Einfluss des nukleoid-assoziierten DNA Bindeproteins StpA auf globale Schaltkreise der Genregulation in *Escherichia coli*

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sabine Finken-Henn
aus Gerolstein

Marburg/Lahn, 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 1997 bis Januar 2000 im Fachbereich Biologie im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität in Marburg/Lahn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. E. Bremer für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung.
Meinen Laborkollegen sowie speziell der Badmintongruppe danke ich für die Tips und Annehmlichkeiten des Laboralltages.
Herrn Dr. Roland Schmid danke ich für die Ansequenzierung der Proteine OmpW, OmpX und Dps.
Ganz besonders danke ich Achim für seine Unterstützung und Motivation in allen Bereichen.

I. Zusammenfassung 1

II. Einleitung 2

1. Eukaryontische Histone 2

2. Organisation des *E. coli*-Chromosoms zum bakteriellen Chromatin 3

3. Nukleoid-assoziierte DNA-Bindeproteine 4

3.1 HU (Heat unstable protein) 5

3.2 IHF (Integration host factor) 7

3.3 Lrp (Leucin regulatory protein) 8

3.4 Fis (Factor for inversion-stimulation) 8

3.5 H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein) 9

3.6 StpA (Suppressor for *td*-mutant phenotype A) 11

4. Stationärphasen-Regulation 13

5. Netzwerke 14

6. Zielsetzung der Arbeit 16

III. Material und Methoden 17

1. Abkürzungen 17

2. Chemikalien und Materialien 17

3. Bakterienstämme und Plasmide 17

4. Medien und Medienzusätze 21

4.1 Vollmedien und Minimalmedien 21

4.2 Indikatormedien 21

4.3 Zusätze von Antibiotika 22

4.4 Wachstumsbedingungen 22

4.5 Zelldichtebestimmung 22

5. Genetische und molekularbiologische Methoden 23

5.1 P1*vir*-Transduktion 23

5.2 DNA-Isolation 23
5.3 Klonierungstechniken 23
5.4 Transformation von *E. coli* 23
5.5 Plasmidkonstruktionen 24
5.6 Konstruktion von *E. coli*-Stämmen 28
5.6.1 Konstruktion der Stämme SF11, SF12 und SF18 29
5.6.2 Konstuktion der Stämme SF39, SF41, SF45, SF64, SF65, SF66 und SF67 30
5.6.3 Konstuktionen zu Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Gene auf die *stpA*-Expression 30
5.6.4 Konstuktionen und Überprüfung von Stämmen mit Mutationen in *rpoS* 31
5.7 Mikroskopie 31
5.8 Anaerobe Anzucht 31
5.9 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot) 31
5.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten 32
5.11 Sequenzierung von DNA 32
5.12 Retardationsexperimente 32
6. Biochemische Methoden 33
6.1 Proteinbestimmung 33
6.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 33
6.3 Überexpression von StpA mit dem T7∅10-Promotor/T7-RNA-Polymerase System 33
6.4 Reinigung von StpA 34
6.5 Herstellung eines StpA spezifischen Antiserums 35
6.6 Immunologischer Nachweis von StpA 35
6.7 Präparation von äusseren Membran-Proteinen 35
6.8 β-Galaktosidase-Enzymtest 36
7. Computeranalysen 36
IV. Ergebnisse 37

1. Konstruktion chromosomaler *stpA*-Mutationen 37

1.1 Konstruktion definierter *stpA*-Mutationen 38

1.2 Transfer der *stpA*-Mutationen an den authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom 38

2. Struktur und Funktionsvergleiche zwischen StpA und H-NS 40

2.1 Funktionelle Vergleiche zwischen StpA und H-NS 40

2.1.1 Einfluss von *stpA* auf das Bakterienwachstum 40

2.1.1.1 Geringer Einfluss von *stpA* auf das bakterielle Wachstum bei 37°C 41

2.1.1.2 Einfluss von *stpA* und *hns* auf das Wachstum bei 18°C 42

2.1.2 Beteiligung von *stpA* an der Regulation des *proU*-Operons und des *bgl*-Operons 43

2.1.2.1 Einfluss von *stpA* auf das *proU*-Operon 43

2.1.2.2 Das kryptische *bgl*-Operon unterliegt einer Regulation durch *stpA* 45

2.1.2.3 Auswirkungen unterschiedlicher *stpA*-Mutationen auf die Repression des *proU*-Operons 45

2.1.2.4 Mutationen in *stpA* und *hns* verändern die Osmosensität der Zelle 47

3. Das StpA-Protein 48

3.1 Überexpression und Reinigung von StpA 48

3.2 Gewinnung und Überprüfung eines Antiserums gegen StpA 49

3.3 Einsatz von StpA in Bandshift-Experimenten 50

3.3.1 StpA bindet an die *proU*-Promotorregion 50

3.3.2 StpA bindet mit hoher Affinität an den eigenen Promotor 52

4. Untersuchungen zur *stpA*-Expression 54

4.1 Konstruktion einer *stpA-lacZ*-Fusion 54

4.2 StpA unterliegt einer negativen Autoregulation und einer Kontrolle durch H-NS 54

4.3 Autoregulation der *stpA*-Expression 55

4.4 Die Induktion von *stpA* erfolgt am Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase 57

4.4.1 Die Abnahme der *stpA*-Expression lässt sich auf Proteinebene verfolgen 59

4.5 Einfluss von H-NS, IHF, HU, Fis, Lrp und RpoS auf die *stpA*-Expression 60

4.5.1 Beteiligung von ArcA/B an der *stpA*-Regulation 61

4.5.2 Einfluss von Umweltbedingungen auf die *stpA*-Expression 62

5. Wachstum in einer verlängerten Stationärphase 63

5.1 Veränderungen der Zellmorphologie durch Mutationen in *stpA* und *hns* 63

5.2 Auswirkungen von Mutationne in *stpA* und *hns* auf das Überleben in Langzeit-Wachstumsexperimenten 65

5.2.1 Mutationen in *stpA* und *hns* beeinflussen das Langzeitwachstum stärker als Mutationen in *hupAB* 65

5.2.2 Überlebensverhalten von *stpA* und *hns*-Mutanten 66

5.2.3 Komplementation des Überlebensdefekt durch Plasmid-codiertes *stpA* und *hns* 67

5.2.4 Der Überlebensdefekt des Stammes SF20 ist kein Stamm-spezifisches Phänomen 68

5.2.5 Suppressormutanten mit verbesserter Überlebensfunktion 69

5.2.6 Suppressormutanten tragen keine Mutationen in *rpoS* 71

5.2.6.1 Mutationen in *rpoS* und *non-mucoid*-Genen zeigen keinen Einfluss auf das Langzeit-Überlebensverhalten 72

5.3 Regulation von *ompW*, *ompX* und *dps* durch H-NS 74

V. Diskussion 76

1. Einfluss von Mutationen in *stpA* und *hns* auf physiologische Parameter in *E. coli* 76

1.1 Bakterielles Wachstum 76

1.2 Einfluss von *stpA* auf das *proU*-Operon 78

1.3 Repression des *bgl*-Operons durch *stpA* 79

2. Regulation der *stpA*-Expression 81

2.1 Einfluss weiterer DNA-Bindeproteine auf die *stpA*-Expression 82

2.2 Umwelteinflüsse 83

3. Spezifische Funktionen von StpA 84

4. Überleben in der Stationärphase 85

4.1 Einfluss von StpA und H-NS auf das Überleben in der Stationärphase 85

4.2 Regulation von *ompW*, *ompX* und *dps* durch H-NS 88

4.2.1 OmpW 89

4.2.2 OmpX 90

4.2.3 Dps 90

5. Evolutionäre Aspekte 91

VI. Literatur 94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Proteinsequenzvergleich zwischen StpA und H-NS 11

Abb. 2: Netzwerk nukleoid-assoziierter DNA-Bindeproteine 16

Abb. 3: Plasmidkonstruktionen 24

Abb. 4: Konstruktion des Plasmids pSF8 aus den Plasmiden pSF4 und pKO3 26

Abb. 5: Konstruktion des Plasmids pSF10 aus den Plasmiden pJL29 und pSF9 27

Abb. 6: *stpA*-Organisation innerhalb des *E. coli*-Chromosoms 37

Abb. 7: Schema der homologen Rekombination mit Hilfe des pKO3-Rekombinationssystem zur Konstruktion von Mutationen am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom 39

Abb. 8: Vergleich der Wachstumskurven bei 37°C 41

Abb. 9: Vergleich der Wachstumskurven bei 18°C 42

Abb. 10: Repression von *proU* durch StpA 44

Abb. 11: Einfluss chromosomaler Mutationen in *stpA* und *hns* auf die *proU-lacU*--Expression 46
Abb. 12: Veränderte Osmosensität durch Mutationen in *stpA* und *hns* 47
Abb. 13: Überproduktion und Reinigung von StpA 49
Abb. 14: Westernblot mit StpA-Antiserum 50
Abb. 15: Interaktionen von StpA mit der regulatorischen Region von *proU* 51
Abb. 16: Interaktionen von StpA mit der regulatorischen Region des eigenen Strukturgens 53
Abb. 17: Regulation der *stpA*-Expression 55
Abb. 18: Repression der *stpA*-Expression 56
Abb. 19: Induktion von *stpA* in LB-Medium 57
Abb. 20: Induktion von *stpA* in einem *hns*-Stamm 58
Abb. 21: Nachweis der StpA-Bildung im Verlauf der Wachstumskurve 59
Abb. 22: *stpA*-Expression in Mutanten von H-NS, IHF, HU, Lrp und RpoS 60
Abb. 23: Einfluss von Mutationen in ArcA/B auf die *stpA*-Expression 61
Abb. 24: *stpA*-Expression unter variierenden Umweltbedingungen 62
Abb. 25: Morphologische Untersuchungen von stationärphase-Zellen mit Mutationen in *stpA, hns* sowie Doppelmutationen 64
Abb. 26: Vergleich der Überlebensraten von *hupAB* und *stpA/hns*-Mutanten nach Inkubation in einer verlängerten Stationärphase 65
Abb. 27: Überlebensraten der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 66
Abb. 28: Spezifische Beteiligung von *stpA* und *hns* am Langzeit-Überleben 67
Abb. 29: Vergleich des Überlebensverhalten von MC4100 und W3110-Derivaten 69
Abb. 30: Überlebensmutanten im Wachstumsvergleich 70
Abb. 31: Vergleich der Suppressormutanten in einem Westernblot 71
Abb. 32: Überlebensverhalten nach Einbringen einer zusätzlichen *rpoS359*::Tn*10*-Mutation 72
Abb. 33: Überlebensverhalten nach zusätzlicher Einbringung einer *non*::Tn*10*-Mutation 73
Abb. 34: Präparation der äusseren Membran aus stationärphase-Kulturen 74

