Liu und Matsumara, 1994; Liu *et al.*, 1995). Daher hat dieser Stamm kein  $\sigma^F$  und ist nicht motil. Weiterhin exprimiert er die durch  $\sigma^F$  regulierte Phosphodiesterase PdeH nicht, weshalb er bereits in der PP eine erhöhte c-di-GMP-Konzentration aufweist.

### 1.5.2. Die *relA1*-Insertion des MC4100

Der Stamm MC4100 hat eine IS2-Insertion zwischen dem 85. und 86. Codon des Gens *relA1* (Durfee *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 1989). Dieses Gen kodiert für die (p)ppGpp-Synthase, die als stringenter Faktor bei AS-Mangel Phosphatreste von ATP auf GTP oder GDP überträgt, sodass (p)ppGpp und AMP entstehen (Cashel und Gallant, 1969; Cashel *et al.*, 1996;

Edlin und Broda, 1968; Gallant, 1979; Metzger *et al.*, 1988). (p)ppGpp löst nach Akkumulation die stringente Antwort aus, durch die die Ribosomenbiosynthese drastisch reduziert wird (Paul *et al.*, 2004) (siehe Kap. 1.2.1. unter PP). *relA*-Mutanten können auf basalem Niveau (p)ppGpp synthetisieren, da mit SpoT eine zweite (p)ppGpp-Synthase existiert, die allerdings nicht bei AS-Mangel aktiviert wird (Hernandez und Bremer, 1991; Laffler und Gallant, 1974). Die (p)ppGpp-Syntheseaktivität von SpoT ist geringer als von RelA und *relA*-Mutanten zeigen keine Akkumulation von (p)ppGpp bei AS-Mangel. SpoT reagiert jedoch auf diverse Nährstoffmangelbedingungen mit verstärkter (p)ppGpp-Synthese.

Die (p)ppGpp-Synthese wird bei einer Vielzahl von Signalen aktiviert und ein hoher zellulärer (p)ppGpp-Gehalt führt zu umfassenden Veränderungen der Genexpression. *relA spoT*-Mutanten zeigen einen pleiotropen Phänotyp, sie sind komplett relaxiert (Stent und Brenner, 1961), zeigen deutlich langsames Wachstum (Uzan und Danchin, 1978) und sind nicht zur generellen Stressantwort fähig (Gentry *et al.*, 1993). Auch in anderen Organismen spielt (p)ppGpp eine zentrale Rolle und ist dort u. a. in die Regulation der Sporulation, die Biofilmbildung, Quorum sensing, die Kompetenzentwicklung, Antibiotikaproduktion und Pathogenität involviert (Jain *et al.*, 2006). Wegen dieser Vielzahl der Effekte gilt (p)ppGpp als generelles Stressantwort-Alarmon (Balsalobre, 2011).

Der Einfluss von (p)ppGpp ist dosisabhängig (Traxler *et al.*, 2011). Bei moderatem (p)ppGpp-Gehalt wird u. a. die Expression von  $\sigma^s$  aktiviert, sodass der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt steigt (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus and Cashel, 2008; Traxler *et al.*, 2011). Bei sehr hohem (p)ppGpp-Gehalt hingegen werden verstärkt  $\sigma^s$ -abhängige Gene exprimiert. Praktisch alle RNAP-Moleküle haben dann (p)ppGpp gebunden, dies erhöht die Affinität der RNAP für alternative Sigmafaktoren wie  $\sigma^s$  und stabilisiert so  $\sigma^s$ , da  $\sigma^s$  an der RNAP vor Bindung durch RssB geschützt ist.

### 1.5.3. Die *fimB–fimE* Deletion des MC4100

Der Stamm MC4100 hat eine 1018 bp-lange Deletion zwischen den Genen *fimB–fimE*, die 553 bp von *fimB* und 5 bp von *fimE* umfasst, wobei die Deletion mit einer IS1-Insertion assoziiert ist (Peters *et al.*, 2003; Turlan und Chandler, 1995). Daher bildet er keine Fimbrien.

Beide Gene sind in die Regulation der Fimbrien-Strukturgene involviert. Fimbrien sind haarähnliche Zellanhänge, die insbesondere bei pathogenen Stämmen die Anheftung an Oberflächen und die Zell-Zell-Adhäsion erleichtern (Madigan *et al.*, 2012). FimB und FimE

regulieren die Expression der Fimbrien-Strukturgene durch Phasenvariation. FimB wirkt dabei als Rekombinase, die zusammen mit FimE die Inversion eines kurzen DNA-Stücks katalysiert, wodurch die Expression der Strukturgene an- und abgeschaltet wird (Blomfield *et al.*, 2001; Gally *et al.*, 1996). Die Expression von FimB wird durch (p)ppGpp-positiv und durch  $\sigma^s$  negativ reguliert (Åberg *et al.*, 2006 und 2008; Dove *et al.*, 1997).

## 2. ZIELSETZUNG

Die Degradierung von Proteinen ist ein ubiquitäres Mittel für die Proteinqualitätskontrolle und die Kontrolle des zellulären Proteingehalts in allen Organismen. In Eukaryonten ist regulierte Proteolyse von zentralen Regulatorproteinen zur Kontrolle zellulärer Vorgänge schon lange bekannt. In den letzten beiden Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass dieses Regulationsprinzip auch in Prokaryonten verwirklicht ist.

$\sigma^s$  (RpoS) ist der Masterregulator der generellen Stressantwort.  $\sigma^s$  wird in ungestressten Zellen auf Basalniveau exprimiert und rasch degradiert. In gestressten Zellen wird die Expression von  $\sigma^s$  gesteigert und die  $\sigma^s$ -Proteolyse inaktiviert.  $\sigma^s$  wird an der RNA-Polymerase (RNAP) stabilisiert und programmiert die Promotererkennung der RNAP um, sodass  $\sigma^s$ -abhängige Gene, die Teil des großen, über 500 Gene umfassenden  $\sigma^s$ -Netzwerks sind, aktiviert werden.

Die Proteolyse von  $\sigma^s$  ist bereits gut untersucht (zusammengefasst in Hengge, 2008; Hengge-Aronis, 2002b; Klauck *et al.*, 2007). Der phosphorylierte Response-Regulator RssB (RssB-P) bindet mit hoher Affinität 1 : 1 an  $\sigma^s$  und markiert  $\sigma^s$  so für die Proteolyse durch den Proteasekomplex  $[(ClpP)_{14}][(ClpX)_6]_2$  (ClpXP). Die Bindung von RssB-P an  $\sigma^s$  katalysiert in  $\sigma^s$  eine Konformationsänderung, durch die die Bindestelle für die  $AAA^+$ -ATPase ClpX exponiert wird. Anschließend bindet der  $\sigma^s$ -RssB-P-Komplex an ClpXP,  $\sigma^s$  wird von ClpX unter ATP-Verbrauch gebunden, entfaltet, in die Serinprotease ClpP transloziert und dann unter weiterem ATP-Verbrauch von ClpP degradiert. RssB-P wird dabei nicht codegradiert, sondern wird wieder frei und kann, da es nicht dephosphoryliert wird, sofort das nächste  $\sigma^s$ -Molekül binden und dem Abbau zuführen.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, *wann* und *wodurch*  $\sigma^s$  im Verlauf des Wachstumszyklus in den beiden *E. coli* K12-Laborstämmen W3110 und MC4110 stabilisiert wird. In der Zelle wird die Höhe des zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts durch mehrere Prozesse bestimmt:  $\sigma^s$ -Biosynthese,  $\sigma^s$ -Proteolyse sowie Stabilisierung von  $\sigma^s$  durch Bindung an die RNAP. Die Entscheidung, ob und in welchem Umfang  $\sigma^s$  degradiert bzw. stabilisiert wird, unterliegt einem hochkomplexen Zusammenspiel aus RssB-Phosphorylierung, Titrierung/ Limitierung, Sequestrierung und Konkurrenz. Dieses war vorher überwiegend qualitativ beschrieben worden und sollte nun, ausgehend von detaillierten Bestimmungen der  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten sowie des  $\sigma^s$ - und ATP-Gehalts im Verlauf des gesamten Wachstumszyklus, quantitativ aufgeklärt werden.

Da viele Arbeiten zur  $\sigma^s$ -Proteolyse in dem *E. coli* K12-Laborstamm MC4100 gewonnen wurden und in den letzten Jahren aber vermehrt mit dem *E. coli* K12-Stamm W3110 gearbeitet wird, sollten die Untersuchungen vergleichend in beiden Stämmen vorgenommen werden und geprüft werden, inwieweit die früheren Ergebnisse von MC4100 auch auf den Stamm W3110 übertragbar sind.



### 3. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1. Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Materialien stammen, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen: Applichem (Darmstadt), Biorad (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Greiner Labortechnik (Frickenhäusen), Millipore, Roche (Grenzach-Wyhlen), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und VWR International (Radnor, USA). Medienzusätze wurden von den Firmen Difco Laboratories (Augsburg), Otto Nordwald GmbH (Hamburg) und Applichem (Darmstadt) verwendet. Weitere Chemikalien, Materialien und Geräte sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

**Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien und Materialien und ihre Hersteller.**

Produkt	Hersteller/ Referenz
3M™ Petrifilme™ select <i>E. coli</i>	3M
$\alpha$ -rabbit-Antikörper	Sigma
Acetylphosphat	Sigma
Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Autoklav D150	System
Antibiotika	Roche, Roth, Merck
APS	Roth
ATP	Roche
BCIP/ NBT	AppliChem
Blotanlage	Biorad
Blotmembran „Immobilon“ für Proteine	Millipore
Bromphenolblau	Roth
Brutschrank	Memmert
BSA	Sigma Aldrich
Chamäleon	Hidex Oy
Coomassie Brilliant Blau R-250	Applichem
DNA-Längenmarker 100 bp extended	New England Biolabs
dNTP	Roche
DTT	Roth
Elektroporationsapparatur	BioRad
Geldokumentationsanlage	Alpha Innotech Corporation
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN II	BioRad
Imidazol	Roth

Inkubationschüttler	Infors
IPTG	Roth
Magermilch	Roth
Medien und Medienzusätze	Difco Laboratories
Millipore-Filter (Rotilabo®-Spritzenfilter)	Roth
Nanodrop	Peqlab
NiNTA	Qiagen
Photometer Ultraspec 1000	Amersham Biosciences Europe
PhosphoImager	Fujifilm Co.
Polymerase OptiTaQ	Roboklon
Prestained Protein Marker	NEB
Rotiphorese Gel 30	Roth
Sterilfilter	Millipore
Thermocycler (PCR-Gerät)	Peqlab
Transblotapparat	Biorad
TEMED	Roth
Whatman Gel-Blotting-Papier	Roth
Zentrifugen	Eppendorf, Hereaus

### 3.2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* K12-Bakterienstämme sind in den Tab. 3.2 und 3.3 angegeben. Für alle Experimente in dieser Arbeit mit dem Stamm MC4100 wurde die interne Stammsammlungsnummer 111 verwendet, für Experimente mit dem Stamm W3110 wurde die Nummer 120 verwendet.

Für Sterilitätstests von Langzeitkulturen wurde außerdem der *Bacillus subtilis* Stamm 168 mit dem Genotyp *trpC2* Wildtyp (Anagnostopoulos und Spizizen, 1961) benutzt.

**Tab. 3.2: Verwendete *E. coli* K12-Bakterienstämme.**

Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100	<i>E. coli</i> K12 <i>F<sup>-</sup> araD139 Δ (arg-lac)U169 deoC flbB5301 relA1 rpsL150 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
RH90	MC4100 <i>rpoS::tn10</i>	Laborsammlung
W3110	Meine Angabe <i>E. coli</i> K12 <i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> IN(rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	
GB328**	W3110 <i>fliA::cat</i> , polare Mutation auf <i>fliZY</i>	Laborsammlung
CKS1	W3110 <i>fliA::scar</i>	diese Arbeit

Desweiteren wurde der Bakteriophage  $\lambda_{\text{vir}}$  verwendet (Laborsammlung) und das Plasmid pCP 20 (Helferplasmid mit FLP-Rekombinase, temperaturinduzierbarer Promotor, temperatursensitiver *ori*, ampicillinresistent, chloramphenicolresistent, (Datsenko und Wanner, 2000)).

### 3.3. Medien und Medienzusätze

Für Medien wurde das Medium Luria-Bertani (LB) nach Silhavy *et al.*, 1984 verwendet (10 g Trypton, 5 g Hefeextract, 8 g NaCl ad 1 l Aqua bidest). Für Festkulturen wurden zu 1 l Medium 16 g Span-Agar zugesetzt, anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden ca. 25 ml in Petrischalen mit 9,6 cm Durchmesser gegossen. Für Reproduktionen wurden dieselben Medienchargen verwendet.

Die benutzten Medienzusätze sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Die Zusätze wurden als 1000-fache Stammlösungen angesetzt (Natriumcitrat 50-fach), mit einem Sterilfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu\text{m}$  sterilfiltriert und bei -20 °C (Natriumcitrat bei 4 °C) aufbewahrt.

**Tab. 3.3: Medienzusätze, ihre Lösungsmittel und Endkonzentrationen.**

Medienzusatz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Chloramphenicol	70 % Ethanol	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Kanamycin	Aqua dest	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
IPTG	Aqua dest	1 $\mu\text{M}$
Natriumcitrat	Aqua dest	20 mM
Spectinomycin	Aqua dest	1,5 mg/ ml

### 3.4. Mikrobiologische Methoden

#### 3.4.1. Sterilisation

Laborglas wurde 4 h bei 180 °C in trockener Hitze sterilisiert. Medien, Puffer und Lösungen wurden 20 min bei 1 bar und 121 °C autoklaviert. Hitzesensitive Lösungen wurden mit einem Sterilfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm sterilfiltriert.

#### 3.4.2. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme auf festem Medium wurden maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt. Für eine längere Aufbewahrung wurden Übernachtskulturen in LB mit DMSO versetzt (7 % Endkonzentration) und in Cryoröhrchen bei –86 °C aufbewahrt.

#### 3.4.3. Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden aerob bei 37 °C oder 28 °C im Reagenzglasroller, im Inkubationsschüttler oder im Schüttelwasserbad bei 250 rpm kultiviert. Die Kulturgefäße wurden mit 10 % ihres Volumens (in seltenen Ausnahmen bis 20 %) befüllt. Die optische Dichte bei 578 nm (OD) wurde zur Inokulation, wenn nicht anders angegeben, auf 0,05 eingestellt.

Flüssige Langzeitkulturen wurden aerob bei 37 °C oder 28 °C im Schüttelwasserbad bei 250 rpm kultiviert. Als Kulturgefäße wurden 300 ml Enghals-Erlenmeyerkolben verwendet, diese wurden mit 45 ml Medium befüllt.

Festkulturen wurden bei 37 °C oder 28 °C im Brutschrank oder Brutraum inkubiert.

#### 3.4.4. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde mit Hilfe der OD bestimmt. Als Referenz wurde bakterienfreies Ausgangsmedium verwendet. Proben mit einer  $OD \geq 0,3$  wurden 1 : 10 mit Referenzmedium verdünnt, Proben mit einer  $OD \geq 3,0$  wurden 1 : 20 verdünnt.

### 3.4.5. Bestimmung der Lebendzellzahl

#### 3.4.5.1. Bestimmung der Lebendzellzahl bei einer bestimmten optischen Dichte

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl (LZ) wurde bei verschiedenen ODs entlang der Wachstumskurve eine Probe entnommen und sofort auf Eis gestellt. Nach rascher Bestimmung der OD wurde die Probe in eiskalter, steriler Saline (0,9 % NaCl) schnell bis  $10^{-7}$  verdünnt. Danach wurden 100 µl ausgewählter Verdünnungsstufen zügig auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lebendzellzahl/ ml bestimmt.

Für die Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts mit dem „ATP Bioluminescence Assay Kit HS II“ (Kap. 3.5.11) wurde die LZ für bestimmte ODs auf eine Nachkommastelle aus den diskreten Originaldaten interpoliert (Tab. 4.3). Dabei wurde vorausgesetzt, dass sich die LZ linear ändert.

#### 3.4.5.2. Bestimmung der Lebendzellzahl von Langzeitkulturen

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl (LZ) von Langzeitkulturen wurden täglich 25 µl Probe entnommen, in steriler Saline (0,9 % NaCl) in 10er Schritten bis  $10^{-7}$  verdünnt und anschließend 10 µl jeder Verdünnungsstufe auf LB-Platten gespottet. Nach Inkubation im Wärmeschrank wurde am nächsten Tag die Lebendzellzahl/ ml bestimmt.

### 3.4.6. Langzeitüberleben von Bakterien

Langzeitkulturen wurden unter standardisierten Bedingungen aerob bei 37 °C oder 28 °C im Schüttelwasserbad bei 250 rpm kultiviert. Als Kulturgefäße dienten 300 ml Enghals-Erlenmeyerkolben, diese wurden einmalig mit 45 ml LB-Medium befüllt und mit Bakterienkultur mit einer Anfangs-OD von 0,05 beimpft. Die Lebendzellzahl wurde täglich durch Spotten auf LB-Platten bestimmt (Kap. 3.4.5.2) Anschließend wurden die Platten mit einer PENTAX \*ist DL-Spiegelreflexkamera fotografiert mit einer Brennweite von 50 mm, Blende 5,6 und einer Belichtungszeit von 1/8 sec.

Nach Beendigung des Langzeittests wurde die Sterilität der Kulturen getestet. Dazu wurden zunächst Kolonien mit unterschiedlicher Koloniemorphologie mehrfach auf LB-Platten gereinigt. Anschließend wurden gereinigte Kolonien erstens auf

3M™ Petrifilme™ select *E. coli* ausgestrichen. Die Petrifilme enthalten  $\beta$ -Glucuronidase als einzige Kohlenstoffquelle und weisen selektiv *E. coli* (und in seltenen Fällen *Shigella*) nach. Zweitens wurden dieselben Kolonien in einer Kolonie-PCR eingesetzt zur Amplifikation des *uidA*-Gens, das für die  $\beta$ -Glucuronidase kodiert. Bei beiden Tests dienten *Bacillus subtilis*- und frische W3110-Zellen als Kontrollen.

### 3.4.7. P1-Lysat

Für die Herstellung eines P1-Lysats wurden 5 ml Übernachtskultur des Donorstammes 1 : 60 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD von etwa 0,3 kultiviert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l 1M CaCl<sub>2</sub> und 50  $\mu$ l Wildtyp P1<sub>vir</sub>-Lysat erfolgte die Lyse der Bakterienzellen bei 37 °C für ca. 4 h. Nach Sichtbarwerden der Lyse wurden 250  $\mu$ l Chloroform zur Abtötung der Zellen hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen und 15 min Inkubation bei 37 °C wurde das Lysat für 10 min bei 2650 g abzentrifugiert und der Überstand in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform wurde das Phagenlysat bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.4.8. P1-Transduktion

Für die P1-Transduktion wurde zunächst vom Donorstamm ein P1-Lysat hergestellt. Mit diesem wurde dann der Rezipientenstamm infiziert. Dazu wurden 5 ml Übernachtskultur des Rezipientenstammes 10 min bei 2650 g abzentrifugiert, anschließend wurde das Zellpellet in 2,5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt. Dann wurden 200  $\mu$ l Zellsuspension mit 100  $\mu$ l P1-Lysat gemischt, als Kontrolle dienten Zellen ohne Lysat. Die Kulturen wurden 10 min bei Raumtemperatur kultiviert, dann wurden 0,5 ml LB-Medium hinzugegeben. Nach 20-minütigem Rollen bei 37 °C wurden 50  $\mu$ l Natriumcitrat zupipettiert, danach wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

### 3.4.9. Motilitätsassay

Um die Motilität zu testen, wurden Übernachtskulturen angezogen. Von diesen wurde die optische Dichte bei 578 nm bestimmt und auf OD 4,0 eingestellt. Anschließend wurden 4  $\mu$ l in Schwimmagarplatten (5 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, 3 g Agar, 1000 ml Aqua bidest)

pipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 28 °C für 6 h und bei 37 °C für 4 h. Anschließend wurden die Schwimmhöfe ausgemessen.

### 3.5. Biochemische und molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1. TSS-Transformation mit pCP20

Die TSS-Transformation wurde im Wesentlichen nach Chung *et al.*, 1989 durchgeführt. Dafür wurde 1 ml Kultur des Rezipientenstammes bei 37 °C bis zu einer OD von etwa 0,5 inkubiert. Dann wurden 200 µl Kultur W3110 *fliA::cat* mit 200 µl 2x TSS (20 % (w/v) PEG-6000, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 90 ml LB-Medium, nach dem Autoklavieren 10 ml 100 % DMSO zugeben) und 1,5 µl Plasmid pCP 20 versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 1 h die phänotypische Expression bei 30 °C. Danach wurden die Zellen auf antibiotikahaltige Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

#### 3.5.2. Kolonie-PCR

Die PCR-Reaktion wurde im Wesentlichen nach Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Ein PCR-Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl enthielt: 1 Einheit OptiTaq-Polymerase, 1x OptiTaq-Reaktionspuffer, 1 mM dNTPs, 0,4 pM Primer 1, 0,4 pM Primer 2, Koloniematerial als DNA-Template und Aqua dest.

#### 3.5.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden die Proben mit 6-fach DNA-Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin in 1x TAE) gemischt und in Agarosegelen (1 % Agarose in TAE-Puffer (50x TAE-Stammlösung: 242 g Tris; 57,1 ml, Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 L Aqua bidest)) aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE Puffer bei 90 V für ca. 1 h. Anschließend wurde die DNA etwa 20 min mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt und danach unter UV-Licht betrachtet.

### 3.5.4. Bestimmung des Proteingehalts in Flüssigkulturen

Die Proteinkonzentration einer Bakteriensuspension wurde mit Hilfe der OD bestimmt. Dabei wurde ausgenutzt, dass 1 ml Zellsuspension bei einer OD von 1 etwa 107 µg Protein entsprechen (R. Hengge, unpublizierte Daten) und die Zunahme des Proteingehalts mit der Zunahme der OD korreliert.

### 3.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Extraktion von Proteinen aus Bakterienkulturen wurden die Proben sofort nach der Entnahme mit 10 % Trichloressigsäure (Endkonzentration) versetzt und mindestens 30 min oder über Nacht auf Eis gefällt. Danach wurden die Proben 10 min bei 22330 g abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem Aceton, gefolgt von 10 min Zentrifugation bei 22330 g, gewaschen. Danach wurde das Pellet im Wärmeschrank getrocknet und anschließend mit 1x SDS-Probenpuffer (0,06 M Tris (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glycerin, 3 % β-Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenol-Blau) versetzt, sorgfältig resuspendiert und 10 min bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben bei –20 °C aufbewahrt.

Die SDS-PAGE wurde im Wesentlichen nach Laemmli, 1970 und Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Dafür wurde in einer Gelelektrophoreseapparatur ein Polyacrylamid-Gel gegossen. Dieses bestand aus einem 12 %-igen Trenngel (2,5 ml LT-Puffer (36,34 g Tris, 0,8 g SDS in 200 ml Aqua bidest, pH 8,8), 4 ml Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1), 3,45 ml Aqua bidest, 5 µl TEMED, 25 µl 10 % APS), welches mit einem 4 %-igen Sammelgel (1,25 ml UP-Puffer (6,06 g Tris, 0,8g SDS in 100 ml Aqua bidest, pH 6,8), 0,65 ml Rotiphorese Gel 30, 3,07 ml Aqua bidest, 5 µl TEMED, 25 µl 10 % APS) überschichtet worden war. Nach dem Befüllen der Gelapparatur mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 0,19 M Glycerin, 0,1 % SDS) und Auftrag der Proben erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 25 mA/ Gel und 400 V. Anschließend wurden die Gele leicht modifiziert nach Fairbanks *et. al.*, 1971 mit Coomassie Brilliant Blue (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie Brillant Blue R-250) gefärbt, kurz erhitzt und anschließend mit 10 % Essigsäure entfärbt oder es erfolgte alternativ das Blotten auf eine Membran.



### 3.5.6. Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mit der Immunoblot-Analyse. Dazu wurden die Proteine nach der SDS-PAGE in einer Transblot-Apparatur auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 sec in Methanol aktiviert, dann kurz mit Aqua bidest abgespült und in Transblotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert und anschließend auf das SDS-Gel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen zwei Whatmanpapieren positioniert und in der Blotapparatur mit Schwämmen fixiert. Der Blotvorgang erfolgte in eiskaltem Transblotpuffer für eine Stunde bei 100 Volt und maximaler Stromstärke.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese mindestens eine Stunde in M-TBST (TBST-Puffer (20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) mit 5 % Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper (anti- $\sigma^s$ , anti-Crl oder anti-Rsd), gelöst in M-TBST, 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nun wurde 3-mal mit TBST für 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-IgG, Alkalische Phosphatase), gelöst in M-TBST, inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit TBST für jeweils 10 min gewaschen und anschließend in AP-Puffer (100 mM Tris (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ ) 10 min äquilibriert. Dann wurde die Membran mit der Färbelösung (10 ml AP-Puffer, 33  $\mu$ l BCIP Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid), 66  $\mu$ l NBT Lösung (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)) entwickelt und die Farbreaktion anschließend mit Leitungswasser gestoppt.

### 3.5.7. Nicht-radioaktive Bestimmung der $\sigma^s$ -Halbwertszeit *in vivo*

Zur Bestimmung der  $\sigma^s$ -Halbwertszeit  $T_{1/2}$  *in vivo* wurde zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Wachstumskurve ein kleiner Teil der Kultur in einen vorgewärmten Erlenmeyerkolben überführt und dann die Proteinbiosynthese mit 1,5 mg/ml Spectinomycin inhibiert. Anschließend wurden in kurzen Zeitabständen Proben mit 40  $\mu$ g Gesamtprotein entnommen, der Abbau mit 10 % eiskalter Trichloressigsäure (Endkonzentration) inhibiert, die Proben auf Eis gesammelt, gefällt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht (Kap. 3.5.5). Dann wurden je 3  $\mu$ g Gesamtprotein jeder Probe in der SDS-PAGE aufgetrennt, im Westernblot mit anti- $\sigma^s$ -Antikörper analysiert und danach die Schwärzung der Banden mit

dem Programm Image Gauge Version 3.45 (Fuji Photo Film Co.) quantifiziert. Aus dem sinkenden  $\sigma^s$ -Gehalt nach Spectinomycinzugabe wurde anschließend die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit  $T_{1/2}$  berechnet.

### 3.5.8. Bestimmung des zellulären $\sigma^s$ -Gehalts *in vivo*

Zur Bestimmung des zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts in W3110 und MC4100 wurde in Zeitabständen von 20 min entlang der Wachstumskurve Proben mit 40  $\mu$ g Gesamtprotein entnommen, die optische Dichte bei 578 nm bestimmt und die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 10 % eiskalter Trichloressigsäure (Endkonzentration) inhibiert. Alle Proben wurden auf Eis gesammelt, gefällt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht (Kap. 3.5.5). Als Kontrolle diente der Stamm RH90, hier wurden die Proben stündlich entnommen.

Nun wurden je 2,5  $\mu$ g Gesamtprotein jeder Probe in der SDS-PAGE aufgetrennt. Außerdem wurde ein definierter  $\sigma^s$ -Standard (Kap. 3.5.9) in abnehmender Konzentration mit aufgetrennt. Alle Proben wurden im Westernblot mit anti- $\sigma^s$ -Antikörper analysiert und danach wurde die Schwärzung der Banden mit dem Programm Image Gauge quantifiziert (Kap. 3.5.6). Anschließend wurde mit Hilfe des  $\sigma^s$ -Standards eine  $\sigma^s$ -Standardfunktion erstellt. Mit dieser konnte der  $\sigma^s$ -Gehalt in den unbekannten Proben berechnet werden.

Zur Berechnung des  $\sigma^s$ -Gehalts in Molekülen/ Zelle wurde mit Hilfe des verwendeten Probenvolumens die eingesetzte Lebendzellzahl bestimmt (Tab. 4.3), aus diesen Angaben konnte anschließend die Lebendzellzahl/  $\mu$ g GP berechnet werden. Außerdem wurde mit Hilfe des  $\sigma^s$ -Standards eine Standardfunktion erstellt, mit der der  $\sigma^s$ -Gehalt/  $\mu$ g GP berechnet wurde. Aus diesen Angaben wurde, unter Einbeziehung des Molekulargewichts, der  $\sigma^s$ -Gehalt/ Zelle berechnet.

### 3.5.9. Erstellung eines definierten $\sigma^s$ -Standards

Für den definierten  $\sigma^s$ -Standard wurde gereinigtes  $\sigma^s$ -Wildtyp-Protein benutzt (Geschenk von E. Klauck). Dieses war zuvor vom Vektor pQE30Xa (IPTG-induzierbarer Überexpressionsvektor von Qiagen, von dem *rpoS* mit N-terminalem 6-fach-Histag und Factor Xa-Schnittstelle exprimiert wird, ampicillinresistent) überexprimiert und mit NiNTA (Qiagen) gereinigt worden. Danach war der 6-fach-Histag mit FaktorXA-Protease (Qiagen) verdaut worden.

Vom gereinigten  $\sigma^s$ -Wildtyp-Protein wurde die Proteinkonzentration mit einem bovinen Serumalbumin-Standard (BSA-Standard) bestimmt. Dazu wurden Konzentrationsreihen von BSA und  $\sigma^s$  angefertigt, in der SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und mit Image Gauge ausgewertet. Anschließend wurde eine BSA-Standardfunktion erstellt und damit die  $\sigma^s$ -Proteinkonzentration berechnet. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde die Proteinkonzentration zusätzlich mit dem Nanodrop bestimmt.

### 3.5.10. Bestimmung des zellulären Crl-und Rsd-Gehalts *in vivo*

Zur Bestimmung des zellulären Crl-bzw. Rsd-Gehalts in W3110 und MC4100 wurde in Zeitabständen von 20 min entlang der Wachstumskurve Proben mit 40  $\mu$ g Gesamtprotein entnommen, die optische Dichte bei 578 nm bestimmt und die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 10 % eiskalter Trichloressigsäure (Endkonzentration) inhibiert. Alle Proben wurden auf Eis gesammelt, gefällt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht (Kap. 3.5.5).

Dann wurden 5  $\mu$ g Gesamtprotein (Crl) bzw. 10  $\mu$ g Gesamtprotein (Rsd) jeder Probe in der SDS-PAGE aufgetrennt. Alle Proben wurden im Westernblot mit anti-Crl- bzw. anti-Rsd-Antikörper analysiert und mit dem Programm Image Gauge quantifiziert. Danach wurde jeweils der höchste Proteingehalt auf 100 % gesetzt. Davon ausgehend wurde der relative Proteingehalt (in Relation zum höchsten Proteingehalt) bestimmt.

### 3.5.11. Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts *in vivo*

Zur quantitativen Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurde das hochsensitive „ATP Bioluminescence Assay Kit HS II“ von Roche verwendet, mit dem ATP im Bereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-12}$  M nachgewiesen werden kann. Das Kit nutzt die ATP-Abhängigkeit der Licht emittierenden Luciferase von *Photinus pyralis* aus, die die Reaktion von ATP + D-Luziferin +  $O_2$  zu Oxiluziferin +  $PP_i$  + AMP +  $CO_2$  + Licht katalysiert. Nach der Michaelis-Menten-Gleichung gilt:  $\text{Lichtintensität} = (V_{\max} \times C_{\text{ATP}}) / (K_m + C_{\text{ATP}})$ . Für geringe ATP-Konzentrationen mit  $C_{\text{ATP}} < K_m$  kann diese Gleichung vereinfacht werden zu  $\text{Lichtintensität} = (V_{\max} \times C_{\text{ATP}}) / K_m$ . In diesem Fall ist die Lichtintensität direkt proportional zur ATP-Konzentration ( $C_{\text{ATP}}$ ) und abhängig von der Menge an Luziferase ( $V_{\max}$ ).

Die Bestimmung des ATP-Gehalts erfolgt in mehreren Schritten.

### 3.5.11.1. Vorbereitende Arbeiten

Da es für die Anwendung des ATP-Assays notwendig war, die eingesetzte Zellzahl auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ ml zu normieren, wurde zunächst die Lebendzellzahl (LZ) bei verschiedenen ODs bestimmt und ein Standard-Pipettierschema entwickelt, um schnell und reproduzierbar die gewünschte LZ bei jeder beliebigen OD einstellen zu können.

Die lyophilisierte Luciferase wurde in 10 ml Verdünnungspuffer gelöst, 5 min auf Eis inkubiert, sehr vorsichtig gemischt und anschließend aliquotiert und schockgefroren. Reste von einmal aufgetautem Reagenz wurden, wenn sie am selben Tag nicht mehr benötigt wurden, verworfen.

Das lyophilisierte ATP wurde mit Verdünnungspuffer auf 16,5 mM ATP eingestellt, aliquotiert und bei -20 °C für maximal vier Wochen gelagert. Für den ATP-Standard wurden mit frisch aufgetautem ATP Verdünnungsstufen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-12}$  M ATP auf Eis in Verdünnungspuffer hergestellt, der Nullabgleich erfolgte mit Verdünnungspuffer ohne ATP. Aus den Messwerten wurde eine Standardfunktion erstellt. Einmal aufgetautes ATP wurde maximal 8 h lang verwendet. Bei mehrstündigen Messreihen wurde deshalb nach 8 h ein neuer ATP-Standard mit frisch aufgetautem ATP hergestellt und eine neue Standardfunktion erstellt.

Von allen Proben inklusive Nullabgleich wurden jeweils 25 µl wie unter ATP-Messung beschrieben in den Assay eingesetzt. Als Qualitätskontrolle bei den Messungen wurden folgende Richtwerte benutzt:  $10^{-5}$  M ATP liegen im Bereich von 20–40 Millionen counts,  $10^{-11}$  M ATP liegen im Bereich von 300–400 counts.

### 3.5.11.2. ATP-Messung

Alle Arbeiten erfolgten zügig auf Eis. Reaktionsvolumen und Inkubationszeiten wurden standardisiert, um dieselbe Reaktionskinetik zu gewährleisten. Zur Messung der Lichtintensität wurde ein Chamäleon mit Luminometerfunktion (Chameleon-425-104 multilabel plate scintillation counter, Hidex Oy, Turku, Finland) verwendet, das Emissionsmaximum lag bei 562 nm. Die Messungen der Proben erfolgten in schwarzen 96-well-Mikrotiterplatten, um Kreuzreaktionen zwischen den wells zu minimieren. Zur Messung und Auswertung wurde das Programm CommFiler benutzt.

Als Kontrollen wurden ein leeres well, Verdünnungspuffer sowie LB-Medium unverdünnt bzw. verdünnt 1 : 5; 1 : 20; 1 : 100; 1 : 500 in Verdünnungspuffer verwendet. Von

sämtlichen Proben (ATP-Standard, Blank, Kontrollen, Zellkulturproben) wurden 25 µl Probe mit 25 µl Lysereagenz versetzt und 5 min auf Eis inkubiert, um den Einfluss endogener ATPasen zu minimieren. Zellkulturproben wurden zuvor mit Verdünnungspuffer auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Nach 4,5 min wurden 50 µl Reaktionsansatz in eine Mikrotiterplatte überführt und nach exakt 5 min Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl frisch aufgetauter Luciferase gestartet. Exakt 10 sec danach erfolgte die Messung der Lichtintensität.

### 3.5.11.3. Berechnung des ATP-Gehalts

Aus den Messwerten der Verdünnungsreihe des ATP-Standards wurde eine Standardfunktion erstellt, mit deren Hilfe die ATP-Stoffmenge in den Zellkulturproben berechnet wurde. Dabei wurden folgende Zellvolumina benutzt (Anja Richter, unpubliziert): Für  $OD < 0.5$  wurden  $2,5 \times 0,8 \mu\text{m} = 1,26 \times 10^{-15} \text{ l}$  zugrunde gelegt, für  $OD 0,5-3,0$  wurden  $2,0 \times 0,8 \mu\text{m} = 1,0 \times 10^{-15} \text{ l}$  verwendet und für  $OD > 3,0$  wurden  $1,2 \times 0,8 \mu\text{m} = 0,60 \times 10^{-15} \text{ l}$  eingesetzt.

## 3.6. Approximation von Parametern in Bereichen zwischen Messpunkten

### 3.6.1. Approximation von $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate

Die  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate wurden schrittweise linear interpoliert. Dabei wurde vorausgesetzt, dass sich die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit, der  $\sigma^s$ -Gehalt sowie die Menge an synthetisierten und degradierten  $\sigma^s$ -Molekülen/Zelle zwischen zwei diskreten Messwerten kontinuierlich verändern.

#### 3.6.1.1. Interpolation der $\sigma^s$ -Halbwertszeiten

Die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden im Verlauf des Wachstumszyklusses ermittelt (Kap. 3.5.7, 4.1.1 und 4.1.2). Sie zeigten eine annähernd lineare Zunahme (abgesehen von der ÜP), eine lineare Ausgleichsgerade bestätigte das. Anschließend wurden die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten zwischen zwei diskreten Messwerten schrittweise linear interpoliert. Dabei wurden Stetigkeit und Differenzierbarkeit vorausgesetzt.

### 3.6.1.2. Interpolation des $\sigma^s$ -Gehalts

Der  $\sigma^s$ -Gehalt wurde im Verlauf des Wachstumszyklusses ermittelt (Kap. 3.5.8 und 4.3.1). Die Zunahme des  $\sigma^s$ -Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklusses war nicht linear, sondern entsprach einer höhergradigen Polynomfunktion. Durch eine Polynomfunktion 9. Grades konnten die Veränderungen des  $\sigma^s$ -Gehalts mit  $R > 0,9$  angenähert werden, allerdings ist diese Funktion wegen des hohen Grades instabil. Darum wurde zwischen zwei diskreten Messwerten schrittweise linear interpoliert. Dabei wurde vorausgesetzt, dass der Verlauf der kontinuierlichen Funktion keine größeren Schwankungen aufweist und dass Stetigkeit und Differenzierbarkeit gegeben sind.

### 3.6.1.3. Interpolation der degradierten $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle

Mit Hilfe der  $\sigma^s$ -Halbwertszeit  $T_{1/2}$  (Kap. 3.5.7, 4.1.1 und 4.1.2) und dem  $\sigma^s$ -Gehalt (Kap. 3.5.8 und 4.3.1) bei einem diskreten Messwert wurde die Anzahl der degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle zwischen zwei diskreten Messwerten schrittweise berechnet. Dabei wurde ausgenutzt, dass im Verlauf von  $T_{1/2}$  die Hälfte der vorhandenen  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle degradiert wird.

### 3.6.1.4. Interpolation der synthetisierten $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle

Mit Hilfe der approximierten  $\sigma^s$ -Halbwertszeit (Kap. 3.6.1.1), dem approximierten  $\sigma^s$ -Gehalt (Kap. 3.6.1.2) und der approximierten Anzahl der degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle zwischen zwei diskreten Messwerten (Kap. 3.6.1.3) wurde die Anzahl der synthetisierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle zwischen diesen Messwerten berechnet. Dabei wurde angenommen, dass nach Abzug der degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle vom  $\sigma^s$ -Gehalt zu einem bestimmten Zeitpunkt die Differenz zum  $\sigma^s$ -Gehalt in diesem Zeitpunkt genau der Anzahl an neu synthetisierten  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle entspricht. Ein Beispiel ist in Tabelle 4.1 gezeigt.

## 3.7. Computerprogramme und Datenbanken

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich die folgenden Computerprogramme genutzt: Microsoft Office XP, Kaleidagraph Version 4.1.3, Image Gauge Version 3.45 und CommFiler.

Für Informationen zu den *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 wurde das Coli Genetic Stock Center, Yale (CGSC) genutzt (<http://cgsc2.biology.yale.edu/index.php>). Für Informationen zu *E. coli* K12-Genen und Proteinen wurden die *E. coli*-Datenbanken EcoCyc (<http://ecocyc.org>) und EcoGene (<http://ecogene.org>) sowie das National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) genutzt.





## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Proteolyse und Stabilisierung von $\sigma^s$ im Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110

Viele grundlegende Einsichten zur  $\sigma^s$ -Proteolyse wurden durch Arbeiten mit dem Stamm MC4100 gewonnen (Becker *et al.*, 1999; Kolmsee und Hengge, 2011; Lange und Hengge-Aronis, 1994; Mika und Hengge, 2005; Muffler *et al.*, 1996a und 1996b; Stüdemann *et al.*, 2003). Da in den letzten Jahren vermehrt mit dem Stamm W3110 gearbeitet wird, war fraglich, ob die Erkenntnisse zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  aus dem MC4100 auf den Stamm W3110 übertragbar sind, denn es war bekannt, dass sich beide Stämme genetisch voneinander unterscheiden und dass außerdem der Sigmafaktor-Gehalt in W3110 etwa doppelt so hoch ist wie in MC4100 (Jishage *et al.*, 1996). Weiterhin existieren mehrere Subtypen von beiden Stämmen (Jishage und Ishihama, 1997; Naas *et al.*, 1994 und 1995; Rodriguez *et al.*, 1992; Spira *et al.*, 2008), weshalb Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen nur bedingt vergleichbar sind. Daher war fraglich, ob frühere Ergebnisse zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  aus dem MC4100 auf den Stamm W3110 übertragbar sind und ob es Unterschiede bei den  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten und der Stabilisierung von  $\sigma^s$  zwischen beiden Stämmen gibt.

Ein für die vorliegende Arbeit wesentlicher Unterschied zwischen beiden Stämmen besteht in den Mutationen *flhD5301* und *relA1*. Da der MC4100 eine *flhD5301*-Mutante ist (Komeda und Iino, 1979), ist er im Gegensatz zum W3110 nicht motil. Die Unterschiede zwischen beiden Stämmen sollten jedoch auf die PP begrenzt sein, da Motilität nur in dieser Wachstumsphase auftritt. Es wurde vermutet, dass die *flhD5301*-Mutation erstens Auswirkungen auf den Abbau von  $\sigma^s$  durch ClpXP haben könnte, da der motile W3110 ATP für den ATP-intensiven Antrieb des Flagellenmotors verbraucht und dass die Mutation zweitens Auswirkungen auf die Stabilisierung von  $\sigma^s$  am RNAPK haben könnte, da  $\sigma^s$  in W3110 in der PP mit  $\sigma^F$  um Bindung an das RNAPK kompetitiert.

Der Stamm MC4100 weist als *relA1*-Mutante (Durfee *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 1989) einen reduzierten (p)ppGpp-Gehalt auf (Bergman *et al.*, 2014). Die Akkumulation von (p)ppGpp in der PP und SP ist von zentraler Bedeutung für die Adaption der Zellen an die SP, da (p)ppGpp bei AS-Mangel u. a. die stringente Antwort auslöst, die die Translation inhibiert (Paul *et al.*, 2004). Außerdem unterstützt ein hoher (p)ppGpp-Gehalt die Induktion der

generellen Stressantwort, da (p)ppGpp die RNAP empfänglicher für alternative Sigmafaktoren macht und so die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  bei der Bindung an das RNAPK erhöht (Jishage *et al.*, 2002). Daher wurde vermutet, dass die *relA1*-Mutation in MC4100 Auswirkungen auf die Induktion der generellen Stressantwort haben könnte.

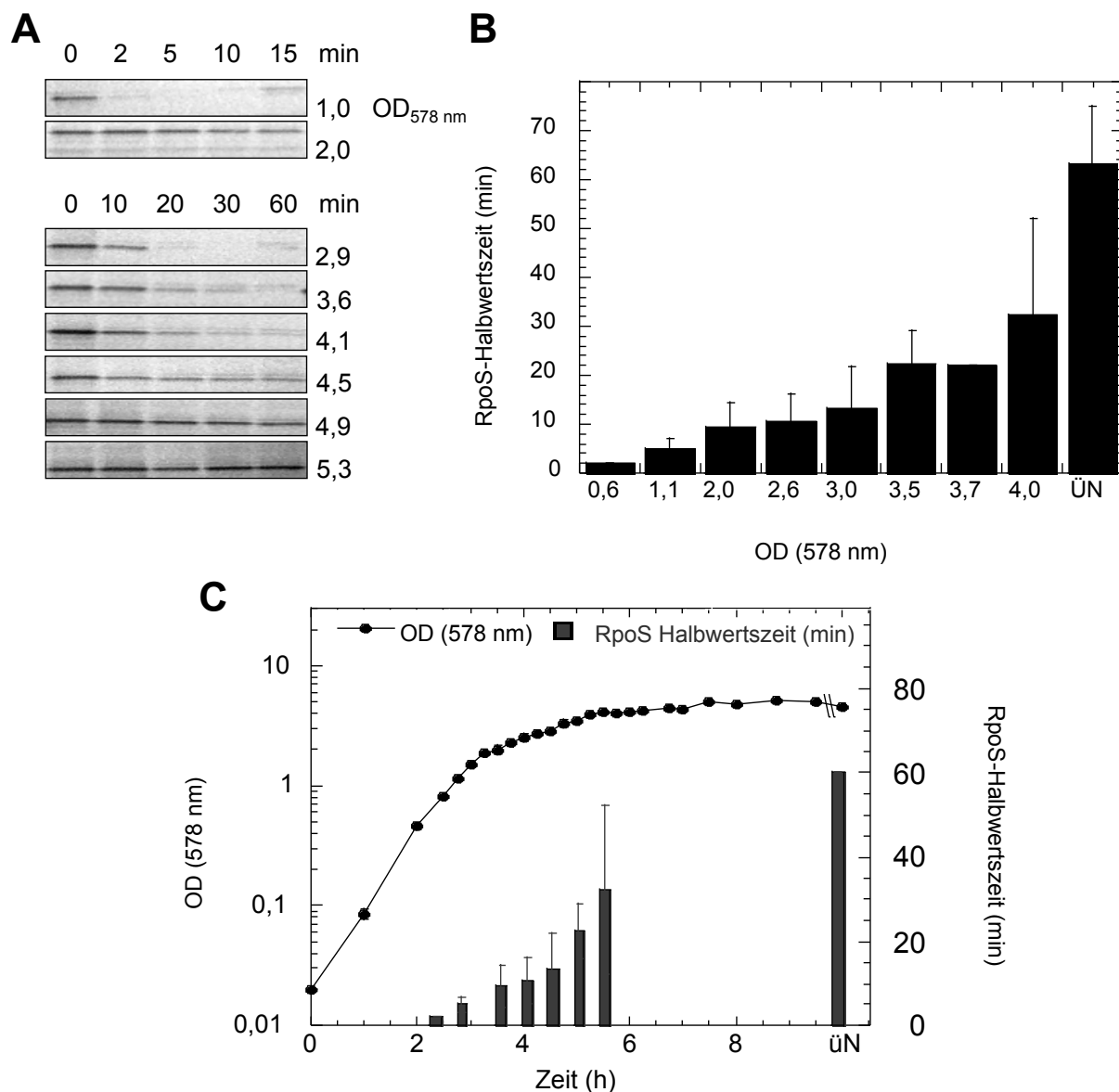
Zu Beginn der Arbeit wurden in kurzen Abständen entlang des gesamten Wachstumszyklus quantitative Daten erhoben. Dazu wurden in beiden Stämmen nicht radioaktive *in vivo*-Abbauxperimente von  $\sigma^s$  unter standardisierten Bedingungen bei 28 °C und 37 °C durchgeführt und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten bestimmt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde in beiden Stämmen der zelluläre  $\sigma^s$ - und ATP-Gehalt bestimmt und das Langzeitüberleben untersucht. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, wurden in der gesamten Arbeit die Proben in kurzen Abständen entlang des Wachstumszyklus untersucht.