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme 18

Tab. 2: Verwendete Plasmide 20

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide 27

Tab. 4: Konstruktionen unterschiedlicher *stpA-lacZ*-Fusionen mit verschiedenen Mutationen 30

I. Zusammenfassung

Nukleoid-asoziierte DNA-Bindeproteine erfüllen sowohl als strukturelle wie auch als regulatorische Komponente wichtige Funktionen innerhalb der Prokaryonten. Zwischen den DNA-Bindeproteinen StpA und H-NS aus *Escherichia coli* besteht eine strukturelle Ähnlichkeit, die sich auch in analogen Funktionen wiederspiegelt. Dabei werden StpA Funktionen als molekularer „back-up" für H-NS zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DNA-Bindeprotein StpA in molekularbiologischen und physiologischen Untersuchungen näher charakterisiert und sein Einfluss auf das bakterielle Wachstum und regulatorische Schaltkreise untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *stpA* auf das bakterielle Wachstum wurden Sämme mit definierten Mutationen in *stpA* konstruiert. Zusätzlich erfolgte die Kombination der *stpA*-Mutationen mit Mutationen in *hns,* um die Auswirkung von Mutationen in beiden Proteinen gleichzeitig zu studieren. In diesen Stämmen wurde der Einfluss der Mutationen auf das bakterielle Wachstum, die Expression des *proU*-Operons und des *bgl*-Operons untersucht. Das *proU*-Operon codiert für ein hochaffines Transportsystem für die osmotische Schutzsubstanz Glycin-Betain, das normalerweise kryptische *bgl*-Operon codiert für Enzyme des ß-Glykosidabbaus. Es wurde eine Beteiligung beider DNA-Bindeproteine an der Regulation des *proU*-Operons sowie eine drastische Auswirkung auf das Wachstum in einer verlängerten Stationärphase festgestellt. Durch Komplementationsversuche unterschiedlicher *hns*-Mutationen durch *stpA* konnte eine „back-up"-Funktion von StpA bei der Repression des *proU* und des *bgl*-Operons bestätigt werden. In Regulationsstudien mittels einer chromosomalen *stpA-lacZ*-Fusion am authentischen *stpA*-Genort im *E. coli*-Chromosom wurde die Beteiligung von H-NS sowie weiterer DNA-Bindeproteine an der *stpA*-Expression untersucht. Dabei wurde eine Repression der *stpA*-Expression durch H-NS beobachtet. Weiterhin unterliegt die *stpA*-Expression einer negativen Autoregulation sowie einer stationärphasen-Induktion. Verschiedene Umweltstimuli, wie z.B. Temperatur, Anaerobiose und Salzstress, beeinflussen die *stpA*-Expression ebenfalls. Das StpA-Protein wurde überexprimiert und mittels eines zwei-Stufen-Verfahrens chromatographisch bis zur Homogenität gereinigt. Das gereinigte Protein wurde in DNA-Bindestudien eingesetzt und zur Produktion eines Antikörpers genutzt. Weiterhin konnte eine bislang unbekannte Regulation der Gene *ompW*, *ompX* und *dps* durch H-NS nachgewiesen werden. Dabei unterliegt die *ompW*-Expression einem positiv Einfluss durch H-NS, *ompX* und *dps* werden negativ von H-NS reguliert.

II. Einleitung

Seit Beginn der 50-iger Jahre gehört *Escherichia coli* wohl zu den bekanntesten Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae*. Aufgrund seiner einfachen Kultivierungsbedingungen hat *E. coli* zunehmend an Bedeutung gewonnen und dient als Forschungsschwerpunkt der Mikrobiologie und der Molekularbiologie. Das gram negative, stäbchenförmige Bakterium kommt normalerweise u.a. in der mikrobiellen Flora des Säugetier-Darmtraktes vor. In den letzten Jahren verursachten virulente *E. coli*-Stämme jedoch eine Reihe von humanpathogenen Darmerkrankungen (Huck *et al.*, 1995, Candrian *et al.*, 1991).
Auch ausserhalb des Darmtraktes ist *E. coli*, z.B. in Gewässern, ebenfalls in der Lage zu überleben und wird in der Trinkwasseranalytik zur Quantifizierung des bakteriellen Verschmutzungsgrades herangezogen (Bej *et al.*, 1990).
Die Habitate Darmtrakt und Wasser unterscheiden sich sehr stark im Bezug auf ihre Umweltbedingungen und Wachstumsanforderungen. Während *E. coli* einerseits im Darmtrakt eine gute Nährstoffversorgung vorfindet, jedoch auf der anderen Seite hoher Osmolarität und Abwehrstrategien des Immunsystems ausgesetzt ist, steht er ausserhalb dieses Habitates, wie z.B. in Gewässern, häufig Umwelteinflüssen mit Nährstofflimitationen, UV-Strahlung und oxidativen Stresssituationen gegenüber. Um den Anforderungen beider Habitate gerecht zu werden, muss *E. coli* eine Reihe von Anpassungsmechanismen zum Überleben unter unterschiedlichen Umweltbedingungen entwickeln. Die Vorraussetzung für solche Anpassungsmechanismen stellt eine flexible und dynamische Genregulation dar. An dieser dynamischen Genregulation sind u.a. histon-ähnliche DNA-Bindeproteine massgeblich beteiligt. Ihre Beteiligung an regulatorischen Vorgängen stellt somit eine Vorraussetzung für das Überleben unter unterschiedlichsten Umweltbedingungen dar (Atlung & Ingmer, 1997; Williams & Rimsky, 1997).

1 Eukaryontische Histone

Die Kompaktierung der eukaryontischen DNA erfolgt durch Histone, welche während des Verlaufes der Evolution einen hohen Grad an Konservierung aufweisen. Das eukaryontische Chromosom liegt in einer regelmässigen Struktur, dem Nukleosom, umhüllt von der Kernmembran im Zellkern vor. Der Aufbau eines Nukleosoms kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden. Je ein Dimer der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden als Oktamer das Zentrum des Nukleosoms. Dieser Komplex wird von der DNA mit einer Länge von 147 bp in einer Linkswindung umschlungen (Luger *et al.*, 1997; Arents *et al.*, 1991). Diese zentrale Domäne ist für die eigentliche Kompaktierung der DNA verantwortlich. Die zweite Domäne wird durch den N-Terminus der Histone gebildet. Diese Domäne ist in der Nukleosomen-Peripherie an Regulationsvorgängen beteiligt (Arents & Moudrianakis, 1995), sodass Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung der Histon-N-Termini durch DNA-Bindeproteine die Transkription modulieren,

und damit Einfluss auf die Genexpression nehmen (Tse *et al.,* 1998). Zwei Nukleosomen sind durch eine Linker-DNA miteinander verbunden. In diesem Bereich wird die DNA durch das Histon H1 strukturiert und zu einer Chromatinfaser gebündelt. H1 ist massgeblich an der Repression der Transkription beteiligt (Paranjape *et al.,* 1994; Belikov & Karpov, 1998).
An der Strukturierung des Chromatins sind neben den Histonen weitere Proteine beteiligt, die aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität entdeckt wurden und zu den „high mobility group" (HMG) Proteinen gehören (Falciola *et al.*, 1994; Lu *et al.,* 1996). Sie werden aufgrund ihres Molekulargewichtes unterschieden und können durch ihr DNA-Bindeverhalten in Sequenz-spezifische und unspezifische DNA-Bindeproteine eingeteilt werden (Grosschedl *et al.*, 1994). HMG-Proteine mit unspezifischem DNA-Bindungsverhalten erkennen DNA-Konformationen wie z.B. Kleeblattstrukturen oder gebogene DNA (Pil & Lippard, 1992). Ihre genaue Funktion ist weitgehend unklar, eine Beteiligung an der Kontrolle des Chromatins wird aber ebenso diskutiert wie eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Replikation und der Transkription (Tremethick & Molloy, 1988). Funktionell weisen diese unspezifischen DNA-Bindeproteine Homologien zu prokaryontischen DNA-Bindeproteinen auf (Bianchi, 1994).

2 Organisation des *E. coli*-Chromosoms zum bakteriellen Chromatin

Die bakterielle DNA liegt, ohne Umhüllung einer Kernmembran, als doppelsträngiges, ringförmig-geschlossenes, fädiges Knäuel relativ in der Mitte der Bakterienzelle und bildet dort bei elektronenmikroskopischer Betrachtung eine hantelförmige Aufhellung. Das *E. coli*-Chromosom enthält die genetische Information von 4288 Genen, von denen 38 % bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte (Blattner *et al.,* 1997). Um die gesamte *E. coli*-DNA in einer Zelle zu verpacken muss diese 1000-fach kompaktiert werden. Diese Funktion der Kompaktierung wird innerhalb der Prokaryonten von sogenannten histon-ähnlichen, nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteinen übernommen, welche jedoch kaum strukturelle Homologien zu eukaryontischen Histonen zeigen (Schmid, 1990; Hayat & Mancarella, 1995). Das *E. coli*-Genom liegt in der bakteriellen Zelle in einem Komplex mit nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteinen vor (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987). Man spricht dabei auch von einem „Compaktosom", welches einen Durchmesser von 15 nm besitzt (Kellenberg & Arnold-Schulz-Gahmen, 1992). Durch ihre Bindung an die DNA können die nukleoid-assoziierten Proteine in Gegenwart von Topoisomerase I negative Supercoils einführen (Rouvière-Yaniv *et al.,* 1979), wobei eine Konzentration der DNA von 20-50 mg/ml erreicht wird. Dies entspricht ungefähr der DNA-Konzentration eines eukaryontischen Interphasekerns. Die räumliche Verteilung der nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteine auf dem *E. coli*-Chromosom beinflusst nicht nur die Kompaktierung der bakteriellen DNA, sondern nimmt weiterhin Einfluss auf die Replikation, Rekombination, Reparatur und Transkription und gewährleistet somit eine flexibele Anpassung der Genexpression an wechselnde Umweltbedingungen (Atlung & Ingmer, 1997; Williams & Rimsky, 1997).

Im Gegensatz zum eukaryontischen Chromatin wird das bakterielle Chromosom als Ganzes vollständig repliziert. In Phasen mit hoher Nährstoffkonzentration, und damit verbunden mit einer hohen Zellteilungsrate, können in einer Bakterienzelle bis zu 4 Kernäquvivalente paralell vorliegen. Das Nukleoid ist dabei vermutlich in 40 unabhängige Domänen verpackt, wobei innerhalb dieser Domänen Vorgänge an der DNA vorgenommen werden können, ohne die übergeordnete Struktur des Chromatins und damit die gesamte superhelikale Spannung der DNA zu beeinflussen.
Zwischen histon-ähnlichen DNA-Bindeproteinen und eukaryontischen Histonen kann keine signifikante strukturelle Ähnlichkeit erkannt werden, sodass ein gemeinsamer Ursprung zwischen DNA-Bindeproteinen bei Eukaryonten und Prokaryonten ausgeschlossen werden kann. Stattdessen erfolgte ein analoger Lösungsansatz für die gleiche Anforderung bei Prokaryonten und Eukaryonten.

3 Nukleoid-assoziierte DNA-Bindeproteine

Eubakterien und Archaea enthalten zur Kompaktierung ihrer DNA kleine, in aller Regel basiche Proteine mit DNA-Bindeeigenschaften, welche mit hoher Kopienzahl in der bakteriellen Zelle vorliegen (Schmid, 1990). Sowohl histon-ähnliche prokaryontische DNA-Bindeproteine als auch eukaryontische HMG-Proteine und Histone führen aufgrund der Wechselwirkung zwischen den meist basischen Aminosäuren mit den negativ-geladenen Phosphatresten der Nukleinsäure zu einer Kompaktierung der DNA.
Im Gegensatz zum eukaryontischen Chromosom sind prokaryontische histon-ähnliche Bindeproteine nicht ständig an das bakterielle Nukleoid gebunden und bilden keine regelmässigen Strukturen aus. Bei den prokaryontischen nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteinen unterschieden man zwischen Proteinen mit überwiegend strukturgebender Funktion einerseits, welche häufig im Inneren des DNA-Protein-Komplexes lokalisiert sind, und andereseits Proteinen, welche in ähnlicher Weise zu Transkriptions-Aktivatoren wirken, und sich an der Oberfläche eines Compaktosoms befinden. Somit finden aktive Prozesse an der DNA, wie z.B. Transkription oder Rekombination, an der Oberfläche des Nukleoids statt, während inaktive bakterielle DNA im Inneren des Nukleoidkomplexes kompaktiert wird. Das bakterielle Nukleoid stellt damit eine Kombination aus sowohl kompaktierender als auch dynamischer Einheit dar.
Mutationen in nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteinen bewirken häufig pleiotrophe Effekte (Kano *et al.*, 1991, Dersch *et al.*, 1994; Atlung & Ingmer, 1997; Yasuzawa *et al.*, 1992). Es treten Unregelmässigkeiten in der DNA-Replikation auf, welche zu Wachstums- und Zellteilungdefekten führen können. Allgemein sind Mutationen in einzelnen DNA-Bindeproteinen jedoch nicht lethal für die bakterielle Zelle. Die meist unspezifische DNA-Bindung lässt vermuten, dass der Ausfall eines DNA-Bindeproteins in aller Regel durch die Funktion eines anderen DNA-Bindeproteins kompensiert werden kann (Yasuzawa *et al.*, 1992).

Durch diese funktionelle Kompensation können lethale Effekte verhindert werden, Wachstumsdefekte sind jedoch häufig.
Nukleoid-assoziierte DNA-Bindeproteine üben ihren Einfluss auf die Genregulation nicht nur unabhängig voneinander aus. Eine Anpassung an herrschende Umweltbedingungen wird oft durch die Kooperation mehrerer DNA-Bindeproteine miteinander erreicht (Roth *et al.,* 1994; Landry *et al.,* 1993). Andererseits treten jedoch auch antagonistische Effekte der histon-ähnlichen Proteine untereinander auf (Goshima *et al.,* 1994; Tippner *et al.,* 1994).
In Archaea sind nukleoid-assoziierte Proteine neben der Kompaktierung u.a. am Schutz der bakteriellen DNA vor Denaturierung durch die häufig sehr hohen Umwelttemperaturen beteiligt (Tabassum *et al.*, 1992; Reeve, 1992). In Eubakterien sind die histon-ähnlichen Proteine HU, IHF, Fis, Lrp, H-NS und StpA massgeblich an der Genregulation beteiligt.

3.1 HU (Heat-unstable nucleoid protein)

Mit einer Anzahl von ca. 30000-50000 Dimeren pro Zelle gehört das HU-Protein zu den DNA-Bindeproteinen, welche mit einer hohen Kopienzahl in der Zelle vorkommen (Talukder *et al.,* 1999). Es besitzt ein Molekulargewicht von 18 kDa mit einen dimeren Aufbau (Rouvière-Yaniv, 1978; Bonnefoy *et al.,* 1994). Seine Bindung erfolgt unspezifisch an einzelsträngige und doppelsträngige DNA sowie an RNA, wobei supergecoilte Strukturen jedoch präferentiell von HU erkannt und gebunden werden (Shindo *et al.,* 1992, Lewis *et al.,* 1999). Das HU-Protein bindet auch an cruciforme DNA, dabei erfolgt die Bindung in der Nähe des Verzweigungspunkes der DNA (Bonnefoy *et al.,* 1994). In der Gegenwart von Topoisomerase I ist HU in der Lage, in relaxierte, zirkuläre DNA negative Supercoils einzuführen (Rouvière-Yaniv *et al.,* 1979; Hodges-Garcia *et al.,* 1989, Norris *et al.,* 1996).
Die massgebliche Beteiligung von HU an Vorgängen wie Rekombination, Transposition des Phagen Mu (Kano *et al.,* 1989), Transposition des Transposons Tn*10* (Morisato & Kleckner, 1987), Gen-Inversion (Wada *et al.,* 1989), Initiation der *oriC*-abhängigen DNA-Replikation (Dri *et al.,* 1991) und Zellteilung (Hwang & Kornberg, 1992) machen HU zu einem wichtigen Modulator der Genexpression. HU ist ebenfalls an der Bildung des Invertasom-Komplexes beteiligt, welcher für die *hin*-vermittelte homologe Rekombination verantwortlich ist (Paull *et al.,* 1994). Die spezifische Inversion des *hin* DNA-Fragmentes, welches durch die Hin-Invertase katalysiert wird, bewirkt ein alternatives Muster der Genexpression durch die veränderte Orientierung eines Flaggelin-Promotors relativ zu seinen Strukturgenen. Weiterhin moduliert HU die Bindung von spezifischen DNA-Bindeproteinen, wie z.B. CRP (Flaschner & Gralla, 1988), IHF (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1992) und des LexA-Repressors (Preobrajenskaya *et al.,* 1994), an die DNA. Funktionelle Homologien, unabhängig von der Aminosäuresequenz, bestehen zwischen dem HU-Protein und dem eukaryontischen Protein HMG1, welches an der eukaryontischen Genregulation beteiligt ist (Bianchi *et al.,* 1992), indem es die DNA-Kompaktierung und die DNA-Bindung weiterer regulatorischer Proteine beeinflusst (Watt & Molloy, 1988; Lewis *et al.,* 1999).

Die Aminosäuresequenz des HU-Proteins ist innerhalb der Prokaryonten hoch-konserviert. In *E. coli* liegt der grösste Anteil des HU-Proteins als HUα und HUβ-Dimere vor. Der heterodimere Aufbau ist dabei kennzeichnend für die Familie der *Enterobacteriaceae.* Die beiden HU-Polypeptidketten HUα (9,5 kDa) und HUβ (9,2 kDa) werden von den Genen *hupA* und *hupB* codiert, welche bei 90 Minuten bzw. 10 Minuten auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert sind (Kano *et al.,* 1986). Die Transkription von *hupA* wird durch das DNA-Bindeprotein Fis aktiviert, wohingegen die Transkription von *hupB* durch Fis reprimiert wird. Beide Gene, *hupA* und *hupB,* unterliegen einer positiven Kontrolle durch CRP (Claret & Rouvière-Yaniv, 1996) und werden vermehrt in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet. Die unterschiedliche Regulation der HU-Untereinheiten könnte für spezifische Aufgaben in der Adaptation an die vorherschenden Wachstumsbedingungen sprechen.

HU-analoge Proteine sind innerhalb der Prokaryonten weit verbreitet. So liegt eine dem HU-Protein ähnliche Situation ebenfalls bei dem Protein HMf aus dem hyperthermophilen Archebacterium *Methanothermus fervidus* vor (Sandman *et al.,* 1994), welches ebenfalls aus zwei Untereinheiten besteht. Wie bei HU ist auch bei HMf eine Untereinheit an der Kompaktierung der bakteriellen DNA beteiligt, die andere Untereinheit akkumuliert in der Stationärphase und ist an der Organisation des Nukleoids beteiligt.