#### 4.1.1. Bei 37 °C wird $\sigma^s$ in MC4100 zweiphasig und in W3110 einphasig stabilisiert

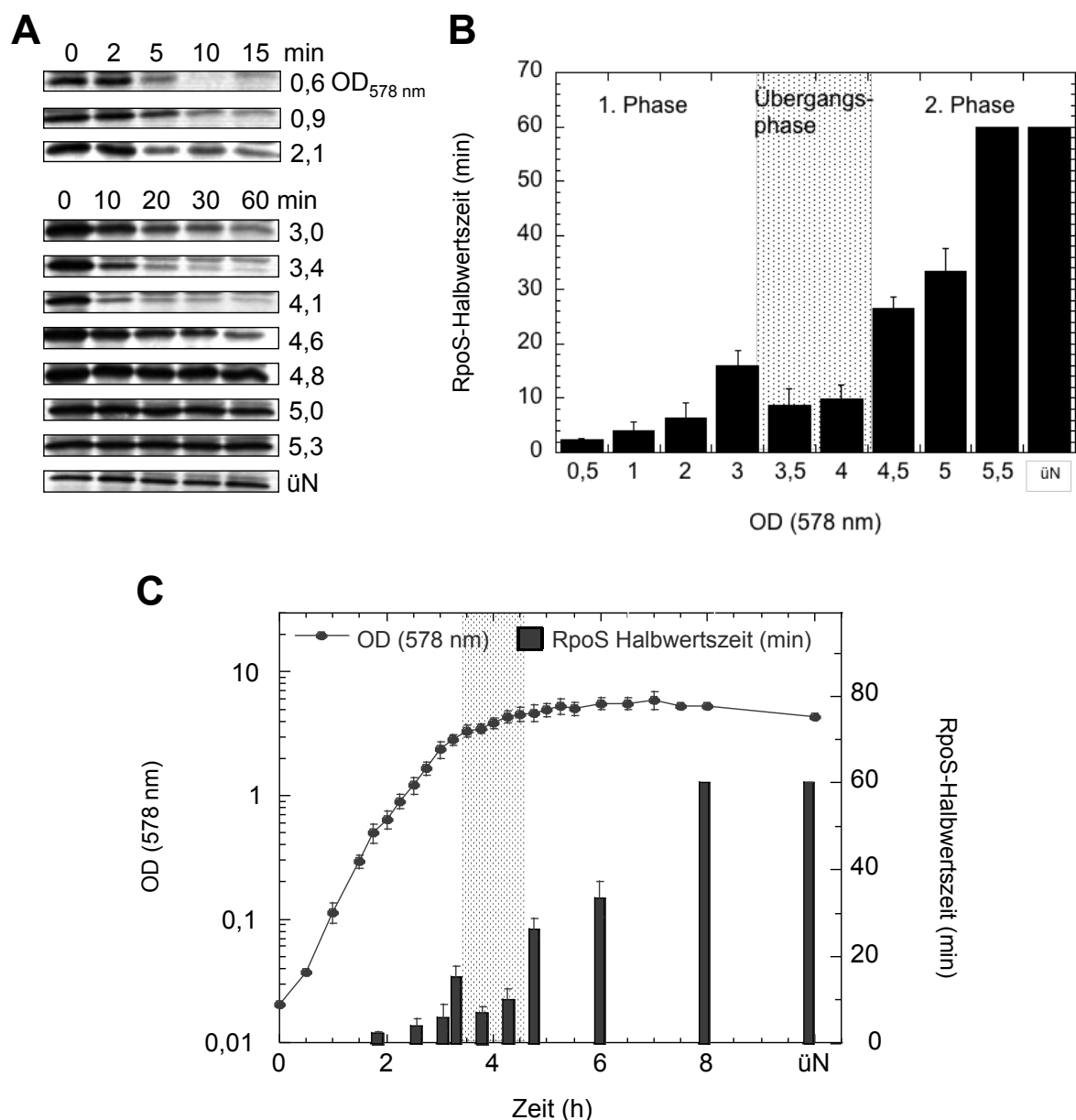
Zuerst wurde die Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  im Wachstumszyklus des Stammes W3110 bei 37 °C untersucht. Für die nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimente von  $\sigma^s$  wurde bei verschiedenen optischen Dichten von 578 nm (OD) die Proteinbiosynthese mit Spectinomycin, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, inhibiert. Dann wurde der relative  $\sigma^s$ -Gehalt, ausgehend vom Beginn der Inhibierung der Proteinbiosynthese, in kurzen Zeitabständen bestimmt und daraus die Halbwertszeit berechnet. Die Ergebnisse (Abb. 4.1) zeigen, dass  $\sigma^s$  in wachsenden Zellen wie erwartet rasch abgebaut wird. Die Halbwertszeit beträgt bei OD 0,5 ca 2 min. Anschließend steigt die Halbwertszeit stetig. Bei Übergang in die SP bei OD 3,0 beträgt die Halbwertszeit ca. 14 min und in der Übernachtskultur ist die Halbwertszeit > 60 min, was zeigt, dass  $\sigma^s$  vollständig stabilisiert wurde.

Als nächstes wurde die Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  in MC4100 bei 37 °C untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 4.2) zeigen, dass  $\sigma^s$  in wachsenden Zellen schnell abgebaut wird. Das ist konform mit früheren Puls Chase-Untersuchungen (Lange und Hengge-Aronis, 1994). Bei OD 0,5 beträgt die Halbwertszeit 2,5 min. Danach steigt die Halbwertszeit bis zum Übergang in die SP bei OD 3,0 kontinuierlich an. Mit dem Eintritt in die SP kommt es bei OD 3,0–4,0 unerwartet zu einem schnellen Anstieg des Abbaus und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit sinkt rapide um den Faktor 3 von 17 min auf 6 min. Danach steigt die Halbwertszeit wieder an und

nimmt in 40 min von OD 4,0–4,5 um knapp das 3-fache zu. Anschließend wird  $\sigma^s$  nach und nach vollständig stabilisiert. Bei OD 5,5 ist die Halbwertszeit  $> 60$  min und  $\sigma^s$  ist stabil.

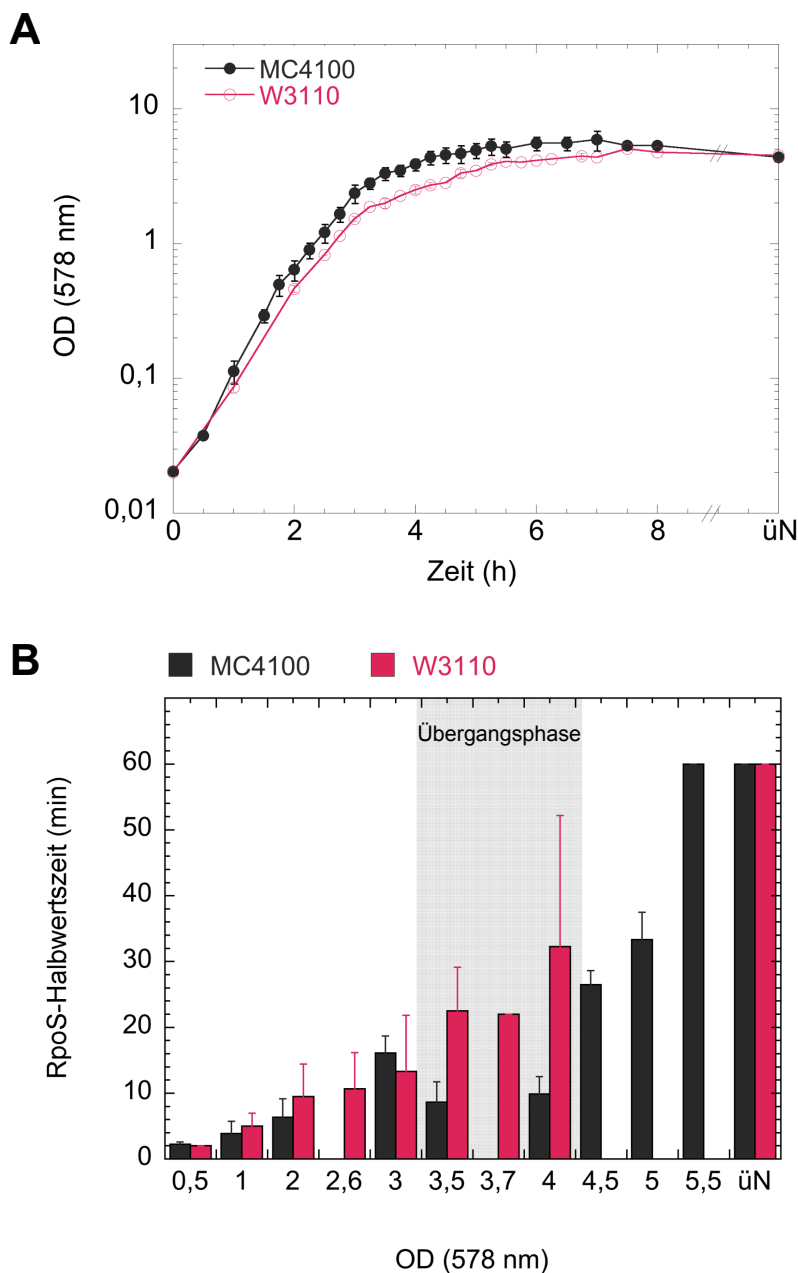


**Abb. 4.1:  $\sigma^s$  wird in W3110 bei 37 °C sukzessive stabilisiert.** Die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^s$  (RpoS) während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes W3110 in LB bei 37 °C bestimmt. **(A)** *In vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^s$ . Bei verschiedenen optischen Dichten von 578 nm (OD) wurde die Proteinbiosynthese mit Spectinomycin gestoppt und das Abbauxperiment gestartet. Dann wurde nach den angegebenen Zeiten der Abbau mit Trichloressigsäure gestoppt. Danach wurden alle Proben gefällt und jeweils 3  $\mu$ g Gesamtprotein im Westernblot mit  $\sigma^s$ -Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot. **(B, C)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD (B) und OD und Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Zeit (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten  $> 60$  min wurden als *stabil* definiert.



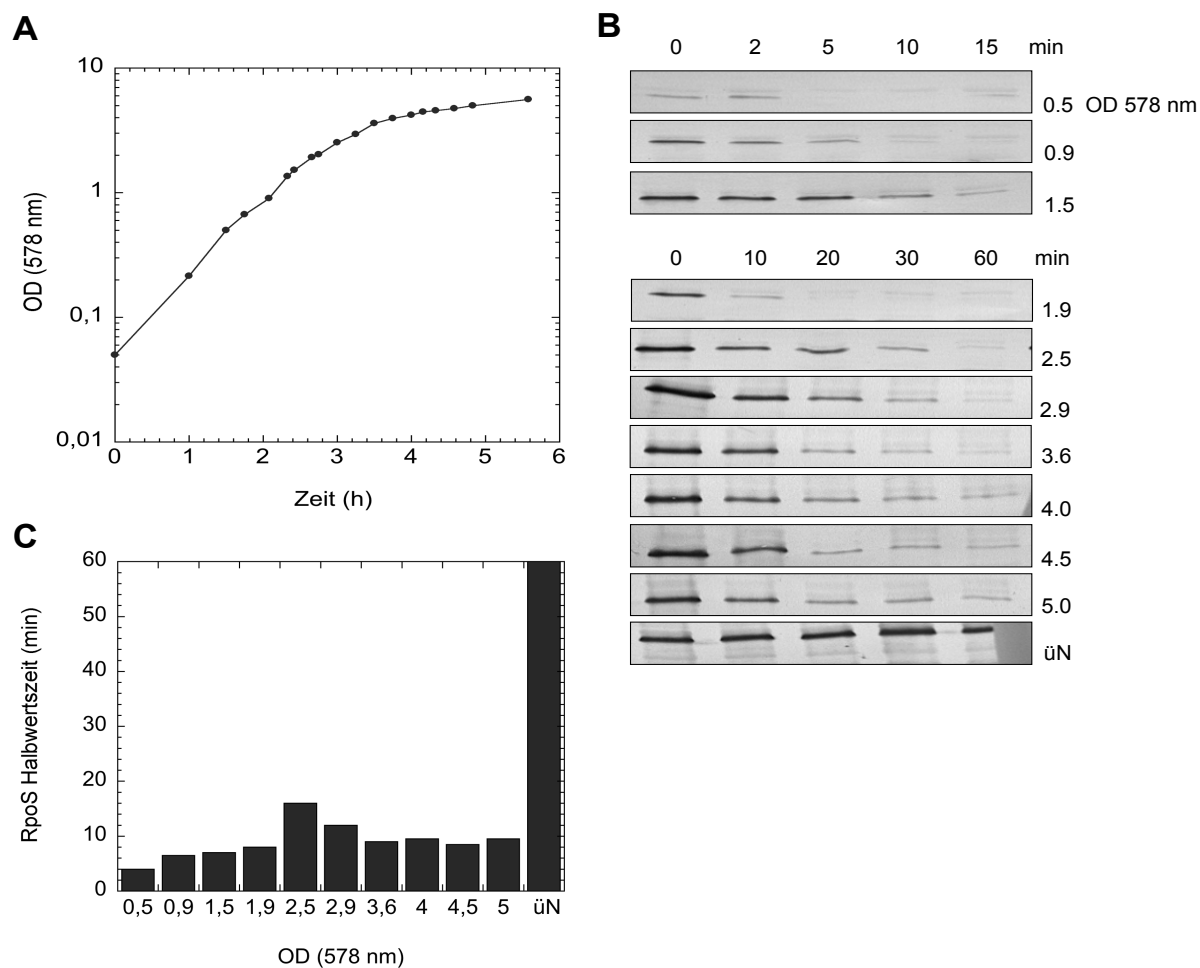
**Abb. 4.2:**  $\sigma^S$  wird in MC4100 bei 37 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der frühen Stationärphase getrennt sind. Die  $\sigma^S$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^S$  während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes MC4100 in LB bei 37 °C bestimmt. **(A)** *In vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^S$  wie in Abb. 4.1A beschrieben. **(B, C)** Halbwertszeiten der  $\sigma^S$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD (B) und OD und Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Zeit (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Die Stabilisierung von  $\sigma^S$  verläuft zweiphasig mit einer zwischengeschalteten Übergangsphase zu Beginn der Stationärphase (grau).

Der Vergleich beider Stämme (Abb. 4.3) verdeutlicht, dass  $\sigma^s$  in MC4100 zweiphasig stabilisiert wird und beide Phasen durch eine Übergangsphase (ÜP) bei OD 3,0–4,0 getrennt sind, während  $\sigma^s$  in W3110 einphasig stabilisiert wird.



**Abb. 4.3: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.** Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauexperimenten von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben im Verlauf des Wachstumszyklus der beiden Stämme in LB bei 37 °C bestimmt. **(A)** Wachstumskurven beider Stämme und **(B)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Mit Beginn der Stationärphase wird  $\sigma^s$  in W3110 zunehmend stabiler, während  $\sigma^s$  in MC4100 in einer Übergangsphase (grau) wieder instabiler wird.

Es wurde vermutet, dass der nicht motile MC4100 in der PP weniger ATP verbraucht, da er ATP für den ATP-intensiven Antrieb des Flagellenmotors einspart, sodass  $\sigma^s$  länger von ClpXP abgebaut werden könnte als in W3110. Dazu wurde der  $\sigma^s$ -Abbau in W3110 *fliA::scar* untersucht (Abb. 4.4). Dieser Stamm bildet keine funktionalen Flagellen aus und ist daher nicht motil.



**Abb. 4.4: In der nicht motilen Mutante W3110 *fliA::scar* wird  $\sigma^s$  schwach zweiphasig stabilisiert.** Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^s$  während des Wachstumszyklus der nicht motilen *E. coli* K12-Mutante W3110 *fliA::scar* in LB bei 37 °C bestimmt. (A) Wachstumskurve. (B) *In vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben. (C) Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Die Stabilisierung von  $\sigma^s$  erfolgt schwach zweiphasig, die Zweiphasigkeit ist jedoch geringer als in der nicht motilen *fliH5301*-Mutante MC4100 (vgl. Abb. 4.2).

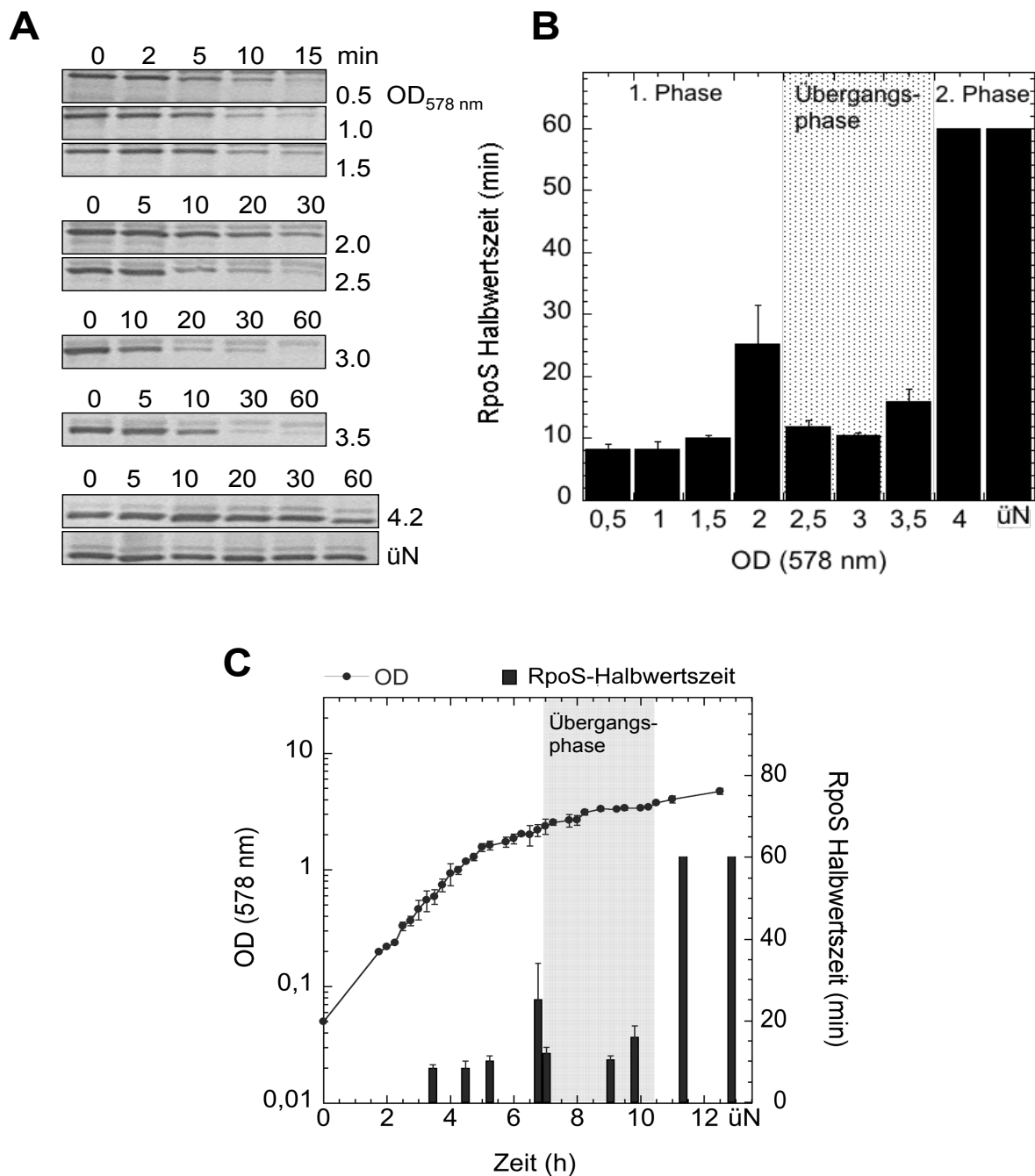
Der *in vivo*-Abbau von  $\sigma^s$  in W3110 *fliA::scar* (Abb. 4.4) zeigt, dass  $\sigma^s$  in wachsenden Zellen zügig abgebaut wird. Bei OD 0,5 beträgt die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit 4 min. Anschließend steigt die Halbwertszeit bis OD 2,5 kontinuierlich an und sinkt dann mit Eintritt in die SP um den Faktor 1,6. Eine gewisse Zweiphasigkeit und damit eine Annäherung an das MC4100-Abbaumuster von  $\sigma^s$  sind erkennbar, jedoch ist der Effekt geringer als in MC4100. Das bedeutet, dass die Abwesenheit von Flagellen im Stamm MC4100 einen Einfluss hat, aber nicht der alleinige Grund für die unterschiedliche Stabilisierung von  $\sigma^s$  in beiden Stämmen ist.

#### 4.1.2. Bei 28 °C wird $\sigma^s$ in beiden Stämmen zweiphasig stabilisiert

Während Untersuchungen bei 37 °C die Situation im Wirt widerspiegeln, entsprechen Untersuchungen bei 28 °C der Situation nach Freisetzung in die Umwelt. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Temperaturen besteht in der Ausbildung, Zusammensetzung und Regulation von Biofilmen. Bei 37 °C bilden pathogene *E. coli*-Stämme Biofilme im Wirt aus. Bei diesen Biofilmen vermitteln Typ 1-Fimbrien und spezielle Adhäsine die initiale Anheftung an den Wirt und die dauerhafte Anheftung wird hauptsächlich durch PGA realisiert (Agladze *et al.*, 2005; Danese *et al.*, 2000; Korea *et al.*, 2011). Unterhalb von 30 °C werden Biofilme hingegen außerhalb des Wirtes auf umspülten Oberflächen gebildet, z. B. in der Kanalisation. Diese sogenannten “submerged biofilms” werden durch CsgD reguliert (Brombacher *et al.*, 2003 und 2006; Prigent-Combaret *et al.*, 2001). Ihre Entstehung wird durch die Ausbildung adhäsiver Curlifimbrien initiiert und an der permanenten Anheftung sind Zellulose, Curlifimbrien und Colansäure involviert, während die PGA-Synthese in Folge der niedrigen Temperatur inhibiert wird (Beloïn *et al.*, 2008; Hengge, 2010; Karatan *et al.*, 2009; Pratt und Kolter, 1998; Wood *et al.*, 2006). Die Bildung von “submerged biofilms” tritt nur bei Stämmen auf, die zuvor motil waren (Pratt und Kolter, 1998; Wood *et al.*, 2006). Es gibt sie zwar auch vereinzelt bei nicht motilen Stämmen (Pratt und Kolter, 1999; Prigent-Combaret *et al.*, 2000), dies ist jedoch die Ausnahme. Die Entstehung, Zusammensetzung und Regulation von Biofilmen unterscheidet sich also bei beiden Temperaturen voneinander.

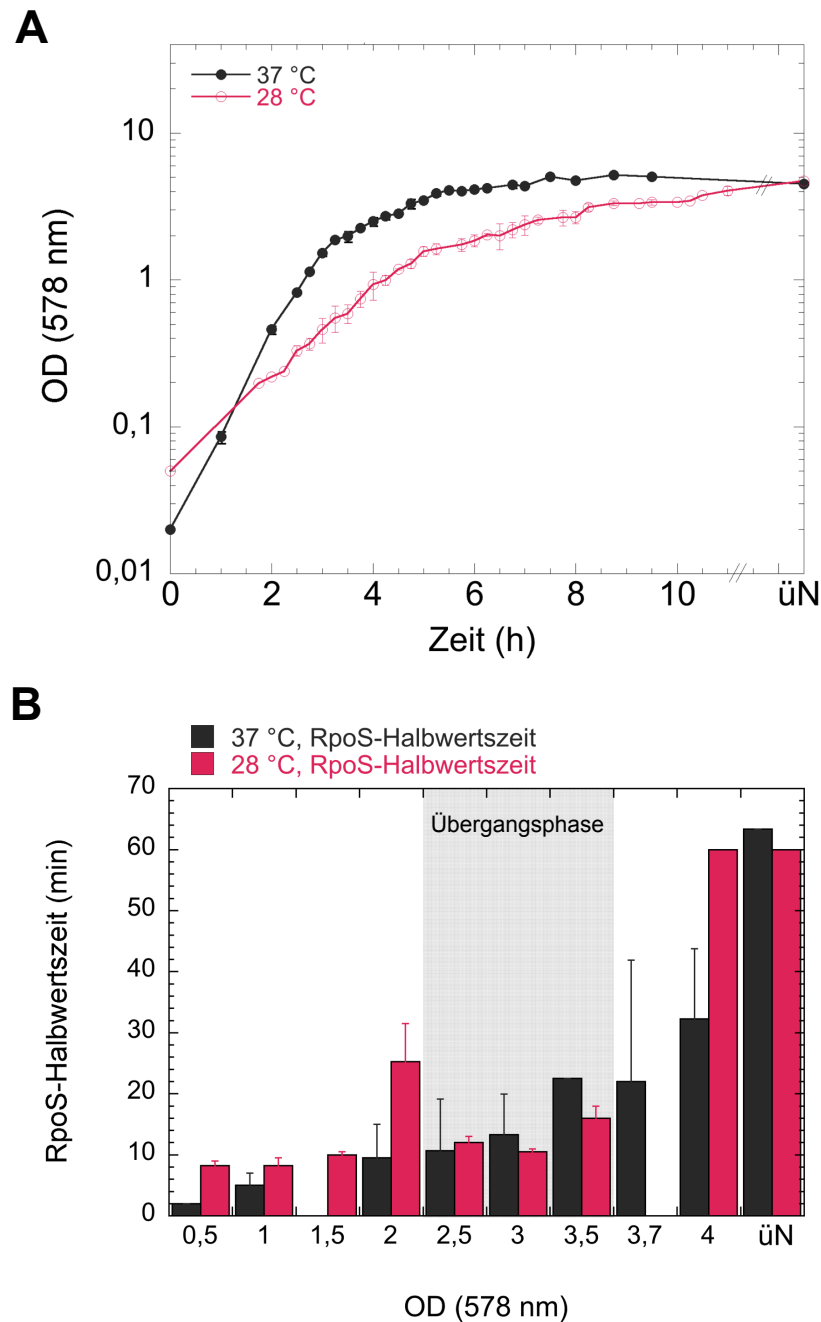
Es stellte sich die Frage, wie sich die  $\sigma^s$ -Proteolyse bei 28 °C verhält, wenn gleichzeitig  $\sigma^s$ -vermittelt CsgD und Curlifimbrien induziert werden. Dazu wurde die Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauexperimenten von

$\sigma^s$  entlang der Wachstumskurve vergleichend in den beiden Stämmen W3110 und MC4100 untersucht.



**Abb. 4.5:**  $\sigma^s$  wird in W3110 bei 28 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der späten postexponentiellen Wachstumsphase getrennt sind. Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^s$  während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes W3110 in LB bei 28 °C bestimmt. **(A)** *In vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben. **(B, C)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD (B) und OD und Halbwertszeiten abhängig von der Zeit (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von zwei Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert.  $\sigma^s$  wird zweiphasig mit einer zwischengeschalteten Übergangsphase (grau) stabilisiert.



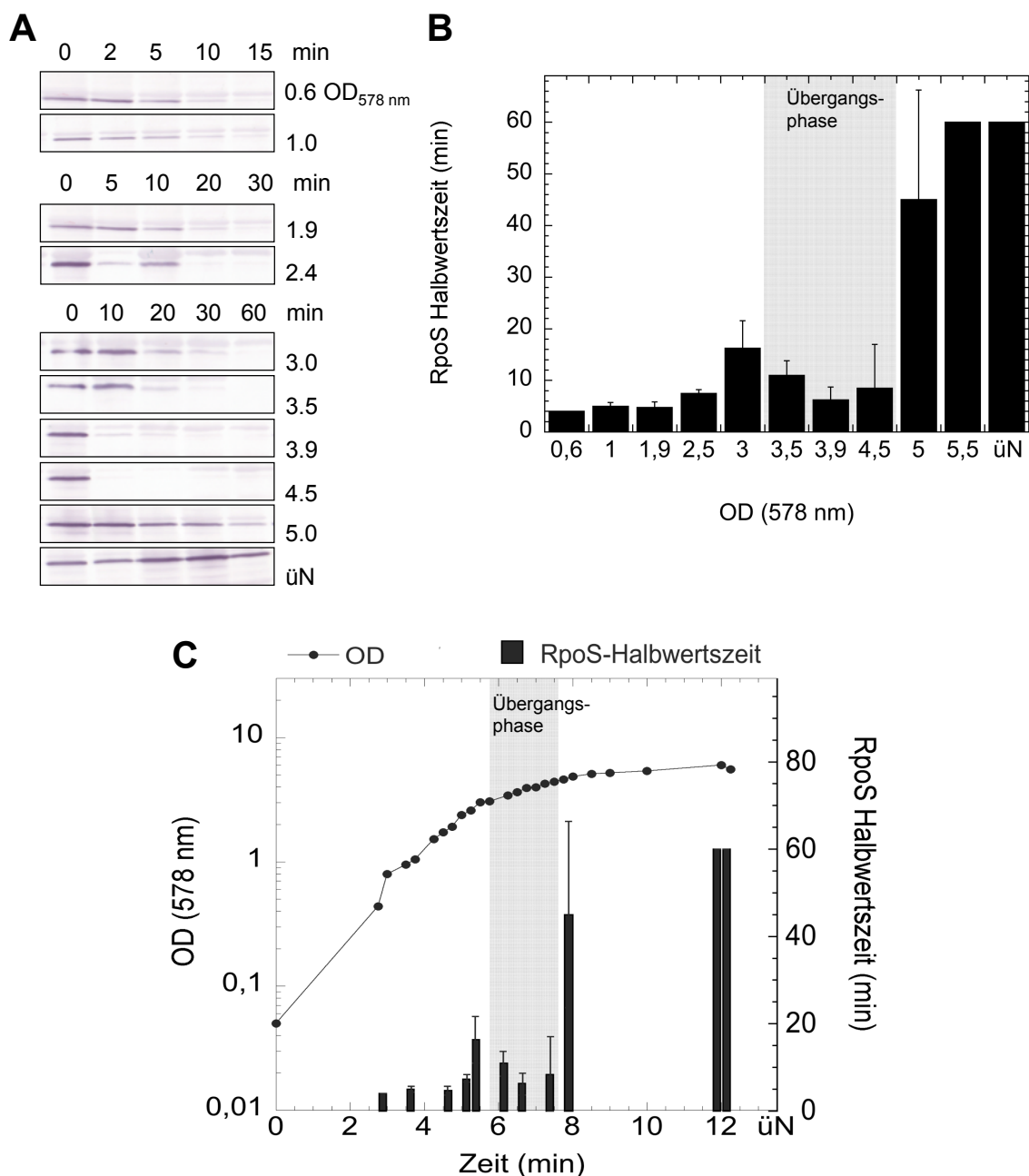


**Abb. 4.6: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  in dem *E. coli* K12-Stamm W3110 bei 37 °C und 28 °C.** Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben im Verlauf des Wachstumszyklus bei beiden Temperaturen in LB bestimmt. **(A)** Wachstumskurven beider Stämme und **(B)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier (37 °C) bzw. zwei (28 °C) Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Mit Beginn der Stationärphase wird  $\sigma^s$  bei 37 °C zunehmend stabiler, während  $\sigma^s$  bei 28 °C während einer Übergangsphase (grau) wieder instabiler wird.

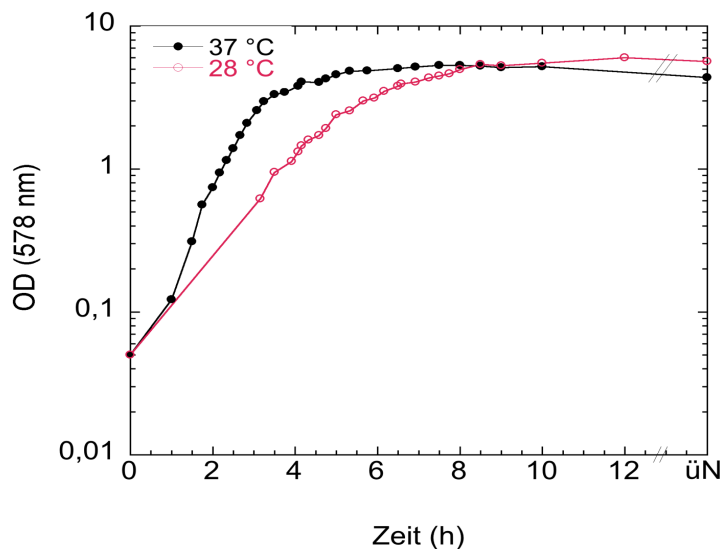
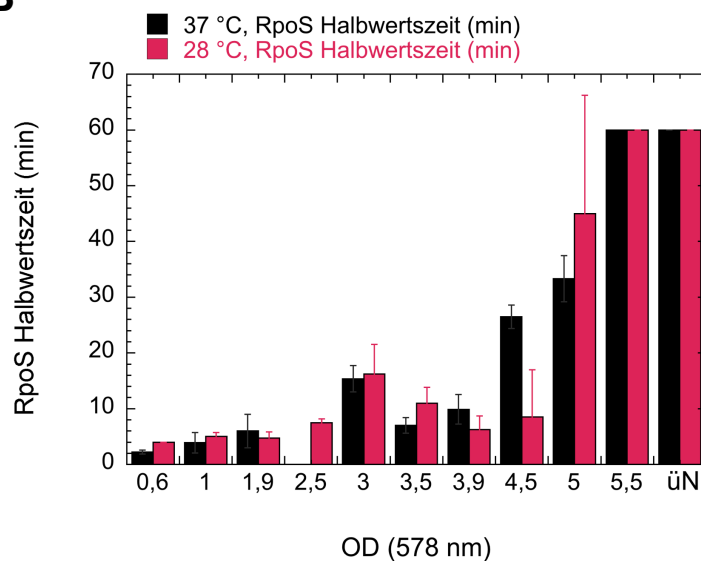
In W3110 zeigen die Ergebnisse (Abb. 4.5), dass die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit in wachsenden Zellen bei OD 0,5 ca. 8 min beträgt. Das ist etwa 4-mal langsamer als bei 37 °C. Anschließend lässt der Abbau bis OD 2,0 nach. Ab OD 2,0 kommt es zu einer ÜP, in der sich die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit um den Faktor 2,5 verringert und der Abbau wieder schneller wird. Danach steigt die Halbwertszeit kontinuierlich, bis  $\sigma^s$  bei OD 4,0 vollständig stabilisiert ist. Die  $\sigma^s$ -Stabilisierung verläuft also in W3110 bei 28 °C zweiphasig mit einer ÜP bei OD 2,0, während sie bei 37 °C einphasig ist (Abb. 4.6). Die Wachstumsrate ist bei 28 °C erwartungsgemäß niedriger als bei 37 °C (Abb. 4.6).

Als nächstes wurde die  $\sigma^s$ -Proteolyse in dem Stamm MC4100 bei 28 °C untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 4.7) zeigen, dass  $\sigma^s$  in wachsenden Zellen bei OD 0,6 mit einer Halbwertszeit von 4 min abgebaut wird. Anschließend steigt die Halbwertszeit bis OD 3,0 an auf 16 min. Von OD 3,0–3,9 kommt es wie bei 37 °C zu einer ÜP, in der die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit von ca. 16 min auf etwa 6 min sinkt. Danach steigt die Halbwertszeit, bis  $\sigma^s$  bei OD 5,5 vollständig stabilisiert wird. Der Vergleich der  $\sigma^s$ -Proteolyse in MC4100 bei 37 °C und 28 °C (Abb. 4.8) zeigt, dass  $\sigma^s$  bei beiden Temperaturen zweiphasig stabilisiert wird und die Wachstumsrate bei 28 °C geringer ist als bei 37 °C.

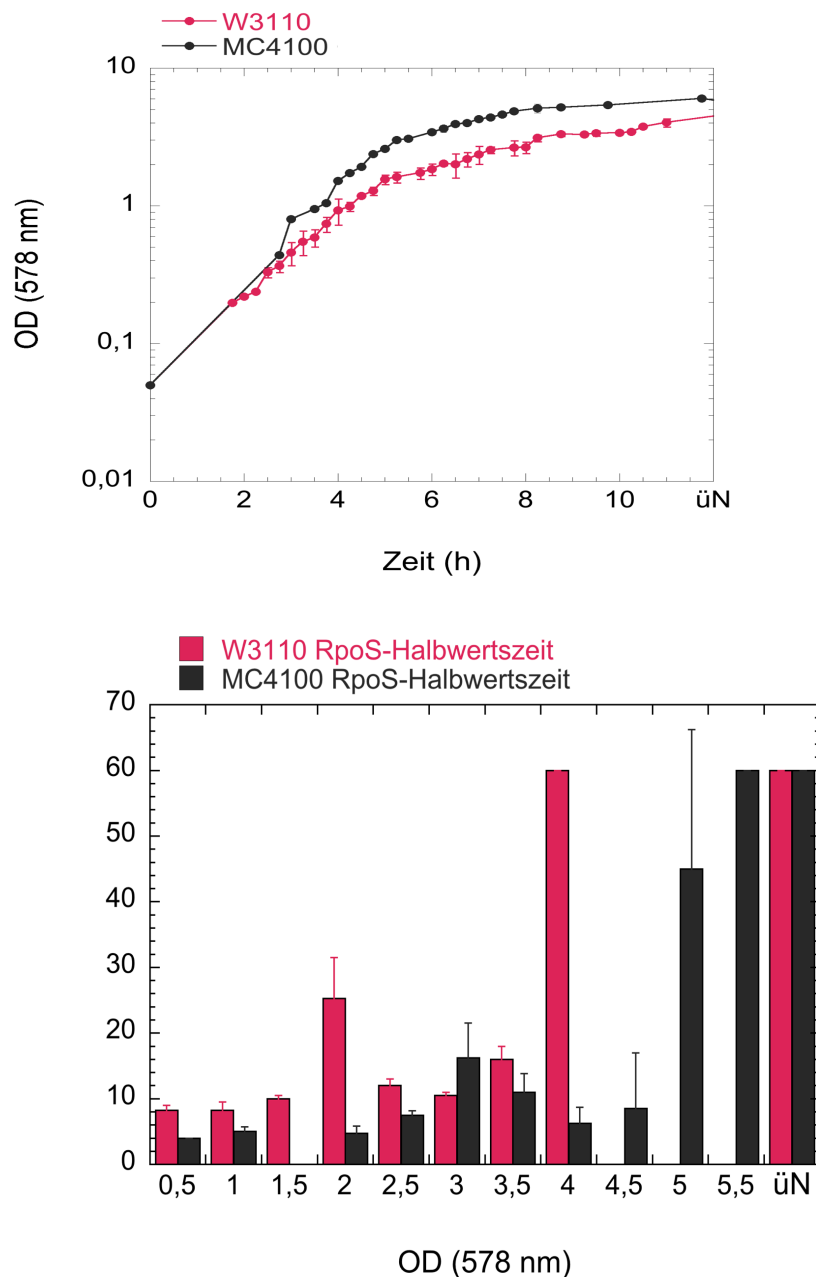
Die Ergebnisse zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  zeigen folgendes: (i) Die Stabilisierung von  $\sigma^s$  entlang der Wachstumskurve erfolgt in den meisten Fällen zweiphasig (Ausnahme W3110, 37 °C). (ii) W3110 stabilisiert  $\sigma^s$  früher bzw. nachhaltiger und scheint eine nahende Hungersituation besser zu erkennen.



**Abb. 4.7:**  $\sigma^S$  wird in MC4100 bei 28 °C in zwei Phasen stabilisiert, die durch eine Übergangsphase in der frühen Stationärphase getrennt sind. Die  $\sigma^S$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbaupersonen von  $\sigma^S$  während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes MC4100 in LB bei 28 °C bestimmt. **(A)** *In vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^S$  wie in Abb. 4.1A beschrieben. **(B, C)** Halbwertszeiten der  $\sigma^S$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD (B) und OD und Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Zeit (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von zwei Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert.  $\sigma^S$  wird zweiphasig mit einer zwischengeschalteten Übergangsphase (grau) stabilisiert.

**A****B**

**Abb. 4.8: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  in dem *E. coli* K12-Stamm MC4100 bei 37 °C und 28 °C.** Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauexperimenten von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben im Verlauf des Wachstumszyklus bei beiden Temperaturen in LB bestimmt. **(A)** Wachstumskurven beider Temperaturen und **(B)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier (37 °C) bzw. zwei (28 °C) Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Im Vergleich zu 37 °C ist bei 28 °C die Wachstumstumsrate in MC4100 reduziert und die zweiphasige Stabilisierung von  $\sigma^s$  ist stärker ausgeprägt.



**Abb. 4.9: Vergleich der Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 28 °C.** Die  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauxperimenten von  $\sigma^s$  wie in Abb. 4.1A beschrieben im Verlauf des Wachstumszyklus in beiden Stämmen in LB bestimmt. **(A)** Wachstumskurven beider Stämme und **(B)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung in Abhängigkeit von der OD dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von zwei Experimenten. Die ODs und die berechneten  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Bei 28 °C wird  $\sigma^s$  in W3110 schneller stabilisiert als in MC4100.

## 4.2. Zellulärer Crl- und Rsd-Gehalt in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100

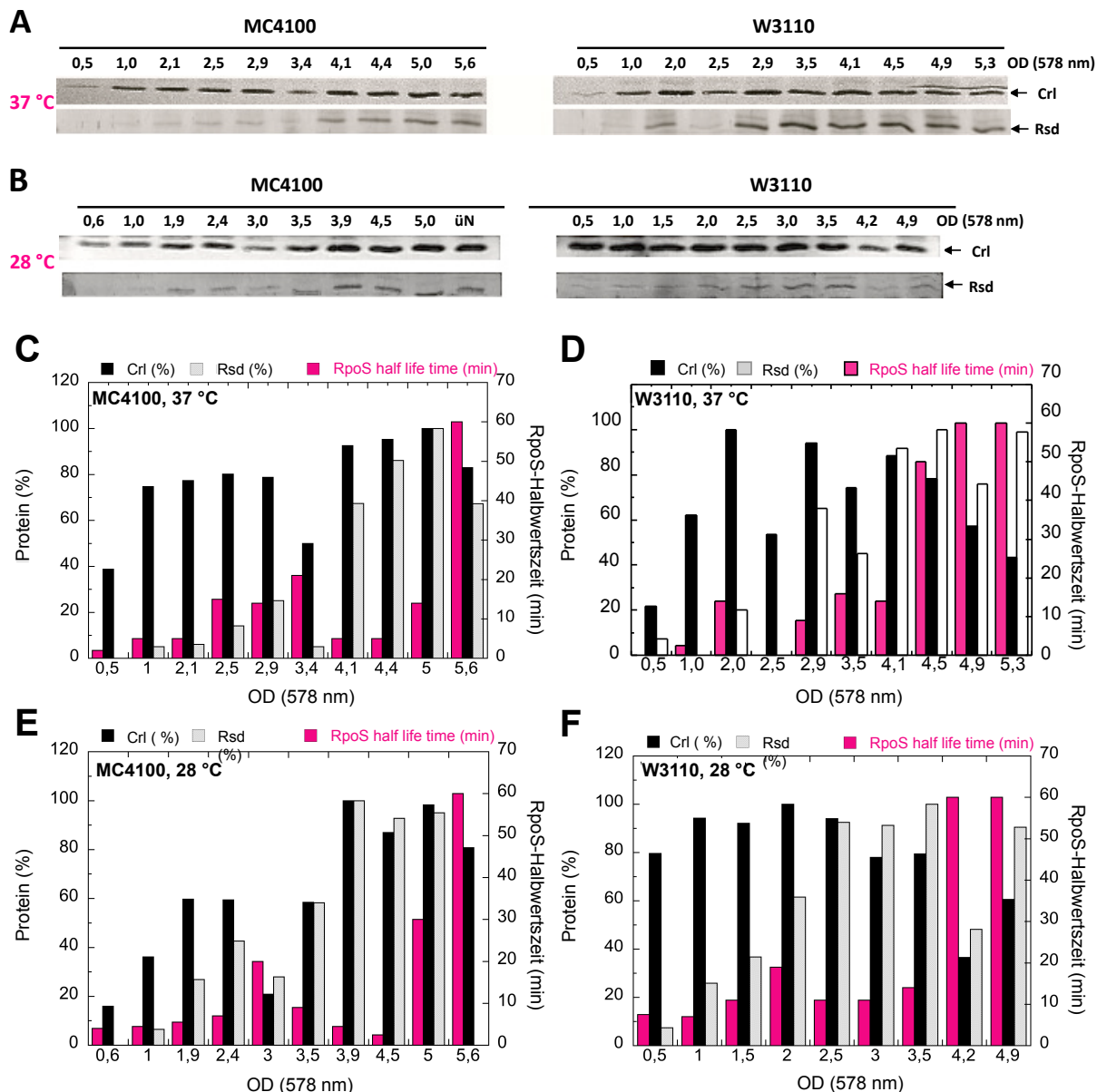
Die vorangegangenen Untersuchungen zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  zeigten, dass  $\sigma^s$  in W3110 bei 28 °C und in MC4100 bei 37 °C und 28 °C nicht zu Beginn der SP stabilisiert wird, sondern dass die Proteolyse von  $\sigma^s$  zunächst in eine ÜP geht, in der der Abbau wieder schneller wird. Daraus ergab sich die Frage, ob die teilweise zweiphasige Stabilisierung von  $\sigma^s$  am unterschiedlichen Bindungsvermögen von  $\sigma^s$  an das RNAPK in beiden Stämmen liegt. Crl und Rsd beeinflussen über Eingriff in die Sigmafaktorkompetition die Bindung von  $\sigma^s$  an das RNAPK. Das hat Auswirkungen auf die  $\sigma^s$ -Proteolyse, da  $\sigma^s$  gebunden an das RNAPK vor Abbau geschützt ist. Daher interessierte, welche Rolle Crl und Rsd bei der teilweise zweiphasigen Stabilisierung von  $\sigma^s$  entlang der Wachstumsphase in LB spielen und wie sie selbst induziert werden.

### 4.2.1. In W3110 akkumuliert Rsd früher als in MC4100

Für die Bestimmung des relativen Crl- und Rsd-Gehalts mittels Westernblot mit Rsd bzw. Crl-Antikörper wurden die bereits vorhandenen Proben der nicht radioaktiven  $\sigma^s$ -*in vivo*-Abbau-Experimente herangezogen.

Der relative Crl-Gehalt ist bei 37 °C in beiden Stämmen in wachsenden Zellen niedrig und steigt bei Zellen, die in die SP gehen, stark an (Abb. 4.10C,D). Bei 28 °C hingegen ist der Crl-Gehalt in W3110 bereits in wachsenden Zellen 4-mal höher als im MC4100 (Abb. 4.10E,F).

Der relative Rsd-Gehalt ist bei 37 °C in beiden Stämmen in wachsenden Zellen sehr niedrig, während er in SP-Zellen hoch ist. Auffallend ist jedoch, dass Rsd im W3110 früher, nämlich bereits mit Beginn der SP akkumuliert, während es in MC4100 erst im Verlauf der SP akkumuliert (Abb. 4.10C,D). Dieser Trend zeigt sich auch bei 28 °C (Abb. 4.10E,F). Die frühere Akkumulation von Rsd spricht dafür, dass  $\sigma^s$  in W3110 früher an der RNAP stabilisiert werden kann als im MC4100.