HBsu, ein HU-ähnliches Protein aus *B. subtilis*, bildet im Gegensatz zu HU, welches einen heterodimeren Aufbau aufweist, überwiegend Homodimere (Köhler & Mahariel, 1997, Nakamura *et al.,* 1999). Ein HU-analoges Protein aus *B. stearothermophilus* wurde kristallisiert, und ein Strukturmodell für die Wirkungsweise von HU aufgestellt (Tanaka *et al.,* 1984). Dabei bilden die beiden Untereinheiten des Proteins zwei Arme aus, die die DNA in der kleinen Furche umschlingen. Das Vorkommen von HU-ähnlichen Proteinen ist ebenfalls innerhalb der *Cyanobacteriaceae*, in Hefemitochondrien und in Pflanzenchloroplasten verbreitet (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987). Ähnlichkeit bestehen weiterhin zwischen HU und dem Protein TF1, welches als Transkriptionsfaktor bei der Replikation des *B. subtilus* Phagen SPO1 dient (Andera & Geiduschek, 1994).

Seine regulativen Funktionen vollzieht das HU-Protein an der Oberfläche von Nukleoprotein-Komplexen und ist dort wahrscheinlich mit Polysomen verbunden (Ueguchi *et al.,* 1997), Shellman & Pettijohn, 1991). HU erhöht durch seine Bindung an die DNA, und die damit einhergehende Beugung, die Flexibilität der DNA und erleichtert dadurch die Interaktion weiterer Proteine mit der DNA.

Eine deregulierte Synthese der HU-Dimere übt auf die bakterielle Zelle weitreichenden Einfluss aus, die SOS-Antwort sowie unkontrollierte Schleimbildung werden induziert (Painbeni *et al.,* 1993). Das Vorliegen beider HU-Untereinheiten ist weiterhin notwenig für die Überlebensfähigkeit von *E. coli* beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase (Claret & Rouvière-Yaniv, 1997), da HU der DNA Schutz gegenüber Strahlungschäden verleiht (Li & Waters, 1998). *E. coli*-Zellen mit Defekten in beiden Untereinheiten zeigen einen elongierten Phänotypen und bilden vermehrt anukleare Zellen (Painbeni *et al.,* 1997).

3.2 IHF (Integration host faktor)

Das dimere IHF-Protein fungiert ebenfalls als wichtiger Organisator des bakteriellen Chromatins. Das *himA*-Gen liegt auf dem *E. coli*-Chromosom bei 38 min. und codiert für die IHFα-Untereinheit (11,3 kDa), die IHFβ-Untereinheit (10,6 kDa) wird durch das *himD*-Gen, welches bei 25 min. liegt, codiert. In seiner funktionellen Form liegt IHF als Heterodimer vor, dabei wird von einer Anzahl von 8000-15000 Dimeren pro Zelle ausgegangen (Ditto *et al.*, 1994). Eine Induktion von IHF wird beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase beobachtet (Ditto *et al.*, 1994), wobei in der stationären Wachstumsphase dann die maximale Menge an IHF-Dimeren mit bis zu 55000 Dimeren pro Zelle vorliegt (Talukder *et al.*, 1999).

Durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen ist IHF in der Lage, die DNA sehr stark zu beugen (Nash & Granston, 1991); die Bindung des Proteins an die DNA führt zu einer Krümmung von 140° (Thompson & Landy, 1988). Die Konsensus-Sequenz für die Bindung besteht aus folgender Nukleotidsequenz mit 13 bp: ATCAANNNNTT (Craig & Nash, 1984). Neben der eigentlichen Konsensussequenz besitzen ebenfalls die flankierenden DNA-Abschnitte Bedeutung für die Bildung eines stabilen Nukleoprotein-Komplexes.

IHF wird u.a. für die Integration und Excision des Phagen λ benötigt (Goodman & Nash, 1989; Goosen & van de Putte, 1995), dabei liegt seine Funktion darin, mit der Integrase und der λ-DNA eine geordnete Struktur zu bilden. Weiterhin ist IHF an der Bildung des NifA-σ^{54}-Holoenzymkomplex und dem NarL-σ^{70}-Holoenzymkomplex beteiligt, indem es aufgrund einer Beugung der DNA zu einem effizienteren Kontakt der beiden Proteine führt (Hoover *et al.*, 1990). IHF vollzieht weiterhin wichtige Funktionen bei der homologen Rekombination, der *oriC*-abhängigen-DNA-Replikation sowie der Transkriptions- und Translations-Kontrolle (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987).. Zellen mit Mutationen in IHF zeigen eine deutlich verminderte Rekombinatonsfähigkeit.

Neben seiner Rolle als Aktivator besitzt IHF ebenfalls inhibitorische Funktionen. Durch das Überlappen von IHF-Bindestellen mit der -10 bzw. der -35 Region einiger Promotoren, wie z.B. des *ompB*-Operons (Tsui *et al.*, 1991), übt es einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Transkription aus. Ebenfalls reprimierend, jedoch aufgrund eines indirekten Einflusses, wirkt IHF auf die Bildung der Porine OmpC und OmpF (Slauch & Silhavy, 1991). Im Falle der Repression von *ompF* erfolgt die Regulation durch Kompetetion von IHF um Bindestellen für das Regulatorprotein OmpR. Die Wirkungsweise von IHF auf die Repression des *ompC*-Gens ist noch nicht vollständig geklärt.

Da die Untereinheiten von IHF eine grosse Ähnlichkeit zu den Untereinheiten von HU aufweisen kann das von Tanaka *et al.*, (1984) postulierte Modell für die Bindung von HU an die DNA ebenfalls als Grundlage für die Bindung der IHF-Untereinheiten an die DNA angewendet werden. Dabei wird der Kontakt des IHF-Proteins zur DNA über Bindung an die kleine Furche hergestellt. Weiterhin in Anlehnung zu HU besitzt auch IHF funktionelle Analogien zu dem eukaryontischen Protein HMG1 (Rice, 1997). Im Gegensatz zu den

strukturell ähnlich-aufgebauten Untereinheiten des HU-Proteins zeigen die Untereinheiten von IHF jedoch nur eine schwache Identität auf Aminosäureebene von 25 % zueinander und zeigen damit eine relativ unterschiedliche evolutionäre Entwicklung, welche möglicherweise auf Spezialisierung der IHF-Untereinheiten für unterschiedliche Prozesse schliessen lässt. Die relativ grossen strukturellen Unterschiede zwischen den IHF-Untereinheiten erweitern zudem das Interaktionsspektrum mit anderen Proteinen.

3.3 Lrp (Leucin responsive regulatory protein)

Das Lrp-Protein fungiert als transkriptioneller Regulator, indem es einerseits Gene aktiviert, welche für die Aminosäurebiosynthese benötigt werden, und andererseits Gene des Aminosäurekatabolismus reprimiert (Newman *et al.,* 1992). Dabei stellen Gene, welche für die Aminosäurebiosynthese verantwortlich sind (z.B. *ilvIH,* Platko *et al.,* 1990), ebenso wie Gene des Aminosäurekatabolismus (z.B. *gcv*, Lin *et al.,* 1992) und den Transport von Metaboliten z.B. *ompC* and *micF*, (Ferrario *et al.,* 1995), Zielgene der Regulation durch Lrp dar.
Ein 18,8 kDa grosses Protein wird von dem *lrp*-Gen codiert. Es befindet sich bei 20 min. auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert und unterliegt einer negativen Autoregulation (Lin *et al.,* 1992). L-Leucin dient als wichtiges regulatorisches Signal in der *lrp*-Expression (Quay *et al.,* 1977; Bhagwat *et al.,* 1997); weiterhin wird die Expression durch 3´,5´-bispyrophosphat (ppGpp) stimuliert (Cashel & Rudd, 1987). Allgemein ist die *lrp*-Expression in Minimalmedium höher als in Vollmedium, dies spricht für eine Beteiligung von Lrp an der Adaption der *E. coli*-Zelle an das vorliegende Nährstoffangebot (Landgraf *et al.,* 1996). In der exponentiellen Wachstumsphase liegen in der *E. coli*-Zelle ca. 1300 Lrp-Dimere vor, während der stationären Wachstumsphase kommt es zu einem Abfall der Proteinmenge (Talukder *et al.,* 1999).
Da zur Bindung von Lrp-Homodimeren die konservierte Sequenz AGAATTTTATTCT notwendig ist (Wang & Calvo, 1993), gehört es zu den sequenz-spezifischen DNA-Bindeproteinen. Die Bindung von Lrp an die DNA erfolgt über ein Helix-Turn-Helix-Motiv des Protein-C-Terminus. Durch seine Bindung an Promotoren kommt es zu einer Krümmung der DNA (Wang & Calvo, 1993). Stationärphasen-induzierte Gene wie z.B. *csiD* und *bolA* unterliegen häufig einer Regulation durch Lrp (Marschall *et al.*, 1998; Lange & Hengge-Aronis, 1991). Neben seiner Funktion als Strukturkomponente des bakteriellen Nukleoids erfüllt Lrp ebenfalls stoffwechselphysiologische Aufgaben.