**Abb. 4.10: Vergleich des zellulären Rsd- und Crl-Gehalts in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 28 °C und 37 °C.** Für die Bestimmung des relativen Rsd- und Crl-Gehalts wurde bei verschiedenen optischen Dichten von 578 nm (OD) die Proteinbiosynthese mit Spectinomycin gestoppt. Dann wurden alle Proben mit TCA gefällt und jeweils 5 µg Gesamtprotein (Crl) bzw. 10 µg Gesamtprotein (Rsd) im Westernblot mit Rsd bzw. Crl-Antikörper analysiert. **(A, B)** Crl- und Rsd-Gehalt in MC4100 und W3110 bei 37 °C bzw. 28 °C. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Westernblot. **(C–F)** Crl- und Rsd-Gehalt sowie  $\sigma^S$  (RpoS)-Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der OD in W3110 und MC4100 bei 37 °C bzw. 28 °C. Zu Beginn der Stationärphase ist der Rsd-Gehalt in W3110 bei beiden Temperaturen deutlich höher als in MC4100.

Die Ergebnisse zum Crl- und Gehalt zeigen folgendes: (i) Die Veränderungen des relativen zellulären Crl- und Rsd-Gehalts korrelieren nicht mit der Stabilisierung von  $\sigma^S$ . Daraus kann geschlossen werden, dass weder Crl noch Rsd an der transienten Stabilisierung und Destabilisierung von  $\sigma^S$  beteiligt sind. (ii) Der relative Rsd-Gehalt ist in W3110 höher als in

MC4100. Das passt zu den Ergebnissen von Hofmann *et al.*, 2011, die zeigten, dass die Auslösung der stringent response durch RelA/ (p)ppGpp die *rsd-P2*-Promotoraktivität erhöht.

### 4.3. Unterschiede im zellulären $\sigma^s$ -Gehalt in den beiden

#### *E. coli* K12-Stämmen MC4100 und W3110

Die Ergebnisse zur Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  und zum zellulären Crl- und Rsd-Gehalt deuteten darauf hin, dass sich der  $\sigma^s$ -Gehalt und damit die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  um das RNAPK in beiden Stämmen voneinander unterscheiden. Darum interessierte, wie hoch der  $\sigma^s$ -Gehalt in MC4100 und W3110 im Verlauf des Wachstumszyklus ist und in welchem Zusammenhang  $\sigma^s$ -Gehalt und Stabilisierung von  $\sigma^s$  stehen.

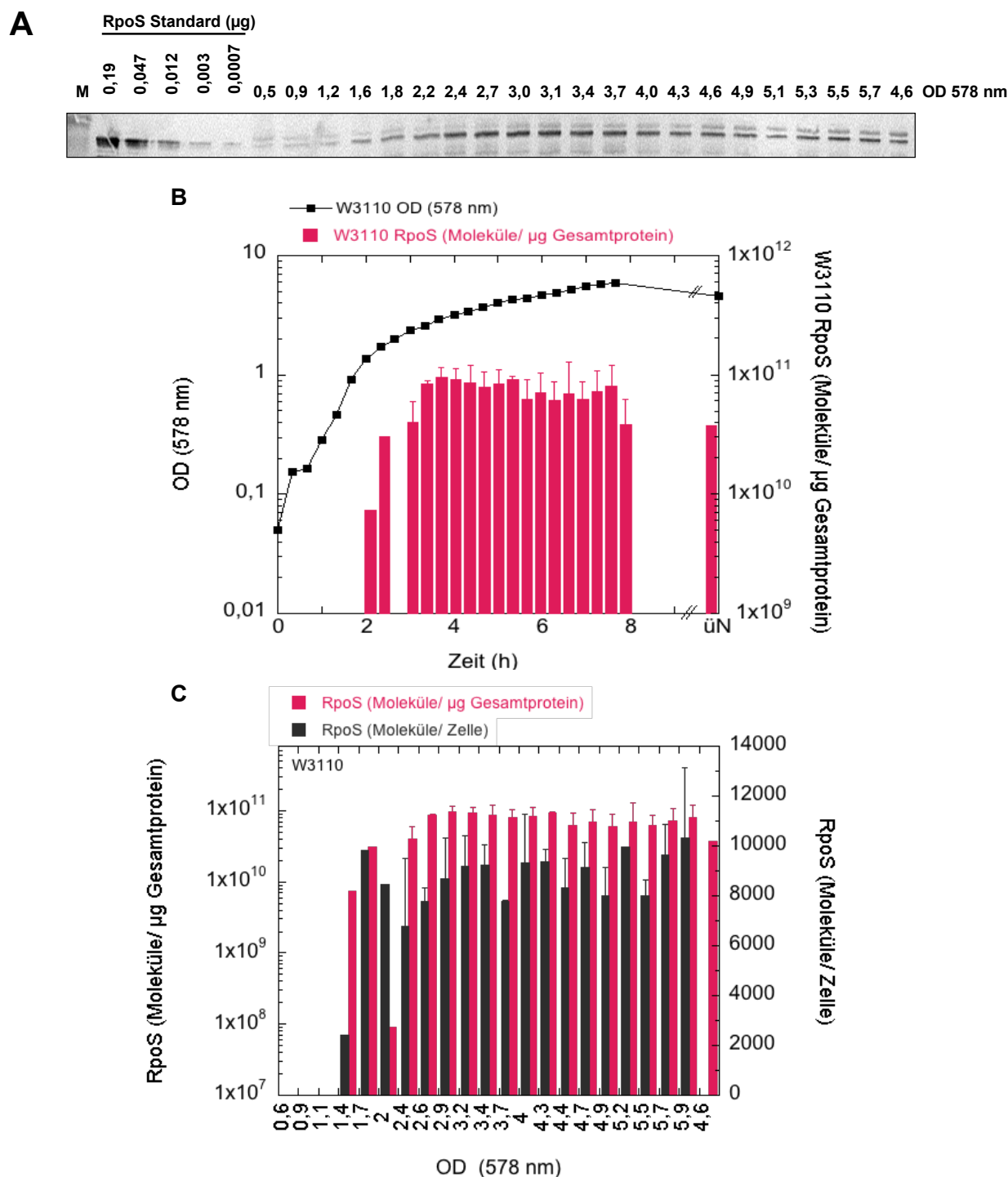
Vor Beginn dieser Arbeit war bereits aus den Daten von Jishage und Ishihama, 1995 sowie Jishage *et al.*, 1996 bekannt, dass der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt in MC4100 ca. 30 fmol/  $\mu\text{g}$  GP und in W3110 ca. 40–60 fmol/  $\mu\text{g}$  GP beträgt. Bei diesen Daten wurde allerdings nicht die unterschiedliche Zellmorphologie in LP und SP berücksichtigt. Daher war anzunehmen, dass die Angaben ungenau waren. Außerdem war bekannt, dass diverse Stammvarianten vom W3110 existieren (Jishage und Ishihama, 1997) und MC4100 (Spira *et al.*, 2008). Daher waren die Daten von Jishage und Ishihama nicht auf die bei uns im Labor verwendeten Stämme übertragbar waren.

Der zelluläre  $\sigma^s$ -Gehalt wurde in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 in kurzen Abständen entlang der Wachstumskurve bestimmt. Zur Berechnung der  $\sigma^s$ -Gehalts/ Zelle wurden die Lebendzellzahlen (LZ) für beide Stämme bestimmt (Kap. 4.5.1., Tab. 4.3).

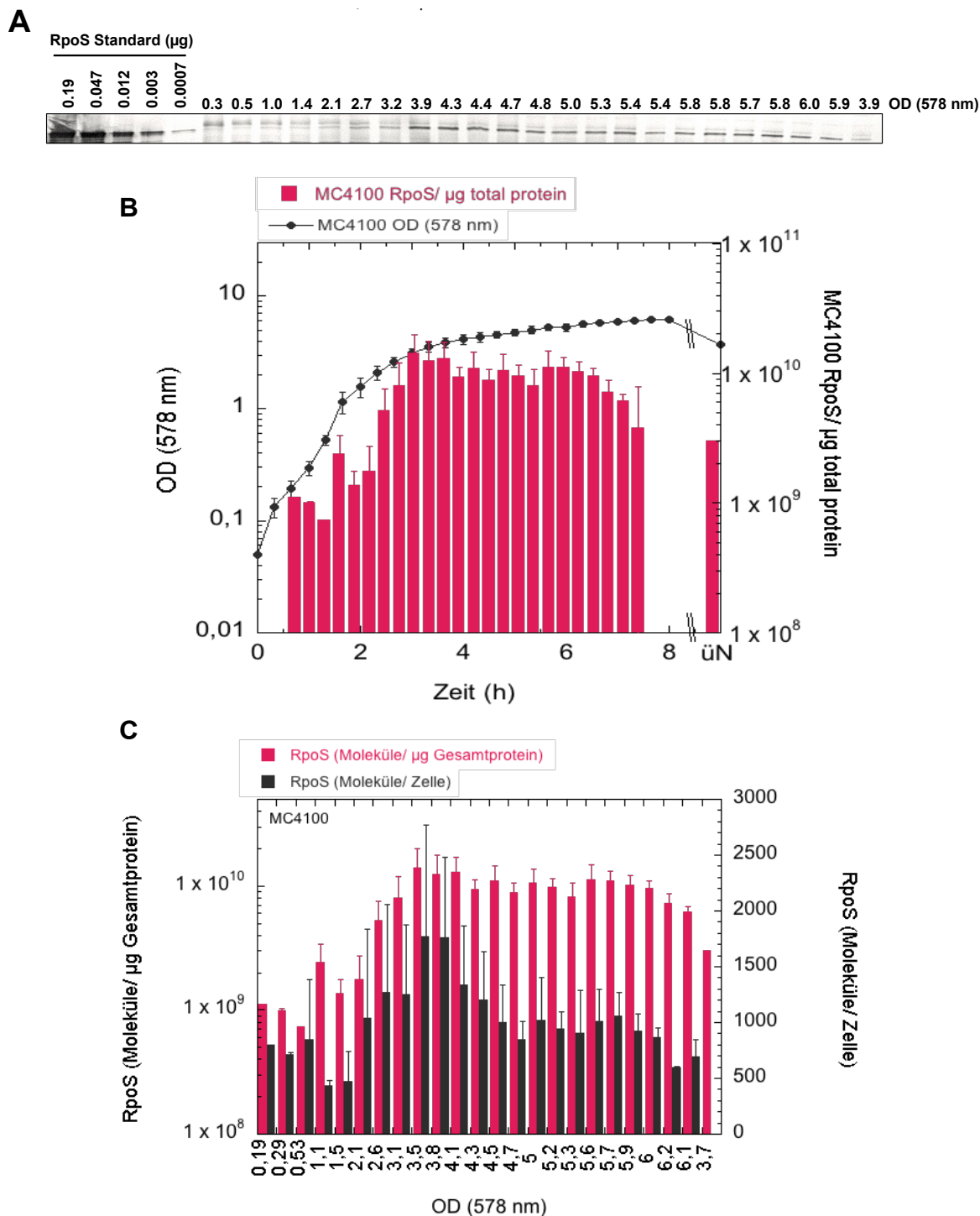
#### 4.3.1. Der $\sigma^s$ -Gehalt ist in W3110 6–7-mal höher als in MC4100 und in der Übernachtskultur 12-mal höher

Für die *in vivo*-Bestimmung des zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts von MC4100 und W3110 wurde entlang der Wachstumskurve alle 20 Minuten Proben entnommen und analysiert.



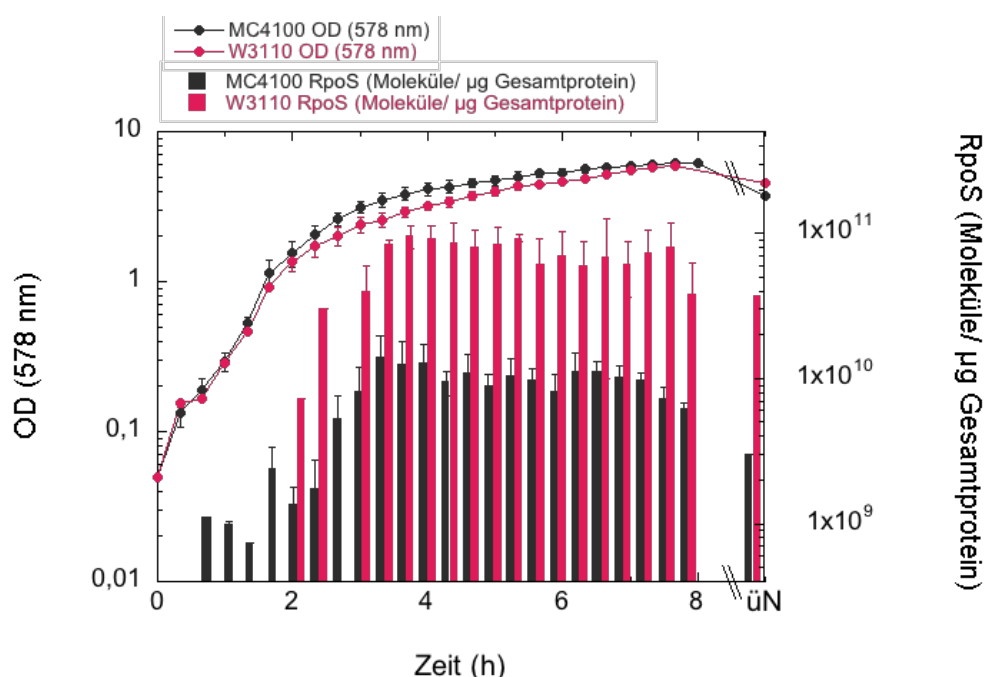


**Abb. 4.11:** Der  $\sigma^s$ -Gehalt beträgt in W3110 bei 37 °C zwischen 2400–9900  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle bzw.  $7,3 \times 10^9$ – $9,6 \times 10^{10}$   $\sigma^s$ -Moleküle/  $\mu\text{g}$  GP. Bestimmung des zellulären  $\sigma^s$  (RpoS)-Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes W3110 in LB bei 37 °C. **(A)** Bei verschiedenen optischen Dichten von 578 nm (OD) wurde die Proteinbiosynthese mit Spectinomycin gestoppt. Dann wurden alle Proben mit TCA gefällt und jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein im Westernblot mit  $\sigma^s$ -Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot. **(B, C)**  $\sigma^s$ -Gehalt und OD in Abhängigkeit von der Zeit (B) bzw.  $\sigma^s$ -Gehalt in Abhängigkeit von der OD (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von drei Experimenten. Die ODs und der  $\sigma^s$ -Gehalt wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.



**Abb. 4.12:** In MC4100 beträgt der  $\sigma^S$ -Gehalt bei 37 °C zwischen 430–1760  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle bzw.  $7,3 \times 10^8$ – $1,4 \times 10^{10}$   $\sigma^S$ -Moleküle/  $\mu\text{g}$  GP. Bestimmung des zellulären  $\sigma^S$  (RpoS)-Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes MC4100 in LB bei 37 °C. **(A)** Bei verschiedenen optischen Dichten von 578 nm (OD) wurde die Proteinbiosynthese mit Spectinomycin gestoppt. Dann wurden alle Proben mit TCA gefällt und jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein im Westernblot mit  $\sigma^S$ -Antikörper analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot. **(B, C)**  $\sigma^S$ -Gehalt und OD in Abhängigkeit von der Zeit (B) bzw.  $\sigma^S$ -Gehalt in Abhängigkeit von der OD (C), dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von vier Experimenten. Die ODs und der  $\sigma^S$ -Gehalt wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.

In W3110 bei 37 °C liegt der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus zwischen  $7,3 \times 10^9$  und  $9,6 \times 10^{10}$   $\sigma^S$ -Molekülen/  $\mu\text{g}$  GP (2400–9900  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle) (Abb. 4.11). In MC4100 liegt der  $\sigma^S$ -Gehalt bei 37 °C entlang des Wachstumszyklus zwischen  $7,3 \times 10^8$ – $1,4 \times 10^{10}$   $\sigma^S$ -Moleküle/  $\mu\text{g}$  GP (430–1760  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle) (Abb. 4.12.). Der Vergleich beider Stämme (Abb. 4.13) zeigt, dass der  $\sigma^S$ -Gehalt in W3110 6–7-mal höher und in der Übernachtskultur sogar 12-mal höher ist als in MC4100. Außerdem zeigt der Stammvergleich, dass der  $\sigma^S$ -Gehalt in der LP in beiden Stämmen etwa 11–13-mal niedriger ist als in der SP. Er zeigt aber auch, dass trotz basaler Expression und starkem  $\sigma^S$ -Abbau von ca.  $10^9$   $\sigma^S$ -Moleküle/  $\mu\text{g}$  GP ( $> 400$   $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle) vorhanden sind.



**Abb. 4.13:** Der  $\sigma^S$ -Gehalt ist in W3110 bei 37 °C 6–7-mal höher und in der Übernachtskultur sogar 12-mal höher als in MC4100. Wachstumskurven und zellulärer  $\sigma^S$  (RpoS)-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme W3110 und MC4100 in LB bei 37 °C, dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von drei (W3110) bzw. vier (MC4100) Experimenten. Bestimmung des  $\sigma^S$ -Gehalts wie bei Abb. 4.11A beschrieben. Die ODs und der  $\sigma^S$ -Gehalt wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse folgendes: (i) Der  $\sigma^S$ -Gehalt liegt im gesamten Wachstumszyklus in W3110 zwischen 2400–9900  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle und in MC4100 zwischen 430–1760  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle. (ii) Der  $\sigma^S$ -Gehalt ist in W3110 6–7-mal höher als in MC4100. (iii) In der LP sind trotz raschem  $\sigma^S$ -Abbau mehr als 400  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle

vorhanden. Das deutet darauf hin, dass das  $\sigma^s$ -Proteolysesystem nur eine bestimmte Höchstmenge  $\sigma^s$ / Zeiteinheit degradieren kann.

#### 4.4. Der zelluläre $\sigma^s$ -Gehalt als Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts von Proteinbiosynthese und Proteolyse von $\sigma^s$ in den Stämmen W3110 und MC4100

Der  $\sigma^s$ -Gehalt wird in der Zelle durch zwei Gegenspieler bestimmt: die  $\sigma^s$ -Biosynthese und die Proteolyse von  $\sigma^s$ . Abhängig von der Intensität und der Regulation dieser beiden Prozesse verändert sich der  $\sigma^s$ -Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus. Die vorangegangenen Ergebnisse ließen vermuten, dass sich in den einzelnen Wachstumsphasen nicht nur die Höhe des  $\sigma^s$ -Gehalts stetig verändert, sondern auch der Einfluss von Synthese und Proteolyse von  $\sigma^s$  auf den  $\sigma^s$ -Gehalt.

Aus den Daten zur  $\sigma^s$ -Halbwertszeit (Kapitel 4.1) und zum  $\sigma^s$ -Gehalt (Kapitel 4.3) im Verlauf des Wachstumszyklus konnte auf den Einfluss von  $\sigma^s$ -Synthese und Proteolyse am  $\sigma^s$ -Gesamtgehalt rückgeschlossen werden. Es blieb jedoch unklar, wie sich der gemessene  $\sigma^s$ -Gehalt in einer Probe zusammensetzt, d. h. wie viel davon von einer bis zur nächsten Probennahme, also innerhalb von 20 min, neu synthetisiert bzw. abgebaut wurde und wie viel davon *alt* ist und ob und wie sich die Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus ändert.

##### 4.4.1. Proteolyse und Synthese von $\sigma^s$ sind in W3110 bis zu 10-mal höher als in MC4100

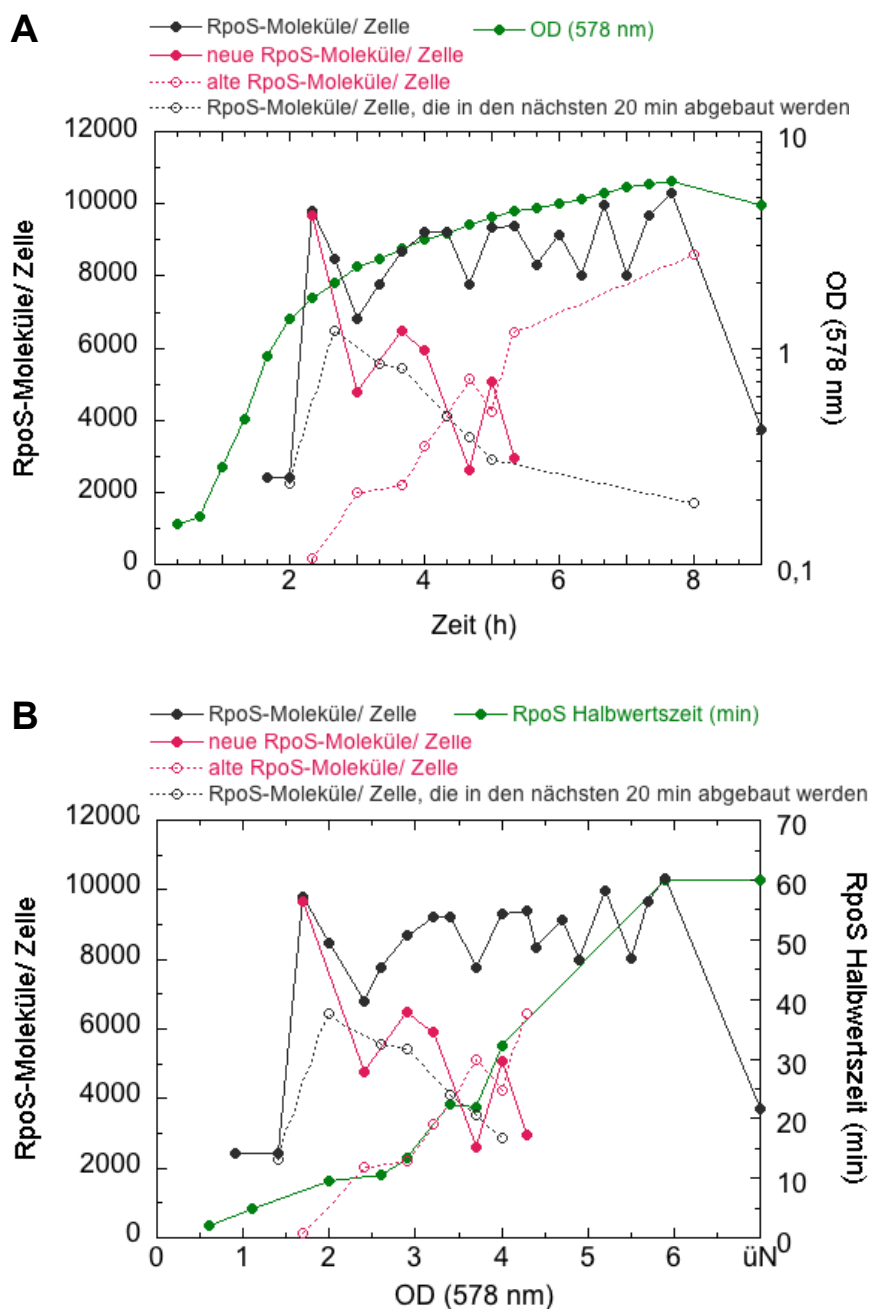
Zuerst wurde berechnet, wie sich der in Kapitel 4.3. gemessene  $\sigma^s$ -Gehalt in einer Probe zusammensetzt und bestimmt, wie viel davon seit der letzten Probennahme (vor 20 min) neu synthetisiert wurde und wie viel davon *alt* ist und aus der Probe zuvor stammte und in der Zwischenzeit also nicht degradiert wurde. Dazu wurde zu dem in Kapitel 4.3. bestimmten  $\sigma^s$ -Gehalt die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit hinzugezogen und daraus hochgerechnet, wie viele der gemessenen  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle bis zur nächsten Probennahme nach 20 min abgebaut werden und wie viele noch übrig bleiben werden. Diese Menge wurde als *altes*  $\sigma^s$  bezeichnet. Danach wurde das *alte*  $\sigma^s$  vom  $\sigma^s$ -Gehalt der nächsten Probennahme abgezogen. Das Ergebnis ist die Menge an neu synthetisierten  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle seit der letzten Probe, also innerhalb der

letzten 20 min. Diese Menge wurde als *neues  $\sigma^s$*  bezeichnet. Diese Menge ist ein Maß für die *Syntheseaktivität*. Beides, altes und neues  $\sigma^s$ , ergibt addiert den zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts zu einem bestimmten Zeitpunkt. Danach wurde hochgerechnet, wie viele  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle bis zur nächsten Probennahme degradiert werden. Diese Menge ist, zusammen mit der Menge an altem  $\sigma^s$ , ein Maß für die *Proteolyseaktivität* zu einem bestimmten Zeitpunkt.

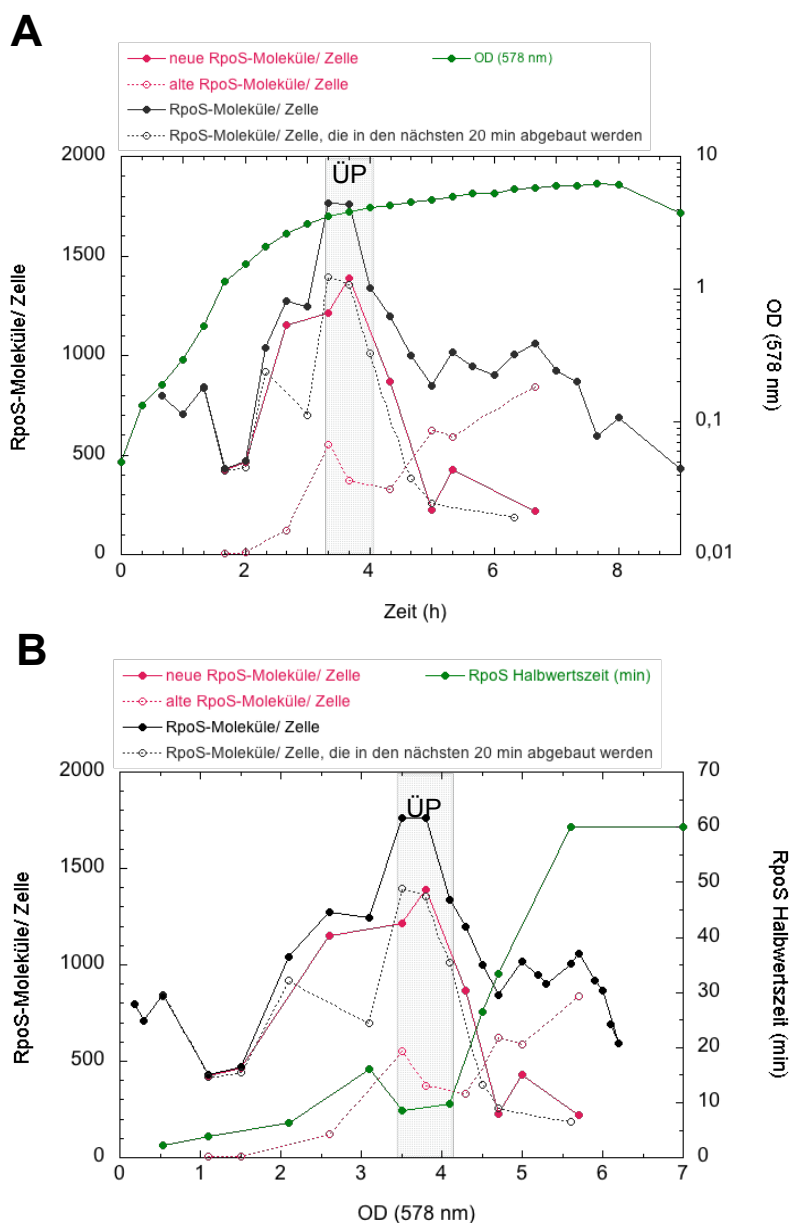
Zuerst wurde die Proteolyse- und Syntheseaktivität von  $\sigma^s$  in W3110 bei 37 °C berechnet (Abb. 4.14).

In der PP ist in W3110 der ansteigende  $\sigma^s$ -Gehalt das Resultat aus sinkender, relativer  $\sigma^s$ -Proteolyse einerseits (von 94 % auf 62 % in Bezug auf den gesamten  $\sigma^s$ -Pool), die zu einer Verzwanzigfachung an altem, nicht abgebautem  $\sigma^s$  führt und so dazu beiträgt, dass der  $\sigma^s$ -Gehalt stark ansteigt und hoher  $\sigma^s$ -Biosyntheseleistung andererseits. Zwar steigt die Anzahl degradiert  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle trotz zunehmender  $\sigma^s$ -Halbwertszeit um das 2–3-fache an, da aber gleichzeitig der  $\sigma^s$ -Gehalt durch Synthese und zunehmendem Vorhandensein von altem  $\sigma^s$  ansteigt, sinkt der Anteil der degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle vom gesamten  $\sigma^s$ -Pool im Verlauf der PP von 94 % auf 62 %, sodass der Einfluss der Proteolyse auf den  $\sigma^s$ -Pool abnimmt. Außerdem sinkt in der PP, trotz Anstieg des  $\sigma^s$ -Gehalts, die  $\sigma^s$ -Synthese um etwa 1/3. Zusammen mit dem Anstieg alter  $\sigma^s$ -Moleküle reicht die nachlassende Synthese aber aus, um insgesamt einen Anstieg des zellulären  $\sigma^s$ -Pools zu bewirken.

In der SP ist der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt/ Zelle in W3110 das Resultat aus stark sinkender relativer  $\sigma^s$ -Proteolyserate (von 44 % auf 17 % in Bezug auf den gesamten  $\sigma^s$ -Pool), die zu einer Zunahme an altem  $\sigma^s$  führt, bei gleichzeitig sinkender  $\sigma^s$ -Biosynthese. Zwar sind Proteolyse und Biosynthese von  $\sigma^s$  auch nach Stabilisierung von  $\sigma^s$  basal nachweisbar, ihr Einfluss auf den  $\sigma^s$ -Gehalt ist aber nur noch gering, da die hohe  $\sigma^s$ -Molekülzahl zu einer Stabilisierung des  $\sigma^s$ -Pools führt. Die Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools ändert sich kaum noch, weil das Verhältnis von abgebautem, freiem  $\sigma^s$  zu altem, stabilem  $\sigma^s$  sinkt, das spiegelt sich in der Stabilisierung von  $\sigma^s$  wieder. Die hohe Molekülzahl von  $\sigma^s$  und die Bindung an das RNAPK bieten nun beste Voraussetzungen für eine starke generelle Stressantwort.



**Abb. 4.14: Zusammensetzung des  $\sigma^S$ -Gehalts in W3110 im Verlauf des Wachstumszyklus.** Für die Analyse des  $\sigma^S$  (RpoS)-Pools in dem *E. coli* K12-Stamm W3110 in LB bei 37 °C wurde der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt alle 20 Minuten entlang der Wachstumskurve bestimmt (Abb. 4.11). Anschließend wurde an Hand der  $\sigma^S$ -Halbwertszeit (Abb. 4.1) berechnet, wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle vom zellulären  $\sigma^S$ -Gesamtgehalt bis zur nächsten Probennahme in 20 min degradiert werden und wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle übrig bleiben werden, diese Menge wurde als *altes  $\sigma^S$*  bezeichnet. Aus diesen Angaben wurde die Menge an neu synthetisierten  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle berechnet, das Ergebnis wurde als *neues  $\sigma^S$*  bezeichnet. Außerdem wurde berechnet, wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle von einer Probe zur nächsten voraussichtlich degradiert bzw. neu synthetisiert werden. **(A, B)** Zusammensetzung des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts und optische Dichte (OD) in Abhängigkeit von der Zeit (A) bzw. Zusammensetzung des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts in Abhängigkeit von der OD (B).  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Die Höhe des zellulären  $\sigma^S$ -Gesamtgehalts resultiert aus einem dynamischen Gleichgewicht von  $\sigma^S$ -Proteolyse und  $\sigma^S$ -Biosynthese.



**Abb. 4.15: Zusammensetzung des  $\sigma^S$ -Gehalts in MC4100 im Verlauf des Wachstumszyklus.** Für die Analyse des  $\sigma^S$  (RpoS)-Pools in dem *E. coli* K12-Stamm MC4100 in LB bei 37 °C wurde der zelluläre  $\sigma^S$ -Gehalt alle 20 Minuten entlang der Wachstumskurve bestimmt (Abb. 4.12). Dann wurde an Hand der  $\sigma^S$ -Halbwertszeit (Abb. 4.2) berechnet, wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle vom zellulären  $\sigma^S$ -Gesamtgehalt bis zur nächsten Probennahme in 20 min degradiert werden und wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle übrig bleiben werden, diese Menge wurde als *altes  $\sigma^S$*  bezeichnet. Aus diesen Angaben wurde die Menge an neu synthetisierten  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle berechnet, das Ergebnis wurde als *neues  $\sigma^S$*  bezeichnet. Außerdem wurde berechnet, wie viele  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle von einer Probe zur nächsten voraussichtlich degradiert bzw. neu synthetisiert werden. **(A, B)** Zusammensetzung des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts und optische Dichte (OD) in Abhängigkeit von der Zeit (A) bzw. Zusammensetzung des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts in Abhängigkeit von der OD (B); ÜP = Übergangsphase der zweiphasigen  $\sigma^S$ -Stabilisierung.  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als *stabil* definiert. Die Höhe des zellulären  $\sigma^S$ -Gesamtgehalts resultiert aus einem dynamischen Gleichgewicht von  $\sigma^S$ -Proteolyse und  $\sigma^S$ -Biosynthese.

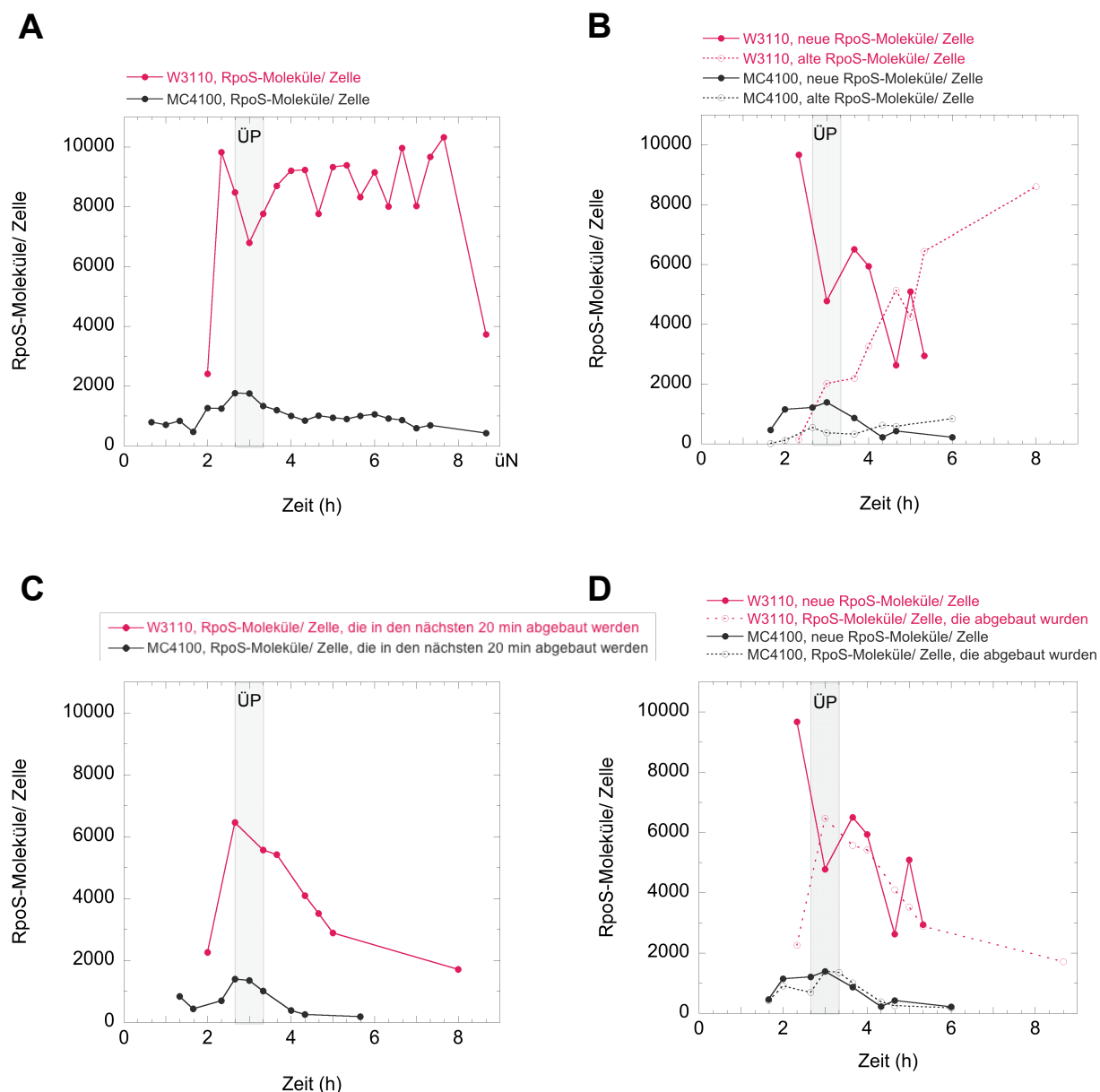
Als nächstes wurde die Proteolyse- und Syntheseaktivität von  $\sigma^s$  in MC4100 bei 37 °C bestimmt (Abb. 4.15).

In der frühen PP ist der  $\sigma^s$ -Gehalt/ Zelle in MC4100 das Resultat aus schnellem Abbau bei gleichzeitig hoher relativer Syntheserate von  $\sigma^s$ . Auffallend ist jedoch, dass die absoluten Molekülzahlen an abgebautem und synthetisiertem  $\sigma^s$  deutlich niedriger sind als in W3110 zum selben Zeitpunkt. Auffallend ist weiterhin, dass die Anzahl der abgebauten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle niedriger ist als es bei der kurzen  $\sigma^s$ -Halbwertszeit zu erwarten gewesen wäre. Durch die hohe Abbau- und Syntheserate von  $\sigma^s$  ändert sich die Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools permanent. In der späteren PP nimmt der Abbau ab mit der Folge, dass der Anteil alter  $\sigma^s$ -Moleküle zunimmt, wodurch der  $\sigma^s$ -Gehalt steigt. Da die  $\sigma^s$ -Syntheserate parallel ebenfalls zunimmt, steigt der  $\sigma^s$ -Gehalt in dieser Zeit stark an. Da aber der  $\sigma^s$ -Gehalt in MC4100 zu Beginn der SP etwa 8-mal niedriger ist als in W3110 (Kapitel 4.3.1., Abb. 4.13), verbleiben am Ende der ersten  $\sigma^s$ -Stabilisierungsphase in MC4100 nur etwa 550 alte, nicht abgebaute  $\sigma^s$ -Moleküle innerhalb von 20 min in der Zelle und konkurrieren mit den anderen Sigmafaktoren um das RNAPK. Wenn man bedenkt, dass in W3110 bei Eintritt in die SP über 5000 alte  $\sigma^s$  Moleküle/ Zelle vorhanden sind, zeigt das, dass die Konkurrenzeffizienz der wenigen freien  $\sigma^s$ -Moleküle um das RNAPK in MC4100 im Vergleich zum W3110 sehr gering sein dürfte, zumal der relative Rsd-Gehalt in MC4100 bei Eintritt in die SP ebenfalls geringer ist (Abb. 4.10). Die Berechnung liefert daher eine schlüssige Erklärung, weshalb  $\sigma^s$  in MC4100 am Ende der ersten Stabilisierungsphase nicht stabilisiert werden kann.

In der ÜP ist der  $\sigma^s$ -Gehalt/ Zelle in MC4100 maximal, weil die Syntheserate maximal wird. Die kürzere  $\sigma^s$ -Halbwertszeit und der hohe Anteil an degradiertem  $\sigma^s$  in der ÜP entsprechen eher der Situation in der PP als in der frühen SP, wobei die deutlich längere Generationszeit den Beginn der SP klar anzeigt.

In der zweiten Stabilisierungsphase von  $\sigma^s$  ist der  $\sigma^s$ -Gehalt/ Zelle das Resultat aus gesunkener Abbau- und Syntheseleistung von  $\sigma^s$ , die zur Zunahme an altem  $\sigma^s$  führt. Abbau und Synthese von  $\sigma^s$  verlieren an Einfluss auf den  $\sigma^s$ -Pool, sodass der  $\sigma^s$ -Gehalt relativ stabil bleibt. Die Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools ändert sich kaum noch. Das Verhältnis von abbaubarem, freiem  $\sigma^s$  zu altem, stabilem  $\sigma^s$  ist weiter gestiegen. 4/5 des  $\sigma^s$ -Pools sind stabil und sehr wahrscheinlich an das RNAPK gebunden. Die Anzahl stabiler  $\sigma^s$ -Moleküle hat sich erhöht, was zeigt, dass  $\sigma^s$  zunehmend an das RNAPK gebunden ist. Da 1/5 des  $\sigma^s$ -Gehalts instabil bleibt, zeigt das, dass der Abbau von  $\sigma^s$  nicht vollständig zum Erliegen kommt.





**Abb. 4.16: Vergleich der Zusammensetzung des  $\sigma^S$ -Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C in LB.** Analyse des  $\sigma^S$ (RpoS)-Pools mit Hilfe des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts (Abb. 4.11 und 4.12) und der  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten (Abb. 4.4 und 4.2), vgl. Abb. 4.14 und 4.15. ÜP = Übergangsphase der zweiphasigen  $\sigma^S$ -Stabilisierung in MC4100, grau unterlegt. **(A)** Zellulärer  $\sigma^S$ -Gesamtgehalt in W3110 und MC4100 (Daten aus Abb. 4.11 und 4.12). **(B)** Aufschlüsselung des  $\sigma^S$ -Gesamtgehalts in *altes* und *neues*  $\sigma^S$  in beiden Stämmen. **(C)** Anteil des  $\sigma^S$ -Gesamtgehalts, der innerhalb der nächsten 20 min in beiden Stämmen degradiert werden wird. **(D)** Aufschlüsselung des  $\sigma^S$ -Gehalts in neues und degradiertes  $\sigma^S$  in beiden Stämmen. In beiden Stämmen ist die Zusammensetzung des  $\sigma^S$ -Gehalts hochdynamisch. Während sich in W3110 der  $\sigma^S$ -Pool im Verlauf des Wachstumszyklus durch sinkende  $\sigma^S$ -Proteolyse- und Biosynthese kontinuierlich verändert, kommt es in MC4100 nach steigender  $\sigma^S$ -Proteolyse und Biosynthese in der postexponentiellen Phase mit Beginn der Stationärphase zur Auslösung der ÜP, in deren Verlauf sowohl  $\sigma^S$ -Proteolyse als auch  $\sigma^S$ -Biosynthese herunterreguliert werden.

Beim Vergleich beider Stämme (Abb. 4.16) fällt auf, dass in der PP in W3110 nicht nur der  $\sigma^s$ -Gehalt bis zu 9-mal höher ist, sondern auch die Abbau- und Syntheseleistung von  $\sigma^s$ , denn in W3110 werden in 20 min bis zu 7-mal mehr  $\sigma^s$ -Moleküle abgebaut und bis zu 9-mal mehr synthetisiert als in MC4100. Das zeigt, welch hohes Potenzial im  $\sigma^s$ -Biosynthese- und im Proteolysesystem steckt und zeigt, dass beides in MC4100 bereits in der PP gedrosselt ist.

In der ÜP unterscheiden sich der  $\sigma^s$ -Gehalt und dessen Zusammensetzung in beiden Stämmen drastisch. In W3110 ist der  $\sigma^s$ -Gehalt 6-mal höher und es sind bereits 2/3 des  $\sigma^s$ -Pools stabil, während es im MC4100 nur 1/4 sind. Dadurch ist die tatsächliche Anzahl der alten, stabilen  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle/ 20 min in W3110 20-mal höher als in MC4100. Das legt nahe, dass die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  um das RNAPK in W3110 sehr viel höher sein dürfte als in MC4100 und weist außerdem darauf hin, dass der W3110 seinen vorhandenen  $\sigma^s$ -Pool sehr viel effizienter zur Anpassung an die SP-Bedingungen nutzt als der MC4100. Die Anpassungsfähigkeit an die frühe SP durch  $\sigma^s$ -abhängige Veränderung der Genexpression ist also in beiden Stämmen grundsätzlich verschieden.

Nach der ÜP beginnen sich beide Stämme anzugleichen. Beide haben nun eine vergleichbar lange  $\sigma^s$ -Halbwertszeit, in beiden sind Biosynthese und Abbau von  $\sigma^s$  stark gedrosselt und beide zeigen eine vergleichbare prozentuale Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Gehalts. Nach der vollständigen Stabilisierung von  $\sigma^s$  ist der  $\sigma^s$ -Gehalt in W3110 10-mal höher als in MC4100 und in beiden Stämmen werden 4/5 des  $\sigma^s$ -Pools stabilisiert und 1/5 bleiben instabil.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sich der  $\sigma^s$ -Pool permanent verändert und seine Zusammensetzung hochdynamisch ist. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse folgendes: (i) In wachsenden Zellen ist die  $\sigma^s$ -Synthese gering und  $\sigma^s$  wird zügig abgebaut. (ii) In der ersten Stabilisierungsphase bleibt die  $\sigma^s$ -Synthese in etwa gleich aber  $\sigma^s$  wird stabiler, dadurch steigt der  $\sigma^s$ -Gehalt stark an. (iii) Während der erneuten Destabilisierung von  $\sigma^s$  in der ÜP bleibt der  $\sigma^s$ -Gehalt sehr hoch, weil die stark gestiegene  $\sigma^s$ -Synthese den schnelleren  $\sigma^s$ -Abbau kompensiert. (iv) In der zweiten Stabilisierungsphase wird  $\sigma^s$  stabiler, obwohl die  $\sigma^s$ -Synthese sinkt. Der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt ist also nicht durch Synthese sondern durch Stabilisierung bedingt. (v) Mechanistisch unterscheiden sich beide Stämme kaum voneinander. In beiden Stämmen sind trotz unterschiedlichem  $\sigma^s$ -Gehalt die prozentuale Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Gehalts und das Verhältnis von abgebautem zu neu synthetisiertem  $\sigma^s$  sowie von stabilem zu instabilem  $\sigma^s$  in den einzelnen Wachstumsphasen in etwa dieselben. Die real vorhandenen  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle und die tatsächliche Anzahl an synthetisierten bzw. abgebauten  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle unterscheiden sich jedoch in beiden Stämmen erheblich,

denn in W3110 werden pro 20 min bis zu 10-mal mehr  $\sigma^s$ -Moleküle synthetisiert bzw. abgebaut als in MC4100.

#### 4.4.2. Approximation der Dynamik des $\sigma^s$ -Pools im Verlauf des Wachstumszyklus

Im vorherigen Kapitel 4.4.1. wurde der Einfluss von Proteolyse und Biosynthese von  $\sigma^s$  auf den zellulären  $\sigma^s$ -Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus unter Zuhilfenahme der  $\sigma^s$ -Halbwertszeit (Abb. 4.1 und 4.2) und des  $\sigma^s$ -Gehalts (Abb. 4.11 und 4.12) berechnet. Allerdings war anzunehmen, dass diese Ergebnisse relativ ungenau sind, da die Bestimmung des  $\sigma^s$ -Gehalts und der  $\sigma^s$ -Halbwertszeit aus technischen Gründen nicht kontinuierlich erfolgte, sondern anhand von Stichproben. Um einen tieferen Einblick in die hohe Dynamik des  $\sigma^s$ -Pools und dessen Regulation zu bekommen, wurden deshalb ergänzend die  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheseraten approximiert. Mit Hilfe dieser Approximation ist es möglich, Annahmen zum  $\sigma^s$ -Gehalt und zu dessen Zusammensetzung zu jedem Zeitpunkt innerhalb des gesamten Wachstumszyklus zu treffen.

##### 4.4.2.1. Approximation von $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate

Unstimmigkeiten einzelner Berechnungen ließen vermuten, dass die Anzahl der berechneten, degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle deshalb so niedrig war, weil der  $\sigma^s$ -Gehalt lediglich im Abstand von 20 min bestimmt wurde, während die Vorgänge dazwischen nicht erfasst wurden und daher dem Modell einer Blackbox entsprechen. So beträgt z. B. in MC4100 bei OD 0,5 der  $\sigma^s$ -Gehalt etwa 843 Moleküle/ Zelle und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit liegt bei ca. 2,75 min; 20 min später bei OD 1,1 beträgt der  $\sigma^s$ -Gehalt ca. 430 Moleküle/ Zelle und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit liegt bei etwa 3,9 min (Abb. 4.2, 4.12). Aus diesen Daten folgt, dass der ClpXP-Proteolyseapparat bei OD 0,5 in der Lage ist, in 2,75 min etwa 421  $\sigma^s$ -Moleküle abzubauen. Trotzdem wurden nach 20 min lediglich 838 abgebaute  $\sigma^s$ -Moleküle berechnet (Abb. 4.15), obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass es einige tausend Moleküle sind.

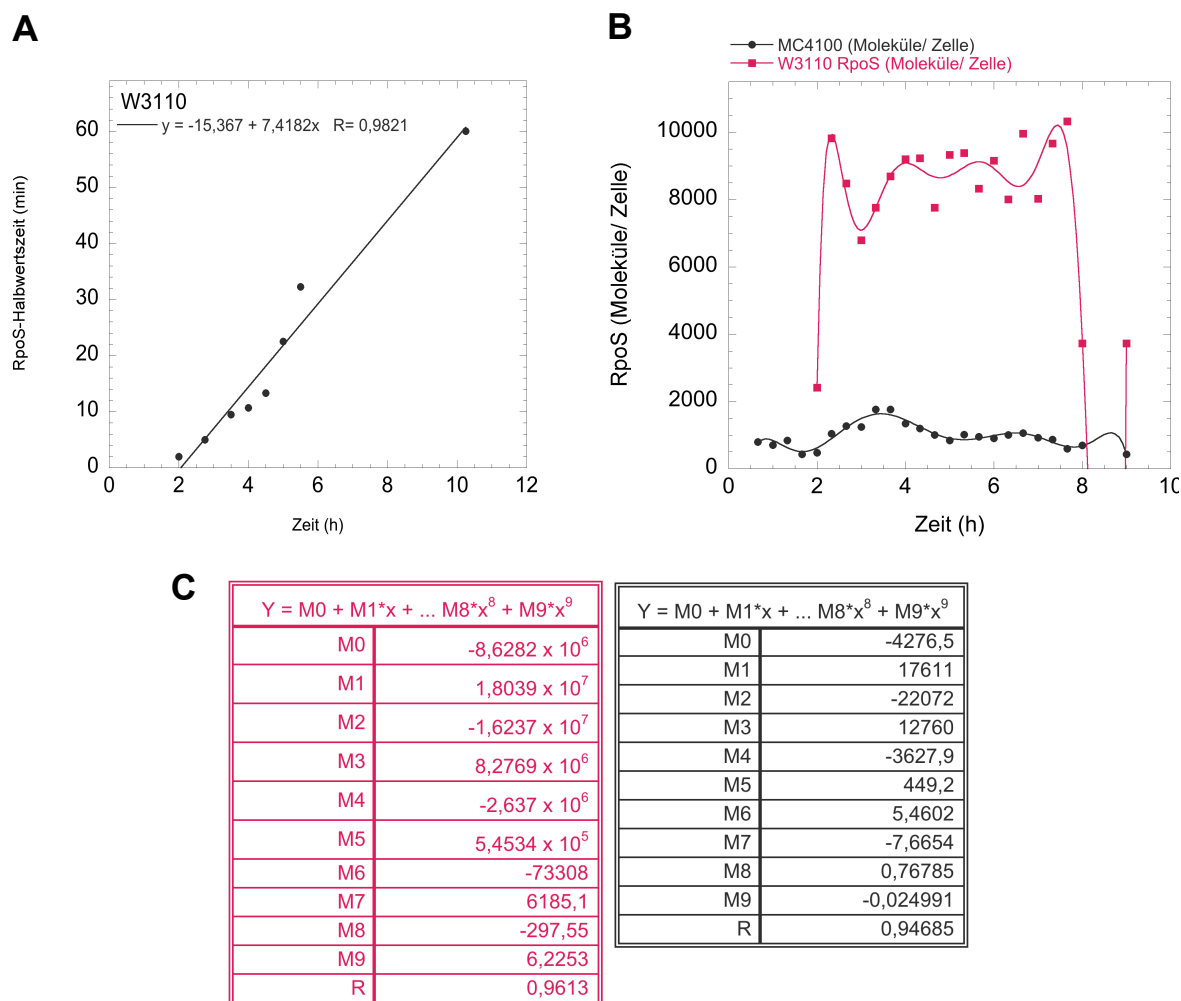
Da es technisch nicht möglich war, die  $\sigma^s$ -Synthese- und Proteolyserate und damit die dynamische Veränderung des  $\sigma^s$ -Pools kontinuierlich zu bestimmen, wurde diese stattdessen approximiert. Ausgehend vom obigen Beispiel des MC4100 bei OD 0,5 sowie 843 detektierten  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle und einer Halbwertszeit von 2,75 min und unter der

Annahme, dass sich die  $\sigma^s$ -Molekülzahl/ Zelle und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit in den nächsten 20 min linear ändern, kann durch lineare Interpolation abgeschätzt werden, dass in den nächsten 20 min 2122  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle abgebaut und 1712  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle synthetisiert werden (Tab. 4.1).

**Tab. 4.4: Approximation der dynamischen Veränderungen des  $\sigma^s$ -Pools am Beispiel des *E. coli* K12-Stammes MC4100 zwischen OD 0,53 und OD 1,1** durch lineare Interpolation des  $\sigma^s$  (RpoS)-Gehalts, der  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten sowie der degradierten und synthetisierten  $\sigma^s$ -Moleküle im Verlauf der 20-minütigen Blackbox (grau unterlegt) zwischen OD 0,53 und OD 1,1.

MC4100; OD 0,53–1,1									
Zeit (min)	0	2,75	5,66	8,74	11,99	15,43	19,07		20
OD (578 nm)	0,53								1,1
RpoS-Halbwertszeit (min)	2,75	2,91	3,08	3,25	3,44	3,64	3,84		3,9
RpoS-Moleküle/ Zelle	843	786	726	663	595	526	449		430
degradierte RpoS-Moleküle/ Zelle		421	393	363	331	297	263	54	$\Sigma$ 2122
synthetisierte RpoS-Moleküle/ Zelle		365	333	300	264	229	186	35	$\Sigma$ 1712

Die Approximation geht dabei von der Annahme aus, dass sich die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit, der  $\sigma^s$ -Gehalt und die Biosynthese von  $\sigma^s$  innerhalb der nächsten 20 min linear verändern. Die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit zeigt entlang der Wachstumskurve eine annähernd lineare Zunahme (abgesehen von der ÜP in MC4100), die lineare Regressionsgerade mit dem Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,9$  bestätigt das (Abb. 4.17A). Durch schrittweise lineare Interpolation können anschließend die Werte zwischen den diskreten Messwerten, also in der Blackbox, geschätzt werden, wobei Stetigkeit und Differenzierbarkeit vorausgesetzt werden. So kann approximativ die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit zwischen zwei Messpunkten bestimmt werden (Abb. 4.17A, Tab. 4.1).



**Abb. 4.17: Approximation der Halbwertszeiten der  $\sigma^S$ -Degradierung und des  $\sigma^S$ -Gehalts zur Interpolation unbekannter Daten zwischen zwei diskreten Messwerten.** (A) Gemittelte Halbwertszeiten der  $\sigma^S$ (RpoS)-Degradierung im *E. coli*-K12-Stamm W3110 in Abhängigkeit von der Zeit bei 37 °C. Die  $\sigma^S$ -Halbwertszeiten wurden mit nicht radioaktiven *in vivo*-Abbauexperimenten von  $\sigma^S$  während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes W3110 in LB bei 37 °C bestimmt, vgl. Abb. 4.1. Die Zunahme der Halbwertszeiten der  $\sigma^S$ -Degradierung ist annähernd linear. (B, C) Gemittelter  $\sigma^S$ -Gehalt in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 in Abhängigkeit von der Zeit bei 37 °C (B). Bestimmung des  $\sigma^S$ -Gehalts vgl. Abb. 4.11 und 4.12. Die Zunahme des  $\sigma^S$ -Gehalts entspricht annähernd einer Polynomfunktion 9. Grades (C).

Der Anstieg des  $\sigma^S$ -Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus ist nicht linear, sondern entspricht einer höhergradigen Polynomfunktion. Durch eine Polynomfunktion 9. Grades können die Veränderungen des  $\sigma^S$ -Gehalts mit  $R^2 > 0,9$  angenähert werden, allerdings ist diese Funktion wegen des hohen Grades instabil, da sie insbesondere beim W3110 zwischen den Interpolationspunkten im Verlauf der Wachstumskurve immer stärker schwingt (Abb. 4.17B,C). Darum wurden die Werte zwischen den diskreten Messwerten schrittweise interpoliert (Tab. 4.1). Dabei wurde angenommen, dass Stetigkeit und Differenzierbarkeit

gegeben sind und dass der Verlauf der kontinuierlichen Funktion keine größeren Schwankungen aufweist. Diese Annahme muss nicht zwingend zutreffen, alternativ wäre denkbar, dass  $\sigma^s$  degradiert wird, bis ein Schwellenwert unterschritten wird, und dass der  $\sigma^s$ -Pool dann aufgefüllt wird. Dafür gibt es jedoch keine Hinweise, sodass die schrittweise lineare Approximation des  $\sigma^s$ -Gehalts plausibel erscheint. Insgesamt scheint also die hier aufgestellte Approximation als Grundlage für die weitere Arbeit geeignet, sofern berücksichtigt wird, dass schrittweise interpoliert wurde und dabei die Annahme der linearen Veränderung getroffen wurde.

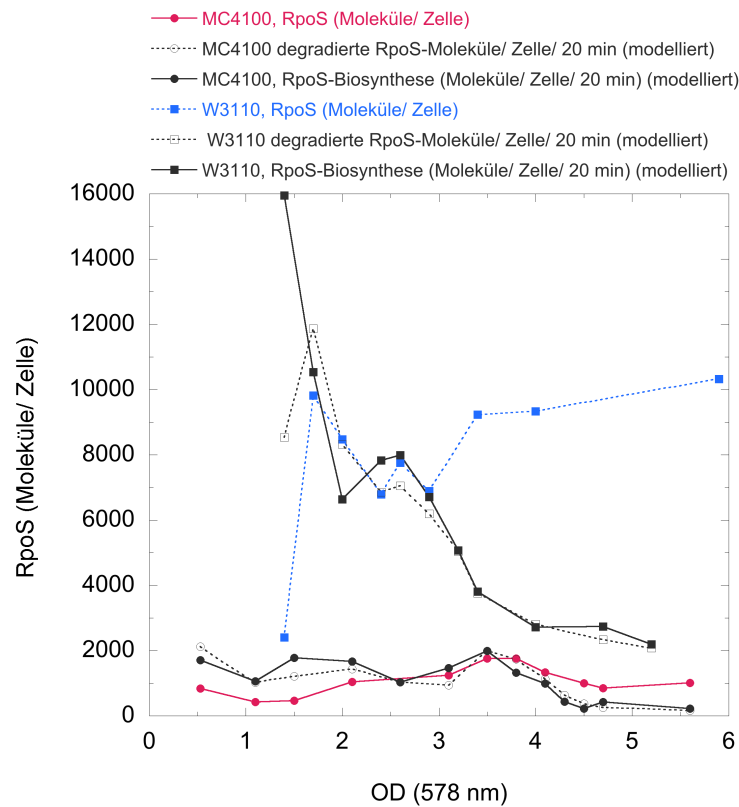
Zunächst wurde die  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheseleistung und die Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools im Verlauf des Wachstumszyklus approximiert und mit den zuvor berechneten Daten verglichen (Tab. 4.2; Abb. 4.18 und 4.19).

**Tab. 4.5: Approximation der  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Biosyntheserate in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C durch schrittweise lineare Interpolation.**  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten vgl. Abb. 4.2,  $\sigma^s$ -Gehalt vgl. Abb. 4.12. Zur besseren Vergleichbarkeit der degradierten  $\sigma^s$ -Moleküle im Verlauf des Wachstumszyklus wurden in MC4100 nur Werte ab OD 1,5 berücksichtigt.

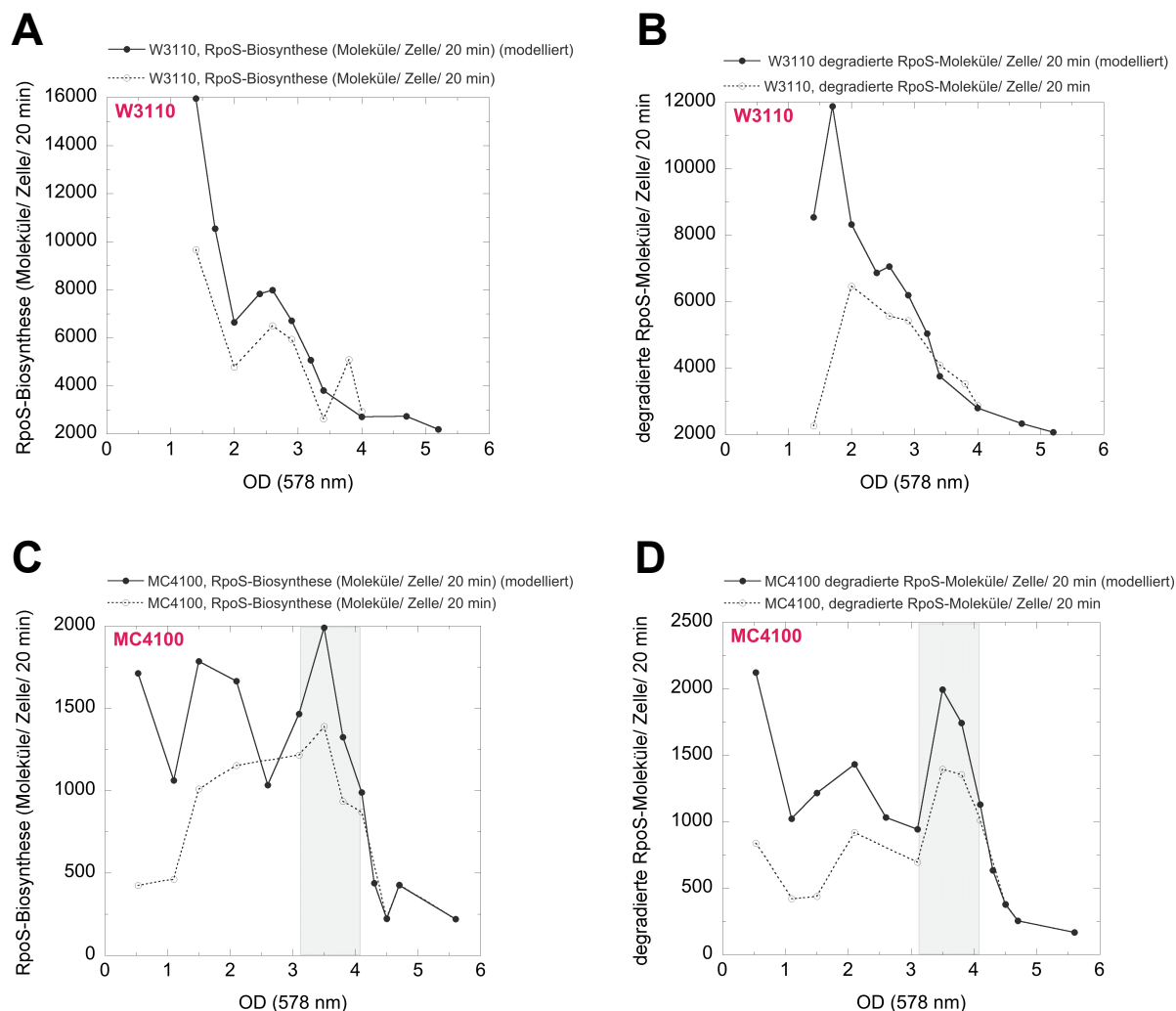
<b>MC4100</b>														
OD (578 nm)	0,5	1,1	1,5	2,1	2,6	3,1	3,5	3,8	4,1	4,3	4,5	4,7	5,6	
RpoS-Halbwertszeit (min)	2,75	3,9	5,1	6,3	12,7	16,1	8,7	9,3	9,9	18,2	26,5	33,3	60	
RpoS-Moleküle/ Zelle	843	430	472	1040	1121	1247	1765	1760	1340	1199	1002	846	1008	
Degrad. RpoS-Moleküle/ Zelle/ 20 min	2122	1024	1216	1432	1032	944	1993	1743	1130	635	378	254	168	$\Sigma$ 10925*
Synthet. RpoS-Moleküle/ Zelle/ 20 min	1712	1061	1785	1665	1034	1466	1990	1324	989	439	222	426	220	
<b>W3110</b>														
OD (578 nm)	1,4	1,7	2,0	2,4	2,6	2,9	3,2	3,4	4,0	4,7	5,2	5,9		
RpoS-Halbwertszeit (min)	5,0	7,2	9,5	10,1	10,7	13,3	17,9	22,5	32,2	39,2	46,1	60		
RpoS-Moleküle/ Zelle	2412	9820	8479	6793	7761	8692	9203	9231	9330	9153	9962	10321		
Degrad. RpoS-Moleküle/ Zelle/ 20 min	8534	11871	8323	6862	7057	6195	5051	3759	2805	2332	2077			$\Sigma$ 65456
Synthet. RpoS-Moleküle/ Zelle/ 20 min	15953	10539	6638	7831	7989	6706	5070	3808	2716	2737	2197			

Die Approximation zeigt, dass die berechneten  $\sigma^s$ -Molekülzahlen/ Zelle in Kapitel 4.4.1 zu niedrig waren. Das war zu erwarten, weil nur alle 20 min beprobt wurde, was bei dem hochdynamischen  $\sigma^s$ -Pool zu ungenauen Ergebnissen führt. Der Vergleich von berechneten und approximierten  $\sigma^s$ -Molekülzahlen im Verlauf des gesamten Wachstumszyklus zeigt dementsprechend, dass die Abweichungen in der LP und PP am höchsten sind (Abb. 4.19). Die Berechnungen in der SP aus Kapitel 4.4.1. stimmen hingegen mit der Approximation gut überein. Darüber hinaus bestätigt der Vergleich von berechneten und approximierten  $\sigma^s$ -Molekülzahlen, dass die Steigung der Funktion, die die Zu- oder Abnahme der

$\sigma^S$ -Molekülzahlen beschreibt, dieselbe ist und dass außerdem in W3110 die  $\sigma^S$ -Proteolyse- und Biosyntheserate deutlich höher sind als in MC4100 (Abb. 4.19).



**Abb. 4.18: Zusammensetzung des  $\sigma^S$ -Gehalts in W3110 und MC4100 im Verlauf des Wachstumszyklus (approximiert)** als Ergebnis des dynamischen Gleichgewichts von  $\sigma^S$  (RpoS)-Proteolyse und  $\sigma^S$ -Biosynthese. In W3110 werden geschätzt bis zu 8-mal mehr  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle synthetisiert und bis zu 6-mal  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle degradiert als in MC4100.



**Abb. 4.19: Vergleich von diskreten und approximierten Daten zur Proteolyse und Biosynthese von  $\sigma^s$  in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C. (A, C) Synthetisierte  $\sigma^s$  (RpoS)-Moleküle/ Zelle/ 20 min im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 (A) und MC4100 (C). (B, D) Degradiertere  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle/ 20 min im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 (B) und MC4100 (D). Die Approximation bestätigt die Ergebnisse zur Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools als Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts aus  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Biosynthese, die tatsächlichen  $\sigma^s$ -Molekülzahlen sind jedoch höher als in Kapitel 4.4.1. berechnet.**

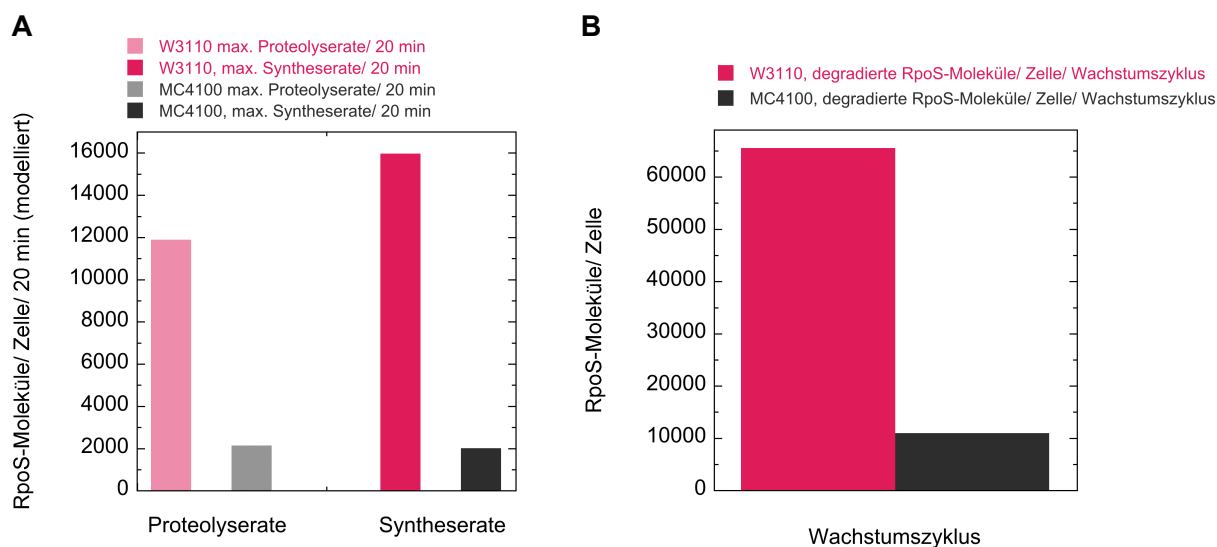
#### 4.4.2.2. Abschätzung der maximalen $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheserate im Verlauf des Wachstumszyklus

Mit Hilfe der approximierten Daten zur Zusammensetzung des  $\sigma^s$ -Pools (Tab. 4.2) kann für den dabei berücksichtigten Messbereich die maximale  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Biosyntheserate/ 20 min bei 37 °C abgeschätzt werden. In 20 min wurden in W3110 maximal ca. 16000  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle neu synthetisiert und ca. 12000  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle



degradiert (Abb. 4.20). In MC4100 ist die maximale Biosyntheseleistung hingegen 8-mal niedriger und die maximale Proteolyseleistung 6-mal niedriger als in W3110, dies stimmt mit den Berechnungen in Kapitel 4.4.1 gut überein (Abb. 4.16 und 4.20).

Die Ergebnisse zeigen, dass in 20 min in W3110 maximal etwa 12000  $\sigma^S$ -Moleküle von wenigen RssB-P-Molekülen/ Zelle degradiert werden. Das ist möglich, weil ein  $\sigma^S$ -Markierungszyklus von der Bindung an RssB-P bis zur Abgabe an ClpX nur wenige Sekunden dauert (Kap. 4.4.2.3).



**Abb. 4.20:** In W3110 werden im Verlauf des Wachstumszyklus geschätzt 8-mal mehr  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle synthetisiert und 6-mal mehr  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle degradiert (berücksichtigte optische Dichten vgl. Tab. 4.2). **(A)** Maximale Proteolyse- bzw. Biosyntheserate von  $\sigma^S$  (RpoS) in degradierte bzw. synthetisierte  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle bei einer diskreten OD. MC4100: maximale  $\sigma^S$ -Proteolyse bei OD 0,5 und maximale  $\sigma^S$ -Biosynthese bei OD 3,5; W3110: maximale  $\sigma^S$ -Proteolyse bei OD 1,7 und maximale  $\sigma^S$ -Biosynthese bei OD 1,4; vgl. Tab. 4.2. **(B)** Gesamte  $\sigma^S$ -Proteolyse- bzw.  $\sigma^S$ -Biosynthese in  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle im Verlauf des Wachstumszyklus.

#### 4.4.2.3. Berechnung der Zeitdauer eines RssB-Markierungszyklus

Zu besserer Beurteilung der maximalen  $\sigma^S$ -Proteolyse- und Syntheseleistung (Kap. 4.4.2.2.) wurden die Zeitdauer und die Häufigkeit eines RssB-Markierungszyklus im Zeitraum  $T_{1/2}$  berechnet. Die Rechnung basiert auf dem approximierten  $\sigma^S$ -Gehalt  $x$  (Tab. 4.2), einem unbekannten RssB-Gehalt  $y$  und der approximierten  $\sigma^S$ -Halbwertszeit  $T_{1/2}$  (Tab. 4.2). Da das Verhältnis von  $\sigma^S$  zu RssB in der LP 20 : 1 ist (Becker *et al.*, 2000), folgt, dass  $x/20$  RssB-Moleküle/ Zelle zu diesem Zeitpunkt vorhanden sind, daraus folgt  $y = x/20$ . Da nur ca. 25 % der RssB-Moleküle phosphoryliert werden (Klauck, 1999), folgt  $y_{\text{phosphoryliert}} = y/4$ .

Da  $y = x/20$  gilt, folgt daraus  $y_{\text{phosphoryliert}} = x/80$ . Da RssB-P an  $\sigma^s$  1 : 1 stöchiometrisch bindet (Becker *et al.*, 1999 und 2000; Klauck *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001), stehen also  $x/80$  RssB-P-Moleküle für die Bindung von  $\sigma^s$  zur Verfügung. Vorausgesetzt, alle RssB-P-Moleküle sind aktiv und gerade nicht in den proteolytischen Zyklus involviert, können sie  $x/80$   $\sigma^s$ -Moleküle an sich binden und dem Abbau zuführen. Weiterhin werden im Zeitraum  $T_{1/2}$  insgesamt  $x/2$   $\sigma^s$ -Moleküle degradiert. Da  $y_{\text{phosphoryliert}} = x/80$  gilt, folgt daraus  $40y = x/2$ . RssB-P muss also innerhalb des Zeitraum  $T_{1/2}$  40-mal an  $\sigma^s$  binden und dieses an ClpXP abgeben.

In wachsenden MC4100-Zellen (OD 0,5) beträgt der  $\sigma^s$ -Gehalt 843 Moleküle/ Zelle und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit liegt bei 2,75 min. Bei 40 Bindungsereignissen von RssB-P an  $\sigma^s$  folgt, dass ein Markierungszyklus von RssB-P (unter der Annahme, dass dieser immer gleich lang dauert) 4,1 sec dauert.

Zusammengefasst zeigt die Approximation der dynamischen Veränderungen des  $\sigma^s$ -Pools im Verlauf des Wachstumszyklus folgendes: (i) Die Approximation der degradierten bzw. synthetisierten  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle führt unter Zuhilfenahme der Kontinuitätsannahme zu höheren  $\sigma^s$ -Molekülzahlen als die Berechnung unter Zuhilfenahme der distinkten Messwerte in Kap. 4.4.1. (ii) In W3110 werden im gesamten Wachstumszyklus 8-mal mehr  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle synthetisiert und 6-mal  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle degradiert als in MC4100. (iii) In W3110 liegt die maximale  $\sigma^s$ -Syntheserate/ 20 min bei ca. 16000  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle, in MC4100 liegt sie dagegen bei etwa 2000  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle. Die maximale  $\sigma^s$ -Proteolyserate/ 20 min liegt in W3110 bei etwa 12000  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle und in MC4100 bei etwa 2000  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle. (iv) Ein RssB-Markierungszyklus von der Bindung an  $\sigma^s$  bis zur Abgabe an ClpXP dauert 4,1 sec.

#### 4.5. Zellulärer ATP-Gehalt in den beiden *E. coli* K12-Stämmen MC4100 und W3110

Biosynthese und Proteolyse von  $\sigma^s$  sind nur möglich, wenn die Zelle genügend ATP aus ADP oder anderen energiereichen Verbindungen erzeugen kann. Der zelluläre ATP-Gehalt ist daher ein wichtiges Regulativ der Biosynthese- und Proteolyserate von  $\sigma^s$ . In der LP gewinnt die Zelle ATP hauptsächlich durch Elektronentransportphosphorylierung, bei der ATP durch die ATP-Synthase, die durch den Protonengradienten über der Membran angetrieben wird, generiert wird (Fuchs, 2014). Da das Nährstoffangebot optimal ist, werden genügend

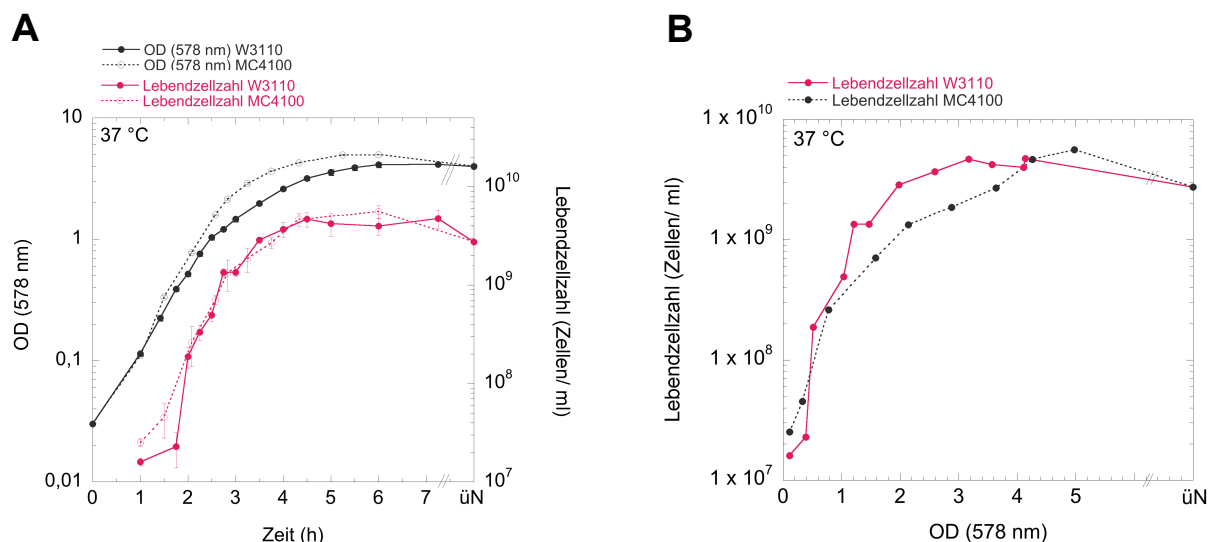
Elektronen gewonnen, sodass ein stabiler Protonengradient entsteht, der die ATP-Synthase antreibt. In der SP hingegen ist der ATP-Gehalt niedrig (Becker *et al.*, 2000; Buckstein *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2012), weil das mangelnde Nährstoffangebot die ATP-Erzeugung begrenzt.

Die vorangegangenen Ergebnisse ließen vermuten, dass die  $\sigma^s$ -Proteolyserate durch ATP limitiert wird. Daher stellte sich die Frage, wie hoch der ATP-Gehalt im Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110 ist. Weiterhin ließ die erneute Destabilisierung von  $\sigma^s$  vermuten, dass die ÜP durch einen kurzfristigen Anstieg des ATP-Gehalts ausgelöst werden könnte. Ein solcher Anstieg zu Beginn der SP war von Buckstein *et al.*, 2008 für den *E. coli* K12-Stamm MG1655 in MOPS-Medium beschrieben worden.

Zur quantitativen Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurde das “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II” von Roche verwendet, mit dem ATP im Bereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-12}$  M nachgewiesen werden kann.

#### 4.5.1. Lebendzellzahlbestimmung in den beiden Stämmen W3110 und MC4100

Die Nutzung des “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II” von Roche setzt eine Standardisierung der Zellzahl in jeder Probe voraus. Daher wurde zunächst die Lebendzellzahl (LZ) bei verschiedenen ODs bestimmt. Dazu wurden bei ausgewählten ODs die Zellen rasch auf Eis verdünnt und ausgewählte Verdünnungsstufen auf Agarplatten ausplattiert. Anschließend wurde die cfu bestimmt.



**Abb. 4.21: Lebendzellzahlbestimmung in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C in LB.** Zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Wachstumskurve wurde Proben entnommen und die optische Dichte bei 578 nm (OD) bestimmt. Anschließend wurden die Proben verdünnt, ausgewählte Verdünnungsstufen auf Agarplatten ausplattiert und die Lebendzellzahl bestimmt. **A,B:** Lebendzellzahl in MC4100 und W3110 bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit bzw. in Abhängigkeit von der OD dargestellt jeweils als zusammenfassende Auswertung von mindestens drei Experimenten. Die Lebendzellzahlen wurden gemittelt, die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an.

Die LZ steigt in W3110 (Abb. 4.21) von  $1,6 \times 10^7$  Zellen/ml in der LP bis auf  $4,7 \times 10^9$  Zellen/ml in der SP an und sinkt über Nacht auf  $2,7 \times 10^9$  Zellen/ml ab (Abb. 4.21). Die Zunahme der LP ist in der frühen PP stetig und knickt dann bei OD 1,5 leicht ein (Beginn der Flagellensynthese). Ab etwa OD 3,5 bleibt die LZ stabil. In MC4100 steigt die LZ im Verlauf der Wachstumskurve (Abb. 4.21) von  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml in der LP bis auf  $5,6 \times 10^9$  Zellen/ml in der SP an und sinkt über Nacht auf  $2,7 \times 10^9$  Zellen/ml ab (Originaldaten bei 28 °C nicht gezeigt).

Beim Vergleich beider Stämme auf, dass die OD und LZ zwischen beiden Stämmen differiert. Bis OD 2,0 ist die LZ in MC4100 geringfügig höher als in W3110, was zeigt, dass die Zellen in MC4100 zu diesem Zeitpunkt etwas kleiner sind als die W3110-Zellen, wobei die Zunahme der LZ, also die Replikationsrate, in beiden Stämmen in etwa dieselbe ist. Zwischen OD 2–4 ist die LZ in W3110 etwa 1,8-mal höher als in MC4100. Das zeigt, dass der W3110 in diesem Zeitraum bereits seine Wachstumsrate reduziert und mehr und kleinere Zellen generiert als der MC4100, was wiederum zeigt, dass die Replikationsrate in diesem Zeitraum in W3110 höher ist als in MC4100.

Die Ergebnisse zur Lebendzellzahlbestimmung wurden anschließend aus den diskreten Originaldaten für bestimmte ODs auf eine Nachkommastelle interpoliert (Tab. 4.3).

**Tab. 4.3: Lebendzellzahlbestimmung in den beiden *E. coli* K12-Stämmen MC4110 und W3110 bei 37 °C und 28 °C.** Beschreibung siehe Abb. 4.21. Die Ergebnisse aus mindestens drei Reproduktionen zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden gemittelt. Im Anschluss daran wurde die Lebendzellzahl für bestimmte optische Dichten (OD) auf eine Nachkommastelle aus den diskreten Originaldaten interpoliert. Dabei wurde angenommen, dass sich die LZ linear verändert. Originaldaten zum W3110 bei 28 °C mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gisela Klauck.

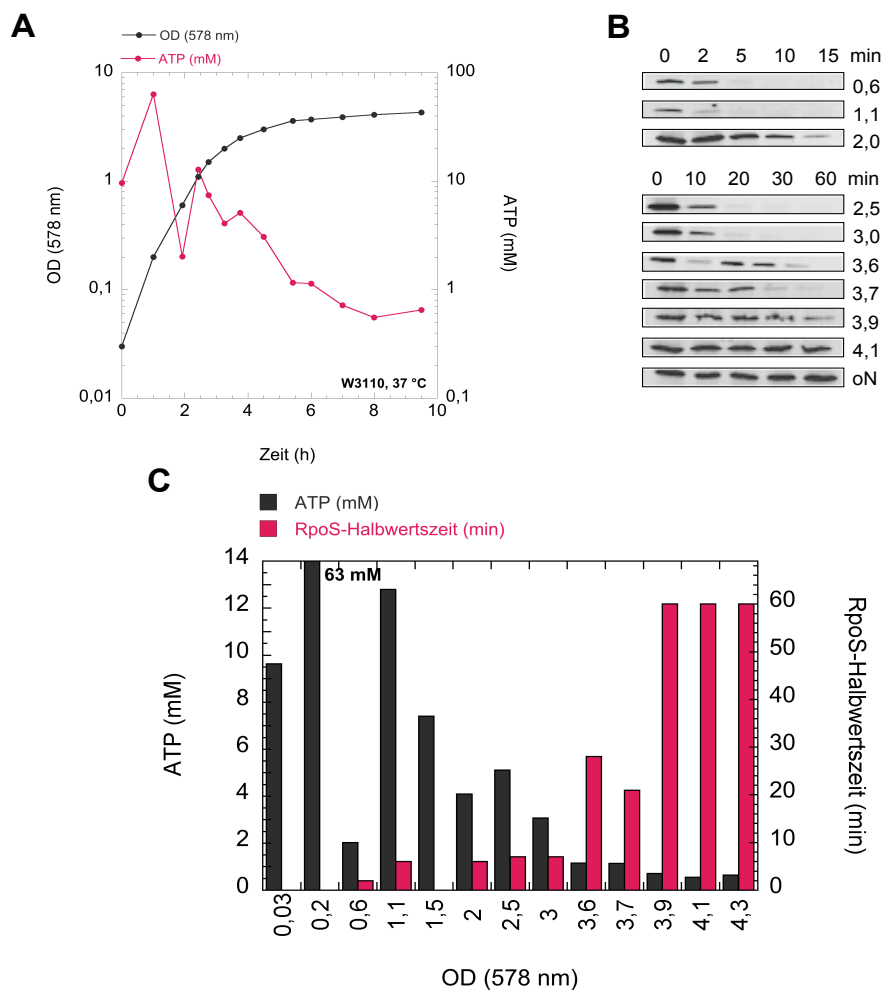
OD (578 nm)	MC4100, 37 °C	W3110, 37 °C	MC4100, 28 °C	W3110, 28 °C
0,1	2,50E+07	1,60E+07	6,60E+07	2,95E+07
0,3	4,50E+07	1,95E+07		
0,5	1,30E+08	2,30E+07	3,30E+08	1,48E+08
0,7	2,60E+08	1,87E+08		
1,0	4,10E+08	3,23E+08	6,60E+08	2,95E+08
1,5	6,60E+08	4,94E+08	7,80E+08	5,89E+08
2,0	1,30E+09	1,35E+09	9,00E+08	8,82E+08
2,5	1,60E+09	2,87E+09	1,70E+09	2,08E+09
3,0	2,10E+09	3,60E+09	2,60E+09	3,28E+09
3,5	2,60E+09	4,68E+09	3,60E+09	3,93E+09
4,0	4,40E+09	4,22E+09	4,60E+09	4,59E+09
4,5	5,00E+09		5,60E+09	6,42E+09
5,0	5,60E+09		6,70E+09	8,26E+09
über Nacht	2,70E+09	2,74E+09	7,60E+09	3,80E+09

#### 4.5.2. Bei 37 °C ist der ATP-Gehalt in W3110 bis zu 10-mal höher als in MC4110

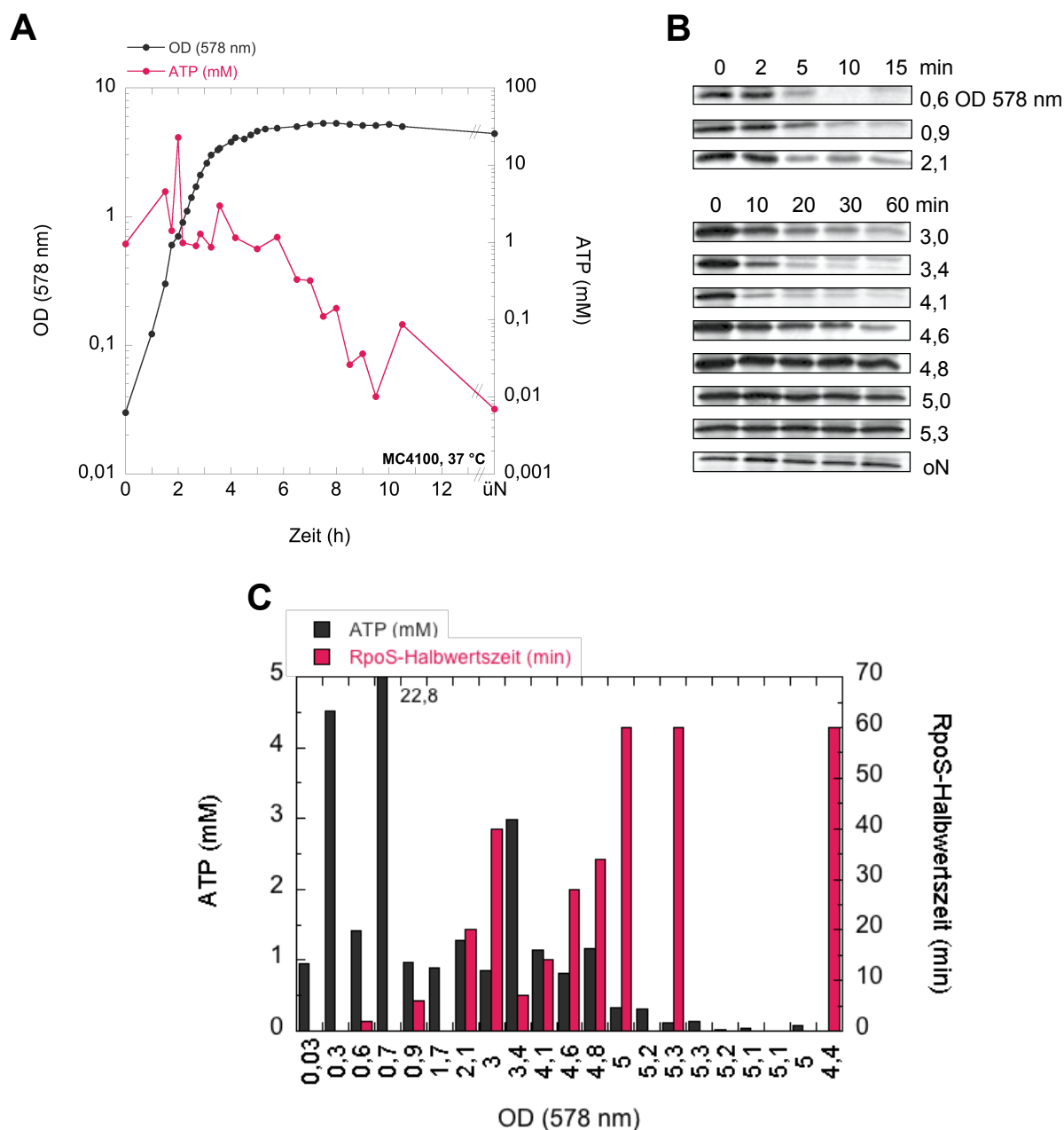
Zur quantitativen Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurde das “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II” von Roche verwendet. Parallel dazu wurden in denselben Kulturen nochmals nicht radioaktive *in vivo*- $\sigma^s$ -Abbauxperimente durchgeführt und die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit bestimmt.

Der ATP-Gehalt liegt bei 37 °C in W3110 zwischen 63 und 0,5 mM in der Zelle (Abb. 4.22). Bis zum Eintritt in die SP sinkt er auf 3 mM und fällt dann weiter auf 0,5 mM ab. Abb. 4.22C zeigt, dass  $\sigma^s$  bei einem ATP-Gehalt unter 0,5 mM vollständig stabilisiert wird. Eine generelle Korrelation von Zunahme der  $\sigma^s$ -Halbwertszeit und Abnahme des ATP-Gehalts konnte nicht beobachtet werden.

In MC4100 beträgt der ATP-Gehalt bei 37 °C zwischen 23 und 0,01 mM (Abb. 4.23) und ist damit deutlich niedriger als in W3110. Mit Beginn der SP steigt der ATP-Gehalt wieder an, dieser Anstieg markiert den Beginn der ÜP. Erst danach sinkt der ATP-Gehalt wieder ab, bis  $\sigma^s$  bei einem ATP-Gehalt unter ca. 0,5 mM vollständig stabilisiert wird (Abb. 4.23C und 4.24C).