3.4 Fis (Factor for inversion-stimulation)

Das Fis-Protein wurde ursprünglich als ein Faktor zur Stimmulation der ortsspezifischen DNA-Inversion isoliert. Dabei wirkt Fis sowohl auf das Gin-Protein, welches die Bildung eines alternativen Schwanz-Proteins des Phagen Mu reguliert, als auch auf das Hin-Protein aus *Salmonella typhimurium,* welches an der Bildung eines alternativen Flagellin-Proteins beteiligt ist (Kahmann *et al.,* 1985). Die molekulare Masse des Proteins beträgt 12 kDa, als funktionelle Einheit wirken Fis-Dimere. Durch die Bindung des Fis-Proteins erfährt die DNA eine starke

Krümmung. Es liegt für die Fis-Bindung nur eine sehr schwache Sequenzzpezifität vor, allerdings wird bei der Bindung bereits gebogene DNA bevorzugt und verstärkt gekrümmt. Die C-Termini des Dimeres besitzen ein Helix-Turn-Helix-Motiv, welches für die Ausbildung von Protein-DNA-Interaktion wichtig ist. Die Inversionsdomäne liegt im N-Terminus und bildet eine flexible ß-Haarnadel aus (Safo *et al.,* 1997). Im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase beträgt die Anzahl der Fis-Moleküle bis zu 60000 Dimere pro *E. coli*-Zelle, während der Stationärphase ist das Fis-Protein jedoch nicht mehr nachweisbar (Talukder *et al.,* 1999). Die *fis*-Expression ist negativ autoreguliert (Ninnemann *et al.,* 1992).
Fis wirkt als Aktivator einer schnellen RNA-Synthese durch Bindung an rRNA-Promotoren (Afflerbach *et al.,* 1999) und ermöglicht die Anpassung der *E. coli*-Zelle durch rasches Wachstum an eine günstige Nährstoffversorgung (Nilsson *et al.,* 1992). Weiterhin ist Fis an der Initiierung der Replikation am *oriC* beteiligt, vermutlich durch Kümmung der DNA (Gille *et al.,* 1991). Die *hns*-Expression unterliegt ebenfalls einer Repression durch Fis (Tippner *et al.,* 1994)

3.5 H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein)

Das *hns*-Gen liegt auf dem *E. coli*-Genom bei 27,5 min (Higgins *et al.,* 1988; May *et al.,* 1990) und codiert für ein 15,5 kDa grosses, basisches Protein, welches *in vivo* überwiegend Homodimere ausbildet (Spassky & Buc, 1977). Die Expression von *hns* wird durch Fis reprimiert (Falconi *et al.,* 1996) und ist negativ autoreguliert (Dersch *et al.,* 1993). In der Stationärphase kommt es zu einer verstärkten Expression (Dersch *et al.,* 1993; Free & Dorman, 1995), es liegen dann bis zu 20000 H-NS-Dimere pro Zelle vor (Talukder *et al.,* 1999). Das Kälteschock-Protein CspA aktiviert die *hns*-Transkription (La Teana *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.,* 1998; Brandi *et al.*, 1999; Dersch *et al.*, 1994).
Die Bindung von H-NS erfolgt bevorzugt an gebogene, AT-reiche Sequenzen (Lucht *et al.*, 1994; Owen-Hughes *et al.,* 1992; Yamada *et al.,* 1990; Zuber *et al.,* 1994), eine spezifische Bindung durch ein DNA-Bindemotiv ist aber nicht bekannt. Das H-NS-Protein wirkt als globaler Modulator der Genexpression (Atlung & Ingmer, 1997; Ussery *et al.,* 1994). Aufgrund seiner DNA-Bindeeigenschaften ist es in der Lage, das bakterielle Chromatin zu kompaktieren (Spurio *et al.,* 1992) und eine Nukleosomen-ähnliche Struktur auszubilden (Tupper *et al.,* 1994). Im Gegensatz zu HU agiert das H-NS-Protein vermehrt im Zentrum des Nukleoidkomplexes (Dürrenberger *et al.,* 1991). Göransson *et al.* (1990) stellten ein Modell auf, welches die Wirkungsweise von H-NS als „transkriptioneller Silencer" vermutlich durch seine Bindung an ausgedehnte chromosomale Regionen erklärt. Der N-Terminus des Proteins erfüllt Funktionen in der Oligomerisierung, besitzt als Transaktivierungsdomäne interagierende Funktionen und wirkt allgemein bei Protein-Protein-Interaktionen (Ueguchi *et al.,* 1997, Williams & Rimsky, 1997; Donato & Kawula, 1999). Der C-terminale Bereich ist überwiegend durch die unspezifische DNA-Bindung gekennzeichnet, NMR-spektroskopische

Untersuchungen zeigen dort in relativer Nähe zueinander zwei distinkte DNA-Bindungsdomänen mit hoher positiver Ladung (Shindo *et al.*, 1999).
Durch Beeinflussung des DNA-Supercoilings wirkt H-NS auf die DNA-Topologie und beeinflusst damit Promotoren, welche auf Struktur-Veränderungen reagieren (Owen-Hughes *et al.*, 1992; Mojica & Higgins, 1997). Der regulatorische Einfluss von H-NS umfasst eine Vielzahl meist Umwelt-kontrollierter Gene, eine reprimierende Wirkung von H-NS geht u.a. auf folgende Gene aus: das osmotisch regulierte *proU*-Operon (May *et al.*, 1990; Lucht *et al.*, 1994; Barron *et al.*, 1987); das *bgl*-Operon (May *et al.*, 1990; Lejeune & Danchin., 1990; Mukerji & Mahadevan, 1997); das *pap*-Operon (White-Ziegler *et al.*, 1998; Forsman *et al.*, 1992); *fimB* (Donato *et al.*, 1997); *rcsA* (Ebel & Trempy, 1999; Sledjski & Gottesman; 1995) und das stationärphasen induzierte Gen *yhhP* (Yamashino *et al.*, 1998). Weiterhin ist H-NS an der Regulation von Proteinen der äusseren Membran bzw. Porinen beteiligt (Graeme-Cook *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1996). Die Rate der rRNA-Transkription (Afflerbach *et al.*, 1999; Tippner *et al.*, 1994; Afflerbach *et al.*, 1998) und eine Kontrolle des Regulatorproteins AppY (Atlung *et al.*, 1996) erfolgen ebenfalls durch H-NS. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass viele *hns*-regulierte Gene ebenfalls unter der Kontrolle des stationärphasen-Sigmafaktors RpoS stehen. H-NS wirkt ebenfalls posttranskriptionell reprimierend auf *rpoS* (Barth *et al.*, 1995; Bouvier *et al.*, 1998).
Neben seiner Rolle als transkriptioneller Repressor besitzt H-NS auch aktivierende Wirkung, die aktivierende Funktion betrifft jedoch deutlich weniger Zielgene als die reprimierende Funktion. Ein Wirkungsmechanismus für die Aktivierung ist noch weitgehend unbekannt, oft liegt ein indirekter Einfluss vor. Einer positiven Auswirkung durch H-NS unterliegen die *fimA*-Promotor-Inversion (Donato & Kawula, 1999); Erhöhung der *E. coli*-Motilität durch den aktivierenden Einfluss auf das *flhCD*-Operon (Bertin *et al.*, 1994; Donato & Kawula, 1998); Regulation des *smtA*-Gens (Yamanaka *et al.*, 1995); Aktivierung der *csiD*-Transkription (Marschall *et al.*, 1998); Aktivierung des P1-Promotors des *proU*-Operons (Dattananda *et al.*, 1991); und Aktivierung von Enzymen des aeroben Stoffwechsels (Gérard *et al.*, 1999) sowie des Maltose-Operons (Johansson *et al.*, 1998).
Weiterhin ist H-NS an der Regulation von Virulenzfaktoren beteiligt (Higgins *et al.*, 1990), wie z. B. in pathogenen *Shigellen* (Porter & Dorman, 1994; Palchaudhuri *et al.*, 1998; Prosseda *et al.*, 1998); *Salmonellen* (Robbe-Saule *et al.*, 1997) und enteroinvasiven *E. coli*-Stämmen (Prosseda *et al.*, 1998).
Aufgrund der zentralen Stellung von H-NS in der Regulation von Genexpression, Rekombination und Genomstabilität zeigen Mutationen in *hns* einen pleiotrophen Phänotyp (May *et al.*, 1990; Williams & Rimsky, 1997; Laurent-Winter *et al.*, 1997).
Proteine mit strukturellen Homologien zu H-NS finden sich ausserhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* weiterhin bei *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) und *Bordetella pertussis* (Goyard & Bertin, 1997). Proteine mit geringer struktureller Homologie zu H-NS wie das HvrA-Protein aus *Rhodobacter capsulatus* (Buggy *et al.*, 1994), oder das eukaryontische Protein BctD aus der Maus (Timchenko *et al.*, 1996), können Mutationen in *hns*

teilweise komplementieren (Bertin *et al.*, 1999). Innerhalb der *Enterobacteriaceae* findet man eine starke strukturelle Homologie der H-NS-ähnlichen Proteine bei *E. coli, Shigella flexneri, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Erwinia chrysanthemi* und *Proteus vulgaris.* Die breite Verteilung der H-NS ähnlichen Proteine demonstriert die zentrale Rolle von H-NS als Modulator der Genexpression (Atlung & Ingmer, 1997). Auffallige Ähnlichkeiten bestehen zwischen H-NS und einem weiteren DNA-Bindeprotein aus *E. coli*, StpA, die strukturelle Identität beträgt 58%.

1	M S V M L Q S L N N I R T L R A M A	*E. coli* **StpA**
1	M S E A L K I L N N I R T L R A Q A	*E. coli* **H-NS**
19	R E F S I D V L E E M L E K F R V V	*E. coli* **StpA**
19	R E C T L E T L E E M L E K L E V V	*E. coli* **H-NS**
37	T K E R R E E E E Q Q Q R E L A E R	*E. coli* **StpA**
37	V N E R R E E E S A A A A E V E E R	*E. coli* **H-NS**
55	Q E K I S T W L E L M K A D G I N P	*E. coli* **StpA**
55	T R K L Q Q Y R E M L I A D G I D P	*E. coli* **H-NS**
73	E E L L G N S S A A A P R A G K K R	*E. coli* **StpA**
73	N E L L N S L A A V K S G T K A K R	*E. coli* **H-NS**
91	Q P R P A K Y K F T D V N G E T K T	*E. coli* **StpA**
91	A Q R P A K Y S Y V D E N G E T K T	*E. coli* **H-NS**
109	W T G Q G R T P K P I A Q A L A E -	*E. coli* **StpA**
109	W T G Q G R T P A V I K K A M D E Q	*E. coli* **H-NS**
126	G K S L D D F L I	*E. coli* **StpA**
127	G K S L D D F L I K Q	*E. coli* **H-NS**

Abbildung 1: Proteinsequenzvergleich zwischen StpA und H-NS

Diese auffallende strukturelle Homologie zwischen H-NS und StpA deutet auf ein ähnliches Funktionsspektrum hin.

3.6 StpA (Suppressor of *td*-mutant phenotype A)

Ursprünglich wurde StpA aufgrund seiner Fähigkeiten isoliert, einen splicing defekten *td*-Phänotypen eines T4-Phagen zu supprimieren (Zhang *et al.*, 1995) und weiterhin in einer *hns*-Mutante die Repression des *adi*-Gens, welches für eine pH-abhängige Arginin-Decarboxylase codiert, wiederherzustellen (Shi & Bennet, 1994). Nähere Untersuchungen ergaben, dass einige *hns*-Mutationen funktionell durch StpA komplementiert werden können (Zhang *et al.*, 1996; Sonden & Uhlin, 1996), sodass StpA als ein molekularer „back-up" für H-NS angesehen werden kann.

Das *stpA*-Gen liegt bei 60,27 min. auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert, benachbart von zwei offenen Leserahmen für das *ygaP*-Gen und das *ygaW*-Gen mit bislang noch unbekannter Funktion. Das StpA-Protein besitzt mit einer molekularen Grösse von 15,4 kDa eine fast identische molekulare Grösse zu dem H-NS-Protein. Sequenzanalysen zeigen zusätzlich, dass dieses 15,4 kDa grosse StpA-Protein auch auf Aminosäureebene auffällige strukturelle Homologien zu H-NS aufweist (Zhang & Belfort, 1992; Zhang *et al.,* 1996). Daher findet man in der Literatur für StpA auch teilweise die Bezeichnung *hnsB* (Zhang *et al.,* 1996).
Zusätzlich besitzen StpA und H-NS einen ähnlichen Aufbau ihrer Domänenstruktur und können in drei funktionelle Bereiche unterteilt werden (Free *et al.,* 1998; Williams *et al.,* 1996). Dabei ist auch bei StpA der N-Terminus als Transaktivierungsdomäne beschrieben, die DNA-Bindeeigenschaft ist im C-Terminus lokalisiert. In Analogie zu H-NS besitzt auch das StpA-Protein kein spezifisches Sequenzbindemotiv, jedoch eine erhöhte Affinität für gebogene DNA. *In vivo* kommt es zur Ausbildung von Heterodimeren zwischen StpA und H-NS (Williams *et al.,* 1996).
Neben diesen strukturellen Ähnlichkeiten zeigen StpA und H-NS auch auffallende biochemische Übereinstimmungen. Im Vergleich mit H-NS bindet StpA ebenfalls bevorzugt an gebogene DNA-Fragmente und ist damit in der Lage, mit einer vergleichbaren Effiziens zu H-NS negative Supercoils zu erzeugen (Zhang *et al.,* 1996). Die Expression von *stpA* unterliegt einer starken Repression durch H-NS (Zhang *et al.,* 1996; Free & Dorman, 1997).
Mutationen in *stpA* alleine wirken sich nur geringfügig auf die bakterielle Genregulation und die Wachstumsfähigkeit aus. Zur Zeit ist noch kein Gen bekannt, welcher ausschliesslich einer Regulation durch StpA unterliegt. Mittels 2-dimensionaler Protein-Gele konnte gezeigt werden, dass nur eine geringe Anzahl momentan noch unbekannter Proteine einer direkten Kontrolle durch StpA unterliegen. Eine deutlich grössere Anzahl weiterer Proteine benötigt jedoch ein geregeltes Zusammenwirken von StpA und H-NS, sie werden in einer *stpA/hns*-Doppelmutante nicht gebildet (Laurent-Winter *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass im Gegensatz zu Mutationen in *stpA* alleine, Doppelmutationen in *stpA* und *hns* gleichzeitig durchaus Auswirkungen sowohl auf die Genexpression als auch auf das Zellwachstum ausüben. Eine Schwierigkeit, *stpA*-Phänotypen zu identifizieren, liegt zusätzlich darin, dass Mutationen in *stpA* durch die Wirkung von *hns* überdeckt werden. Dies gilt entsprechend auch für *hns*-Phänotypen, da StpA jedoch mengenmässig in einem weit geringeren Ausmass von der bakteriellen Zelle gebildet wird ist der Überdeckungseffekt von *hns*-Mutationen durch *stpA* weniger stark ausgeprägt. Daher wird es für die Suche nach weiteren *stpA* bzw. *hns*-Phänotypen wichtig, mit Stämmen zu arbeiten, welche Doppelmutationen sowohl in *stpA* als auch in *hns* tragen und den Einfluss des jeweiligen Proteins durch Komplementation zu überprüfen. Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen führen z.B. zu einer verringerten Überlebensfähigkeit beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase. Weiterhin sind beide Proteine an der Aktivierung des Maltose-Regulons beteilgt, dabei beeinflussen H-NS und StpA die Expression des Aktivatorproteins MalT und des Porinproteins LamB (Johansson *et al.,* 1998). Bezüglich der Repression des *bgl*-Operons kann StpA *hns*-Phänotypen komplementieren. Free *et al.* (1998) schlagen zur

Komplementation der *bgl*-Derepression in einer *hns*-Mutante durch StpA die Konstruktion eines „molekularen Adapters" vor, StpA stellt dabei eine funktionelle Verbindung zwischen dem mutierten H-NS-Protein und dem *bgl*-Operon her. Dieses Modell wird jedoch von Ohta *et al.* (1999) angezweifelt. Die Überexpression von StpA führt zur Komplementation weiterer *hns*-Phänotypen. Bezüglich der Repression des *pap*-Operons, des *proU*-Operons und des *hns*-Gens wirkt StpA in Analogie zu H-NS als transkriptioneller Repressor (Sonden & Uhlin, 1996).
Eine prominente Rolle spielt StpA in seiner Funktion als RNA-Chaperon, indem es unspezifisch an RNA binden und somit katalytische Funktionen beim RNA-Assembly erfüllen kann (Zhang *et al.*, 1995). Definitionsgemäss versteht man unter RNA-Chaperonen Proteine, welche die korrekte Faltung der RNA thermodynamisch begünstigen und fehlgefaltete RNA-Strukturen auflösen (Herschlag, 1995). Untersuchungen zu Funktionen der Domänen des StpA-Proteins haben gezeigt, dass die RNA und DNA-Annealing-Aktivität sowie die *trans*-splicing-Aktivität im C-Terminus lokalisiert sind (Cusick & Belfort, 1998). Auch H-NS besitzt diese typische RNA-Chaperon-Funktionen, H-NS kann ebenfalls den splicing-defekten Phänotypen eines T4-Phagen komplementieren und als RNA-Chaperon wirken, jedoch mit einer deutlich verringerten Effiziens im Vergleich zu StpA (Zhang *et al.*, 1996). Obwohl StpA ursprünglich als ein Suppressor einer Intron-Mutation isoliert wurde, haben neuere Arbeiten gezeigt, dass es eine stärkere Suppression von Exon-splicing-Defekten besitzt (Clodi *et al.*, 1999).
Die Expression von *stpA* ist transient stationärphasen-induziert; maximal liegen in der *E. coli*-Zelle bis zu 200-1000 Moleküle vor (Sonden & Uhlin, 1996; Free & Dorman; 1997; Williams & Rimsky, 1997). Damit liegt die zelluläre StpA-Konzentration mindestens um das 1000-fache niedriger als die zelluläre H-NS-Konzentration. Die *stpA*-Promotorregion weisst sich aufgrund ihres AT-Reichtum als gebogene DNA aus. Im Gegensatz zu *hns*, welches u.a. einer Regulation durch Fis unterliegt, spielt Fis in der *stpA*-Regulation keine Rolle (Free & Dorman, 1997). In Minimalmedium unterliegt StpA dagegen einem positiven Einfluss durch Lrp, dies verdeutlich sich in einem leichten Abfall der *stpA*-Expression in einer *lrp*-Mutante, dieser Effekt kann durch die Anwesenheit von Leucin ebenfalls hervorgerufen werden (Free & Dorman, 1997). Erhöhte Temperaturen und gesteigerte Osmolarität führen ebenfalls zu einem leichten Anstieg der *stpA*-Expression, C-Limitation äussert sich in einer abgeschwächten Expression (Sonden & Uhlin, 1996; Free & Dorman; 1997). Eine Anpassung an die beschriebenen Umweltsignale, wie Temperatur und Osmolarität, deutet möglicherweise darauf hin, dass die Funktionen von StpA speziell auf das Habitat des Säugerdarmtraktes abgestimmt sind.