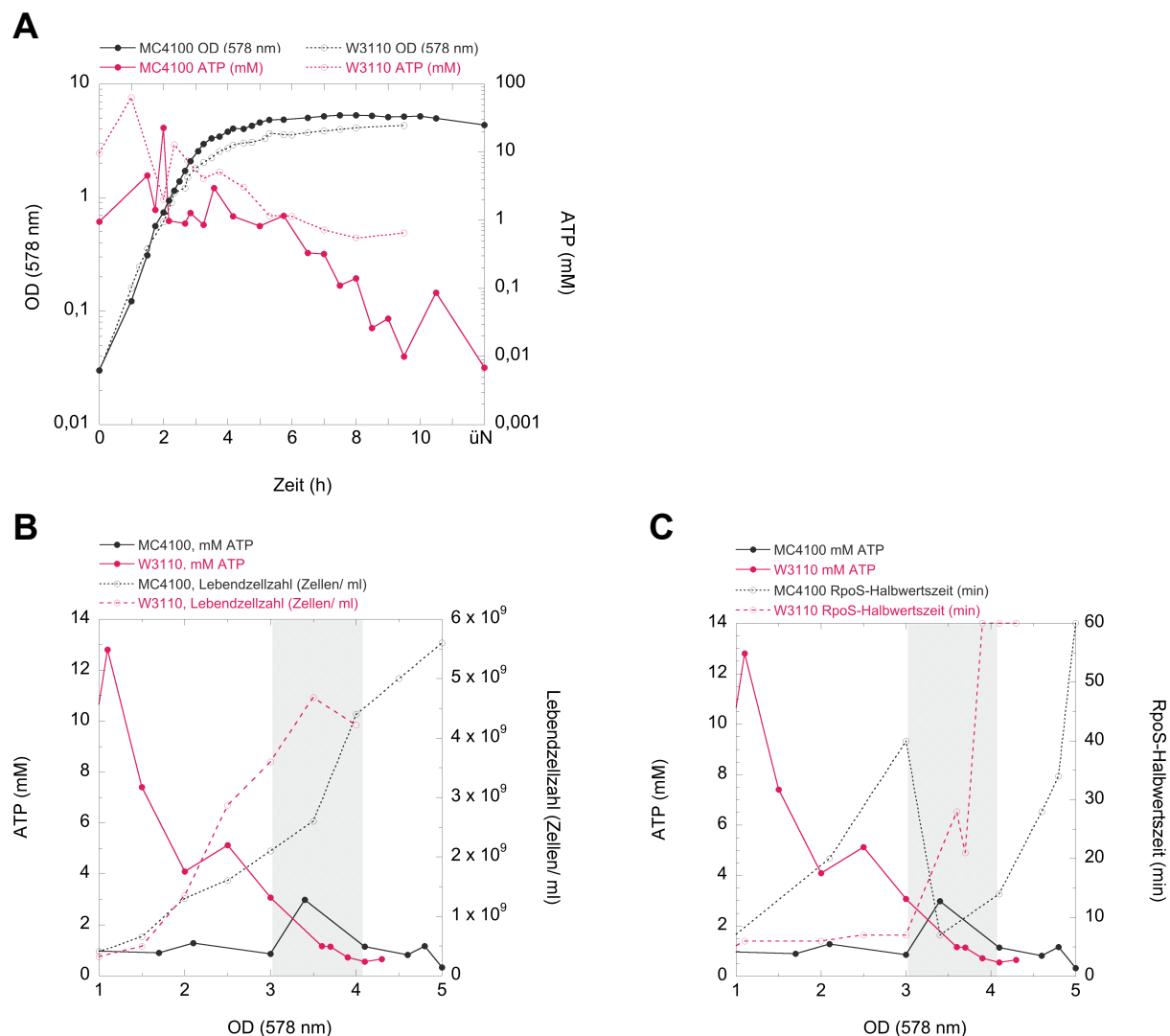
**Abb. 4.22: Der ATP-Gehalt beträgt in W3110 bei 37 °C zwischen 63 und 0,5 mM und die Stabilisierung von  $\sigma^s$  korreliert mit einer ATP-Konzentration von < 0,5 mM ATP.** Parallele Bestimmung von zellulärem ATP-Gehalt und  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes W3110 in LB bei 37 °C. Zur Einstellung der Lebendzellzahl wurde Tabelle 4.3 benutzt. Für die Berechnung der ATP-Konzentration wurden drei verschiedene Zellvolumina verwendet (Anja Richter, unpubliziert): Für  $OD_{578\text{ nm}} < 0.5$  wurden  $2,5 \times 0,8\text{ }\mu\text{m} = 1,26 \times 10^{-15}\text{ l}$  zugrunde gelegt, für  $OD_{578\text{ nm}} 0,5\text{--}3,0$  wurden  $2,0 \times 0,8\text{ }\mu\text{m} = 1,0 \times 10^{-15}\text{ l}$  verwendet und für  $OD_{578\text{ nm}} > 3,0$  wurden  $1,2 \times 0,8\text{ }\mu\text{m} = 0,60 \times 10^{-15}\text{ l}$  verwendet. **(A)** Optische Dichte (OD) und zellulärer ATP-Gehalt in Abhängigkeit von der Zeit. **(B)** Nicht radioaktiver *in vivo*-Degradierungsassay von  $\sigma^s$  in derselben Kultur, in der der ATP-Gehalt bestimmt wurde. Beschreibung siehe Abb. 4.1A. **(C)** Halbwertszeiten der  $\sigma^s$ -Degradierung und zellulärer ATP-Gehalt in Abhängigkeit von der OD.  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten > 60 min wurden als stabil definiert.



**Abb. 4.23:** Der ATP-Gehalt beträgt in MC4100 bei 37 °C zwischen 23 und 0,01 mM und die Stabilisierung von  $\sigma^s$  korreliert mit einer ATP-Konzentration von < 0,5 mM ATP. Parallele Bestimmung von zellulärem ATP-Gehalt und  $\sigma^s$  (RpoS)-Halbwertszeiten während des Wachstumszyklus des *E. coli* K12-Stammes MC4100 in LB bei 37 °C wie in Abb. 4.22 beschrieben.

Der Vergleich beider Stämme (Abb. 4.24) zeigt, dass der ATP-Gehalt in W3110 in der LP und PP deutlich höher ist als in MC4100. Das erklärt die höhere  $\sigma^s$ -Proteolyse- und Syntheseaktivität in W3110 in dieser Zeit energetisch. Der Stammvergleich zeigt weiterhin, dass der ATP-Gehalt in der SP stark zwischen beiden Stämmen stark differiert (Abb. 4.24C).

Während es W3110 gelingt, ATP in der SP bei etwa 0,5 mM stabilisieren, kollabiert der ATP-Gehalt in MC4100 und sinkt auf 0,01 mM ab.

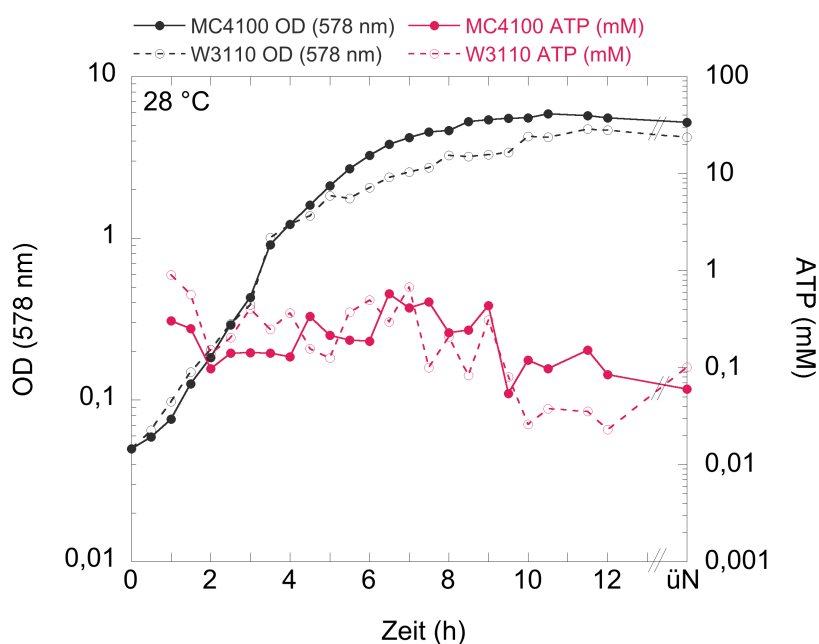


**Abb. 4.24: Vergleich des ATP-Gehalts in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C in LB.** Zusammenhang von ATP-Gehalt,  $\sigma^S$ -Halbwertszeit und Lebendzellzahl im Verlauf des Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110 in LB bei 37 °C. Bestimmung des ATP-Gehalts wie in Abb. 4.22 beschrieben, Bestimmung der  $\sigma^S$ (RpoS)-Halbwertszeit wie in Abb. 4.1A beschrieben, für die Lebendzellzahl wurden die Werte aus Tabelle 4.3 verwendet. Die Übergangsphase (ÜP) der zweiphasigen  $\sigma^S$ -Stabilisierung in MC4100 ist grau unterlegt. **(A)** ATP-Gehalt und optische Dichte (OD) in Abhängigkeit von der Zeit in beiden Stämmen. **(B, C)** ATP-Gehalt und Lebendzellzahl (B) bzw. ATP-Gehalt und  $\sigma^S$ -Halbwertszeit (C) in beiden Stämmen in Abhängigkeit von der OD. Für die Lebendzellzahl wurden die Werte aus Tabelle 4.3 verwendet. In W3110 ist der ATP-Gehalt während des Wachstums bei 37 °C etwa 10-mal höher als in MC4100.

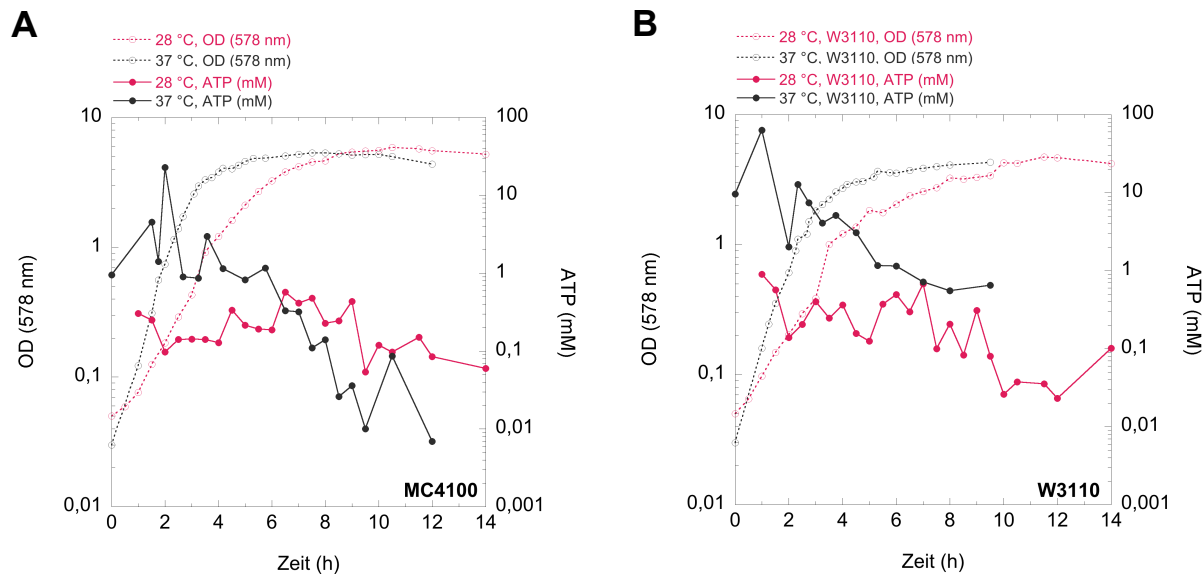


#### 4.5.3. Bei 28 °C ist der ATP-Gehalt in beiden Stämmen mindestens 10-mal niedriger als bei 37 °C

Bei 28° C liegt der ATP-Gehalt in beiden Stämmen zwischen 0,03 und 1 mM ATP (Abb. 4.25) und ist damit mindestens 10-mal niedriger als bei 37 °C (Abb. 4.25). Der geringe ATP-Gehalt in beiden Stämmen zeigt, dass  $\sigma^S$  nicht generell bei einem ATP-Gehalt unter 0,5 mM stabil wird, da dieser Wert von beiden Stämmen bei 28 °C bereits in der PP unterschritten wird. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Temperaturen (Abb. 4.26) fällt weiterhin auf, dass der ATP-Gehalt, anders als bei 37 °C, in beiden Stämmen vergleichbar niedrig ist und dass er außerdem bei 37 °C im Verlauf des Wachstumszyklus deutlich absinkt, während er bei 28 °C, abgesehen von geringen Schwankungen, relativ stabil bleibt (Abb. 4.26A). Das spricht dagegen, dass die Stabilisierung von  $\sigma^S$  hauptsächlich durch Limitierung von ATP verursacht wird und weist darauf hin, dass das Absinken des ATP-Gehalts wahrscheinlich eher eine ergänzende Rolle bei der Stabilisierung von  $\sigma^S$  spielt.



**Abb. 4.25: Der ATP-Gehalt liegt in W3110 und MC4100 bei 28 °C zwischen 0,03 und 1 mM.** Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts während des Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme W3110 und MC4100 in LB bei 28 °C wie in Abb. 4.22 beschrieben.



**Abb. 4.26: Vergleich des ATP-Gehalts im Verlauf des Wachstumszyklus der beiden *E. coli* K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 37 °C und 28 °C in LB.** Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts in beiden Stämmen wie in Abb. 4.22 beschrieben. **(A, B)** ATP-Gehalt und optische Dichte in MC4100 (A) und W3110 (B) in Abhängigkeit von der Zeit bei beiden Temperaturen.

Zusammenfassend zeigt die quantitative Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts folgendes:

(i) Der ATP-Gehalt ist bei 37 °C in W3110 in der LP und PP mindestens 10-mal höher als in MC4100. Das erklärt die  $\sigma^S$ -Biosynthese- und Proteolyse rate in W3110 im Vergleich zu MC4100 energetisch. (ii) Während der Destabilisierung von  $\sigma^S$  in der ÜP bei 37 °C steigt der ATP-Gehalt in MC4100 kurzfristig an. (iii) Im Verlauf der SP stabilisiert W3110 ATP bei 37 °C bei etwa 0,5 mM, während der ATP-Gehalt in MC4100 kollabiert. Das weist auf ein besseres Energiemanagement des W3100 hin. (iv) Bei 28 °C ist der ATP-Gehalt in beiden Stämmen niedriger als bei 37 °C.

#### 4.6. Langzeitüberleben der beiden *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110

Die Ergebnisse in dieser Arbeit ließen vermuten, dass die Stressresistenz in W3110 besser ausgeprägt ist als in MC4100, da bei beiden Temperaturen in W3110 die Wachstumsrate und die LZ niedriger sind, wodurch die Replikationsrate geringer ist und die Zellen Energie sparen. Das wurde durch die Bestimmung des ATP-Gehalts in Kapitel 4.5. bestätigt. Dieser ist in W3110 bei 37 °C deutlich höher als in MC4100, was zeigt, dass dem Stamm W3110 mehr Energieressourcen zur Verfügung stehen. Weiterhin ist der (p)ppGpp-Gehalt in W3110 höher,

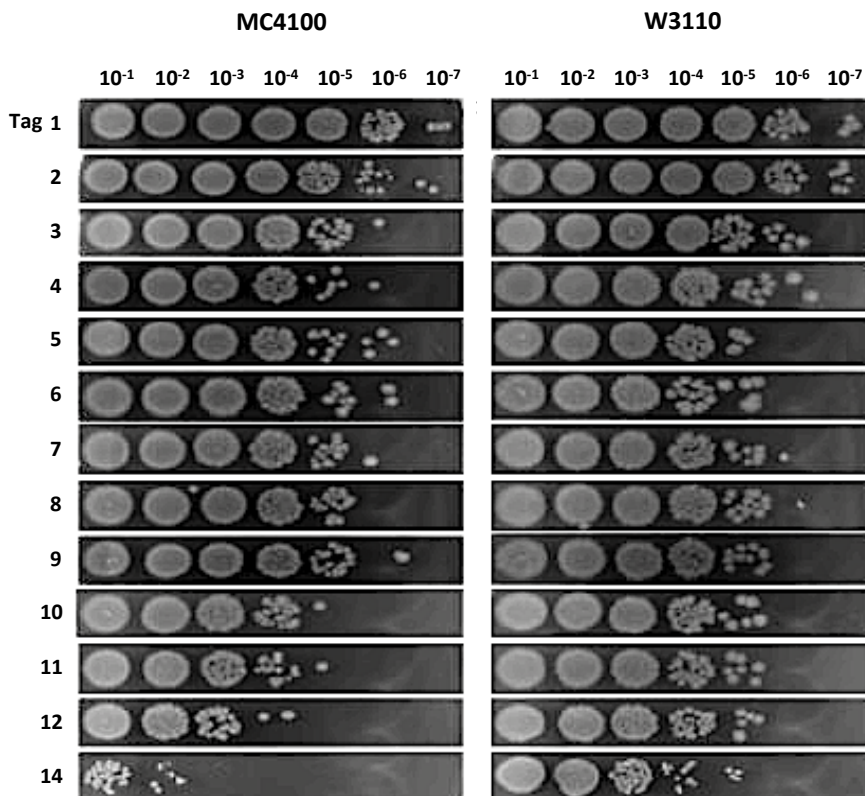
da dieser Stamm im Vergleich zu MC4100 *relAI*-Wildtyp ist. Deshalb wird die stringente Antwort in diesem Stamm stärker ausgelöst. Da außerdem  $\sigma^s$  in W3110 bei beiden Temperaturen früher vollständig stabilisiert wird (Kapitel 4.1.1. und 4.1.2.), führt das sehr wahrscheinlich zu einer schnelleren und effizienteren Adaption an Mangelbedingungen als in MC4100. Deshalb wurde angenommen, dass die Stressresistenz in W3110 bei beiden Temperaturen höher ist als in MC4100.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass bei 37 °C nicht nur der ATP-Gehalt in W3110 deutlich höher ist (Kapitel 4.5.2.1), sondern auch der  $\sigma^s$ -Gehalt (Kapitel 4.2.3.) und dass sich nach Übernachtskultur der MC4100 bereits in der AbP befindet, während der W3110 noch langsam weiterwächst (Kapitel 4.1.1.). Das deutete darauf hin, dass der W3110 besser an die SP-Bedingungen adaptieren kann und daher vermutlich länger bei diesen Bedingungen überleben kann. Zudem wird die Stabilisierung von  $\sigma^s$  in MC4100 durch die vorübergehende Destabilisierung von  $\sigma^s$  in der ÜP verzögert (Kapitel 4.1.1.). Daher war anzunehmen, dass die Stressresistenz in MC4100 in der SP herabgesetzt ist. Es stellten sich also die Fragen, ob sich das Langzeitüberleben in beiden Stämmen unterscheidet und ob der W3110 ein besseres Langzeitüberleben als der MC4100 aufweist (als Indiz für ein besseres Energiemanagement).

Dazu wurden Kulturen beider Stämme unter standardisierten Bedingungen mehrere Wochen lang inkubiert und die LZ in regelmäßigen Abständen bestimmt. Um sicherzustellen, dass die Langzeitkulturen trotz mehrfacher Probenentnahme bis zum Ende des Experiments nicht kontaminiert waren, wurde die Sterilität mit zwei unabhängigen Tests überprüft. Dazu wurden Reinkulturen auf Agarplatten isoliert. Anschließend wurden Einzelkolonien erstens auf 3M<sup>TM</sup> Petrifilme<sup>TM</sup> select *E. coli* ausgestrichen, die selektiv *E. coli* nachweisen und zweitens parallel in eine Kolonie-PCR eingesetzt, zur Amplifikation von *uidA*, dem Gen, das die  $\beta$ -Glucuronidase kodiert und das spezifisch für *E. coli* ist.

#### 4.6.1. Die Lebendzellzahl ist in W3110-Langzeitkulturen 100–1000-fach höher als in MC4100

Bei 37 °C wurden Kulturen von W3110 und MC4100 14 Tage lang ohne Medienwechsel inkubiert. Jeden Tag wurde die LZ bestimmt. Es zeigte sich, dass die LZ periodisch schwankt. Das deutet darauf hin, dass durch das Absterben eines Teils der Kultur eine zusätzliche Nährstoff- und Energiequelle entsteht, die den lebenden Zellen kryptisches Wachstum ermöglicht (Abb. 4.27).

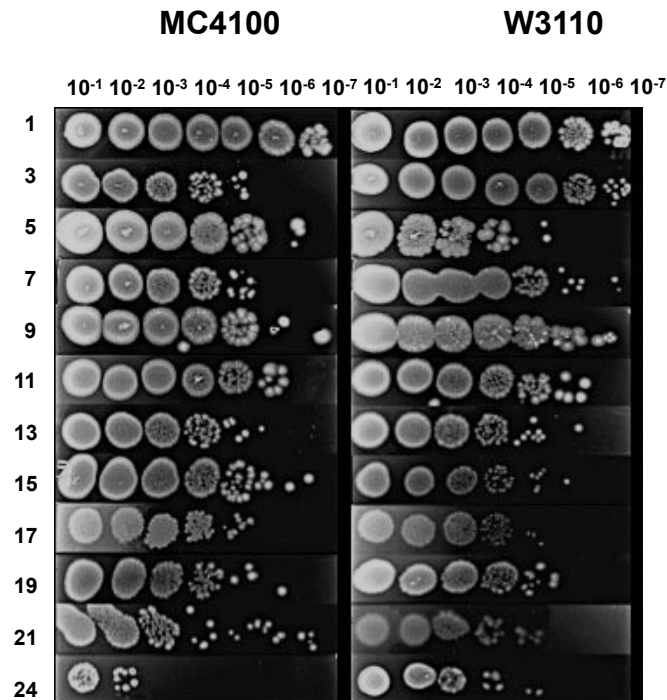


**Abb. 4.27: Langzeitüberlebenstest der beiden *E. coli* K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 37 °C.** Kulturen der beiden *E. coli* K12-Stämme MC4100 und W3110 wurden in LB-Medium bei 37 °C 14 Tage lang inkubiert. Jeden Tag wurden 10 µl entnommen und in Saline verdünnt. Dann wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  auf LB-Platten gespottet und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Langzeittest, das Ergebnis wurde reproduziert. Die Zellzahl ist in W3110 nach 14 Tagen Kulturdauer etwa 100 bis 1000-mal höher als in MC4100.

Nach 14 Tagen betrug die LZ bei 37 °C in W3110 ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ ml. Das ist 300-mal weniger als am ersten Tag. Die hohe LZ belegt, dass der W3110 fähig ist, längere Zeit ohne erneute äußere Energiezufuhr zu überleben und weist auf ein gutes Energiemanagement und/ oder höhere Stressresistenz hin. In MC4100 sank die LZ früher ab als in W3110 und betrug nach 14 Tagen nur noch ca.  $7 \times 10^4$  Zellen/ ml. Das ist ca. 40.000-mal weniger als an Tag 1 und ca. 300-mal weniger als nach 14 Tagen in W3110. Das zeigt, dass das Energiemanagement in MC4100 deutlich schlechter ist als in W3110.

Die Sterilkontrollen bestätigten, dass die Kulturen bis zum Ende des Experiments steril waren (Daten nicht gezeigt).

Bei 28 °C wurde das Langzeitüberleben 24 Tage lang untersucht. Die LZ nahm, ebenso wie bei 37 °C, periodisch ab, dies deutet auf kryptisches Wachstum hin (Abb. 4.28).



**Abb. 4.28: Langzeitüberlebenstest der beiden *E. coli* K12-Stämme W3110 und MC4100 bei 28 °C.** Kulturen beider Stämme wurden in LB-Medium bei 28 °C 24 Tage lang inkubiert. An ausgewählten Tagen wurden 10 µl entnommen und in Saline verdünnt. Dann wurden die Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  auf LB-Platten gespottet und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Langzeittest, das Ergebnis wurde reproduziert. Die Zellzahl ist in W3110 nach 24 Tagen Kulturdauer etwa 100 bis 1000-mal höher als in MC4100.

Nach 24 Tagen war die LZ bei 28 °C in W3110 etwa 100-fach höher als in MC4100 (Abb. 4.28). Die Sterilitests nach Beendigung der Experimente bestätigten die Sterilität der Kulturen (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich beider Temperaturen (Tag 1–14) fällt auf, dass sich in W3110 die LZ bei beiden Temperaturen kaum voneinander unterscheidet. In MC4100 gibt es dagegen große Unterschiede. Während in MC4100 bei 37 °C nach 14 Tagen bereits viele Zellen gestorben sind, sind die Zellen bei 28 °C noch im kryptischen Wachstum und wachsen gerade wieder hoch. Das zeigt, dass der MC4100 bei 28 °C mehr Energiereserven hat als bei 37 °C.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse zum Langzeitüberleben folgendes: (i) Das Langzeitüberleben ist bei beiden Temperaturen in W3110 besser als in MC4100. Das weist auf eine bessere Stressresistenz des W3110 hin. (ii) In MC4100 ist das Langzeitüberleben bei 28 °C besser als bei 37 °C. Das weist darauf hin, dass dieser Stamm bei 28 °C schonender mit seinen Energieresourcen umgeht als bei 37 °C.



## 5. DISKUSSION

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, wie und wodurch  $\sigma^s$  im Verlauf des Wachstumszyklus in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 stabilisiert wird. Da RssB-P während des proteolytischen Zyklus von  $\sigma^s$  nicht dephosphoryliert wird (Kanow-Scheel, 2008), kann die extrem schnelle Stabilisierung von  $\sigma^s$  bei Stress nicht durch Modulation der RssB-Aktivität via Phosphordonorlimitierung erreicht werden. Zwar könnte es eine spezielle, aktivierbare Phosphatase für RssB geben, dafür gibt es aber keine Evidenz. Bei permanenter Phosphorylierung von RssB-P muss daher ein Mechanismus gefordert werden, der es ermöglicht, mindestens eine Komponente der  $\sigma^s$ -Proteolyse zu inaktivieren, damit  $\sigma^s$  stabilisiert und die generelle Stressantwort ausgelöst werden kann. Die *in vivo*-Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen die zentrale Rolle von RssB bei der Stabilisierung von  $\sigma^s$  und zeigen, dass die Proteolysekapazität des ClpXP-Systems für  $\sigma^s$  im Verlauf des Wachstumszyklus durch den geringen RssB-P-Gehalt limitiert wird. Die Bestimmung des  $\sigma^s$ -Gehalts offenbarte einen massiven Anstieg von  $\sigma^s$  in der SP, wodurch die Expression von RssB ausgetriggert wird. Zusammen mit dem zunehmenden Phosphordonorentzug sinkt der Gehalt an RssB-P in der SP immer weiter ab, sodass die  $\sigma^s$ -Proteolyse inhibiert wird. Ergänzend sinkt der ATP-Gehalt in der SP so weit ab, dass dieser dann zu niedrig ist, um den großen  $\sigma^s$ -Pool weiterhin durch ClpXP zu binden, zu entfalten und zu degradieren.

Der Vergleich der beiden *E. coli*-K12-Stämme W3110 und MC4100 offenbarte große Unterschiede zwischen beiden Stämmen. In W3110 wird  $\sigma^s$  in der frühen SP zügig stabilisiert, sodass die generelle Stressantwort ausgelöst wird und der Stamm an die SP adaptieren kann. Die gute Adaptionsfähigkeit dieses Stammes bestätigte sich im besseren Langzeitüberleben, da der deutlich höhere  $\sigma^s$ -Gehalt in diesem Stamm eine stabile Basis für eine starke Stressantwort bietet. In MC4100 hingegen wird  $\sigma^s$  zu Beginn der SP nicht stabilisiert, sondern geht zunächst in eine zwischengeschaltete ÜP, bei der  $\sigma^s$  vorübergehend destabilisiert wird. Die Bestimmung des Rsd-Gehalts zeigte, dass dieser in MC4100 zu diesem Zeitpunkt so niedrig ist, dass  $\sigma^{70}$  sehr wahrscheinlich nicht von der RNAP verdrängt werden kann. In Kombination mit dem geringeren (p)ppGpp-Gehalt, bedingt durch die *relA*-Mutation des MC4100, ist die Sigmafaktorkompetition von  $\sigma^s$  in diesem Stamm zu Beginn der SP sehr wahrscheinlich zu gering, um  $\sigma^s$  an das RNAPK zu binden. Außerdem sind der  $\sigma^s$ -Gehalt und der ATP-Gehalt in MC4100 deutlich niedriger als in W3110. All das hat für den MC4100

weitreichende Auswirkungen, da dadurch die Adaption an die SP verzögert wird und die Stressresistenz herabgesetzt ist, was durch das frühere Eintreten in die AbP und das deutlich schlechtere Langzeitüberleben bestätigt wird.

### 5.1. In ungestressten Zellen sichert der geringe RssB-P-Gehalt durch Limitierung der $\sigma^S$ -Proteolyserate den basalen $\sigma^S$ -Gehalt

In ungestressten Zellen wird  $\sigma^S$  degradiert, indem es an RssB-P gebunden und anschließend an das ClpXP-Proteasesystem abgegeben wird, wo es unter ATP-Verbrauch entfaltet und degradiert wird (Becker *et al.*, 1999; Klauck *et al.*, 2001; Muffler *et al.*, 1996b, Zhou *et al.*, 2001; Zhou und Gottesman, 1998). Die Inhibierung des Regulators durch Degradierung in Abwesenheit des Signals gibt es nicht nur bei  $\sigma^S$ , sondern z. B. auch bei  $\sigma^H$  in *E. coli* und beim Transkriptionsaktivator ComK in *Bacillus subtilis* (Kirstein *et al.*, 2009; Konovalova *et al.*, 2014; Narberhaus *et al.*, 2009). Umgekehrt ist auch die Aktivierung des Regulators durch Degradierung in Anwesenheit des Signals verbreitet, so z. B. beim Anti- $\sigma^E$ -Faktor RseA in *E. coli* (Ades, 2008; Clausen *et al.*, 2011; Kroos und Akiyama, 2013) und beim Repressor CtsR in *B. subtilis* (Kirstein *et al.*, 2009; Konovalova *et al.*, 2014).

$\sigma^S$  wird degradiert, weil einerseits genügend RssB-P- und ATP-Moleküle vorhanden sind und andererseits zu wenig  $\sigma^S$ -Moleküle vorhanden sind, um erfolgreich mit  $\sigma^{70}$  um Bindung an das RNAPK zu konkurrieren. Die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^S$  ist deshalb gering, weil  $\sigma^S$  nur auf basalem Niveau exprimiert wird (Lange und Hengge-Aronis, 1994) und die Konzentration von Crl, (p)ppGpp, Rsd und 6-S-RNA, die das Sigmafaktor-Konkurrenzgleichgewicht von  $\sigma^S$  und  $\sigma^{70}$  zu Gunsten von  $\sigma^S$  modulieren würden, zu niedrig ist (Sharma und Chatterji, 2010) (Abb. 4.10). Deshalb wird in ungestressten Zellen die Genexpression durch  $\sigma^{70}$  dominiert, der in höherer Konzentration als alle anderen Sigmafaktoren vorliegt und zudem die größte Affinität an das RNAPK hat (Jishage und Ishihama, 1995; Jishage *et al.*, 1996), während  $\sigma^S$  degradiert wird (Abb. 5.1).

In ungestressten Zellen beträgt die  $\sigma^S$ -Halbwertszeit 2–3 min und  $\sigma^S$  wird zügig degradiert (Abb. 4.1 und 4.2). Das ist mit früheren Pulse Chase-Experimenten konform (Lange und Hengge-Aronis, 1994). In MC4100 liegt der  $\sigma^S$ -Gehalt bei OD 0,5 bei ca. 850  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle (Abb. 4.12), die Halbwertszeit beträgt 2,75 min (Abb. 4.2) und der ATP-Gehalt liegt bei etwa 1,4 mM (Abb. 4.22), was etwa 840.000 ATP-Molekülen/ Zelle entspricht. Unter der Annahme, dass ca. 500 ATP-Moleküle/ degradiertem  $\sigma^S$  benötigt

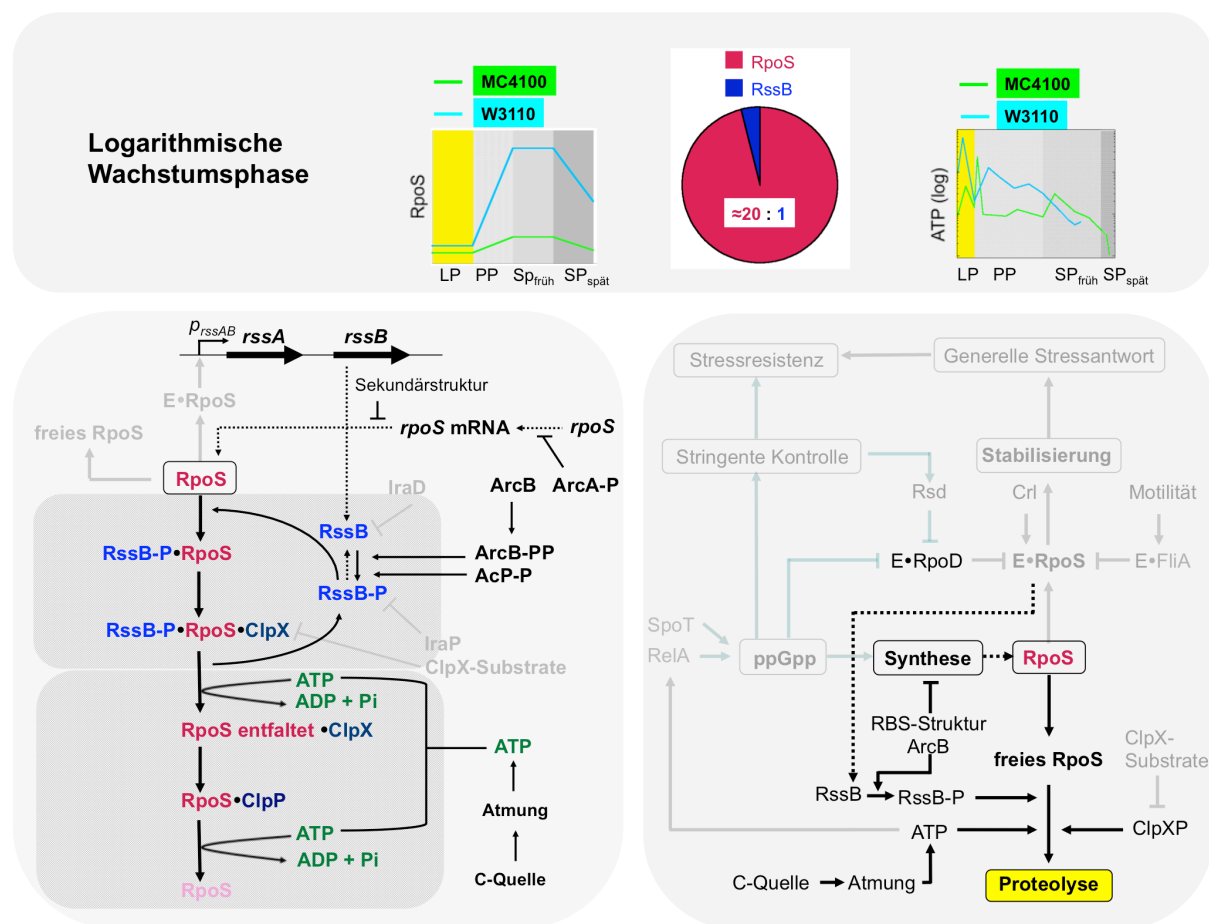


werden, zeigen diese Angaben, dass der ATP-Gehalt genügen würde, um etwa 1700  $\sigma^S$ -Moleküle/ Halbwertszeit zu degradieren. (ATP-Bedarf pro ClpX<sub>6</sub> etwa 100–600 ATP/ min (Burton *et al.*, 2003; Kenniston *et al.*, 2003); ATP-Bedarf pro ClpP<sub>14</sub> etwa 1 ATP/ Translokationsschritt von 5-8 Aminosäuren (Aubin-Tam *et al.*, 2011; Baker und Sauer, 2012; Maillard *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2008b; Shin *et al.*, 2009)). Auch wenn ATP für viele Zwecke in der Zelle benötigt wird, sodass nur ein Teil für die Proteolyse zur Verfügung steht, legt das nahe, dass ATP die  $\sigma^S$ -Proteolyse in der LP nicht limitiert.

Wieso werden also trotz hoher ATP-Konzentration, geringem  $\sigma^S$ -Gehalt und kurzer  $\sigma^S$ -Halbwertszeit nicht alle  $\sigma^S$ -Moleküle degradiert? Denkbar wäre, dass das ClpXP-Proteolysesystem bereits an seiner Kapazitätsgrenze arbeitet. Das ist jedoch nicht der Fall, denn in MC4100 liegt die maximale  $\sigma^S$ -Degradierungsrate bei 1500–2000  $\sigma^S$ -Molekülen/ 20 min und in W3110 ist sie 5–6-mal so hoch (Abb. 4.16, 4.18 und Tab. 4.2). Daraus muss geschlossen werden, dass das ClpXP-System prinzipiell in der Lage ist, 5–6-mal mehr  $\sigma^S$ -Moleküle zu degradieren, als es dies in MC4100 tut. Wieso werden also nicht mehr Moleküle degradiert? Substratmangel ist unwahrscheinlich, da  $\sigma^S$  ausreichend synthetisiert wird (Abb. 4.12, 4.18 und Tab. 4.2). Substratzug durch Sequestrierung an der RNAP kann wegen der geringen Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^S$  ausgeschlossen werden. Auch eine zu geringe ClpXP-Konzentration kann ausgeschlossen werden, da die  $\sigma^S$ -Halbwertszeit sehr kurz ist (Abb. 4.3), was zeigt, dass genügend ClpXP-Moleküle vorhanden sind, um  $\sigma^S$  zügig zu degradieren.

Ist RssB-P limitiert? Limitierung der  $\sigma^S$ -Proteolyse durch RssB wurde bereits von Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002 und Becker *et al.*, 2000 gezeigt, jedoch nicht in ungestressten Zellen. Inhibierung von RssB-P durch Sequestrierung via Ira-Proteine erscheint unwahrscheinlich, da diese durch spezifische Signale induziert werden (Phosphat- bzw. Magnesiummangel, DNA-Schäden) (Bougdour *et al.*, 2006 und 2008; Merrikh *et al.*, 2009) und ein LP-induziertes Anti-RssB-Protein nur aus uropathogenen *E. coli*-Stämmen bei oxidativem Stress, der während einer Phagozytoseinfektion entsteht, bekannt ist (Hryckowian *et al.*, 2014; Hryckowian und Welch, 2013). Auch Limitierung der RssB-Phosphodonoren AcP (Bouché *et al.*, 1998) und ArcB (Mika und Hengge, 2005; Yamamoto, 2005) ist unwahrscheinlich, da das ArcBA-System in ungestressten Zellen nicht durch Energiemangel oder oxidierte Quinone inaktiviert wird (Mika und Hengge 2005) und AcP bei der guten Nährstofflage aus überschüssigem Acetyl-CoA gewonnen wird. Zwar konkurriert RssB mit anderen Substraten um AcP aber die kurze  $\sigma^S$ -Halbwertszeit von 2–3 min (Abb. 4.3) zeigt,

dass genügend RssB-P vorhanden ist und spricht gegen Limitierung der Phosphordonoren. Außerdem wird RssB-P im proteolytischen Zyklus recycelt (Kanow-Scheel, 2008), sodass ein eventueller Engpass an Phosphordonoren überbrückt werden kann. Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass das vorhandene RssB phosphoryliert und aktiv ist. Allerdings beträgt das Verhältnis von  $\sigma^S$  : RssB in der LP etwa 20 : 1 (Becker *et. al.*, 2000). Bei beispielsweise 850  $\sigma^S$ -Molekülen in MC4100 bei OD 0,5 (Abb. 4.12) können nur ca. 10-11 RssB-P-Moleküle/ Zelle  $\sigma^S$  binden. Das weist darauf hin, dass RssB-P bereits in der LP limitiert ist. Der geringe RssB-Gehalt ist durch den geringen  $\sigma^S$ -Gehalt in der LP bedingt, da die Expression von RssB über einen homöostatischen Feedbackzyklus  $\sigma^S$ -abhängig ist (Abb. 5.1). Geringer  $\sigma^S$ -Gehalt und noch geringerer RssB-Gehalt bedingen also einander und führen so zur Begrenzung der  $\sigma^S$ -Proteolyse in der LP.

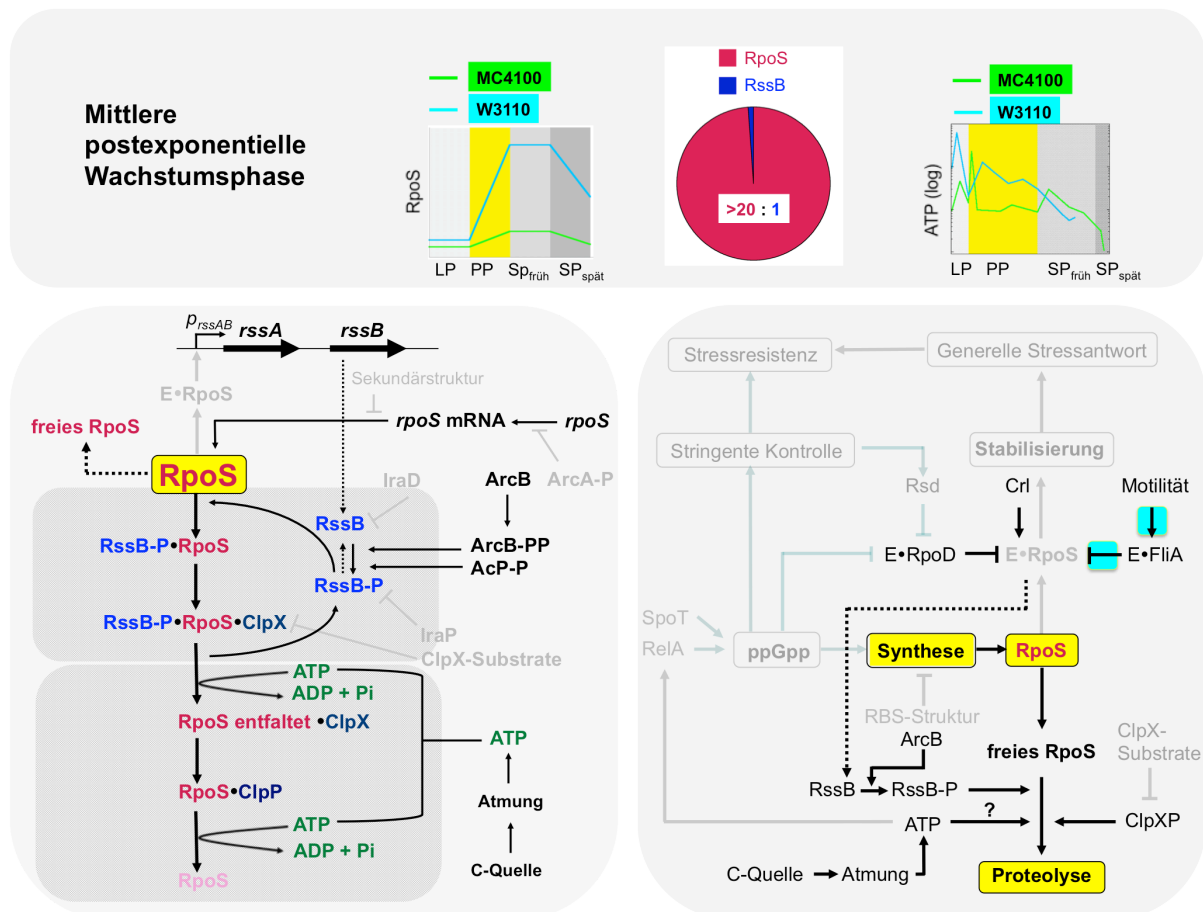


**Abb. 5.1: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^S$ ) in der Logarithmischen Wachstumsphase** in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100.  $\sigma^S$  wird basal exprimiert und sofort degradiert. Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^S$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^S$  : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^S$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^S$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. E: RNA-Polymerase. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

## 5.2. Postexponentielle Phase: $\sigma^s$ titriert RssB-P aus; der Weg zur Stabilisierung von $\sigma^s$ wird bereitet

Wenn das Nährstoffangebot suboptimal wird, beginnt die Replikationsrate zu sinken und die Zellen gehen in die PP. Die schlechter werdende Nährstoffversorgung führt dazu, dass der ATP-Gehalt sinkt (Abb. 4.24A). Den höchsten ATP-Bedarf verursacht die Synthese von Makromolekülen (Fuchs, 2014). Der beginnende AS-Mangel führt via RelA/ (p)ppGpp zur Reduktion der Wachstumsrate und sichert so den schonenden Umgang mit den schwindenden ATP-Ressourcen. In W3110 sieht man deutlich, dass dieser Stamm seine Wachstumsrate ab OD 1,5 reduziert (Abb 4.21), das spart ATP. MC4100 hingegen zeigt die für *relA1*-Mutanten typische erhöhte Wachstumsrate (Bergman *et al.*, 2014). Dadurch wächst er zu lange weiter und verbraucht sehr viel ATP.

In der PP liegt der ATP-Gehalt in W3110 bei 37 °C bei 1,2–7,5 Millionen ATP-Molekülen/ Zelle, in MC4100 ist er etwa 10-mal niedriger (Abb. 4.22 und 4.23). Der höhere ATP-Gehalt erlaubt dem W3110, bis zu 7-mal mehr  $\sigma^s$ -Moleküle/ 20 min zu degradieren und bis zu 9-mal mehr  $\sigma^s$ -Moleküle/ 20 min zu synthetisieren als der MC4100 (Abb. 4.16B,C, Abb. 4.20 und Tab. 4.2). Außerdem wird ATP in W3110 ab etwa OD 1,5 für den Betrieb von Flagellen genutzt. Der Stamm MC4100 ist eine *flhD5301*-Mutante (Komeda und Iino, 1979) und nicht motil. Das ließ zunächst vermuten, dass in MC4100 mehr ATP für die  $\sigma^s$ -Proteolyse durch ClpXP zur Verfügung steht. Der deutlich niedrigere ATP-Gehalt im Vergleich zum W3110 widerlegt das allerdings (Abb. 4.23A) und der  $\sigma^s$ -Abbau in der nicht motilen Mutante W3110 *fliA::scar* (Abb. 4.4) bestätigt, dass der ATP-abhängige Flagellenbetrieb nicht die Ursache für die unterschiedliche Stabilisierung von  $\sigma^s$  ist, denn die  $\sigma^s$ -Halbwertszeiten von Wildtyp und Mutante sind in der PP vergleichbar (Abb. 4.1 und 4.4).