4 Stationärphasen-Regulation

In ihren natürlichen Habitaten sind Mikroorganismen oft ungünstigen Wachstumsbedingungen mit Nährstofflimitation oder verschiedensten Stresssituationen ausgesetzt, z. B in Gewässer (Muela *et al.*, 1999). Durch solche Umweltbedingungen werden die Bakterien am exponentiellen Wachstum gehindert und überdauern diese Situationen metabolisch eingeschränkt, ohne eine Zunahme der Zellzahl und der Zellmasse (Kolter *et al.*, 1993). Da

DNA-Bindeproteine häufig wachstumsphasen-reguliert sind (Free *et al.*, 1995) und oft in der stationären Wachstumsphase verstärkt exprimiert werden (Talukder *et al.*, 1999), wird eine spezielle Beteiligung der DNA-Bindeproteine an der Stationärphasenregulation diskutiert. Unter der Stationärphase versteht man ganz allgemein eine Phase, in der die Anzahl der Bakterien abnimmt (Kolter *et al.*, 1993). In einer verlängerten Stationärphase sind besonders gram-negative Bakterien, da sie keine Sporen ausbilden, schädlichen Umwelteinflüssen, wie z. B. oxidativem Stress, Säureeinwirkung, UV-Bestrahlung, Hitzeeinwirkung und wechselnder Osmolarität ausgesetzt (Lange & Hengge-Aronis, 1991; Brown & Elliott). Eine *E. coli*-Zelle, welche sich in der Stationärphase befindet ist metabolisch nicht völlig inaktiv; ihr Proteingehalt ist jedoch bis auf 20 % reduziert. Eines der prominentesten Proteine, welches in der Stationärphase mit bis zu 180000 Molekülen pro *E. coli*-Zelle vorliegt (Talukder *et al.*, 1999), ist das Protein DPS (DNA-binding protein from starved cells), welches durch unspezifische Bindung die DNA besonders vor oxidativen Schäden schützt (Grant *et al.*, 1998; Martinez & Kolter, 1997; Michán *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 1998). Auch bei den gram-positiven Bakterien überimmt ein Dps-analoges Protein, MrgA, vergleichbare Funktionen zu DPS (Chen & Helmann, 1995; Antelmann *et al.*, 1997).

Aufgrund der vielschichtigen Umwelteinflüsse unterliegt die Stationärphase einer gesonderten Regulation, welche durch den stationärphasen-Sigmafaktor σ^s reguliert wird. Mehr als 50 unterschiedliche Gene (Hengge-Aronis, 1996; Farewell *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1999, Lazar *et al.*, 1998; Chang & Cronan, 1999; De Biase *et al.*, 1999) liegen unter der Kontrolle von σ^s. Diese stationärphasen-induzierten Proteine vermitteln der *E. coli* Zelle verstärkten Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen. Das *rpoS*-Gen, welches für den Sigmafaktor σ^s codiert, liegt auf dem *E. coli*-Genom bei 59 min; RpoS besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa. Bislang ist noch keine Konsensussequenz bekannt, welche von RpoS erkannt und bevorzugt gebunden wird.

Die Regulation von *rpoS* umfasst sehr unterschiedliche Faktoren (Hengge-Aronis, 1999; Majdalani *et al.*, 1998; Sledjeski *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1998) und findet auf Transkriptions- (Lange & Hengge-Aronis, 1991), Translations- (Muffler *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998) und Proteinstabilitätsebene (Muffler *et al.*, 1997; Kolter *et al.*, 1993) statt. Neben einer wachstumsphasen-abhängigen Regulation sowie einer vermehrten Bildung nach einem osmotischen Anstieg unterliegt RpoS ebenfalls einer Repression durch H-NS (Loewen *et al.*, 1998 Majdalani *et al.*, 1998, Sledjeski *et al.*, 1996), dabei wird sowohl die Translation als auch die Proteinstabilität durch H-NS beeinflusst (Barth *et al.*, 1995, Yamashino *et al.*, 1995). Weiterhin werden viele umweltkontrollierte Gene (Farewell *et al.*, 1998) durch ein Zusammenspiel von RpoS und H-NS moduliert.

5 Netzwerke

Enteritische Bakterien, wie z.B. *E. coli,* sind in ihren Habitaten sehr unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt und besitzen daher eine komplexe Regulation ihrer

Genexpression. DNA-Bindeproteine helfen ihnen einerseits, ihr Genom effektiv zu kompaktieren, aber andererseits eine den Umweltbedingungen angepasste, dynamische Genregulation auszubilden. Dabei wirken die histon-ähnlichen Proteine nicht nur unabhängig voneinander, sondern sind in einem komplexen Regulationsnetzwerk integriert.

Proteine, welche wichtige Funktionen beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase erfüllen, werden durch ein Zusammenspiel von H-NS und StpA reguliert (Johansson & Uhlin, 1999). Zur Einstellung eines ausgewogenen Konzentrationsverhältnisses von StpA und H-NS unterliegen beide DNA-Bindeproteine einer negativen Autoregulation, und reprimieren jeweils gegenseitig ihre Expression (Dersch *et al.,* 1993; Zhang *et al.,* 1996). In einer *hns*-Mutante wirkt StpA als molekularer „back-up" für H-NS (Sonden & Uhlin, 1996). Die *stpA*-Expression wird durch H-NS reprimiert, wohingegen eine Aktivierung durch Lrp und Umwelteinflüsse, wie z.B. Osmolarität und erhöhte Wachstumstemperatur, erfolgt (Free & Dorman, 1997; Sonden & Uhlin, 1996). H-NS unterliegt einem positiven Einfluss durch Fis (Falconi *et al.,* 1996), und wird ebenfalls durch CspA nach einem Kälteschock aktiviert (La Teana *et al.,* 1991). Durch überlappende Bindungstellen an die DNA üben Fis und H-NS antagonistische Effekte auf die Genexpression, z.B. die rRNA-Synthese, aus (Afflerbach *et al.,* 1998), ergänzen sich jedoch in ihrer Funktion bei der Aktivierung der homologen Rekombination (Landy *et al.,* 1993). Durch ein Zusammenwirken von HU und H-NS wird die homologe Rekombination ebenfalls unterstützt (Dri *et al.,* 1992). Die Replikation des *oriC* wird durch einen Komplex aus HU, IHF und Fis initiiert (Ogawa *et al.,* 1989; Roth *et al.,* 1994). Die Kompensation von HU-spezifischen Funktionen in einer HU-Mutante durch IHF wird diskutiert (Pettijohn, 1988). Sowohl HU als auch IHF aktivieren die Transposition des Phagen MU (Lavoie & Chaconas, 1994; Kano *et al.,* 1989), während H-NS die Transposition des Phagen Mu reprimiert und antagonistisch auf den aktivierenden Einfluss von IHF wirkt (Kano *et al.,* 1993). Fis aktiviert die Expression des *hupA*-Gens, reprimiert jedoch das *hupB*-Gen (Claret & Rouviere-Yaniv, 1996). Die Genexpression vieler Umwelt-induzierter Gene liegt unter dem dualen Einfluss von H-NS und RpoS (Pratt *et al.,* 1996). In einigen Fällen werden diese Gene in der exponentiellen Wachstumsphase durch H-NS reprimiert und in der Stationärphase durch RpoS aktiviert (De Biase *et al.,* 1999). RpoS wird zusätzlich von H-NS sowohl posttranskriptional als auch auf der Proteinstabilitäts-Ebene reguliert (Yamashino *et al.,* 1995; Barth *et al.,* 1995). Stationärphasen induzierte Gene, wie z.B. DPS, werden durch RpoS aktiviert (Rockabrand *et al.,* 1998; Lomovskaya *et al.,* 1994). Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Zusammenwirken nukleoid-assoziierter DNA-Bindeproteine in einem regulatorischen Netzwerk.

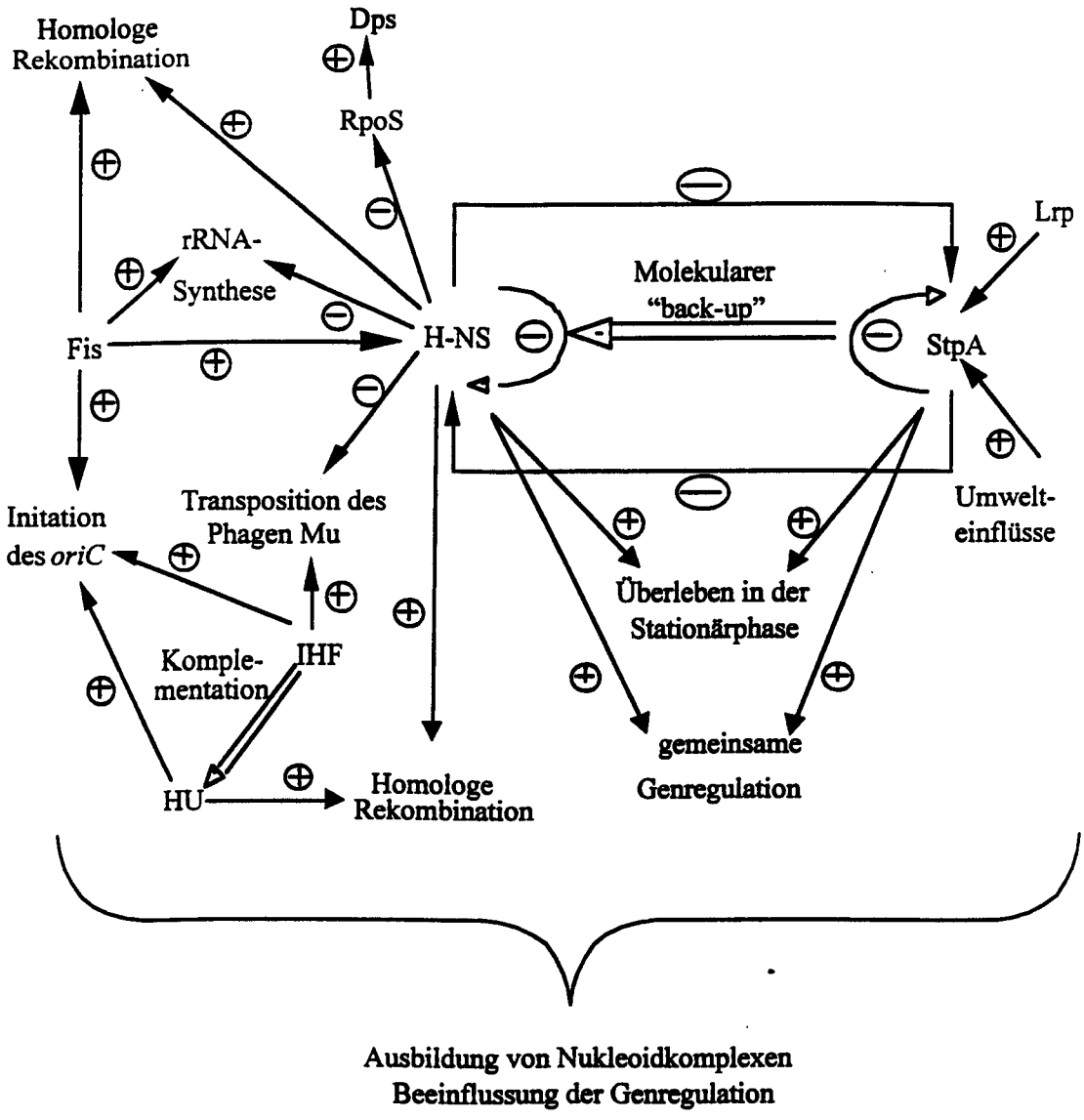


Abbildung 2: Netzwerk nukleoid-assoziierter DNA-Bindeproteine

6 Zielsetzung der Arbeit

Nukleoid-assoziierte DNA-Bindeproteine sind an der Genregulation von *E. coli* massgeblich beteiligt. Sie sind dabei in einem komplexen Netzwerk integriert wobei sie sich sowohl synergistisch als auch antagonistisch beeinflussen.