**Abb. 5.2: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^S$ ) in der mittleren postexponentiellen Wachstumsphase in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100.** Zunehmende  $\sigma^S$ -Synthese führt zu einem massiven Anstieg des  $\sigma^S$ -Gehalts, dieser titriert RssB-P aus. Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^S$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^S$  : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^S$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^S$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. Türkise Kästchen: Situation in W3110. E: RNA-Polymerase. Für weitere Informationen siehe Text. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

Im Verlauf der PP steigt der  $\sigma^S$ -Gehalt um das 11–13-fache an (Abb. 4.13), das ist konform mit den Ergebnissen von Jishage und Ishihama, 1995 und Jishage *et al.*, 1996. Wird durch den starken Anstieg des  $\sigma^S$ -Gehalts die ClpXP-Protease durch ATP limitiert? Der  $\sigma^S$ -Gehalt liegt in W3110 in der PP bei ca. 2400–9800  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle (Abb. 4.11) und der ATP-Gehalt beträgt ca. 2–13 mM ATP/ Zelle, das sind etwa 1,2–7,5 Millionen ATP-Moleküle/ Zelle (Abb. 4.23). Bei etwa 500 ATP-Molekülen/ degradiertem  $\sigma^S$  wäre die ATP-Konzentration gerade ausreichend, um das vorhandene  $\sigma^S$  zu degradieren. Auch in MC4100 würde die ATP-Konzentration von ca. 0,9–1,4 mM ATP/ Zelle prinzipiell genügen, um die etwa 430–1200  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle zu degradieren (Abb. 4.12 und 4.26). Allerdings wird ATP in

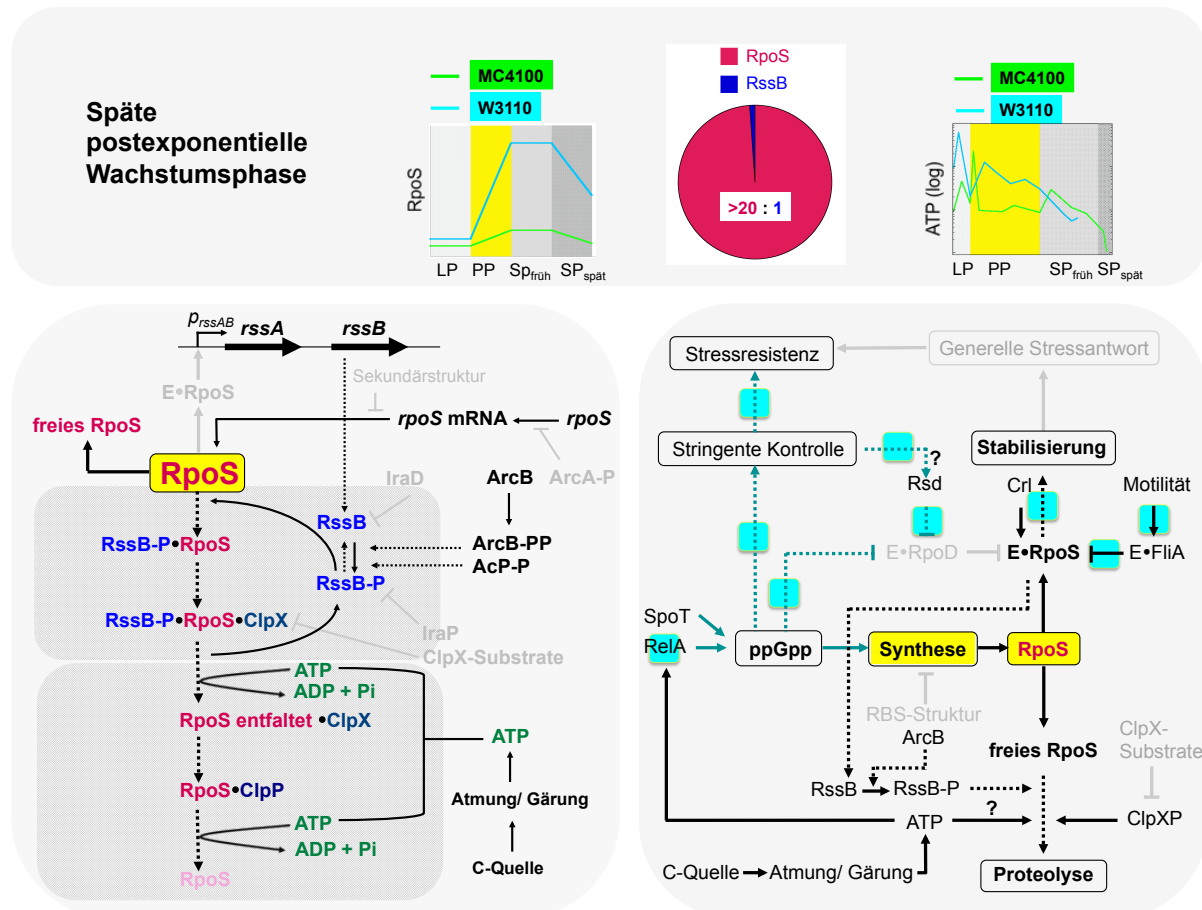
beiden Stämmen für viele andere Prozesse wie z. B. Proteinbiosynthese und Wachstum benötigt, sodass eine Limitierung der ClpXP-Protease durch ATP wahrscheinlich ist.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass in der PP weniger  $\sigma^s$ -Moleküle abgebaut werden als theoretisch, basierend auf dem Substratangebot und der kurzen Zeitdauer eines  $\sigma^s$ -RssB-P-Markierungszyklus von 4,1 sec, möglich wären (Kap. 4.4.2). Wodurch wird die  $\sigma^s$ -Proteolyse limitiert? In ungestressten Zellen wird die Proteolyse durch den geringen  $\sigma^s$ -Gehalt limitiert, der via homöostatischen Feedbackzyklus einen sehr niedrigen RssB-Gehalt bedingt (Kap. 5.1). In der PP steigt der  $\sigma^s$ -Gehalt um das 11–13-fache an (Abb. 4.13). Da aber in dieser Wachstumsphase wegen der geringen Kompetitionseffizienz von  $\sigma^s$  nur wenige  $E\sigma^s$ -Komplexe entstehen und die RssB-Expression  $E\sigma^s$ -abhängig ist, verschiebt sich das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB von 1 : 20 in der LP (Becker *et al.* 2000) zu Ungunsten von RssB. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass ein  $\sigma^s$ -Molekül von RssB-P gebunden wird. Der ansteigende  $\sigma^s$ -Gehalt führt also in der PP via homöostatischem Feedbackzyklus dazu, dass die Proteolyserate limitiert wird und  $\sigma^s$  stabiler wird (Abb. 5.2 und 5.3).

Die nachlassende  $\sigma^s$ -Proteolyse führt dazu, dass der Anteil alter  $\sigma^s$ -Moleküle in der Zelle bis auf das 20-fache ansteigt (4.19B). Dadurch, und auch durch die zwar nachlassende aber immer noch hohe  $\sigma^s$ -Biosynthese (Abb. 4.16B und Tab. 4.2), wächst der  $\sigma^s$ -Pool immer stärker an, wodurch sich das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P immer weiter verschiebt. Die  $\sigma^s$ -Biosynthese, das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P, die nachlassende Proteolyseleistung und der  $\sigma^s$ -Gehalt bedingen also einander und beeinflussen sich gegenseitig wahrscheinlich nach folgendem Prinzip: Hohe  $\sigma^s$ -Biosynthese führt zur Verschiebung des Verhältnisses von  $\sigma^s$  : RssB-P, dadurch sinkt die Proteolyserate, der Anteil an altem  $\sigma^s$  nimmt zu und der  $\sigma^s$ -Pool wird größer. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P noch weiter, wodurch die Proteolyserate weiter sinkt, sodass der  $\sigma^s$ -Pool noch größer wird, wodurch sich das Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P noch weiter verschiebt u. s. w. Das Ergebnis ist, dass die  $\sigma^s$ -Proteolyse nachlässt und der  $\sigma^s$ -Pool bis zum Ende der PP so stark ansteigt, dass die Kompetitionseffizienz von  $\sigma^s$  im Wettbewerb mit den anderen Sigmafaktoren um die Bindung an das RNAPK stark zunimmt. Zum Ende der PP gibt es in W3110 ca.  $9,6 \times 10^{10}$   $\sigma^s$ -Molekülen/  $\mu\text{g GP}$ , das entspricht etwa 8700  $\sigma^s$ -Molekülen/ Zelle (Abb. 4.11). Parallel steigt der Gehalt des Anti- $\sigma^{70}$ -Faktors Rsd von gut 20 % in der sehr frühen PP auf über 90 % an (Abb. 4.10D). Dadurch wird vermehrt  $\sigma^{70}$  durch Rsd sequestriert (Ishihama, 1999; Jishage und Ishihama, 1998 und 1999; Mitchell *et al.*, 2007; Österberg *et al.*, 2011; Piper *et al.*, 2009; Sharma und Chatterji, 2010; Trotochaud und Wassarman, 2005),

sodass  $\sigma^s$  leichter an das RNAPK binden. Unterstützt wird  $E\sigma^s$  zusätzlich durch (p)ppGpp, da (p)ppGpp in hoher Konzentration (Traxler *et al.*, 2011) die RNAP empfänglicher für alternative Sigmafaktoren macht und die Affinität von  $\sigma^{70}$  an das RNAPK inhibiert (Jishage *et al.*, 2002; Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008; Srivatsan und Wang, 2008).

In der PP unterscheiden sich also der  $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt in W3110 und MC4100 und auch der (p)ppGpp-Gehalt, da *relA*-Mutanten zwar mit SpoT eine zweite (p)ppGpp-Synthase haben, diese wird allerdings nicht bei AS-Mangel aktiviert (Hernandez und Bremer, 1991; Laffler und Gallant, 1974). Welche Folgen hat das? In W3110 ist der  $\sigma^s$ -Gehalt am Ende der PP 9-mal höher als in MC4100 (Abb. 4.13). Zusätzlich ist der Rsd-Gehalt höher (Abb. 4.10C,D) und auch der (p)ppGpp-Gehalt dürfte höher sein. Dadurch steigt die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  in W3110 stärker an als in MC4100, sodass  $\sigma^s$  in W3110 zunehmend an der RNAP stabilisiert werden kann (Abb. 4.3) und  $\sigma^s$ -abhängige Genexpression induzieren kann. Die höhere LZ in der späten PP in W3110 bestätigt den Beginn der  $\sigma^s$ -abhängigen Genexpression, denn sie zeigt, dass die W3110-Zellen kleiner geworden sind (Abb. 4.21). Das bedeutet, dass sich die Zellen bereits abrunden und dies geschieht unter Kontrolle von  $\sigma^s$  (Abb. 1.2). In MC4100 schwächt dagegen der niedrigere  $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt die Konkurrenzeffizienz von  $\sigma^s$  im Wettbewerb mit den anderen Sigmafaktoren um Bindung an das RNAPK und erschwert die Auslösung der generellen Stressantwort und damit die Adaptionfähigkeit in diesem Stamm (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der späten postexponentiellen Wachstumsphase in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C.** In W3110 sind der  $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt höher als in MC4100. Das stärkt die Konkurrenz von  $\sigma^s$  in W3110, sodass  $\sigma^s$  in W3110 zunehmend an der RNA-Polymerase (E) stabilisiert werden kann. Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^s$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^s$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. Türkise Kästchen: Situation in W3110. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

### 5.3. In der frühen Stationärphase wird $\sigma^s$ in W3110 stabilisiert, aber in MC4100 verstärkt degradiert

Wenn die Maßnahmen, die in der PP zum Schutz gegen Stress getroffen wurden, nicht ausreichen und sich die Umweltbedingungen weiter verschlechtern, treten die Zellen in die SP ein (Kolter *et al.*, 1993). In der SP herrscht meist massiver Nährstoffmangel, möglich sind aber auch andere Stressauslöser wie z. B. veränderte osmolare Bedingungen, Temperatur- oder pH-Änderungen (zur Übersicht: Navarro Llorens *et al.*, 2010; Battesti *et al.* 2011 und 2015; Hengge, 2008, 2009, 2011; Landini *et al.*, 2014). Bedingt durch den Hunger sinkt der

ATP-Gehalt stark ab und liegt in der frühen SP in beiden Stämmen nur noch zwischen 3–0,7 mM ATP, das entspricht etwa  $1,8\text{--}0,43 \times 10^6$  ATP-Molekülen/ Zelle (Abb. 4.22–4.24). Da ca.  $1\text{--}5 \times 10^{10}$  ATP-Moleküle/ Zellzyklus benötigt werden (Moran *et al.*, 2010), ist der vorhandene ATP-Gehalt zu niedrig, um zu wachsen. Die Replikation wird also durch ATP limitiert.

In der SP ändern die Zellen ihre Strategie grundlegend und wechseln vom Wachstums- in den Überlebensmodus (Hengge, 2011; Kolter *et al.*, 1993). Dieser fundamentale Wechsel des Lebensstils wird durch umfangreiche Umstrukturierung der Genexpression via  $\sigma^S$  erreicht (Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2011) und führt zur Multiresistenz der Zellen, die bestmögliche Überlebenschancen bietet (Abb. 1.2 und 1.3).

### 5.3.1. Austitrierung von RssB, Sequestrierung von $\sigma^{70}$ und Stärkung der $\sigma^S$ -Kompetition schaffen in W3110 die Grundlage zur Stabilisierung von $\sigma^S$

Der  $\sigma^S$ -Gehalt ist in der SP sehr hoch und liegt in W3110 bei max. 10000  $\sigma^S$ -Molekülen/ Zelle (Abb. 4.11). Das ist mehr als bei Jishage *et al.*, 1996 angegeben. Allerdings ist die zugrunde gelegte Zellzahl dort eine andere, da dafür Klett-Einheiten benutzt wurden, was den Nachteil hat, dass dabei die unterschiedliche Zellmorphologie in LP und SP nicht berücksichtigt wird. Die Daten in dieser Arbeit sind genauer, da für jede OD die Lebendzellzahl bestimmt wurde (Tab. 4.3), wodurch die unterschiedlichen Zellvolumina in LP und SP inkludiert sind. Im Ishihama-Labor wurde zudem mit einem japanischen W3110-Laborstamm gearbeitet (Jishage und Ishihama, 1997), von dem allein in Japan mindestens 11 verschiedene W3110-Linien existieren, die sich genetisch in die Gruppen A–E untergliedern (Jishage und Ishihama, 1997). Die A-Gruppe, mit der in dieser Arbeit experimentiert wurde, entspricht dem Wildtyp. Die B-Gruppe, mit der Jishage *et al.*, 1996 gearbeitet haben, hat ein trunkiertes *rpoS*-Gen mit zwei Substitutionen und einem Amber-Stopcodon an Position 33 und einer zweiten, dahinterliegenden Translations-Initiations-Region, sodass ein trunkiertes  $\sigma^S$  translatiert wird, dem N-terminal 51 AS und damit die Region 4, die die Erkennung des –35-Elements vermittelt, fehlen (Helmann und Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992; Subbarayan und Sarkar, 2004 und 2004a). Daher sind die Ergebnisse zum  $\sigma^S$ -Gehalt von A- und B-Gruppe des W3110 nicht miteinander vergleichbar.



Limitiert der geringe ATP-Gehalt nicht nur die Replikation, sondern auch die ClpXP-Protease? Der  $\sigma^S$ -Gehalt beträgt in W3110 in der frühen SP ca. 7700–9300  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle (Abb. 4.11) und der ATP-Gehalt sinkt von 3 mM auf 0,7 mM ab, dies entspricht etwa 1.800.000–430.000 ATP-Molekülen/ Zelle (Abb. 4.22). Bei geschätzten 500 ATP-Molekülen/ degradiertem  $\sigma^S$  ist diese ATP-Konzentration zu niedrig, um den vorhandenen  $\sigma^S$ -Pool zu degradieren. Die Vermutung, dass  $\sigma^S$  bei Unterschreitung einer bestimmten ATP-Konzentration vollständig stabil wird, konnte nicht bestätigt werden. Zwar deuteten die Ergebnisse bei 37 °C darauf hin, dass dieser Schwellenwert im Bereich von 0,5 mM ATP liegt (Abb. 4.22 und 4.24C), jedoch zeigten die Ergebnisse bei 28 °C einen generell etwa 10-fach niedrigeren ATP-Gehalt in beiden Stämmen als bei 37 °C (Abb. 4.25 und 4.26). *De facto* liegt der ATP-Gehalt bei 28 °C im Bereich von 0,03–1 mM und unterschreitet damit bereits in der LP und frühen PP trotz  $\sigma^S$ -Abbau den vermuteten Schwellenwert von 0,5 mM ATP. Daraus muss geschlossen werden, dass erstens eine ATP-Konzentration unter 0,5 mM ATP ClpXP nicht zwangsläufig limitiert und dass zweitens ATP nicht der entscheidende Regulator bei der  $\sigma^S$ -Stabilisierung ist, sondern lediglich eine ergänzende Rolle spielen dürfte. Das widerspricht der Aussage von Peterson *et al.*, 2012, dass die  $\sigma^S$ -Proteolyse durch ATP limitiert wird. Allerdings wurde dort der ATP-Gehalt nicht direkt gemessen, sondern indirekt gezeigt, dass die Generierung von ATP via Glykolyse und Citronensäurezyklus für die  $\sigma^S$ -Proteolyse notwendig ist. Daher sind die Ergebnisse in dieser Arbeit aussagekräftiger, da hier der ATP-Gehalt, der noch von anderen Metabolismusprozessen abhängig ist, direkt bestimmt wurde. Peterson und Møller, 2000 postulierten, dass der ATP-Pool unabhängig von der Wachstumsrate relativ gleichbleibend sei. Auch das kann nicht bestätigt werden und erscheint wegen des massiven Nährstoffmangels in der SP auch unwahrscheinlich. Zudem stimmt das in dieser Arbeit gefundene Absinken des ATP-Gehalts in der SP überein mit Moses und Sharp, 1972; Bagnara und Finch, 1973 und Franzen und Binkley, 1961, die ebenfalls zeigten, dass der ATP-Pool in *E. coli* proportional zur Wachstumsrate ist und im Verlauf des Wachstumszyklus sinkt. Ein ähnliches Absinken des ATP-Gehalts wurde für *Salmonella typhimurium* von Smith und Maaloe, 1964 und für *Aerobacter aerogenes* von Neidhardt und Fraenkel, 1961 gezeigt.

Limitiert der geringe RssB-P-Gehalt die  $\sigma^S$ -Proteolyse? Durch den hohen  $\sigma^S$ -Gehalt in der SP akkumuliert neu synthetisiertes RssB via homöostatischen Feedbackzyklus, kann aber nicht mehr phosphoryliert werden, da in der SP immer größerer Mangel an Phosphordonoren einsetzt. Der AcP-Gehalt ist in der SP niedrig (Klein *et al.*, 2007; McCleary und Stock, 1994)

und ArcB steht nicht mehr zur Verfügung (Mika und Hengge, 2005), weil durch den Nährstoffmangel in der SP weniger Elektronen in die Atmungskette eingehen und die Quinone zunehmend oxidiert werden, wodurch ArcB inaktiviert wird (Mika und Hengge, 2005). Die Kontrolle der ArcB-Aktivität und damit der Phosphorylierung von RssB durch die Quinone der Atmungskette trägt daher entscheidend zur Stabilisierung von  $\sigma^s$  bei. Das ist nicht ungewöhnlich, da Response-Regulatoren wie RssB häufig durch Änderung des Phosphorylierungsstatus reguliert werden und die Regulation des Adaptors bzw. Antisigmafaktors durch aktive Änderung des Phosphorylierungsstatus in anderen Organismen konserviert ist (Desriac *et al.*, 2013), so z. B. in *Bacilli* (van Schaik *et al.*, 2005), *Staphylococcus aureus* (Engman *et al.*, 2012; Palma and Cheung, 2001; Pané-Farré *et al.*, 2006; Senn *et al.*, 2005) und *L. monocytogenes* (Ferreira *et al.*, 2004; Wiedmann *et al.*, 1998).

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es weitere, unbekannte Phosphordonoren für RssB gibt, da Knockouts von AcP und ArcB noch basale  $\sigma^s$ -Proteolyse erlauben (Mika und Hengge, 2005) und die ÜP in MC4100 zeigt, dass zumindest in diesem Stamm genügend Phosphordonoren zur Verfügung stehen. Außerdem erlaubt auch unphosphoryliertes RssB basale  $\sigma^s$ -Proteolyse (Peterson *et al.*, 2004). Weiterhin kann RssB-P mehrfach in den proteolytischen Zyklus eingehen (Kanow-Scheel, 2008), sodass mittels Phosphordonormangel nur neu synthetisiertes RssB inaktiv gehalten werden kann. Allerdings deuten die Ergebnisse in Kanow-Scheel, 2008 darauf hin, dass RssB-P nicht beliebig oft  $\sigma^s$  binden und der Proteolyse zuführen kann, sodass wegen der kurzen Dauer eines RssB-P-Markierungszyklus von 4,1 sec (Kap. 4.4.2.3) anzunehmen ist, dass sich das eventuell noch vorhandene RssB-P nach kurzer Zeit erschöpft.

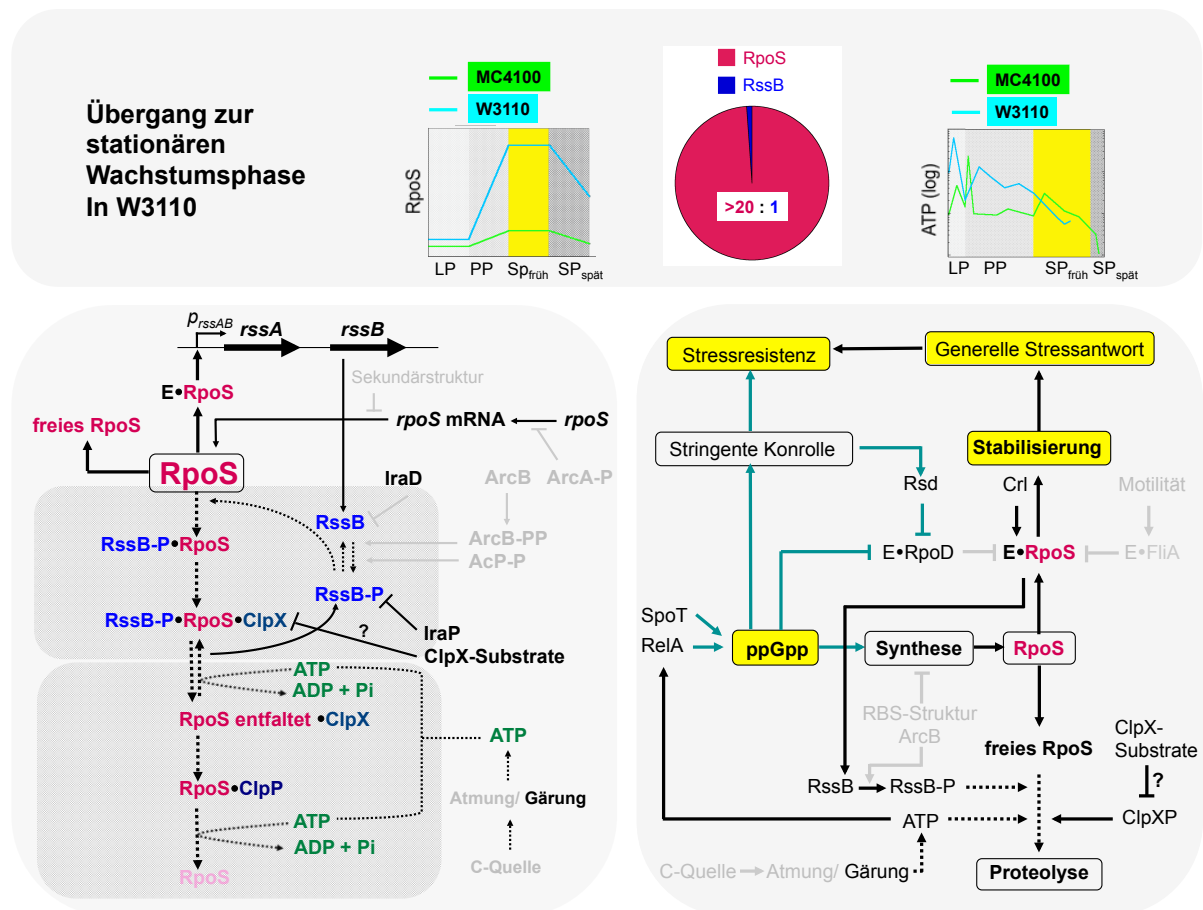
Sind der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt und das dadurch bedingte ungünstige Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P die Schlüsselregulatoren bei der Stabilisierung von  $\sigma^s$ ? In der frühen SP sinkt die  $\sigma^s$ -Biosynthese- und Proteolyse in W3110 (Abb. 4.1, 4.16B, 4.18 und Tab. 4.2) und der Gehalt an altem  $\sigma^s$  nimmt zu (Abb. 4.14). Biosynthese und Proteolyse von  $\sigma^s$  verlieren immer stärker an Einfluss auf die Höhe des  $\sigma^s$ -Gehalts (Abb. 4.18). Dadurch wird der  $\sigma^s$ -Pool stabilisiert und steigt in W3110 auf über 9000  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle an (Abb. 4.11), während parallel die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit auf über 30 min ansteigt (Abb. 4.1). Der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt zieht via homöostatischen Feedbackzyklus eine erhöhte Expression von RssB nach sich. Ab einer bestimmten Konzentration von  $E\sigma^s$  kann aber die RssB-Synthese nicht weiter gesteigert werden, da der RssB-Promotor dann mit maximaler Geschwindigkeit arbeitet. Ein sehr hoher  $\sigma^s$ -Gehalt titriert daher die RssB-Synthese aus und dies führt zur Verschiebung des

Verhältnisses von  $\sigma^s$  : RssB, sodass die Wahrscheinlichkeit für  $\sigma^s$ , von RssB-P gebunden zu werden, sinkt. Der hohe  $E\sigma^s$ -Gehalt in der SP führt also dazu, dass  $\sigma^s$  stabiler wird.

Dies allein genügt aber nicht, um  $\sigma^s$  vollständig zu stabilisieren, da der  $\sigma^s$ -Gehalt in beiden Stämmen bereits in der frühen SP sehr hoch ist und  $\sigma^s$  ist dennoch nicht vollständig stabil ist. Zudem beträgt die  $\sigma^s$ -Molekülzahl maximal ein Drittel von  $\sigma^{70}$  (Jishage *et al.*, 1996) und  $\sigma^s$  hat von allen Sigmafaktoren die geringste Bindungsaffinität an das RNAP *in vitro* (Colland *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993). Das macht wahrscheinlich, dass erst das Zusammenspiel von Austitrierung von RssB-P, Erhöhung der  $\sigma^s$ -Kompetition und Sequestrierung von  $\sigma^{70}$  zur vollständigen Stabilisierung von  $\sigma^s$  führt. Um die Kompetitionseffizienz von  $\sigma^s$  im Wettbewerb mit den anderen Sigmafaktoren um Bindung an das RNAPK zu erhöhen, muss vermutlich  $\sigma^{70}$  zunächst aktiv von der RNAP verdrängt werden und  $\sigma^s$  außerdem bei der Bindung an das RNAPK unterstützt werden. Dafür spricht, dass der Gehalt des Anti- $\sigma^{70}$ -Faktors Rsd (Jishage und Ishihama, 1998; Piper *et al.*, 2009) in beiden Stämmen erst bei einer OD über 4,0 maximal wird (Abb. 4.10).

Zusammengefasst führt der sehr hohe  $\sigma^s$ -Gehalt in W3110 zur Austitrierung der RssB-Expression und damit zur Stabilisierung von  $\sigma^s$ , sodass eine effiziente Umschaltung des Transkriptoms auf  $\sigma^s$ -abhängige Gene und damit die Adaption an die SP möglich werden (Abb. 5.4). Auch wenn der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt in W3110 zunächst überrascht, da er nicht den Daten von Jishage und Ishihama, 1996 entspricht und auch bezweifeln lässt, dass der  $\sigma^s$ -Gehalt nur maximal ein Drittel von  $\sigma^{70}$  beträgt (Ishihama, 2000; Maeda *et al.*, 2000), macht er Sinn, da die Affinität von  $\sigma^s$  für das RNAPK geringer ist als die von  $\sigma^{70}$  (Maeda *et al.*, 2000), sodass die hohe  $\sigma^s$ -Molekülzahl dafür sorgt, dass das Kompetitions Gleichgewicht von  $\sigma^s$  im Wettbewerb mit den anderen Sigmafaktoren um Bindung an das RNAPK auf Seiten von  $\sigma^s$  liegt. Durch die Überschwemmung der Zelle mit  $\sigma^s$  wird indirekt die Bindung der anderen Sigmafaktoren an das RNAPK reprimiert und so die Auslösung der lebenswichtigen generellen Stressantwort gesichert. Weiterhin spricht dafür, dass Klumpp und Hwa, 2008 mittels Modellierung fanden, dass die Anzahl der gesamten RNAP-Moleküle im Verlauf des Wachstumszyklus um das etwa 8-fache ansteigt auf ca. 10000 RNAP-Moleküle/ Zelle (Klumpp und Hwa, 2008). In Mauri und Klumpp, 2014 wurde sogar von 11400 RNAP-Molekülen/ Zelle ausgegangen und von 0–20.000 alternativen Sigmafaktor-Molekülen/ Zelle. Das passt zu dem in dieser Arbeit gefundenen hohen  $\sigma^s$ -Gehalt. Außerdem ist  $\sigma^s$  während der Transkriptionselongation am RNAPK sequestriert und wird erst nach Elongation der ersten ca. 100–500 Nukleotide frei (Raffaello *et al.*, 2005). Da in der SP die

Genexpression durch  $\sigma^s$  dominiert und viele  $E\sigma^s$ -Transkriptionsergebnisse parallel stattfinden, sinkt durch die Sequestrierung von  $\sigma^s$  an der RNAP der Gehalt an freiem  $\sigma^s$ . Weiterhin spricht dafür, dass Ganguly und Chatterji, 2012 zeigten, dass die relative Bindungsaffinität von  $\sigma^{70}$  und  $\sigma^s$  für das RNAPK temperaturabhängig ist und sich mit steigender Temperatur zu Gunsten von  $E\sigma^s$  verschiebt. Sie fanden, dass bei 30–35 °C für die relative Bindungsaffinität  $E\sigma^{70} > E\sigma^s$  gilt, während bei 40 °C  $E\sigma^s > E\sigma^{70}$  gilt (Ganguly und Chatterji, 2012). Möglicherweise liegt das an den Sequenzunterschieden zwischen beiden Sigmafaktoren, die dazu führen, dass  $\sigma^s$  unter suboptimalen Bedingungen besser an das RNAPK binden kann als  $\sigma^{70}$  (Gruber *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 1999). Zudem ist bekannt, dass  $\sigma^{70}$  relativ thermolabil ist.



**Abb. 5.4: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der frühen Stationärphase in W3110 (bei 37 °C, vor vollständiger Stabilisierung von  $\sigma^s$ ).** Hoher  $\sigma^s$ -Gehalt, Ausdünnung der Expression von RssB, Sequestrierung von  $\sigma^{70}$  und steigende  $\sigma^s$ -Kompetitionseffizienz schaffen die Grundlage für die Stabilisierung von  $\sigma^s$  an der RNA-Polymerase (E). Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^s$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^s$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011).

### 5.3.2. Der geringe $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt und der erhöhte ATP-Gehalt verhindern in MC4100 in der Übergangsphase die Stabilisierung von $\sigma^s$

Eine ganz andere Situation zeigt sich zu Beginn der SP in MC4100 bei 37 °C. Nachdem bis zum Ende der PP der  $\sigma^s$ -Gehalt auf etwa 1750  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle angewachsen ist (Abb. 4.12), die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit auf 16 min (Abb. 4.2), der relative Rsd-Gehalt auf 25 % des Maximums gestiegen ist (Abb. 4.10) und der ATP-Gehalt auf 0,9 mM gesunken ist (Abb. 4.23), wird mit Eintritt der Zellen in die SP der Kurs zur Stabilisierung von  $\sigma^s$  nicht fortgesetzt, sondern es kommt unerwartet zur Destabilisierung von  $\sigma^s$  in einer ÜP, bei der innerhalb kurzer Zeit die  $\sigma^s$ -Halbwertszeit um das 2–3-fache sinkt (Abb. 4.2). Solch zweiphasige Stabilisierung erinnert an diauxisches Wachstum, bei dem  $\sigma^s$  ebenfalls zweiphasig stabilisiert wird (Fischer *et al.*, 1998). Trotzdem erstaunt die Destabilisierung von  $\sigma^s$  zu Beginn der SP, weil die Stabilisierung von  $\sigma^s$  am RNAPK zu Beginn der SP zur Auslösung der generellen Stressantwort benötigt wird.

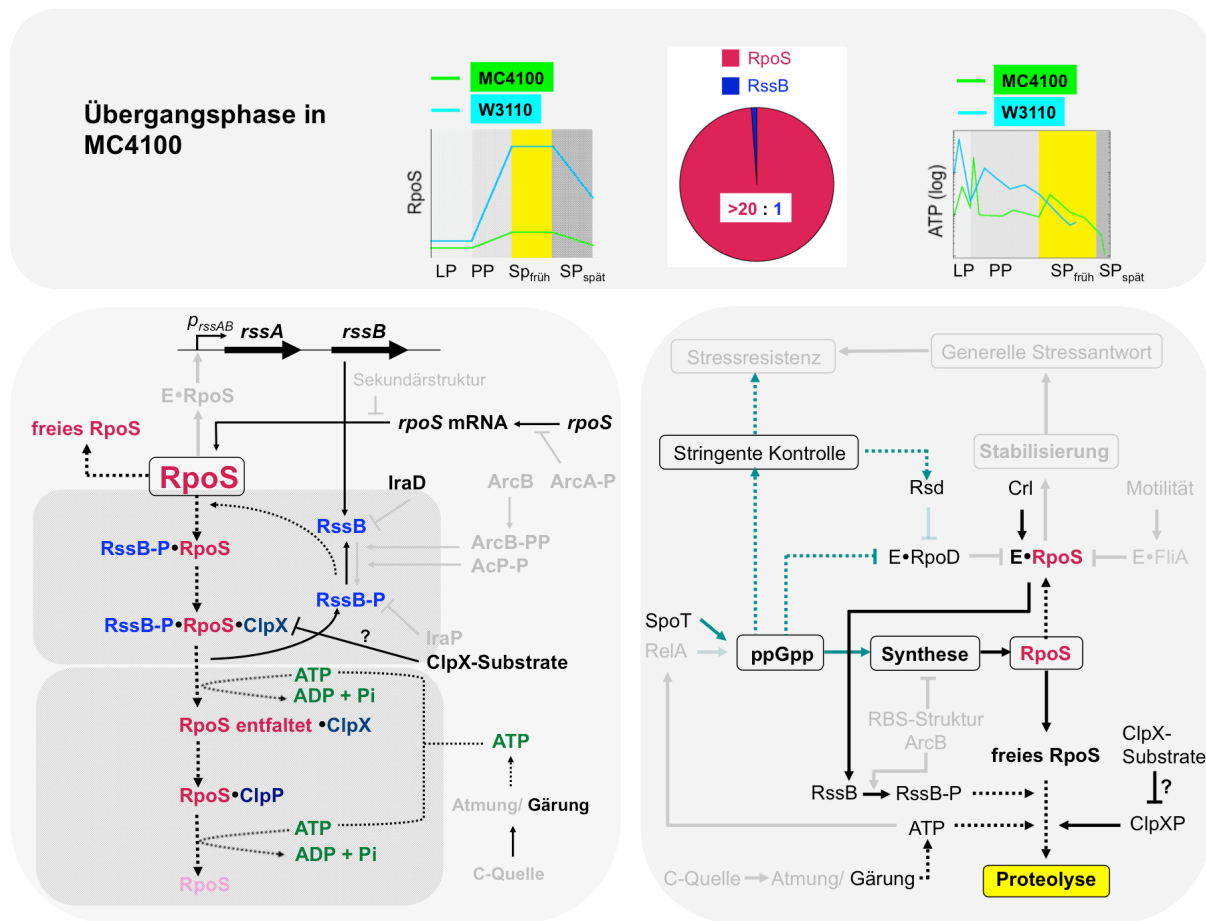
In MC4100 sind im Vergleich zu W3110 bei 37 °C der  $\sigma^s$ -Gehalt (Abb. 4.3), der Rsd-Gehalt (Abb. 4.10) und der (p)ppGpp-Gehalt (Bergman *et al.*, 2014) niedriger. Daher haben die wenigen  $\sigma^s$ -Moleküle wahrscheinlich nur eine geringe Chance, an das RNAPK zu binden. Weil  $\sigma^{70}$  von allen Sigmafaktoren in höchster Konzentration vorliegt (Jishage *et al.*, 1996) und außerdem die größte Affinität an das RNAPK hat (Colland *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993), ist wahrscheinlich, dass  $\sigma^s$  in der Konkurrenz mit  $\sigma^{70}$  um das RNAPK unterliegt. Das  $\sigma^s$ -Bindungsgleichgewicht dürfte daher in MC4100 auf Seiten von RssB-P liegen, während es in W3110 zunehmend auf Seiten des RNAPK liegt.

Ein hoher Rsd-Gehalt allein, gepaart mit hohem  $\sigma^s$ -Gehalt, ist jedoch nicht ausreichend, um  $\sigma^s$  an der RNAP zu stabilisieren, da  $\sigma^s$  in W3110 bei 28 °C ebenfalls zweiphasig stabilisiert wird und hier der relative Rsd-Gehalt zu Beginn der ÜP bereits über 90 % beträgt und auch der  $\sigma^s$ -Gehalt sehr hoch ist (Anja Richter, unpubliziert). Allerdings wird die ÜP hier schon in der PP ausgelöst, in der FliZ  $E\sigma^s$  inhibiert, indem es im Promotorbereich von  $\sigma^s$ -abhängigen Genen bindet und  $E\sigma^s$  inhibiert, während es gleichzeitig die Expression  $\sigma^F$ -abhängiger Gene aktiviert (Pesavento und Hengge, 2012; Pesavento *et al.*, 2008). Das macht wahrscheinlich, dass bei 28 °C die Sequestrierung von  $\sigma^{70}$  via Rsd in der späten PP  $\sigma^F$  in der Konkurrenz mit  $\sigma^s$  um Bindung an das RNAPK einen Vorteil verschafft

und legt nahe, dass erst das Zusammenspiel von Sequestrierung von  $\sigma^{70}$ , gezielter Stärkung der  $\sigma^s$ -Kompetitionseffizienz um das RNAPK und Inhibierung des Anti- $\sigma^s$ -Faktors FlhZ die Stabilisierung von  $\sigma^s$  an das RNAPK in diesem Stamm ermöglichen. Darüber hinaus zeigt es, dass die ÜP nicht genetisch bedingt ist.

Zu Beginn der ÜP steigt der ATP-Gehalt in MC4100 bei 37 °C von 0,9 auf 3,0 mM ATP (Abb. 4.23), das entspricht einem Anstieg von ca. 500.000 auf ca. 1,1 Millionen ATP-Moleküle/ Zelle. (Abb. 4.13). Dadurch steht plötzlich wieder mehr Energie für die ATP-intensive Proteolyse von  $\sigma^s$  zur Verfügung (Abb 4.26 und 4.27C). Solch kurzfristiger Anstieg des ATP-Gehalts in der frühen SP wurde bereits von Buckstein *et al.*, 2008 beschrieben. Dieser Anstieg könnte durch die *relA1*- und *flhD5301*-Mutation in MC4100 verursacht sein (Durfee *et al.*, 2008; Komeda und Iino, 1979; Metzger *et al.*, 1989). RelA synthetisiert in W3110 unter ATP-Verbrauch (p)ppGpp. Da (p)ppGpp mit Beginn der SP akkumuliert, steigt der ATP-Bedarf in W3110. FlhD bildet zusammen mit FlhC den Masterregulator der Flagellensynthese FlhDC und die Rotation der Flagellen ist ATP intensiv. Da der MC4100 weniger (p)ppGpp synthetisiert und nicht motil ist, spart er also ATP ein, zusätzlich wirkt zu Beginn der SP die geringere Lebendzellzahl in MC4100 stabilisierend auf den ATP-Gehalt (Abb. 4.24B). Beides könnte den kurzen Anstieg des ATP-Gehalts erklären. Der höhere ATP-Gehalt (Abb. 4.24C) schafft, in Kombination mit dem niedrigeren  $\sigma^s$ -Gehalt im Vergleich zum W3110 (Abb. 4.13), in MC4100 die energetische Grundlage für die ÜP, da so genügend ATP vorhanden ist, um die im Vergleich zum W3110 wenigen vorhandenen  $\sigma^s$ -Moleküle zu degradieren.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass in MC4100 zu Beginn der SP Rsd  $\sigma^{70}$  nicht sequestrieren kann und daher  $\sigma^s$  in der Sigmafaktorkompetition um Bindung an das RNAPK unterliegt, sodass  $\sigma^s$  weiter als Proteolysesubstrat zur Verfügung steht. Zusammen mit dem Anstieg des ATP-Gehalts bei gleichzeitig niedrigem  $\sigma^s$ -Gehalt wird die ClpXP-abhängige Degradierung von  $\sigma^s$  wieder mit größerer Effizienz möglich. Die vorübergehende Destabilisierung von  $\sigma^s$  in der ÜP hat weitreichende Folgen für den MC4100, da die generelle Stressantwort in diesem Stamm dadurch verspätet ausgelöst wird. Das zeigt sich im deutlich schlechteren Langzeitüberleben (Abb. 4.27).



**Abb. 5.5: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der frühen Stationärphase in MC4100 bei 37 °C (vor vollständiger Stabilisierung von  $\sigma^s$ ).** Geringer  $\sigma^s$ - und Rsd-Gehalt im Vergleich zu W3110 schwächen in MC4100 die  $\sigma^s$ -Kompetitionseffizienz und verhindern die Stabilisierung an der RNA-Polymerase (E). Ein kurzfristiger Anstieg des ATP-Gehalts führt stattdessen vorübergehend zur Destabilisierung von  $\sigma^s$ . Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^s$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^s$ :RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^s$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. E: RNA-Polymerase. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

#### 5.4. Hoher $\sigma^s$ -Gehalt, Austitrierung von RssB und Limitierung von ATP führen in der Stationärphase zur vollständigen Stabilisierung von $\sigma^s$

Im Verlauf der SP wird  $\sigma^s$  vollständig stabilisiert ( $\sigma^s$ -Halbwertszeit > 60 min), sodass  $\sigma^s$  die Kontrolle über die Genexpression übernehmen kann (Abb. 4.1, 4.2, 4.5 und 4.7). An der Schwelle zur vollständigen Stabilisierung von  $\sigma^s$  liegt der ATP-Gehalt in W3110 bei 37 °C bei ca. 0,5 mM ATP (Abb. 4.22), dies entspricht etwa 330.000 ATP-Moleküle/ Zelle, und der  $\sigma^s$ -Gehalt beträgt etwa 10.000  $\sigma^s$ -Moleküle/ Zelle (Abb. 4.11). Da mehrere hundert ATP-Moleküle für die Degradierung eines  $\sigma^s$ -Moleküles benötigt werden, ist der ATP-Gehalt

viel zu niedrig, um den übergroßen  $\sigma^S$ -Pool in nennenswerter Weise zu degradieren. Der ATP-Gehalt sinkt in der SP, weil durch den massiven Nährstoffmangel weniger Elektronen für den Protonengradienten gewonnen werden und folglich weniger ATP durch die ATP-Synthase generiert werden kann. ATP-Limitation kann die  $\sigma^S$ -Proteolyserate an mehreren Stellen begrenzen: Zum Einen könnte  $\sigma^S$  nicht mehr an ClpX gebunden werden (Martin *et al.*, 2008a), sodass die RssB-P- $\sigma^S$ -Komplexe akkumulieren. Weiterhin kann der Transport durch ClpX (Martin *et al.*, 2008) oder die Substratentfaltung (Singh *et al.*, 2000; Thibault *et al.*, 2006) inhibiert sein, sodass die Rückfaltungsreaktion von  $\sigma^S$  dann schneller ist als die Entfaltungsreaktion. Dies hätte zur Folge, dass  $\sigma^S$  die ClpX-Pore verstopft. Auch die Translokation durch ClpP<sub>14</sub> und die ATP-abhängige Hydrolyse der Peptidbindungen (Arribas und Castano, 1993; Gottesman *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997; Wojtkowiak *et al.*, 1993) können durch ATP-Mangel inhibiert sein. Der geringe ATP-Gehalt in der SP ist konform mit Peterson *et al.*, 2012, die zeigten, dass *in vitro* mindestens 0,1 mM ATP für die Proteolyse benötigt werden, allerdings betrug hier das Verhältnis von  $\sigma^S$  : RssB-P 50 : 1 und entspricht damit nicht dem realen Verhältnis in der SP (Becker *et al.*, 2000).

Ähnlich verhält es sich in MC4100. Hier beträgt der  $\sigma^S$ -Gehalt etwa 1700  $\sigma^S$ -Moleküle/ Zelle (Abb. 4.12) und der ATP-Gehalt liegt bei ca. 0,3 mM ATP (Abb. 4.23), dies entspricht etwa 120.000 ATP-Molekülen/ Zelle. Auch hier ist der ATP-Gehalt zu niedrig, um größere Mengen  $\sigma^S$  zu degradieren. Der hohe  $\sigma^S$ -Gehalt führt also bei geringem ATP-Gehalt zur Stabilisierung von  $\sigma^S$ . Das ist konform mit Peterson *et al.*, 2012, die indirekt zeigten, dass ATP die  $\sigma^S$ -Proteolyserate limitiert, ebenso mit Kwon *et al.*, 2010, die zeigten, dass der ATP-Gehalt bei Phosphatmangel sinkt.

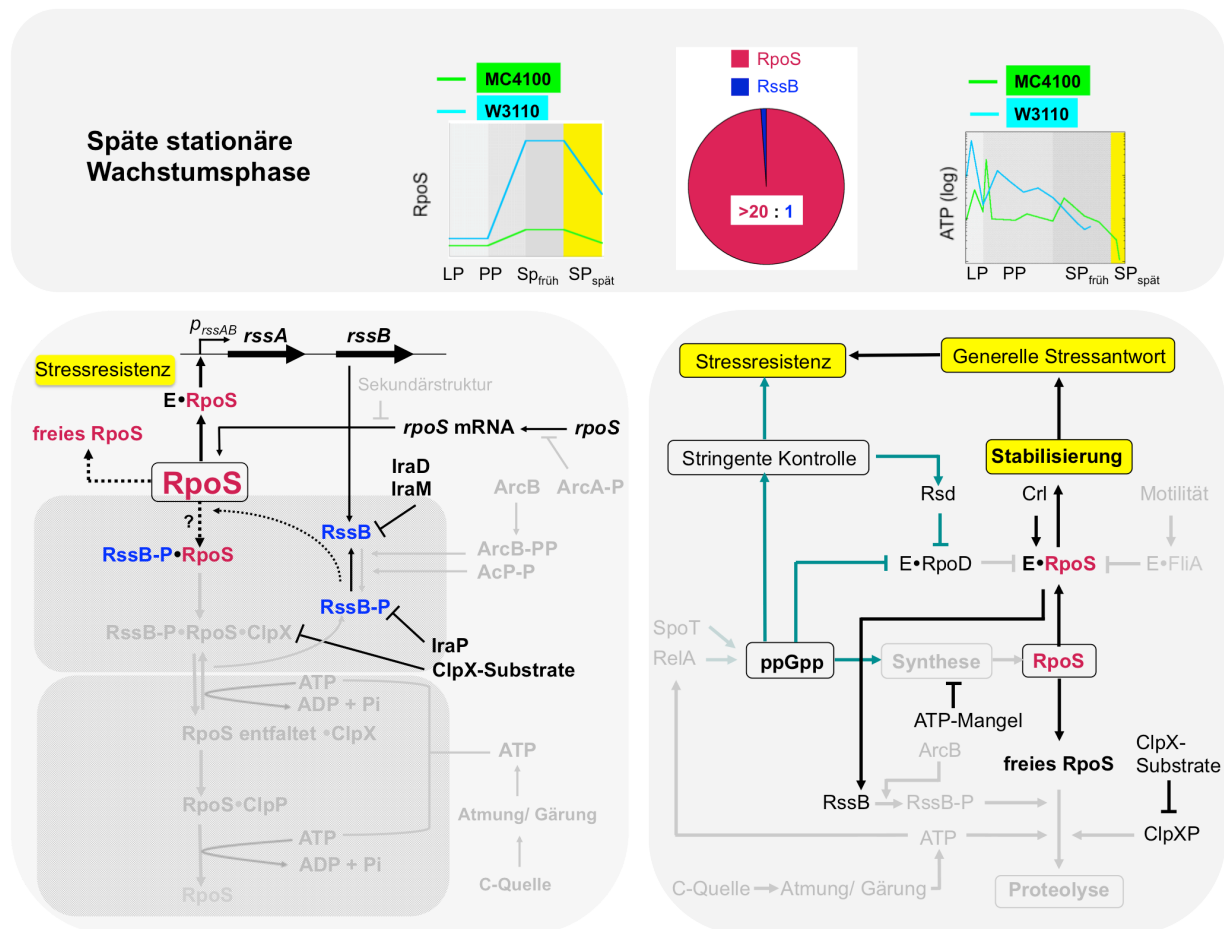
Gleichzeitig wird durch den sehr hohen  $\sigma^S$ -Gehalt die Expression von RssB austitriert. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis von  $\sigma^S$  : RssB-P so stark, dass vergleichsweise wenige RssB-Moleküle zur Degradierung des mehrere tausende Moleküle umfassenden  $\sigma^S$ -Pools zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, dass die RssB-Phosphordonoren AcP und ArcB stehen (Bouché *et al.*, 1998; Mika und Hengge, 2005; Yamamoto, 2005) nicht mehr zur Verfügung stehen, sodass neu synthetisiertes RssB nicht mehr phosphoryliert werden kann. Der Hunger in der SP bremst also die  $\sigma^S$ -Proteolyserate nicht nur durch ATP-Mangel aus, sondern auch entscheidend durch Inaktivierung des RssB-Phosphordonors ArcB (durch Inaktivierung durch oxidierte Chinone). Da das noch vorhandene RssB-P *in vitro* nicht beliebig oft im proteolytischen Zyklus recycelt werden kann (Kanow-Scheel, 2008), ist anzunehmen, dass sich diese RssB-P-Moleküle nach einigen  $\sigma^S$ -Markierungszyklen erschöpfen und dann die



Proteolyse zum Erliegen kommt. In *in vitro*-Degradierungsassays mit mehrfacher Initiierung der  $\sigma^S$ -Proteolyse (durch mehrmalige Zugabe von  $\sigma^S$  bei einmaliger Zugabe von RssB-P zum Start des Experiments) bleibt  $\sigma^S$  nach einigen Zyklen stabil und weder die Zugabe von ClpX, ClpP, ATP noch AcP konnte die  $\sigma^S$ -Proteolyse wieder initiieren (Daten nicht gezeigt). Nach der Stabilisierung von  $\sigma^S$  konnte der RssB-P- $\sigma^S$ -Komplex nachgewiesen werden (Kanow-Scheel, 2008). Das weist auf eine strukturelle Veränderung von RssB-P oder  $\sigma^S$  hin, sodass der Komplex aggregiert und die Abgabe von  $\sigma^S$  verhindert wird. Micevski *et al.*, 2015 publizierten kürzlich ein Modell, in dem ebenfalls strukturelle Unterschiede von aktivem und inaktivem RssB angenommen werden (dimerähnlicher inaktiver Zustand von RssB und monomerähnlicher aktiver Zustand von RssB), allerdings gehen sie davon aus, dass die RssB-Struktur bereits vor Bindung an  $\sigma^S$  die Bindungsaffinität beeinflusst. Denkbar ist außerdem, dass RssB-P zwar  $\sigma^S$  binden kann aber nicht mehr richtig entfaltet oder dass die Rückfaltung schneller ist als die Entfaltung, sodass  $\sigma^S$  nicht mehr an ClpX abgegeben werden kann.

Weiterhin ist in der SP eine Konkurrenzsituation von verschiedenen Proteolyse substraten um ClpXP denkbar. Der  $\sigma^S$ -RssB-P-Komplex konkurriert mit anderen Substraten um Bindung an ClpXP. Viele putative Clp-Substrate sind stationärphaseninduziert (Flynn *et al.*, 2003) und ClpXP dient außerdem als Chaperon bei Hitzeschock und degradiert missgefaltete oder oxidierte Proteine, die in der SP vermehrt anfallen (Fredriksson *et al.*, 2007). Diese Substrate könnten daher in der SP ClpXP blockieren.

Zusammengefasst drosseln also in der SP der geringe Gehalt an RssB-P und ATP die Proteolyse so stark, dass diese zum Erliegen kommt (Abb. 5.6). Dieses Erliegen ist kein absoluter Zustand, denn in Übernachtskulturen sinkt der  $\sigma^S$ -Gehalt (Abb. 4.13), was zeigt, dass  $\sigma^S$  noch in sehr geringem Maße abgebaut werden kann. Das weist auf einen unbekannten Phosphordonor hin, der auch schon von Mika und Hengge, 2005 vermutet wurde. Daneben bindet auch RssB mit geringer Affinität  $\sigma^S$ , (Peterson *et al.*, 2004), sodass auch dies die basale Proteolyseaktivität erklären könnte. Interessanter Weise wird in beiden Stämmen trotz sehr unterschiedlichem  $\sigma^S$ -Gehalt etwa 1/5 des  $\sigma^S$ -Pools über Nacht abgebaut (Kap. 4.4.1.), was darauf hinweist, dass die regulatorischen Prinzipien, die zur Stabilisierung von  $\sigma^S$  führen, in beiden Stämmen dieselben sind.



**Abb. 5.6: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS ( $\sigma^s$ ) in der späten Stationärphase** in den *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100 bei 37 °C, (nach vollständiger Stabilisierung von  $\sigma^s$ ). Hoher  $\sigma^s$ -Gehalt und Titrierung von RssB-P führen zusammen mit ATP-Limitierung zum Zusammenbruch der Proteolyse. Akkumulation von Crl-, Rsd- und ppGpp erleichtert bei hohem  $\sigma^s$ -Gehalt die Stabilisierung von  $\sigma^s$  an der RNA-Polymrase (E). Für weitere Informationen siehe Text. **(Oben)**  $\sigma^s$ -Gehalt, geschätztes Verhältnis von  $\sigma^s$  : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ClpXP-abhängige Proteolyse von  $\sigma^s$ . **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von  $\sigma^s$  als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. E: RNA-Polymerase. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

Der hohe  $\sigma^s$ -Gehalt in der SP führt, zusammen mit (p)ppGpp, Rsd und Crl, die die Bindung von  $\sigma^s$  an das RNAPK fördern, zur Umstrukturierung der Genexpression. Durch die Austitrierung von RssB-P kompetiert dieses nicht länger mit dem RNAPK um  $\sigma^s$ , sodass das Wettbewerbsgleichgewicht nun auf Seiten des RNAPK liegt (Abb. 5.6). Da durch den hohen Rsd-Gehalt (Abb. 4.10) und (p)ppGpp-Gehalt  $\sigma^{70}$  sequestriert wird (Jishage und Ishihama, 1998; Jishage *et al.*, 2002; Mitchell *et al.*, 2007; Patikoglou *et al.*, 2007), zusätzlich der sehr hohe (p)ppGpp-Gehalt die Bindung alternativer Sigmafaktoren an das RNAPK erleichtert (Magnusson *et al.*, 2005; Potrykus und Cashel, 2008; Sharma und Chatterji, 2010) und

außerdem Crl akkumuliert (Abb. 4.10) und als Transkriptionsfaktor an  $\sigma^S$  an E137 in Domäne 2 (Banta *et al.*, 2013) bindet und dessen Konformation so verändert, dass  $\sigma^S$  leichter an das RNAPK binden kann (Banta *et al.* 2013 und 2014; Bougdour *et al.*, 2004; Cavaliere *et al.* 2014; England *et al.*, 2008; Pratt und Silhavy, 1998; Typas *et al.*, 2007a), kann  $\sigma^S$  nun an der RNAP stabilisiert werden. Dies verändert die Promotorselektivität der RNAP und führt zur Erkennung von Promotoren  $\sigma^S$ -abhängiger Gene und damit zur Expression des großen  $\sigma^S$ -Regulons. Infolgedessen wird die generelle Stressantwort ausgelöst und so die Grundlage für das Überleben in der SP geschaffen. Da der  $\sigma^S$ -Gehalt in W3110 bei 37 °C deutlich höher ist als in MC4100 (Abb. 4.13), ist die Stressantwort in diesem Stamm stärker ausgeprägt als in MC4100, was sich im besseren Langzeitüberleben im Vergleich zum MC4100 zeigt (Abb. 4.27).

## 5.5. In der Absterbephase ist die $\sigma^S$ -Proteolyse energetisch nicht möglich

Wenn die lebensfeindlichen Bedingungen in der SP länger anhalten, beginnen die Zellen zu verhungern und gehen in die AbP. Der Eintritt in die AbP kann sehr lange dauern, es wurde mehrfach gezeigt, dass *E. coli*-Zellen lange ohne Nährstoffe überleben können (Finkel, 2006; Finkel und Kolter, 1999; Zambrano *et al.*, 1993; Zinser und Kolter, 2004).

In der AbP sterben die Zellen nicht kontinuierlich ab, sondern wachsen kryptisch, da durch lysierende Zellen Nährstoffe freigesetzt werden, die den noch lebenden Zellen als Nahrungsquelle dienen. Das führt zum zyklischen An- und Abstieg der LZ und sorgt dafür, dass die Zellen lange überleben können (Finkel, 2006; Kolter *et al.*, 1993; Navarro Llorens *et al.*, 2010; Zambrano und Kolter, 1996). Einige Zellen können dadurch länger als andere Zellen desselben Stammes überleben, weil sich in der AbP die Mutationsrate drastisch erhöht, sodass Subpopulationen entstehen (Finkel, 2006; Finkel und Kolter, 1999; Gay, 1935; Kram und Finkel, 2014; Zinser und Kolter, 2000 und 2004; Zambrano *et al.*, 1993; Zinser *et al.*, 2003). Andere Zellen können dies, weil sie bereits vorher das Wachstum einstellen, in einen Ruhezustand übergehen und zu Persisterzellen werden. Solche Persisterzellen wurden zuerst in *Staphylococcus aureus* beobachtet (Bigger, 1944) und seitdem in vielen Organismen gefunden, z. B. in *Pseudomonas aeruginosa* (Forte Giacobone und Oppezzo, 2014; Möker *et al.*, 2010), *Acinetobacter Baumannii* (Barth *et al.*, 2013) und in *Mycobacterium spp.* (Grant *et al.*, 2012). In diesen Pathogenen sind Persisterzellen ein Grund, weshalb durch Antibiotika nicht alle Erreger in der AbP sterben, sondern einige lange überleben können.

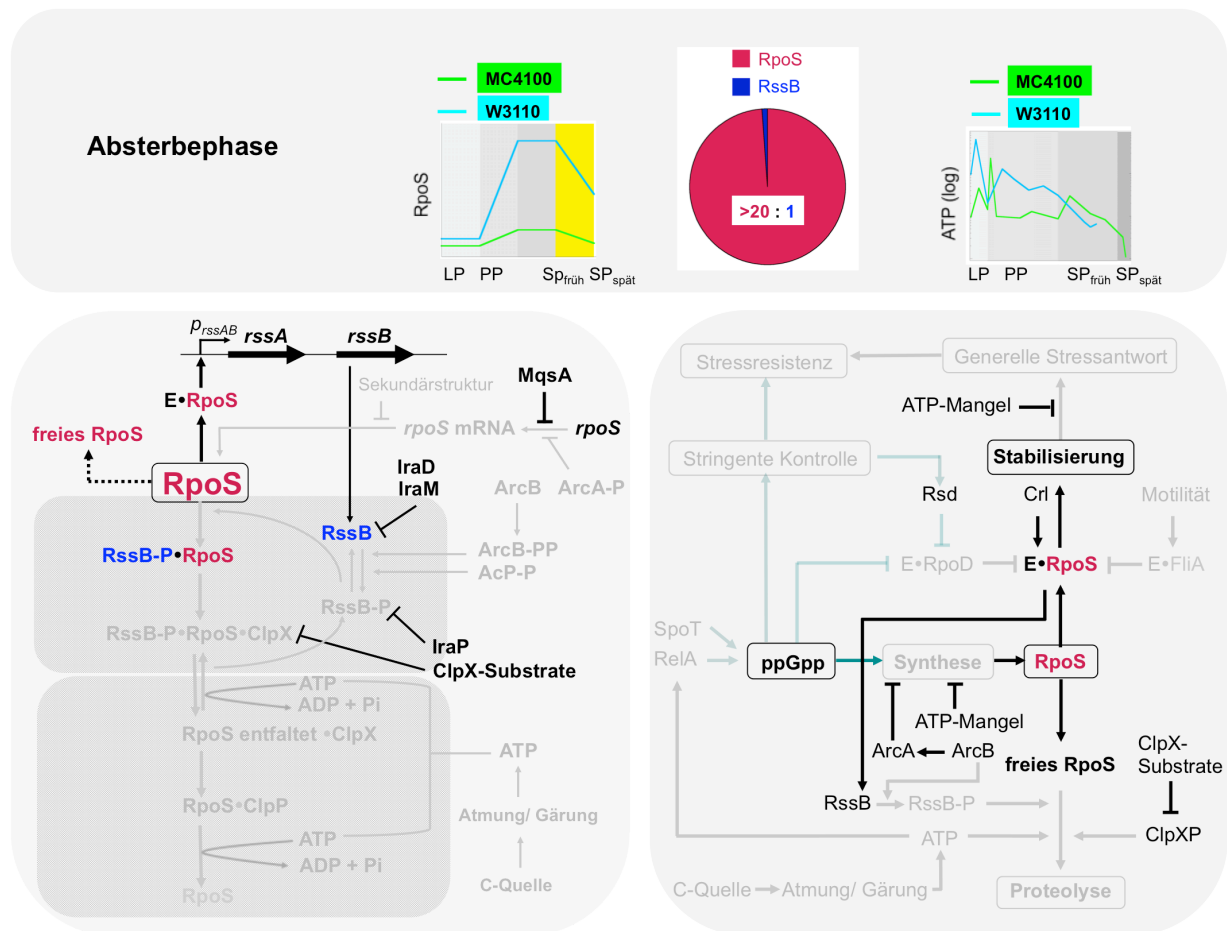
In der AbP bricht der Protonengradient zusammen, weil keine Elektronen aus Kohlenstoffquellen generiert werden können. Daher ist keine weitere Erzeugung von ATP möglich. In Übernachtskulturen beträgt der ATP-Gehalt in MC4100 ca. 0,007 mM ATP, das sind ca. 2500 ATP-Moleküle/Zelle, die sich ohne erneute Generierung von ATP schnell verbrauchen dürften. Ohne ATP sind zelluläre Prozesse wie Transport, Biosynthese von Makromolekülen, Proteolyse u. s. w. nicht mehr möglich, sodass die Zellen nur passiv verharren können, unfähig, etwas zu verändern (Abb. 5.7).

Die *rpoS*-Transkription wird jetzt durch MqsA inhibiert, das als Teil eines Toxin-Antitoxin-Systems die Zelllyse auslöst (Landini *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011).

In Übernachtskulturen bei 37 °C befinden sich MC4100-Zellen bereits in der AbP, während W3110-Zellen noch in der SP sind und langsam weiterwachsen (Abb. 4.3 und 4.23A). Folglich sind W3110-Zellen in Langzeitkulturen auch deutlich überlebensfähiger als MC4100-Zellen (Abb. 4.27 und 4.28). Der frühere Eintritt des MC4100 in die AbP ist das Ergebnis des ressourcenintensiven Lebensstils. MC4100-Zellen haben, typisch für *relA1*-Mutanten, eine erhöhte Wachstumsrate (Bergman *et al.*, 2014) und betreiben in der SP, insbesondere in der ÜP, noch lange Biosynthese von Makromolekülen und Zellwachstum (Abb. 4.3 und 4.21A), wodurch sie zu spät vom Wachstums- in den Überlebensmodus wechseln, was zu Lasten der ATP-Ressourcen geht. Das zeigt sich bei 37 °C im geringeren ATP-Gehalt und führt zum schlechteren Langzeitüberleben im Vergleich zum W3110 (Abb. 4.24A und 4.27). Der niedrigere  $\sigma^s$ -Gehalt in MC4100 im Vergleich zum W3110 sowie der geringere Rsd- und (p)ppGpp-Gehalt in der späten PP und frühen SP schwächen in MC4100 die Konkurrenz von  $\sigma^s$  um das RNAPK in diesem Zeitraum derart, dass die Zellen erst sehr spät  $\sigma^s$  stabilisieren und via  $E\sigma^s$  die generelle Stressantwort auslösen und folglich zu spät an die SP adaptieren (Abb. 4.10 und 4.13).

Die W3110-Zellen verhalten sich hingegen im Verlauf des Wachstumszyklus ressourcenschonender, wachsen weniger stark hoch, wechseln früher in den Überlebensmodus und verbrauchen so weniger ATP für Replikation und Biosynthese. Das erklärt den höheren  $\sigma^s$ -Gehalt in diesem Stamm (Abb. 4.13) und macht nachvollziehbar, weshalb die approximierte maximale  $\sigma^s$ -Biosynthese- und Proteolyseleistung in diesem Stamm 6–8-mal höher ist als in MC4100 (Tab. 4.2, Abb. 4.18 und 4.20). Das bessere Energiemanagement im Verlauf des Wachstumszyklus dürfte, zusammen mit der früheren Stabilisierung von  $\sigma^s$ , entscheidend dazu beitragen, dass die Adaption an die SP und damit die Stressresistenz und

das Langzeitüberleben in W3110 besser ausgebildet sind als in MC4100 und dass dieser Stamm später in die AbP eintritt (Abb. 4.27).



**Abb. 5.7: Molekulare Mechanismen der Proteolyse und Stabilisierung von RpoS (σ<sup>s</sup>) in der Absterbephase** in den beiden *E. coli* K12-Stämmen W3110 und MC4100. Anhaltender Energie- und Kohlenstoffmangel führt zum Zusammenbruch von Proteolyse und Biosynthese. Weitere Informationen siehe Text. **(Oben)** σ<sup>s</sup>-Gehalt, geschätztes Verhältnis von σ<sup>s</sup> : RssB-P und ATP-Gehalt im Verlauf des Wachstumszyklus von W3110 und MC4100. **(Unten links)** RssB/ ClpXP-abhängige Proteolyse von σ<sup>s</sup>. **(Unten rechts)** Proteolyse und Stabilisierung von σ<sup>s</sup> als Ergebnis einer komplexen Regulation durch Konkurrenz, Sequestrierung und Titrierung. E: RNA-Polymerase. Die Abbildung ist eine Weiterentwicklung der Abbildung aus Hengge, 2011.

## 5.6. Abschlussbetrachtung: Einordnung des Themas in den größeren Zusammenhang

Proteolyse als regulatorisches Mittel ist ubiquitär verbreitet und hat zwei Gründe: Proteinqualitätskontrolle oder Regulation spezifischer Proteine. In Eukaryonten dominiert die Ubiquitin-abhängige Degradierung von Proteinen im 26S-Proteasom (Haglund und

Dikic, 2005; Hershko und Chiechanover, 1998). In Pflanzen z. B. spielt das Ubiquitin-Proteasom-System eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, beim Wachstum und bei der Adaption an abiotischen Stress (Kurepa *et al.*, 2008; Lyzenga und Stone, 2012; Smalle *et al.*, 2003; Stone, 2014; Stone und Callis, 2007; Vierstra, 2009; Yee und Goring, 2009). Pflanzen benutzen, anders als Bakterien, Hormone bei der Integration von Signalen und zur Auslösung von Stressantworten. Das Stresshormon Abscisinsäure wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert, indem Ubiquitin an Abscisinsäure bindet und es so für den Abbau markiert (Stone, 2014). In ungestressten Zellen ist die Abscisinsäure-Konzentration gering, da Enzyme, die für die Abscisinsäure-Biosynthese essentiell sind, durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden (Raab *et al.*, 2009; Salt *et al.*, 2011). In gestressten Zellen wird die Proteolyse inhibiert. Dadurch wird die Biosynthese aktiviert, die Hormonkonzentration steigt und die Stressantwort wird ausgelöst (Finkelstein, 2013).

In Prokaryonten ist die regulierte Proteolyse in Stressantworten, Pathogenese, Wachstums- und Differenzierungsprozesse und vieles weitere mehr involviert (Gottesman, 2003; Gur *et al.*, 2011; Jenal und Hengge-Aronis, 2003; Kirstein *et al.*, 2009; Konovalova *et al.*, 2014). Dazu enthalten Proteine entweder ein Degradierungssignal oder werden von Adaptorproteinen für den Abbau markiert (Battesti und Gottesman, 2013; Jenal und Hengge-Aronis, 2003; Kirstein *et al.*, 2009). Generelle Adaptorproteine wie ClpS, das Proteine durch N-terminales Anhängen spezifischer AS markiert (sogenannte N-end rule) (Dogan *et al.*, 2002), und SspB, das Proteine durch C-terminales Anhängen kurzer Sequenzen markiert (Keiler, 2008), markieren defekte Proteine, während spezifische Erkennungsproteine wie RssB nur wenige ausgewählte Proteine markieren. RssB ist ein hochspezifisches Erkennungsprotein für  $\sigma^S$  (Zhou *et al.*, 2001; Muffler *et al.*, 1996), das auch als Anti- $\sigma^S$ -Faktor wirkt (Becker *et al.*, 2000; Zhou und Gottesman, 1998) und durch Titrierung, Phosphordonoren und die Anti-RssB-Faktoren IraD, IraM und IraP (Bougdoor *et al.*, 2004, 2006 und 2008), die als Anti-Anti- $\sigma^S$ -Faktoren wirken, reguliert wird. Die Regulation des zellulären  $\sigma^S$ -Gehalts durch Proteolyse mit Hilfe eines Anti-Sigmafaktors, der selbst durch Phosphorylierung und Anti-Anti-Sigmafaktoren reguliert wird, gibt es nicht nur in *E. coli*. In *Salmonella* z. B. wird  $\sigma^S$  ebenso wie in *E. coli* nach Bindung an das durch Phosphorylierung aktivierte Protein MviA, ein RssB-Homolog, durch ClpXP degradiert (Bearson *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 1999). Die Anti-Anti-Sigmafaktoren sind nicht sehr hoch konserviert. IraD z. B. gibt es nur in *E. coli*, *Shigella* und *Salmonella*,

nicht aber in *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2013; Merrikh *et al.*, 2009 und 2009a). Das lässt darauf schließen, dass die Stabilisierung von  $\sigma^s$  in *E. coli*, *Salmonella* und *Shigella* bei Stress stringenter reguliert wird als in anderen Proteobakterien (Baharoglu *et al.*, 2013).

$\sigma^s$  ist in  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien hochkonserviert und die Hauptstrukturelemente des Proteolysesystems sind in den  $\gamma$ -Proteobakterien konserviert. Daher verwenden viele  $\gamma$ -Proteobakterien dasselbe oder ein ähnliches Proteolysesystem für die Regulation des zellulären  $\sigma^s$ -Gehalts. Die Funktion von  $\sigma^s$  und das kontrollierte  $\sigma^s$ -Regulon unterscheiden sich aber grundlegend in den verschiedenen Organismen (Santos-Zavaleta *et al.*, 2011). In vielen pathogenen Stämmen ist  $\sigma^s$  eng mit der Regulation der Virulenz verknüpft (Kazmierczak *et al.*, 2005), wobei auch hier die Funktion von  $\sigma^s$  divers ist. In dem uropathogenen *E. coli*-Stamm CFT073 akkumuliert  $\sigma^s$  in der LP bei oxidativem Stress, der während einer Phagozytoseinfektion entsteht, wodurch die infizierten Zellen resistent werden und schwieriger vom Immunsystem bekämpft werden können (Hryckowian und Welch, 2013; Hryckowian *et al.*, 2014). In *Pseudomonas aeruginosa* ist  $\sigma^s$  u. a. in die Sekretion von extrazellulären Virulenzfaktoren und Toxinen involviert (Hogardt *et al.*, 2004; Sonnleitner *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 1999). In *Salmonella* induziert  $\sigma^s$  die Virulenz, indem es die Adaption an den niedrigen pH-Wert des Magens (Bearson *et al.*, 1998) und die säureinduzierte Kreuzresistenz gegen kurze Fettsäureketten im Dünndarm auslöst (Coynault *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1992; Rychlik und Barrow, 2005). In *V. cholerae* dagegen reprimiert  $\sigma^s$  die Virulenzgene (Merrell *et al.*, 2000) und kontrolliert stattdessen die „Mucosal Escape Response“ (Nielsen *et al.*, 2006), die durch Aktivierung der Chemotaxis- und Motilitätsgenexpression (Butler und Camilli, 2005; Ringgaard *et al.*, 2015) zur kontrollierten Ablösung der bis dahin sessilen Erreger aus dem Dünndarmepithel führt. Dazu inhibiert  $\sigma^s$  die Biofilmbildung und die Virulenzgenexpression (Miller *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2002), während es in *Salmonella* die Biofilmbildung auf dem Lymphgewebe ermöglicht (Nickerson und Curtiss, 1997).

Die verschiedenen, z. T. antagonistischen Funktionen von  $\sigma^s$  bedingen eine unterschiedliche zeitliche Akkumulation von  $\sigma^s$ . Anders als in den in dieser Arbeit untersuchten apathogenen *E. coli*-K12-Stämmen ist die Akkumulation von  $\sigma^s$  in pathogenen Stämmen davon abhängig, ob sich die Zellen im Wirt oder in der Umwelt befinden.  $\sigma^s$  akkumuliert im Wirt häufig schon in wachsenden Zellen, während es außerhalb des Wirts eine generelle Stressantwort auslöst. In *Salmonella* z. B. ist  $\sigma^s$  außerhalb des Wirts in der SP in die Stressantwort bei Kälte und Nährstoffmangel involviert (O’Neal *et al.*, 1994), im Wirt

dagegen akkumuliert  $\sigma^s$  bereits in wachsenden Zellen, damit die Stressantwort gegen den Säurestress im Magen nach der oralen Aufnahme des Erregers möglich ist. Die Akkumulation von  $\sigma^s$  wird dabei, ebenso wie in *E. coli*, durch Erhöhung der Translationseffizienz mittels kleiner RNAs erreicht (Audia und Foster, 2003). Auch in dem uropathogenen *E. coli*-Stamm CFT073 akkumuliert  $\sigma^s$  bereits in wachsenden Zellen, was die Virulenz dieses Stammes erhöht (Hryckowian und Welch, 2013; Hryckowian *et al.*, 2014). In *V. cholerae* hingegen akkumuliert  $\sigma^s$  erst in der SP und löst die „Mucosal Response“ aus (Nielsen *et al.*, 2006), ebenso wie in *Pseudomonas aeruginosa* (Bertani *et al.*, 2003; Potvin *et al.*, 2008; Schuster *et al.*, 2004; Whiteley *et al.*, 2000), wo  $\sigma^s$  eine generelle Stressantwort generiert (Cochran *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 1999).

Zusammengefasst ist  $\sigma^s$  ein bedeutendes Beispiel für einen hochkonservierten globalen Regulator, dessen Regulation durch Proteolyse mittels homologer Proteolyse-Strukturelemente konserviert ist, dessen Funktion jedoch hoch divers ist. Das weist darauf hin, dass erstens die Proteolyse von  $\sigma^s$  durch das RssB/ClpXP-System erst in den  $\gamma$ -Proteobakterien entstanden ist, dass zweitens sich die Funktion von  $\sigma^s$  vermutlich nach Aufpaltung innerhalb der Proteobakterien mehrfach verändert haben könnte und dass drittens Bakterien in der Lage sind, die Promotorerkennung durch alternative Sigmafaktoren wie  $\sigma^s$  im Verlauf der Evolution zu verändern, sodass sich schrittweise das kontrollierte Regulon und damit der funktionale Zusammenhang von  $\sigma^s$  verändern, sodass eine Anpassung an verschiedene Nischen möglich wird.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abele, A. (2005). Stress-regulierte Proteolyse der  $\sigma^S$ - und  $\sigma^{70}$ -Untereinheiten der RNA-Polymerase in *Escherichia coli*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Åberg, A., Shingler, V., and Balsalobre, C. (2006). (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol. Microbiol.*, 60(6), 1520–1533.
- Åberg, A., Shingler, V., and Balsalobre, C. (2008). Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Mol. Microbiol.*, 67(6), 1223–1241.
- Ades, S. E. (2008). Regulation by destruction: design of the  $\sigma^E$  envelope stress response. *Curr. Op. Microbiol.*, 11, 535–540.
- Adler, J. and Templeton, B. (1967). The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiology*, 46, 175–184.
- Agladze, K., Wang, X., and Romeo, T. (2005). Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J. Bacteriol.*, 187, 8237–8246.
- Altuvia, S., Almiron, M., Huisman, G., Kolter, R., and Storz, G. (1994). The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and  $\sigma^S$  in stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 13, 265–272.
- Amsler, C. D., Cho, M., and Matsumura, P. (1993). Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J. Bacteriol.*, 175, 6238–6244.
- Anagnostopoulos, C. und Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 81(5), 741–746.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., and Harwood, V. J. (2005). Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3041–3048.
- Arluisson, V., Hohng, S., Roy, R., Pellegrini, O., Régnier, P., and Ha, T. (2007). Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA. *Nucl. Acids Res.*, 35(3), 999–1006.
- Arnqvist, A., Olsén, A., Pfeifer, J., Russell, D. G., and Normark, S. (1992). The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol. Microbiol.*, 6(17), 2443–2452.
- Arribas, J. and Castano, J. G. (1993). A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268(28); 21165–21171.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassylyev, D. G. (2004). Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*, 117(3), 299–310.
- Aubin-Tam, M. E., Olivares, A. O., Sauer, R. T., Baker, T. A., and Lang, M. J. (2011). Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. *Cell*, 145(2); 257–267.
- Audia, J. P. and Foster, J.W. (2003). Acid shock accumulation of sigma S in *Salmonella enterica* involves increased translation, not regulated degradation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5, 17–28.

- Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.*, 36(4), 525–557.
- Bachmann, B. J. (1996). Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460–2488. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Backfisch, T., Pruteanu, M., Hengge, R., and Gilles, E. D. (2005). Mathematic modeling of RpoS regulation in *E. coli*. *Foundations of Systems Biology and Engineering*, 239–242.
- Bagnara, A. S. and Finch, L. R. (1973). Relationships between intracellular contents of nucleotides and 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 36(2), 422–427.
- Baharoglu, Z., Krin, E., and Mazel, D. (2013). RpoS Plays a Central Role in the SOS Induction by Sub-Lethal Aminoglycoside Concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.*, 9(4), e1003421.
- Bak, G., Han, K., Kim, D., and Lee, Y (2014). Roles of rpoS-activating small RNAs in pathways leading to acid resistance of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 3, 15–28.
- Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2012). ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823(1), 15–28.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol.*, 39(4), 1069–1079.
- Balsalobre C. (2011). Concentration matters!! ppGpp, from a whispering to a strident alarmone. *Mol. Microbiol.*, 79(4), 827–829.
- Banta, A. B., Chumanov, R. S., Yuan, A. H., Lin, H., Campbell, E. A., Burgess, R. R., and Gourse, R. L. (2013). Key features of  $\sigma$ S required for specific recognition by Crl, a transcription factor promoting assembly of RNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(40), 15955–15960.
- Banta A. B., Cuff, M. E., Lin, H., Myers, A. R., Ross, W., Joachimiak, A., and Gourse, R. L. (2014). Structure of the RNA polymerase assembly factor Crl and identification of its interaction surface with sigma S. *J. Bacteriol.*, 196(18), 3279–3288.
- Barembuch, C. and Hengge R. (2007). Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FlhA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol. Microbiol.*, 65(1), 76–89.
- Barker, M. M; Gaal, T., Josaitis, C. A., and Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.*, 305(4), 673–688.
- Barkow, S. R., Levchenko, I., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2009). Polypeptide translocation by the AAA+ ClpXP protease machine. *Chem. Biol.*, 16, 605–612.
- Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J., and Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the ‘extended -10’ motif at promoters. *EMBO J.*, 16, 4034–4040.
- Barth, M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1995). Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177(12), 3455–3464.

- Barth, V. C., Rodrigues, B. Á., Bonatto, G. D., Gallo, S. W., Pagnussatti, V. E., Ferreira, C. A. S., and de Oliveira, S. D. (2013). Heterogeneous Persister Cells Formation in *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE, 8(12), e84361.
- Basineni S. R., Madhugiri, R., Kolmsee, T., Hengge, R., and Klug, G. (2009). The influence of Hfq and ribonucleases on the stability of the small non-coding RNA OxyS and its target rpoS in *E. coli* is growth phase dependent. RNA Biol., 6(5), 584–594.
- Battesti, A. and Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. Mol. Microbiol., 62, 1048–1063.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol., 65, 189–213.
- Battesti, A., Tsegaye, Y. M., Packer, D. G., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2012). H-NS Regulation of IraD and IraM Antiadaptors for Control of RpoS Degradation. J. Bacteriol., 194(10), 2470–2478.
- Battesti, A., Hoskins, J. R., Tong, S., Milanesio, P., Mann, J. M., Kravats, A., Tsegaye, Y. M., Bougdour, A., Wickner, S., and Gottesman, S. (2013). Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein. Genes Dev., 27(24), 2722–2735.
- Battesti, A. and Gottesman, S. (2013). Current opinion in Microbiology Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. Curr. Op. Microbiol., 16(2), 140–147.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2015). Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112(16), 5159–5164.
- Battista, J. R. (1997). Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annu. Rev. Microbiol., 51, 203–224.
- Bearson, S. M., Benjamin, W. H., Swords, W. E., and Foster, J. W. (1996). Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., 178(9), 2572–2579.
- Bearson, B. L., Wilson, L. and Foster, J. W. (1998). A low pH- inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. J. Bacteriol. 180, 2409–2417.
- Becker, G., Klauck, E., and Hengge-Aronis, R. (1999). Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 6439–6444.
- Becker, G., Klauck, E., and Hengge-Aronis, R. (2000). The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti-sigmaS factor. Mol. Microbiol., 35(3), 657–666.
- Becker, G. and Hengge-Aronis, R. (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter sigma(S) dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of sigma(S). Mol. Microbiol., 39(5), 1153–1165.
- Beloin, C., Roux, A., and Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 322, 249–289.
- Bergman, J. M., Hammarlöf, D. L., and Hughes, D. (2014). Reducing ppGpp Level Rescues an Extreme Growth Defect Caused by Mutant EF-Tu. PLoS ONE, 9(2), e90486.

- Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., and Venturi, V. (2003). Role of GacA, LasI, RhlI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. Arch. Microbiol., 180, 264–271.
- Bewley, M. C., Graziano, V., Griffin, K., and Flanagan, J. M. (2006). The asymmetry in the mature amino-terminus of ClpP facilitates a local symmetry match in ClpAP and ClpXP complexes. J. Struct. Biol., 153, 113–128.
- Bewley, M. C., Graziano, V., Griffin, K., and Flanagan, J. M. (2009). Turned on for degradation: ATPase-independent degradation by ClpP. J. Struct. Biol., 165(2), 118–125.
- Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. The Lancet, 244, 497–500.
- Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F., and Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. Science, 300, 1404–1409.
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, Collado-Vides, M., J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 277, 1453–1474.
- Blech, Jörg (2004). Leben auf dem Menschen: Die Geschichte unserer Besiedler. 4. Auflage, Rowohlt Taschenbuch Verlag, Reinbek bei Hamburg.
- Blomfield, I. C. (2001). The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. Adv. Microb. Physiol., 45, 1–49.
- Bohn, C., Binet, E., and Bouloc, P. (2002). Screening for stabilization of proteins with a translation signature in *Escherichia coli* selects for inactivation of the ClpXP protease. Mol. Genet. Genomics, 266(5), 827–831.
- Bordes, P., Repoila, F., Kolb, A., and Gutierrez, C. (2000). Involvement of differential efficiency of transcription by  $E\sigma^s$  and  $E\sigma^{70}$  RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli* osmE promoter. Mol. Microbiol., 35, 845–853.
- Bordes, P., Conter, A., Morales, V., Bouvier, J., Kolb, A., and Gutierrez, C. (2003). DNA supercoiling contributes to disconnect sigmaS accumulation from sigmaS-dependent transcription in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 48(2), 561–571.
- Bouché, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K., and Hengge-Aronis, R. (1998). Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. Mol. Microbiol., 27(4), 787–795.
- Bougdour, A., Lelong, C., and Geiselmann, J. (2004). Crl, a low temperature-induced protein in *Escherichia coli* that binds directly to the stationary phase sigma subunit of RNA polymerase. J. Biol. Chem., 279(19), 19540–19550.
- Bougdour, A., Wickner, S., and Gottesman, S. (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of  $\sigma^s$  stability in *Escherichia coli*. Genes Dev., 20(7), 884–897.
- Bougdour, A., Cunnig, C., Baptiste, P. J., Elliott, T., and Gottesman, S. (2008). Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. Mol. Microbiol., 68(2), 298–313.
- Brescia, C. C., Kaw, M. K., and Sledjeski, D. D. (2004). The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo., J. Mol. Biol., 339(3), 505–514.

- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A. J., and Landini, P. (2003). The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 149, 2847–2857.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. und Landini, P. (2006). Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion. *J. Bacteriol.*, 188(6), 2027–2037.
- Brown, L. and Elliott T. (1996). Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the hfq gene. *J. Bacteriol.*, 178, 3763–3770.
- Brown, L. and Elliott, T. (1997). Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 179, 656–662.
- Buckstein, M. H., He, J., and Rubin, H. (2008). Characterization of Nucleotide Pools as a Function of Physiological State in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 190(2), 718–726.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., and Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221, 43–46.
- Burton, R. E., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2003). Energy-dependent degradation: Linkage between ClpX-catalyzed nucleotide hydrolysis and protein-substrate processing. *Protein Sci.*, 12(5), 893–902.
- Butler, S. M. and Camilli, A. (2005). Going against the grain: Chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 611–620.
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L., and Darst, S. A. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell*, 9(3), 527–539.
- 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.
- Casadaban, M. J. and Cohen, S. N., (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4530–4533.
- Cashel, M. and Gallant, J. (1969). Two Compounds implicated in the Function of the RC Gene of *Escherichia coli*. *Nature*, 221, 838–841.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J., and Vinella, D. (1996). The stringent response. In: Neidhardt, F. C., Curtiss, R. III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C, Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press; Washington, D.C., pp. 1458–1496.
- Cavaliere, P., Levi-Acobas, F., Mayer, C., Saul, F. A., England, P., Weber, P., Raynal, B., Monteil, V., Bellalou, J., Haouz, A., and Norel, F. (2014). Structural and functional features of Crl proteins and identification of conserved surface residues required for interaction with the RpoS/ $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase. *Biochem J.*, 463(2), 215–224.
- Chatterji, D., Fujita, N., and Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, 3(5), 279–287.
- Checroun, C., Bordes, P., Leroy, O., Kolb, A. und Gutierrez, C. (2004). Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of  $\sigma^S$ , the stress-specific  $\sigma$  factor of *Escherichia coli*, and the  $-10$  and  $-35$  promoter elements. *Nucl. Acids Res.*, 32(1), 45–53.

- Chevance, F. F. and Hughes, K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(6), 455–465.
- Chilcott, G. S. and Hughes, K. T. (2000). Coupling of Flagellar Gene Expression to Flagellar Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4), 694–708.
- CGSC Yale: Coli Genetic Stock Center in Yale <http://cgsc2.biology.yale.edu/index.php>
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2172–2175.
- Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., and Ehrmann, M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 152–162.
- Cochran, W. L., Suh, S. J., McFeters, G. A., and Stewart, P. S. (2000). Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 546–553.
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R., and Kolb, A. (2000). Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and lrp transcription factors. *EMBO J.*, 19(12), 3028–3037.
- Colland, F., Fujita, N., Ishihama, A., and Kolb, A. (2002). The interaction between sigmaS, the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, 7(3), 233–247.
- Costanzo, A. and Ades, S. E. (2006). Growth Phase-Dependent Regulation of the Extracytoplasmic Stress Factor,  $\sigma E$ , by Guanosine 3',5'-Bispyrophosphate (ppGpp). *J. Bacteriol.*, 188(13), 4627–4634.
- Costanzo, A., Nicoloff, H., Barchinger, S. E., Banta, A. B., Gourse, R. L., and Ades, S. E. (2008). ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor sigmaE in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. *Mol. Microbiol.*, 67(3), 619–632.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 711–745.
- Coynault, C., Robbe-Saule, V. and Norel, F. (1996) Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS ( $r^S$ ) regulon. *Mol. Microbiol.*, 22, 149–160.
- Cunning, C., Brown, L., and Elliott, T. (1998). Promoter Substitution and Deletion Analysis of Upstream Region Required for rpoS Translational Regulation. *J. Bacteriol.*, 180(17), 4564–4570.
- Danese P. N., Pratt L. A., Dove S. L., and Kolter R. (2000). The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.*, 37, 424–432.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6640–6645.
- Davies, C. M., Long, J. A., Donald, M., and Ashbolt, N. J. (1995). Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1888–1896.
- DeHaseth, P. L., Zupancic, M. L., and Record, M. T. Jr. (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, 180(12), 3019–3025.

- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M., and Palmer, C. J. (2002). Influence of Soil on Fecal Indicator Organisms in a Tidally Influenced Subtropical Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3), 1165–1172.
- Desriac, N., Broussolle, V., Postollec, F., Mathot, A.-G., Sohier, D., Coroller, L., and Leguerinel, I. (2013). *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. *Frontiers in Microbiol.*, 4(284), 1–13.
- Devi, P. G., Campbell, E. A., Darst, S. A., and Nickels, B. E. (2010). Utilization of variably spaced promoter-like elements by the bacterial RNA polymerase holoenzyme during early elongation. *Mol. Microbiol.*, 75, 607–622.
- Ding, Q., Kusano, S., Villarejo, M., and Ishihama, A. (1995). Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strength: differential recognition of osmoregulated promoters by E sigma D and E sigma S holoenzymes. *Mol. Microbiol.*, 16(4), 649–656.
- Donaldson, L. W., Wojtyra, U., and Houry, W. A. (2003). Solution structure of the dimeric zinc binding domain of the chaperone ClpX. *J. Biol. Chem.*, 278(49), 48991–48996.
- Dorman, Charles J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Rev. Microbiol.*, 2, 391–400.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., and Bukau, B. (2002). ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell*, 9, 673–683.
- Dove, S. L., Smith, S. G., and Dorman, C. J. (1997). Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Mol. Gen Genet.*, 254(1), 13–20.
- Dove, S. L. and Hochschild, A. (2001). Bacterial two-hybrid analysis of interactions between region 4 of the sigma(70) subunit of RNA polymerase and the transcriptional regulators Rsd from *Escherichia coli* and AlgQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 183(21), 6413–6421.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G. M., and Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.*, 190(7), 2597–2606.
- Edlin, G. and Broda, P. (1968). Physiology and genetics of the “ribonucleic acid control” locus in *escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, 32(3), 206–226.
- England, P., Westblade, L. F., Karimova, G., Robbe-Saule, V., Norel, F., and Kolb, A. (2008). Binding of the Unorthodox Transcription Activator, Crl, to the Components of the Transcription Machinery. *J. Biol. Chem.*, 283(48), 33455–33464.
- Engman, J., Rogstam, A., Frees, D., Ingmer, H., and von Wachenfeldt, C. (2012). The YjbH adaptor protein enhances proteolysis of the transcriptional regulator Spx in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 194, 1186–1194.
- Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W., and Gourse, R.L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9761–9766.
- Estrem, S.T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z.W., Niu, W., Ebright, R.H., and Gourse, R.L. (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev.*, 13, 2134–2147.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. und Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.*, 10, 2606–2617.

- Fang, F.C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J. and Guiney, D. G. (1992). The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates *Salmonella* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11978–11982.
- Fang, F. C. and Rimsky, S. (2008). New Insights into Transcriptional Regulation by H-NS. Curr. Op. Microbiol., 11(2), 113–120.
- Farrell, C. M., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2007). Altered specificity of a AAA+ protease. Mol. Cell., 25(1), 161–166.
- Feklistov, A. (2013). RNA polymerase: in search of promoters. Annals of the New York Academy of Sciences, 1293, 10.1111/nyas.12197.
- Ferenci, T. (2001). Hungry bacteria-definition and properties of a nutritional state. Environ. Microbiol., 3(10), 605–611.
- Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., Reeves, P. R. und Wang, L. (2009). Genomic Sequencing Reveals Regulatory Mutations and Recombinational Events in the Widely Used MC4100 Lineage of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., 191(12), 4025–4029.
- Ferreira, A., Gray, M., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2004). Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. Curr. Microbiol. 48, 39–46.
- Ferrières, L. and Clarke, D. J. (2003). The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. Mol. Microbiol., 50, 1665–1682.
- Finkel, S. E. and Kolter, R. (1999). Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(7), 4023–4027.
- Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. Nat. Rev. Microbiol, 4, 113–120.
- Finkelstein, R. (2013). Absciscic acid synthesis and response. Arabidopsis Book, 11, e0166.
- Fischer, D., Teich, A., Neubauer, P. und Hengge-Aronis, R. (1998). The General Stress Sigma Factor  $\sigma^s$  of *Escherichia coli* Is Induced during Diauxic Shift from Glucose to Lactose. J. Bacteriol., 180(23), 6203–6206.
- Flanagan, J. M., Wall, J. S., Capel, M. S., Schneider, D. K., and Shanklin, J. (1995). Scanning transmission electron microscopy and small-angle scattering provide evidence that native *Escherichia coli* ClpP is a tetradecamer with an axial pore. Biochemistry, 34(34), 10910–10907.
- Flynn, J. M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S. H., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2001). Overlapping recognition determinants within the ssrA degradation tag allow modulation of proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(19), 10584–10589.
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol. Cell., 11(3), 671–683.
- Forte Giacobone, A. F. and Opezzo, O. J. (2014). Survival of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to sunlight resembles the phenom of persistence. J. Photochem. Photobiol. B., 142, 232–236.
- Fredriksson, Å., Ballesteros, M., Peterson, C. N., Persson, Ö., Silhavy, T. J., and Nyström, T. (2007). Decline in ribosomal fidelity contributes to the accumulation and stabilization of the master stress response regulator  $\sigma$ S upon carbon starvation. Genes Dev., 21(7), 862–874.



- Fuchs, G. (Hrsg.) (2014). Allgemeine Mikrobiologie. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S. T., Nguyen, L. H., Burgess, R. R., and Gourse, R. L. (2001). Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol. Microbiol.*, 42(4), 939–954.
- Gallant, J. A. (1979). Stringent control in *E. coli*. *Annu Rev Genet.*, 13, 393–415.
- Gally, D. L., Leathart, J., and Blomfield, I.C (1996). Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.*, 21(4), 725–738.
- Ganguly, A. and Chatterji, D. (2012). A Comparative Kinetic and Thermodynamic Perspective of the  $\sigma$ -Competition Model in *Escherichia coli*. *Biophysical J.*, 103(6), 1325–1333.
- Gay, F. P. (1935). Bacteria growth and reproduction. In: Gay, F. P., Bachman, G. W., Benham, R. H., Buchbinder, L., (eds.). Agents of disease and host resistance. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1–38.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., and Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.*, 175(24), 7982–7989.
- Georgellis D., Kwon, O., De Wulf, P., and Lin, E.C. (1998). Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* 273, 32864–32869.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E. C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*, 292(5525), 2314–2306.
- Germer, J., Becker, G., Metzner, M., and Hengge-Aronis, R (2001). Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma(s)-dependent promoter in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 41(3), 705–716.
- Gilbert, W. (1976). Starting and stopping sequencing for the RNA polymerase. In Losick, R. and Chamberlin, M. (eds). *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 193–206.
- Givskov, M., Eberl, L., Møller, S., Poulsen, L. K., and Molin, S. (1994). Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content. *J. Bacteriol.*, 176(1), 7–14.
- Glynn, S. E., Martin, A., Nager, A. R., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2009). Crystal structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell*, 139(4), 744–756.
- Glynn, S. E., Nager, A. R., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2012). Dynamic and static components power unfolding in topologically closed rings of a AAA+ proteolytic machine. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 19(6), 616–622.
- Gonciarz-Swiatek, M., Wawrzynow, A., Um, S. J., Learn, B. A., McMacken, R., Kelley, W. L., Georgopoulos, C., and Sliemers, O., (1999). Recognition, targeting, and hydrolysis of the lambda O replication protein by the ClpP/ClpX protease. *J. Biol. Chem.*, 274(20), 13999–14005.
- Gopalkrishnan, S., Nicoloff, H., and Ades, S. E. (2014). Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, with other *Escherichia coli* sigma factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. *Mol. Microbiol.*, 93(3), 479–493.

- Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy-Lagard, V., and Maurizi, M. R. (1993). ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *J. Biol. Chem.* 268(30), 22618–22626.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* 12(9), 1338–1347.
- Gottesman, S. (2003). Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19, 565–587.
- Goulian, M. (2010). Two-Component Signaling Circuit Structure and Properties. *Curr. Op. Microbiol.*, 13(2), 184–189.
- Gourse, R. L., Ross, W., and Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.*, 37(4), 687–695.
- Grant, S. S., Kaufmann, B. B., Chand, N. S., Haseley, N., and Hung, D. T. (2012). Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(30), 12147–12152.
- Gray, C. H. and Tatum, E. L. (1944). X-ray induced growth factor requirements in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 30, 404–410.
- Gribun, A., Kimber, M. S., Ching, R., Sprangers, R., Fiebig, K. M., and Houry, W.A. (2005). The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J. Biol. Chem.*, 280, 16185–16196.
- Gries, T. J., Kontur, W. S., Capp, M. W., Saecker, R. M., and Record, M. T. Jr. (2010). One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10418–10423.
- Grigorova, I. L., Phleger, N. J., Mutalik, V. K., and Gross, C. A. (2006). Insights into transcriptional regulation and  $\sigma$  competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(14), 5332–5337.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C., and Maurizi, M. R. (1998). Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* 273(20), 12476–12481.
- Gross, C. A., Lonetto, M., and Losick, R. (1992). Bacterial sigma factors. In McKnight, S. L., and Yamamoto, K. R. (eds). *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 129–176.
- Gruber, T. M. and Bryant, D. A. (1997). Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.*, 179(5), 1734–1747.
- Gruber, T. M. and Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441–446.
- Gunnelius, L., Hakkila, K., Kurkela, J., Wada, H., Tyystjärvi, E., and Tyystjärvi, T. (2014). The omega subunit of the RNA polymerase core directs transcription efficiency in cyanobacteria. *Nucl. Acids Res.*, 42(7), 4606–4614.
- Gunnelius, L., Kurkela, J., Hakkila, K., Koskinen, S., Parikainen, M., and Tyystjärvi, T. (2014a). The  $\omega$  Subunit of RNA Polymerase Is Essential for Thermal Acclimation of the *Cyanobacterium Synechocystis* Sp. PCC 6803. *PLoS One*, 9(11), e112599.

- Gur, E., Biran, D., and Ron, E. Z. (2011). Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria - how and when? *Nat. Rev. Micro.*, 9, 839–848.
- Haglund, K. and Dikic, I. (2005): Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J.*, 24, 1–7.
- Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 519–529.
- Haseltine, W. A. and Block, R. (1973). Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70(5), 1564–1568.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H. und Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular Systems Biology*, 2, 0007.
- Helmann, J. D. and Chamberlin, M. J. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem.*, 57, 839–872.
- Henderson, C. A., Vincent, H. A., Casamento, A., Stone, C. M., Phillips, J. O., Cary, P. D., Sobott, F., Gowers, D. M., Taylor, J. E., and Callaghan, A. J. (2013). Hfq binding changes the structure of *Escherichia coli* small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of rpoS. *RNA*, 19(8), 1089–1104.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72(2), 165–168.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase in *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F. *et al.*, (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D. C., 1497–1512.
- Hengge-Aronis, R. (1996a). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. P. 1497-1512. In R. Curtiss III *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cell. Mol. Biol., ASM Press, Washington DC.
- Hengge-Aronis, R. (1996b). Back to log phase:  $\sigma^S$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 21(5), 887–893.
- Hengge-Aronis, R. (2000). The General Stress Response in *Escherichia coli*. In *Bacterial Stress Responses*, 1st ed. Edited by Gisela Storz and Regine Hengge-Aronis, 2011, ASM Press, Washington, DC, 161–178.
- Hengge-Aronis, R. (2002a). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma^S$ -selective? *Curr. Op. Microbiol.*, 5(6), 591–595.
- Hengge-Aronis, R. (2002b). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 4(3), 341–346.
- Hengge-Aronis, R. (2002c). Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the  $\sigma^S$  (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), 373–395.
- Hengge R. (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 631, 40–53.
- Hengge, R. (2009). Proteolysis of  $\sigma^S$  (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 160, 667–676.
- Hengge, R. and Turgay, K. (2009). Proteolysis in prokaryotes-from molecular machines to a systems perspective. *Res. Microbiol.*, 160(9), 615–617.

- Hengge, R. (2009a). Principles of cyclic-di-GMP signaling.—Nat. Rev. Microbiol., 7, 263–273.
- Hengge, R. (2010). Role of c-di-GMP in the regulatory networks of *Escherichia coli*. In A. J. Wolfe und K. L. Visick (ed.), The Second Messenger Cyclic-di-GMP. ASM Press, Washington, DC, 230–252.
- Hengge, R. (2011): The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria. In Bacterial Stress Responses, 2nd ed. Edited by Gisela Storz and Regine Hengge, 2011, ASM Press, Washington, DC.
- Hengge, R., Galperin, M. Y., Ghigo, J. M., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K. T., Jenal, U., and Landini, P. (2015). Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domain-containing c-di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., pii: JB.00424-15.
- Herman, C., Thévenet, D., Boulloc, P., Walker, G. C., and D'Ari, R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). Genes Dev., 12(9), 1348–1355.
- Hernandez, V. J. and Bremer, H. (1991). *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires spoT. J. Biol. Chem., 266(9), 5991–5999.
- Hersch, G. L., Burton, R. E., Bolon, D. N., Baker, T. A., and Sauer, R.T. (2005). Asymmetric interactions of ATP with the AAA+ ClpX6 unfoldase: allosteric control of a protein machine. Cell, 121(7), 1017–1027.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem., 67, 425–479.
- Heuveling, J., Possling, A., and Hengge, R. (2008). A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 69(2), 534–547.
- Hill, C. W. and Harnish, B. W. (1981). Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11), 7069–7072.
- Hirsch, M. and Elliott, T. (2002). Role of ppGpp in rpoS stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 184, 5077–5087.
- Hirsch, M. and Elliott, T. (2005). Stationary-phase regulation of RpoS translation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 187(21), 7204–7213.
- Hofmann, N., Wurm, R., and Wagner, R. (2011). The *E. coli* Anti-Sigma Factor Rsd: Studies on the Specificity and Regulation of Its Expression. PLoS ONE, 6(5), e19235.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L., and Heesemann, J. (2004). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* exoS is controlled by quorum sensing and RpoS. Microbiology, 150, 843–851.
- Hollands, K., Busby, S. J., and Lloyd, G. S. (2007). New targets for the cyclic AMP receptor protein in the *Escherichia coli* K-12 genome. FEMS Microbiol. Lett., 274(1), 89–94.
- Hong, S.H., Wang, X., O'Connor, H.F., Benedik, M.J., and Wood, T.K. (2012). Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. Microbiol. Biotechnol., 5, 509–522.
- Hryckowian, A. J. and Welch, R. A. (2013). RpoS Contributes to Phagocyte Oxidase-Mediated Stress Resistance during Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* CFT073. mBio, 4(1), e00023–13.
- Hryckowian, A. J., Battesti, A., Lemke, J. J., Meyer, Z. C., and Welch, R. A. (2014). IraL Is an RssB Anti-adaptor That Stabilizes RpoS during Logarithmic Phase Growth in *Escherichia coli* and *Shigella*. mBio, 5(3), e01043–14.

- Ingvarsson, H., Mate, M. J., Hogbom, M., Portnoi, D., Benaroudj, N., Alzari, P. M., Ortiz-Lombardia, M., and Unge, T. (2007). Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from the X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 63, 249–259.
- Ishihama, A. (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells*, 4(3), 135–143.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Rev. Microbiol.*, 54, 499–518.
- Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., and Aiba, H. (2012). The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *RNA*, 18(5), 1062–1074.
- Jain, V., Kumar, M., and Chatterji, D. (2006) ppGpp: stringent response and survival. *J. Microbiol.*, 44, 1–10.
- Jenal, U. and Hengge-Aronis, R. (2003). Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr. Op. Microbiol.*, 6, 163–172.
- Jenal, U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Op. Microbiol.*, 7(2), 185–191.
- Jenal, U. and Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet.*, 40, 385–407.
- Jenkins, D. E., Schultz, J. E., and Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170(9), 3910–3914.
- Jenkins, D. E., Chaisson, S. A., and Matin, A. (1990). Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 172(5), 2779–2781.
- Jensen, K. F. 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *J. Bacteriol.*, 175, 3401–3407.
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1995). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.*, 177(23), 6832–6835.
- Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1996). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.*, 178(18), 5447–5451.
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1997). Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J. Bacteriol.*, 179(3), 959–963.
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1998). A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major  $\sigma$  subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(9), 4953–4958.
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1999). Transcriptional Organization and In Vivo Role of the *Escherichia coli* *rsd* Gene, Encoding the Regulator of RNA Polymerase Sigma D. *J. Bacteriol.*, 181(12), 3768–3776.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nyström, T. (2002). Regulation of  $\sigma$  factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.*, 16(10), 1260–1270.

- Jones, J. M., Welty, D. J., and Nakai, H. (1998). Versatile action of *Escherichia coli* ClpXP as protease or molecular chaperone for bacteriophage Mu transposition. *J. Biol. Chem.*, 273(1), 459–465.
- Jorgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P., and Stewart, G. S. (1999). RpoS-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 145, 835–844.
- Joshi, S. A., Hersch, G. L., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2004). Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(5), 404–411.
- Kalir, S. and Alon, U (2004). Using a quantitative blueprint to reprogram the dynamics of the flagella gene network. *Cell*, 117(6), 713–720.
- Kang, S. G., Maurizi, M. R., Thompson, M., Mueser, T., and Ahvazi, B. (2004). Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J. Struct. Biol.*, 148, 338–352.
- Kanow-Scheel, C. (2008). Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Proteolyse der  $\sigma^s$  (RpoS)-Untereinheit der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Karatan, E. and Watnick P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73, 310–347.
- Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, 527–543.
- Keiler, K. C., Waller, P. R., and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA *Science*, 271(5251), 990–993.
- Keiler, K. C. (2008). Biology of trans-translation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 133–151.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M., and Sauer, R. T. (2003). Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell*, 114(4), 511–520.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2005). Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1390–1395.
- Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K., and Steven, A. C. (1995). Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J. Mol. Biol.*, 250(5), 587–594.
- Kim, D. Y. and Kim, K. K. (2008). The structural basis for the activation and peptide recognition of bacterial ClpP. *J. Mol. Biol.*, 379, 760–771.
- Kim, Y. I., Burton, R. E., Burton, B. M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2000). Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell*, 5(4), 639–648.
- Kim, Y. I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R. V., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2001). Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat. Struct. Biol.*, 8(3), 230–233.
- Kirstein, J., Moliere, N., Dougan, D. A., and Turgay, K. (2009). Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7, 589–599.

- Kitagawa, R., Takaya, A., and Yamamoto, T. (2011). Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 157(Pt 11), 3094–3103.
- Klauck, E. (1999). Die Funktion des Responseregulators RssB bei der regulierten Proteolyse der RpoS/ $\sigma^S$ -Untereinheit der RNA-Polymerase in *Escherichia coli*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Klauck, E., Lingnau, M., and Hengge-Aronis, R. (2001). Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 40(6), 1381–1390.
- Klauck, E., Typas, A., and Hengge, R. (2007). The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci. Prog.* 90(Pt 2-3), 103–127.
- Klein, A. H., Shulla, A., Reimann, S. A., Keating, D. H., and Wolfe, A. J. (2007). The Intracellular Concentration of Acetyl Phosphate in *Escherichia coli* Is Sufficient for Direct Phosphorylation of Two-Component Response Regulators. *J. Bacteriol.*, 189(15), 5574–5581.
- Klumpp, S. and Hwa, T. (2008). Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(51), 20245–20250.
- Knoll, A. H. (2003). *Life on a Young Planet: The First Three Billion Years of Evolution on Earth*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, U.S.A.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 749–795.
- Kolmsee, T. and Hengge R. (2011). Rare codons play a positive role in the expression of the stationary phase sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ) in *Escherichia coli*. *RNA Biol.*, 8, 913–921.
- Kolter, R., Siegele, D. A., and Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 855–874.
- Komeda, Y. and Iino, T. (1979). Regulation of expression of the flagellin gene (hag) in *Escherichia coli* K-12: analysis of hag-lac gene fusions. *J. Bacteriol.*, 139(3), 721–729.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(20), 9223–9227.
- Konovalova, A., Lotte Sogaard-Andersen, L., and Kroos, L. (2014). Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiol. Rev.*, 38(3), 493–522.
- Korea, C. G., Ghigo J. M., and Beloin C. (2011). The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *Bioessays*, 33, 300–311.
- Kram, K. E. and Finkel, S. E. (2014). Culture Volume and Vessel Affect Long-Term Survival, Mutation Frequency, and Oxidative Stress of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(5), 1732–1738.
- Krisko, A. and Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(7), pii: a012765.
- Kroos, L. and Akiyama, Y. (2013). Biochemical and structural insights into intramembrane metalloprotease mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828(12), 2873–2885.

- Kurepa, J., Toh-E, A., and Smalle, J. A. (2008). 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. *Plant J.*, 53, 102–114.
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N., and Ishihama, A. (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.*, 271(4), 1998–2004.
- Kwon, Y. K., Higgins, M. B., and Rabinowitz, J. D. (2010). Antifolate-induced depletion of intracellular glycine and purines inhibits thymineless death in *E. coli*. *ACS Chem. Biol.* 5, 787–795.
- Lacour, S. and Landini, P. (2004).  $\sigma^S$ -Dependent Gene Expression at the Onset of Stationary Phase in *Escherichia coli*: Function of  $\sigma^S$ -Dependent Genes and Identification of Their Promoter Sequences. *J. Bacteriol.*, 186(21), 7186–7195.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Laffler, T. and Gallant, J. A. (1974). Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell*, 3(1), 47–49.
- Landini, P., Egli, T., Wolf, J., and Lacour, S. (2014). sigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ. Microbiol. Rep.*, 6(1), 1–13.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 5(1), 49–59.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991a). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J. Bacteriol.*, 173(14), 4474–4481.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.*, 8(13), 1600–1612.
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1994a). The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.*, 13(4), 733–743.
- Lange, R., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1995). Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177(16), 4676–4680.
- Lease, R. A., Cusick, M. E., and Belfort, M. (1998). Riboregulation Proc in *Escherichia coli*: DsrA acts by RNA: RNA interaction at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12456–12461.
- Lease, R. A. and Belfort, M. (2000). A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(18), 9919–9924.
- Lease, R. A., Smith, D., McDonough, K., and Belfort, M. (2004). The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 186, 6179–6185.
- Lease, R. A. and Woodson, S. A. (2004). Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J. Mol. Biol.*, 344(5), 1211–1223.
- Lederberg, J. (1951). Genetic studies with bacteria. In Dunn, L. C. (ed.) *Genetics in the 20th century*. Macmillan, New York, 263–289.



- Lederberg, J. (1951a). Prevalence of *Escherichia coli* strains exhibiting genetic recombination, *Science*, 114, 68–69.
- Lee, C., Schwartz, M. P., Prakash, S., Iwakura, M., and Matouschek, A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell.*, 7(3), 627–637.
- Lee, M. E., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2010). Control of substrate gating and translocation into ClpP by channel residues and ClpX binding. *J. Mol. Biol.*, 399(5), 707–718.
- Lee, S. J. and Gralla, J. D. (2001). Sigma38 (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* 276(32), 30064–30071.
- Lies, M. and Maurizi, M. R. (2008). Turnover of Endogenous SsrA-tagged Proteins Mediated by ATP-dependent Proteases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 283(34), 22918–22929.
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J. E., Zhao, K., Jin, D. J., and Blattner, F. R. (2005). Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 280, 15921–15927.
- Liu, X. and Matsumura, P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar Class II operons. *J. Bacteriol.*, 176, 7345–7351.
- Liu, X., Fujita, N., Ishihama, A., and Matsumura, P. (1995). The C-terminal region of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for transcriptional activation of the flagellar level II operons by the FlhD/FlhC complex. *J. Bacteriol.*, 177, 51.
- Loewen, P. C. and Hengge-Aronis, R. (1994). The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 53–80.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C. A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.*, 174(12), 3843–3849.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.
- Lyzenga, W. J., and Stone, S. L. (2012). Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J. Exp. Bot.*, 63, 599–616.
- Maaloe, O. and Kjeldgaard, N. (1966). Control of Macromolecular Synthesis; a study of DNA, RNA, and protein synthesis in bacteria. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Madhugiri, R., Basineni, S. R., and Klug, G. (2010). Turn-over of the small non-coding RNA RprA in *E. coli* is influenced by osmolarity. *Mol. Genet. Genomics*, 284, 307–318.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., and Brock, T. (eds.) (2012). Brock Biology of Microorganisms. (14th Edition), Benjamin Cummings, USA.
- Maeda, H., Fujita, N., and Ishihama, A. (2000). Competition among seven *Escherichia coli*  $\sigma$  subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.*, 28(18), 3497–3503.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., and Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 13(5), 236–242.
- Maillard, R. A., Chistol, G., Sen, M., Righini, M., Tan, J., Kaiser, C. M., Hodges, C., Martin, A., and Bustamante, C. (2011). ClpX(P) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates. *Cell*, 145(3), 459–469.

- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T., and Gottesman, S. (1998). DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(21), 12462–12467.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St. John, K., and Gottesman, S. (2001) Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.*, 39(5), 1382–1394.
- Majdalani, N., Hernandez, D., and Gottesman, S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol. Microbiol.*, 46, 813–826.
- Majdalani, N., Vanderpool, C. K., and Gottesman, S. (2005). Bacterial small RNA regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40(2), 93–113.
- Majdalani, N. and Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 379–405.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(36), 13318–13323.
- Malpica, R., Sandoval, G. R., Rodríguez, C., Franco, B., and Georgellis, D. (2006). Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal.*, 5-6, 781–795.
- Mandin, P. and Gottesman, S. (2010). Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J.*, 29, 3094–3107.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. O., Hinton, J. C., and Dorman, C. J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 59(6), 1831–1847.
- Maniatis, T., Ptashne, M., Backman, K., Kleid, D., Flashman, S., Jeffrey, A., and Maurer, R. (1975). Recognition sequences of repressor and polymerase in the operators of bacteriophage lambda. *Cell*, 5, 109–113.
- Martin, A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2007). Distinct static and dynamic interactions control ATPase-peptidase communication in a AAA+ protease. *Mol. Cell*, 27(1), 41–52.
- Martin, A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2008). Diverse pore loops of the AAA+ ClpX machine mediate unassisted and adaptor-dependent recognition of ssrA-tagged substrates. *Mol. Cell*, 29(4), 441–450.
- Martin, A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2008a). Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(11), 1147–1151.
- Martin, A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2008b). Protein unfolding by a AAA+ protease: critical dependence on ATP-hydrolysis rates and energy landscapes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 139–145.
- Martinez-Garcia, E., Tormo, A., and Navarro-Llorens, J. M. (2001). Further studies on RpoS in enterobacteria: identification of rpoS in *Enterobacter cloacae* and *Kluyvera cryocrescens*. *Arch. Microbiol.*, 175, 395–404.
- Mauri, M. and Klumpp, S. (2014). A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. *PLoS Comput. Biol.*, 10(10), e1003845.
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Katayama, Y., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Bowers, B., and Gottesman, S. (1990). Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 265(21), 12536–12545.

- McCann, M. P., Kidwell, J. P., and Matin, A. (1991). The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173(13), 4188–4194.
- McCleary, W. R. and Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.*, 269(50), 31567–31572.
- McCullen, C. A., Benhammou, J. N., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects *rpoS* mRNA from degradation. *J. Bacteriol.*, 192, 5559–5571.
- Mendoza-Vargas, A., Olvera, L., Olvera, M., Grande, R., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Jimenez-Jacinto, V., Salgado, H., Juárez, K., Contreras-Moreira, B., Huerta, A. M., Collado-Vides, J., and Morett, E. (2009). Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS ONE*, 4, e7526.
- Merrell, D. S., Tischler, A. D., Lee, S. H., Camilli, A. (2000). *Vibrio cholerae* requires *rpoS* for efficient intestinal colonization. *Infect. Immun.*, 68, 6691–6696.
- Merrikkh, H., Ferrazzoli, A. E., Bougdour, A., Olivier-Mason, A., and Lovett, S. T. (2009). A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(2), 611–616.
- Merrikkh, H., Ferrazzoli, A. E., and Lovett, S. T. (2009a). Growth phase and (p)ppGpp control of IraD, a regulator of *rpoS* stability, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 191, 7436–7446.
- Metzger, S., Dror, I. B., Aizenman, E., Schreiber, G., Toone, M., Friesen, J. D., Cashel, M., and Glaser, G. (1988). The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 263(30), 15699–15704.
- Metzger, S., Schreiber, G., Aizenman, E., Cashel, M., and Glaser, G. (1989). Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA1* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264(35), 21146–21152.
- Micevski, D., Zammit, J. E., Truscott, K. N., and Dougan, D. A. (2015). Anti-adaptors use distinct modes of binding to inhibit the RssB-dependent turnover of RpoS ( $\sigma^S$ ) by ClpXP. *Front. Mol. Biosci.*, 2, 15.
- Mika, F. and Hengge, R. (2005). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA and RssB coordinates synthesis and proteolysis of  $\sigma^S$  in *E. coli*. *Genes Dev.* 19, 2770–2781.
- Mika, F. and Hengge, R. (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *J. Mol. Sciences*, 14(3), 4560–4579.
- Mika, F. and Hengge, R. (2014). Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol.*, (5), 494–507.
- Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., and Bassler, B. L. (2002). Parallel quorum-sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110, 303–314.
- Mitchell, J. E., Oshima, T., Piper, S. E., Webster, C. L., Westblade, L. F., Karimova, G., Mitchell, J. E., Ladant, D., Kolb, A., Hobman, J. L., Busby, S. J., and Lee, D. J. (2007). The *Escherichia coli* Regulator of Sigma 70 Protein, Rsd, Can Up-Regulate Some Stress-Dependent Promoters by Sequestering Sigma 70. *J. Bacteriol.*, 189(9), 3489–3495.
- Möker, N., Dean, C. R., and Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules. *J. Bacteriol.*, 192(7), 1946–1955.

- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Brennan, R. G., and Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol. Cell*, 9(1), 23–30.
- Mooney, R. A., Darst, S. A., and Landick, R. (2005). Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell*, 20, 335–345.
- Moran, U., Phillips, R., and Milo, R. (2010). SnapShot: Key Numbers in Biology. *Cell*, 141.
- Moreno, M., Audia, J.P., Bearson, S.M., Webb, C. and Foster, J.W. (2000) Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* var typhimurium: *in vivo* interactions between sigma S, the response regulator MviA(RssB) and ClpX. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 245–254.
- Moses, V. and Sharp, P. B. (1972). Intermediary metabolite levels in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 71(1), 181–90.
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1996). Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178(6), 1607–1613.
- Muffler, A., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1996a). The RNA-binding protein HF-1, known as a host factor for phage Q $\beta$  RNA replication, is essential for the translation regulation of rpoS in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 10, 1143–1151.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G., and Hengge-Aronis, R. (1996b). The response regulator RssB controls stability of the  $\sigma^s$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 15, 1333–1339
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C., and Hengge-Aronis, R. (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(2), 445–452.
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Fischer, D., Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1997a). The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179(1), 297–300.
- Mukhopadhyay, S., Audia, J. P., Roy, R. N., and Schellhorn, H. E. (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol.*, 37(2), 371–381.
- Munro, P. M., Flatau, G. N., Clément, R. L., and Gauthier, M. J. (1995). Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1853–1858.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W. M., and Arber, W. (1994). Insertion sequence- related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 136, 721–730.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W. M., and Arber, W. (1995). Dynamics of IS-related genetic rearrangements in resting *Escherichia coli* K-12. *Mol. Biol. Evol.* 12, 198–207.
- Narberhaus, F., Obrist, M., Führer, F., and Langklotz, S. (2009). Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res. Microbiol.* 2009, 160, 652–659.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., and Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34(4), 476–495.
- Neidhardt, F. C. and Fraenkel, D. G. (1961). Metabolic regulation of RNA synthesis in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26, 63–74.

- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, 9(1), 27–43.
- Nguyen, L. H., Jensen, D. B., Thompson, N. E., Gentry, D. R., and Burgess, R. R. (1993). In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli* *katF/rpoS* gene product. *Biochemistry*, 32(41), 11112–11117.
- Nickerson, C. A. and Curtiss III, R. (1997) Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.*, 65, 1814–1823.
- Nielsen, A. T., Dolganov, N. A., Otto, G., Miller, M. C., Wu, C. Y., and Schoolnik, G. K. (2006). RpoS controls the *Vibrio cholerae* Mucosal escape response. *PLoS Pathogens*, 2(10), 109.
- Nyquist, K. and Martin, A. (2014). Marching to the beat of the ring: polypeptide translocation by AAA+ proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 39(2), 53–60.
- Ojangu, E.-L., Tover, A., Teras, R., and Kivisaar, M. (2000). Effects of Combination of Different –10 Hexamers and Downstream Sequences on Stationary-Phase-Specific Sigma Factor  $\sigma^S$ -Dependent Transcription in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 182(23), 6707–6713.
- Olsen, A., Jonsson, A., and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338(6217), 652–655.
- ONeal, C.R., Gabriel, W.M., Turk, A.K., Libby, S.J., Fang, F.C., and Spector, M.P. (1994). RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon, and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 176, 4610–4616.
- Ortega, J., Lee, H. S., Maurizi, M. R., and Steven, A. C. (2002). Alternating translocation of protein substrates from both ends of ClpXP protease. *EMBO J.*, 21(18), 4938–4949.
- Österberg, S., del Peso-Santos, T., and Shingler, V. (2011) .Regulation of alternative sigma factor use. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65, 37–55.
- Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., and Aiba, H. (2011). PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(32), 13059–13064.
- Palma, M. and Cheung, A. L. (2001).  $\sigma^B$  Activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect. Immun.* 69, 7858–7865.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., and Hecker, M. (2006). The  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int. J. Med. Microbiol.*, 237–258.
- Paget, M. S. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, 5, 1245–1265.
- Paget, M. S. und Helmann, J. D. (2003). The sigma<sup>70</sup> family of sigma factors. *Genome Biol.*, 4(1), 203.
- Patikoglou, G. A., Westblade, L. F., Campbell, E. A., Lamour, V., Lane, W. J., and Darst, S. A. (2007). Crystal structure of the *Escherichia coli* regulator of sigma70, Rsd, in complex with sigma70 domain 4. *J. Mol. Biol.*, 372(3), 649–659.
- Patten, C. L., Kirchhof, M. G., Schertzberg, M. R., Morton, R. A., and Schellhorn, H. E. (2004). Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet. Genomics.*, 272(5), 580–591.

- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., and Gourse, R. L. (2004). rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 749–770.
- Peña-Sandoval, G. R., Kwon, O., and Georgellis, D. (2005). Requirement of the Receiver and Phosphotransfer Domains of ArcB for Efficient Dephosphorylation of Phosphorylated ArcA In Vivo. *J. Bacteriol.*, 187(9), 3267–3272.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A., and Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 22(17), 2434–2446.
- Pesavento, C. and Hengge, R. (2012). The global repressor FliZ antagonizes gene expression by  $\sigma^S$ -containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucl. Acids Res.*, 40(11), 4783–4793.
- Peters, J. E., Thate, T. E., and Craig, N. L. (2003). Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array. *J. Bacteriol.*, 185(6), 2017–2021.
- Peterson, C. N., Ruiz, N. und Silhavy, T. J. (2004). RpoS Proteolysis Is Regulated by a Mechanism That Does Not Require the SprE (RssB) Response Regulator Phosphorylation Site. *J. Bacteriol.*, 186(21), 7403–7410.
- Peterson, C. N., Mandel, M. J., and Silhavy, T. J. (2005). *Escherichia coli* Starvation Diets: Essential Nutrients Weigh in Distinctly. *J. Bacteriol.*, 187(22), 7549–7553.
- Peterson, C. N., Levchenko, I., Rabinowitz, J. D., Baker, T. A., and Silhavy, T. J. (2012). RpoS proteolysis is controlled directly by ATP levels in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 26(6), 548–553.
- Piper, S. E., Mitchell, J. E., Lee, D. J., and Busby, S. J. (2009). A global view of *Escherichia coli* Rsd protein and its interactions. *Mol Biosyst.*, 5(12), 1943–1947.
- Potrykus, K. and Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 35–51.
- Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., and Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ. Microbiol.*, 13(3), 563–75.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R. C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 38–55.
- Povolotsky, T. L. and Hengge, R. (2012). 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *J. Biotechnol.*, 160(1-2), 10–16.
- Pratt, L. A. and Silhavy, T. J. (1996). The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(6), 2488–2492.
- Pratt L.A. and Kolter R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.*, 30, 285–293.
- Pratt, L.A. and Silhavy, T. J. (1998). Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 29, 1225–1236.
- Pratt, L. A. and Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Op. Microbiol.*, 2, 598–603.
- Pribnow, D. (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 784–788.

- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., and Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.*, 2, 450–464.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., and Dorel, C. (2001). Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. *J. Bacteriol.*, 183(24), 7213–7223.
- Pruteanu, M. and Hengge-Aronis, R. (2002). The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for sigmaS proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in sigmaS turnover in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 45(6), 1701–1713.
- Raab, S., Drechsel, G., Zarepour, M., Hartung, W., Koshiba, T., Bittner, F., and Hoth, S. (2009). Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 59, 39–51.
- Raffaëlle, M., Kanin, E. I., Vogt, J., Burgess, R. R., and Ansari, A. Z. (2005). Holoenzyme switching and stochastic release of sigma factors from RNA polymerase in vivo. *Mol. Cell.*, 20(3), 357–366.
- Raghavan, A. and Chatterji, D. (1998). Guanosine tetraphosphate-induced dissociation of open complexes at the *Escherichia coli* ribosomal protein promoters *rplJ* and *rpsA* P1: nanosecond depolarization spectroscopic studies. *Biophys. Chem.*, 75(1), 21–32.
- Reddy, P. S., Raghavan, A., and Chatterji, D. (1995). Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.*, (2), 255–265.
- Repoila, F., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.*, 48, 855–861.
- Resch, A., Afonyushkin, T., Lombo, T. B., McDowall, K. J., Bläsi, U., and Kaberdin, V. R. (2008). Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the *rpoS* 5'-leader. *RNA*, 14, 454–459.
- Richter, D. (1976). Stringent factor from *Escherichia coli* directs ribosomal binding and release of uncharged tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(3), 707–711.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G. 3rd, Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D. und Wanner, B. L. (2006). *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot. *Nucl. Acids Res.*, 34(1), 1–9.
- Ringgaard, S., Hubbard, T., Mandlik, A., Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2015). RpoS and quorum sensing control expression and polar localization of *Vibrio cholerae* chemotaxis cluster III proteins in vitro and in vivo. *Mol. Microbiol.*, 97(4), 660–75.
- Rodriguez, H., Snow, E. T., Bhat, U., and Loechler, E. L. (1992). An *Escherichia coli* plasmid-based, mutational system in which *supF* mutants are selectable- insertion elements dominates the spontaneous spectra. *Mutat. Res.*, 270, 219–231.
- Römling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M. Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.*, 57(3), 629–639.
- Römling, U. and Amikam, D. (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Op. Microbiol.*, 9(2), 218–228.

- Römling, U., Galperin, M. Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR, 77(1), 1–52.
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science*, 262(5138), 1407–1413.
- Ross, W., Vrentas, C. E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., and Gourse, R. L. (2013). The Magic Spot: A ppGpp Binding Site on *E. coli* RNA Polymerase Responsible for Regulation of Transcription Initiation. *Mol. Cell*, 50(3), 420–429.
- Rychlik, I. and Barrow, P. A. (2005). *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 1021–1040.
- Saecker, R. M., Record Jr., M. T., and deHaseth, P. L. (2011). Mechanism of Bacterial Transcription Initiation: RNA Polymerase - Promoter Binding, Isomerization to Initiation- Competent Open Complexes, and Initiation of RNA Synthesis. *J. Mol. Biol.*, 412(5), 754–771.
- Salt, J. N., Yoshioka, K., Moeder, W., and Goring, D. R. (2011). Altered germination and subcellular localization patterns for PUB44/SAUL1 in response to stress and phytohormone treatments. *PLoS ONE*, 6, e21321.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Santos, J. M., Freire, P., Vicente, M., and Arraiano, C. M. (1999). The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol. Microbiol.*, 32(4), 789–798.
- Santos, J. M., Lobo, M., Matos, A. P., De Pedro, M. A., and Arraiano, C. M. (2002). The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 45(6), 1729–1740.
- Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., and Perez-Rueda, E. (2011). A comparative genome analysis of the RpoS sigmulon shows a high diversity of responses and origins. *Microbiology*, 157, 1393–1401.
- Sato, M., Takahashi, K., Ochiai, Y., Hosaka, T., Ochi, K., and Nabeta, K. (2009). Bacterial alarmone, guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), predominantly binds the beta' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts. *Chembiochem.*, 10(7), 1227–1233.
- Sauter, C., Basquin, J., and Suck, D. (2003). Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, 31(14), 4091–4098.
- Sauer, E. and Weichenrieder, O. (2011). Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(32), 13065–13070.
- Sauer, E. (2013). Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol.*, 10(4), 610–618.
- Schaller, H., Gray, C., and Herrmann, K. (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(2), 737–741.
- Sharp, M. M., Chan, C. L., and Gross, C. A. (1999). The interface of  $\sigma$  with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev.*, 13, 3015–3026.
- Schellhorn, H. E. (2014). Elucidating the function of the RpoS regulon. *Future Microbiol.*, 9(4), 497–507.



- Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R. G. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq–RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.*, 21(13), 3546–3556.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., and Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.*, 51, 973–985.
- Schweder, T., Lee, K. H., Lomovskaya, O., and Martin, A. (1996). Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.*, 178(2), 470–476.
- Senn, M. M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Flückiger, U., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2005). Molecular analysis and organization of the  $\sigma^B$  operon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 187, 8006–8019.
- Sen, M., Maillard, R. A., Nyquist, K., Rodriguez-Aliaga, P., Pressé, S., Martin, A., and Bustamante, C. (2013). The ClpXP protease functions as a motor with constant “rpm” but different “gears.” *Cell*, 155(3), 636–646.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., and Hengge, R. (2013). Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm. *mBio*, 4(2), e00103–13.
- Serra, D. O., Richter, and A. M., Hengge, R. (2013a). Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *J. Bacteriol.*, 195(24), 5540–5554.
- Serra, D. O. and Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ. Microbiol.*, 16(6), 1455–1471.
- Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gaasterland, T., and Riley, M. (2001). A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol.*, 2(9), research0035.1–research0035.7.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D’Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.*, 189(23), 8746–8749.
- Sharma, U. K. and Chatterji, D. (2008). Differential mechanisms of binding of anti-sigma factors *Escherichia coli* Rsd and bacteriophage T4 AsiA to *E. coli* RNA polymerase lead to diverse physiological consequences. *J. Bacteriol.*, 190(10), 3434–3443.
- Sharma, U. K. and Chatterji, D. (2010). Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34(5), 646–657.
- Shin, D. H., Lee, C. S., Chung, C. H., and Suh, S. W. (1996). Molecular symmetry of the ClpP component of the ATP-dependent Clp protease, an *Escherichia coli* homolog of 20 S proteasome. *J. Mol. Biol.*, 262(2), 71–76.
- Shin, Y., Davis, J. H., Brau, R. R., Martin, A., Kenniston, J. A., Baker, T. A., Sauer, R. T., and Lang, M. J. (2009). Single-molecule denaturation and degradation of proteins by the AAA+ ClpXP protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 19340–19345.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. und Enquist, L. W. (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Singh, S. K., Grimaud, R., Hoskins, J. R., Wickner, S., and Maurizi, M. R. (2000). Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(16), 8898–8903.

- Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R., and Grainger, D. C. (2011). *Escherichia coli*  $\sigma$ 70 senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucl. Acids Res.*, 39(12), 5109–5118.
- Sledjeski, D. D. and Gottesman, S. (1995). A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(6), 2003–2007.
- Sledjeski, D. D., Gupta, A., and Gottesman, S. (1996). The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 15, 3993–4000.
- Sledjeski, D. D., Whitman, C., and Zhang, A. (2001). Hfq Is Necessary for Regulation by the Untranslated RNA DsrA. *J. Bacteriol.*, 183(6), 1997–2005.
- Slonczewski, J. L., Foster, J. W. (2009). *Microbiology – An Evolving Science*. W. W. Norton & Company, New York.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T. J., Babiychuk, E., Kushnir, S., and Vierstra, R. D. (2003). The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15, 965–980.
- Smith, R. and Maaloe, C. (1964). Effect of growth rate on the acid-soluble nucleotide composition of *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 86, 229–234.
- Smith, T. G. and Hoover, T. R. (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv. Appl. Microbiol.*, 67, 257–295.
- Sobrero, P. and Valverde, C. (2012). The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit. Rev. Microbiol.*, 38(4), 276–299.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., and Hengge, R. (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(Pt 4), 1318–1331.
- Sondermann, H., Shikuma, N. J., and Yildiz, F. H. (2012). Truncated form of the title: Mechanism of c-di-GMP signaling. *Curr. Op. Microbiol.*, 15(2), 140–146.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K. E., and Blasi, U. (2003). Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb. Pathog.*, 35, 217–228.
- Soper, T. J. and Woodson, S. A. (2008). The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA*, 14(9), 1907–1917.
- Soper, T. J., Mandin, P., Majdalani, N., Gottesman, S., and Woodson, S. A. (2010). Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 9602–9607.
- Soper, T. J., Doxzen, K., and Woodson, S. A. (2011). Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq. *RNA*, 17, 1544–1550.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999). Multiple Control of Flagellum Biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS Protein and the Cyclic AMP-Catabolite Activator Protein Complex in Transcription of the *flhDC* Master Operon. *J. Bacteriol.*, 181(24), 7500–7508.
- Spira, B., Hu, X., and Ferenci, T. (2008). Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 154(Pt 9), 2887–2895.

- Sprangers, R., Gribun, A., Hwang, P. M., Houry, W. A., and Kay, L. E. (2005). Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(46), 16678–16683.
- Srivatsan, A. and Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Op. Microbiol.*, 11(2), 100–105.
- Stent, G. S. and Brenner, S. (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47, 2005–2014.
- Stephani, K., Weichart, D., and Hengge, R. (2003). Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 49(6), 1605–1614.
- Stinson, B. M., Nager, A. R., Glynn, S. E., Schmitz, K. R., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2013). Nucleotide binding and conformational switching in the hexameric ring of a AAA+ machine. *Cell*, 153(3), 628–639.
- Stinson, B. M., Baytshtok, V., Schmitz, K. R., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2015). Subunit asymmetry and roles of conformational switching in the hexameric AAA+ ring of ClpX. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 22, 411–416.
- Stone, S. L. and Callis, J. (2007). Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr. Op. Plant Biol.* 10, 624–632.
- Stone, S. L. (2014). The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science*, 5(135), 1–10.
- Stüdemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D., and Hengge, R. (2003). Sequential recognition of two distinct elements in  $\sigma^S$  (RpoS) by the proteolytic targeting factor RssB and the ClpX chaperone. *EMBO J.*, 22, 4111–4120.
- Subbarayan, P. R. and Sarkar, M. (2004). A comparative study of variation in codon 33 of the rpoS gene in *Escherichia coli* K12 stocks: implications for the synthesis of sigma(s). *Mol. Genet. Genomics*, 270(6), 533–538.
- Subbarayan, P. R. and Sarkar, M. (2004a). A stop codon-dependent internal secondary translation initiation region in *Escherichia coli* rpoS. *RNA*, 10(9), 1359–1365.
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E., and Ohman, D. E. (1999). Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 181, 3890–3897.
- Szyk, A. and Maurizi, M. R. (2006). Crystal structure at 1.9Å of *E. coli* ClpP with a peptide covalently bound at the active site. *J. Struct. Biol.*, 156, 165–174.
- Takayanagi, Y., Tanaka, K., and Takahashi, H. (1994). Structure of the 5' upstream region and the regulation of the rpoS gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 243(5), 525–531.
- Tanaka K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., and Takahashi, H. (1993). Heterogeneity of the principal  $\sigma$  factor in *Escherichia coli*: the rpoS gene product,  $\sigma_{38}$ , is a second principal  $\sigma$  factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3511–3515.
- Tanaka, K., Kusano, S., Fujita, N., Ishihama, A., and Takahashi, H. (1995). Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing sigma 38 (the rpoS gene product). *Nucl. Acids Res.*, 23(5), 827–834.
- Tatum, E. L. and Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 53, 673–684.

- Tenaillon, O., Denamur, E., and Matic, I. (2004). Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends Microbiol.*, 12(6), 264–270.
- Thibault, G., Yudin, J., Wong, P., Tsitrin, V., Sprangers, R., Zhao, R., and Houry, W. A. (2006). Specificity in substrate and cofactor recognition by the N-terminal domain of the chaperone ClpX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47), 17724–17729.
- Thibault, G., Tsitrin, Y., Davidson, T., Gribun, A., and Houry, W. A. (2006a). Large nucleotide-dependent movement of the N-terminal domain of the ClpX chaperone. *EMBO J.*, 25(14), 3367–3376.
- Thompson, M. W. and Maurizi, M. R. (1994). Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J. Biol. Chem.*, 269(27), 18201–18208.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., and Yamamoto, T. (2002). The ClpXP ATP-Dependent Protease Regulates Flagellum Synthesis in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 184(3), 645–653.
- Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E., and Yamamoto, T. (2003). Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol. Microbiol.*, 48(2), 443–452.
- Touloukhonov, I. I., Shulgina, I., and Hernandez, V. J. (2001). Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J. Biol. Chem.*, 276(2), 1220–1225.
- Travers, A. A., Burgess, R. R. (1969). Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature*, 222, 537–540.
- Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V. M., Smith, J. T., and Conway, T. (2008). The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 68(5), 1128–1148.
- Traxler, M. F., Zacharia, V. M., Marquardt, S., Summers, S. M., Nguyen, H.-T., Stark, S. E., and Conway, T. (2011). Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the “feast to famine” gradient in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 79(4), 830–845.
- Trotochaud, A.E. and Wassarman, K. M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 313–319.
- Tu, G. F., Reid, G. E., Zhang, J. G., Moritz, R. L., and Simpson, R. J. (1995). C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem.*, 270(16), 9322–9326.
- Turlan, C. und Chandler, M. (1995). IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. *EMBO J.*, 14, 5410–5421.
- Typas, A. and Hengge, R. (2005). Differential ability of sigma(s) and sigma70 of *Escherichia coli* to utilize promoters containing half or full UP-element sites. *Mol. Microbiol.*, 55(1), 250–260.
- Typas, A. and Hengge, R. (2006). Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigmaS promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 59(3), 1037–1051.
- Typas, A., Becker, G., and Hengge, R. (2007). The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.*, 63(5), 1296–1306.

- Typas, A., Barembruch, C., Possling, A., and Hengge, R. (2007a). Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of  $\sigma$ s activity and levels. *EMBO J.*, 26(6), 1569–1578.
- Updegrove, T., Wilf, N., Sun, X., and Wartell, R. M. (2008). Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry*, 47(43), 11184–11195.
- Uzan, M. and Danchin, A. (1978). Correlation between the serine sensitivity and the derepressibility of the *ilv* genes in *Escherichia coli* *relA*-mutants. *Mol. Gen Genet.*, 165(1), 21–30.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.*, 51(6), 1525–1533.
- van Schaik, W., Tempelaars, M. H., Zwietering, M. H., De Vos, W. M., and Abee, T. (2005). Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating  $\sigma^B$  activity in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 187, 5846–5851.
- Vassilyev, D. G., Sekine, S.-I., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, 417, 712–719.
- Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 385–397.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., and D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 56, 958–970.
- Wade, J. T., Castro Roa, D., Grainger, D. C., Hurd, D., Busby, S. J., Struhl, K., and Nudler, E. (2006). Extensive functional overlap between sigma factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(9), 806–814.
- Wang, J., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell*, 91(4), 447–456.
- Wang, J., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M. (1998). Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *J. Struct. Biol.*, 124(2-3), 151–163.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R., Wood, T. K. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat. Chem. Biol.*, 7, 359–366.
- Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., and Gottesman, S. (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev.*, 15, 1637–1651.
- Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, Wawrzynow. A., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1995). The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J.*, 14(9), 1867–1877.
- Webb, C., Moreno, M., Wilmes-Riesenberg, M., Curtiss III, R., and Foster, J.W. (1999) Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 34, 112–123.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., and Hengge, R. (2005). Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.*, 187(5), 1591–1603.

- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., and Nierhaus, K. H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell.*, 10(4), 779–788.
- Westblade, L. F., Ilag, L. L., Powell, A. K., Kolb, A., Robinson, C. V., and Busby, S. J. (2004). Studies of the *Escherichia coli* Rsd-sigma70 complex. *J. Mol. Biol.*, 335(3), 685–692.
- Whiteley, M., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182, 4356–4360.
- Wick, L.M., Weilenmann, H., and Egli, T. (2002). The apparent clock-like evolution of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics. *Microbiology*, 148, 2889–2902.
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., and Boor, K. J. (1998). General stress transcription factor  $\sigma^B$  and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 180, 3650–3656.
- Williams, K. P., Martindale, K. A., and Bartel, D. P. (1999). Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *EMBO J.*, 18(19), 5423–5433.
- Wojtkowiak, D., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1993). Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268(30), 22609–22617.
- Wojtyra, U. A., Thibault, G., Tuite, A., and Houry, W. A. (2003). The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *J. Biol. Chem.*, 278(49), 48981–48990.
- Wood T.K., Gonzalez Barrios A.F., Herzberg M., and Lee J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 361–367.
- Wösten, M.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(3), 127–150.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.*, 266, 5980–5990.
- Yamamoto, K. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 280, 1448–1456.
- Yamashino, T., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J.*, 14(3), 594–602.
- Yuan, A. H., Gregory, B. D., Sharp, J. S., McCleary, K. D., Dove, S. L., and Hochschild, A. (2008). Rsd family proteins make simultaneous interactions with regions 2 and 4 of the primary sigma factor. *Mol. Microbiol.*, 70(5), 1136–1151.
- Yee, D. and Goring, D. R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J. Exp. Bot.* 60, 1109–1121.
- Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almiron, M., Tormo, A., and Kolter, R. (1993). Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science*, 259, 1757–1760.
- Zambrano, M. M. and Kolter, R. (1996). GASping for life in stationary phase. *Cell*, 86, 181–184.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C., and Storz, G. (2002). The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol. Cell*, 9, 11–22.

- Zhang, N. and Buck, M. A. (2015). Perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*, 5, 1012–1019.
- Zhao, K., Liu, M., and Burgess, R. R. (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to “foraging”-like behavior in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.*, 35, 4441–4452.
- Zhou, Y. and Gottesman, S. (1998). Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. *J. Bacteriol.*, 180(5), 1154–1158.
- Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J. R., Maurizi, M. R., and Wickner, S. (2001). The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev.*, 15(5), 627–637.
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., and Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 3129–3134.
- Zinser, E. R. and Kolter, R. (2000). Prolonged stationary-phase incubation selects for lrp mutations in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 182, 4361–4365.
- Zinser, E. R., Schneider, D., Blot, M., and Kolter, R. (2003). Bacterial evolution through the selective loss of beneficial Genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics*, 164(4), 1271–1277.
- Zinser, E. R. and Kolter, R. (2004). *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res. Microbiol.*, 155(5), 328–336.
- Zuo, Y., Wang, Y., and Steitz, T. A. (2013). The Mechanism of *E. coli* RNA Polymerase Regulation by ppGpp Is Suggested by the Structure of Their Complex. *Mol. Cell*, 50(3), 430–436.





## 7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 27. Juni 2012.

Datum/ Unterschrift