Über die Aufgaben von StpA innerhalb dieses regulatorischen Netzwerkes ist wenig bekannt sodass bislang nur seine Funktion als RNA-Chaperon und molekularer „back-up" für H-NS beschrieben wurde. In dieser Arbeit sollen Auswirkungen von Mutationen in StpA auf die Physiologie von *E. coli* untersucht werden. Weiterhin steht die Charakterisierung der *stpA*-Regulation im Mittelpunkt der Arbeit. Neben den gesonderten Betrachtungen von StpA wird auch das Zusammenwirken von StpA und H-NS untersucht, sowie der Einfluss weiterer DNA-Bindeproteine auf die *stpA*-Expression zur Auklärung der Stellung von StpA im Netzwerk der histon-ähnlichen DNA-Bindeproteine.

III. Material und Methoden

1 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
$Bgl^{+/-}$	ß-Glucosidverwertung
bp	Basenpaare
cfu	Kolonie bildende Einheit
Cml	Chloramphenincol
DTT	Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$Lac^{+/-}$	Lactoseverwertung
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
ODx	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ONPG	Ortho-nitrophenyl-ß-D-glucopyranosid
Spc	Spectinomycin
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid

2 Chemikalien und Materialien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Qiagen (Hilden) und Sigma (Deisenhofen). Die verwendeten Komplexmedien stammten von der Firma Difco (Augsburg).

3 Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Alle *Echerichia coli*-Stämme sind Derivate von *E. coli* K-12 mit Ausnahme des Stammes BL21, welcher zu den Derivaten von *E. coli* B gehört.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5α	F⁻ λ⁻ *supE44* Δ(*argF-lac*) *U169φ80lacZΔ15 hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1*	Hanahan, 1983
MC4100	F⁻ λ⁻ *araD139* Δ(*argF-lac*)*U169 deoC1 flb5301 relA1 rpsL150 ptsF25 rbsR*	Casabadan, 1976
UT5600	*proC leu6 trpE38 entA403 tsx ΔompT*	Kaufmann *et al.*, 1994
GF3	UT5600 λ_{lys} p*lac*UV5-T7-Gen1 p*lacI*^{q} *hns*	G. Forrest
W3110	F⁻ λ⁻ *rrnD⁻-rrnE⁻1*	Bachmann, 1987
EMG2	F⁻ λ⁺	Link *et al.*, 1997
WM2017	*ara Δ(lac-pro) ihfA::tet ihfB::cat thi*	Koch *et al.*, 1991
WM2650	*fis::neo hns*-2	Yasuzawa *et al.*, 1992
WM2083	λ⁻ *hupB::neo lacY1 leuB6 supK supE44 thi-1 thr-1 tonA21*	Rouviere-Yaniv, 1990
WM2084	λ⁻ *hupA::cat lacY1 leuB6 supK supE44 thi-1 thr-1 tonA21*	Rouviere-Yaniv, 1990
PD32	MC4100 *hns-206::bla*	Dersch *et al.*, 1993
PD145	MC4100 *hns-205*::Tn*10*	Dersch *et al.*, 1994
GM37	MC4100φ (*proU-lacZ*) hyb2 [λp*lac*Mu15] Kan^r	May *et al.*, 1986
BK18	MC4100φ (*proU-lacZ*) hyb2 [λp*lac*Mu15] Kan^r *rpoS359*::Tn*10*	B. Kempf, 1991
PD98	MC4100φ (*proU-lacZ*) hyb2 [λp*lac*Mu15] *lrp201*::Tn*10*	P. Dersch, 1995
RM313	MC4100 *arcA zjj*::Tn*10*	Sawers, 1992
RM314	MC4100 *arcB zgi*::Tn*10*	Sawers, 1992
Non::Tn*10*	HfrH *purE lac leu thi non*::Tn*10*	G. Weinstock
SF1	EMG2 *stpA1::spc*	diese Arbeit
SF2	MC4100 *stpA1::spc*	diese Arbeit
SF6	GM37 *stpA1::spc*	diese Arbeit
SF8	GM37 *hns-205*::Tn*10*	diese Arbeit
SF9	W3110 Δ(*argF-lac*) *U169*	diese Arbeit
SF10	EMG2 *stpA2::neo*	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 1

Stamm	Beschreibung	Referenz
SF11	SF9 *hns-206::bla*	diese Arbeit
SF12	SF9 *stpA2::neo*	diese Arbeit
SF13	MC4100 *stpA2::neo*	diese Arbeit
SF18	SF9 *hns-206::bla*; *stpA1::spc*	diese Arbeit
SF20	MC4100 *hns-206::bla*; *stpA2::neo*	diese Arbeit
SF21	MC4100ϕ (*stpA-lacZ)* hyb1	diese Arbeit
SF22	MC4100 *stpA3::spc*	diese Arbeit
SF24	SF21 *hns-206::bla*	diese Arbeit
SF25	SF21 *hns-205*::Tn*10*	diese Arbeit
SF26	SF22ϕ (*proU-lacZ)* hyb2 [λp*lac*Mu15] Kan^r	diese Arbeit
SF27	SF23ϕ (*proU-lacZ)* hyb2 [λp*lac*Mu15] Kan^r	diese Arbeit
SF32	GM37 *hns-206::bla*	diese Arbeit
SF34	SF21 *fis::neo*	diese Arbeit
SF39	MC4100 *hupB::neo*	diese Arbeit
SF41	MC4100 *hupA::cat*	diese Arbeit
SF45	MC4100 *hupA::cat*, *hupB::neo*	diese Arbeit
SF47	SF21 *ihfA::tet*, *ihfB::cat*	diese Arbeit
SF48	SF21 *hupA::cat*, *hupB::neo*	diese Arbeit
SF51	SF21 *rpoS359*::Tn*10*	diese Arbeit
SF52	SF21 *lrp201*::Tn*10*	diese Arbeit
SF58	MC4100 *rpoS359*::Tn*10*	diese Arbeit
SF59	PD32 *rpoS359*::Tn*10*, *hns206::bla*	diese Arbeit
SF60	SF13 *rpoS359*::Tn*10*, *stpA2::neo*	diese Arbeit
SF61	SF20 *rpoS359*::Tn*10*, *stpA2::neo*, *hns206::bla*	diese Arbeit
SF64	MC4100 *non*::Tn*10*	diese Arbeit
SF65	PD32 *non*::Tn*10*, *hns206::bla*	diese Arbeit
SF66	SF13 *non*::Tn*10*, *stpA2::neo*	diese Arbeit
SF67	SF20 *non*::Tn*10*, *stpA2::neo*, *hns206::bla*	diese Arbeit
SF68	SF21 *arcA zjj*::Tn*10*	diese Arbeit
SF69	SF21 *arcB zgi*::Tn*10*	diese Arbeit

Die Bezeichnung der Gene entspricht der von Bachmann (1990) vorgeschlagenen Nomenklatur. Das Symbol Φ kennzeichnet ein Genfusion, die Abkürzung hyb bezeichnet eine Genfusion, die für ein Hybridprotein codiert. Die Bezeichnung λDE3 beschreibt einen Stamm, in dem das T7-RNA-Polymerasegen unter *lacPO*-Kontrolle mit Hilfe eines λ Phagen in das Chromoson integriert wurde.

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pJL29	Vektor für *lacZ*-Proteinfusion, Amp^r	Lucht *et al.*, 1994
[a]pPD100	„low-copy-number" Expressionsvektor mit T7Ø10-Promotor, [b]pHSG575-Derivat, Cml^r	Dersch *et al.*, 1993
pPD3	*hns*$^+$-Derivat von pPD1, Cml^r	Dersch *et al.*, 1993
pOS7	Φ (*proU-lacZ*) hyb2, Amp^r	May *et al.*, 1986
pSK3	*stpA*$^+$-Derivat von pPD100, Cml^r	Dersch *et al.*, 1993
pRMK55	[c]pUC19-Derivat, Cml^r	R.M. Kappes, 1997
pSF1	*stpA*$^+$-Derivat von [c]pUCBM20, Amp^r	diese Arbeit
pSF2	*stpA1*::*spc*-Derivat von pSF1, trägt eine Spectinomycin-Kassette in der *Hpa*I-Schnittstelle	diese Arbeit
[d]pKO3	temperatur-sensitives Integrationsplasmid, Cml^r	Link *et al.*, 1997
pSF3	*stpA1*::*spc*-Derivat von pKO3, Cml^r, Spc^r	diese Arbeit
pSF4	*stpA2*::*neo*-Derivat von pSF1, trägt eine Kanamycin-Kassette in der *Nru*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pSF5	*stpA*$^+$-Derivat von pKO3, Cml^r	diese Arbeit
pSF7	*stpA2*::*spc*-Derivat von pKO3, trägt eine Spectinomycin-Kassette in der *Nru*I-Schnittstelle, Cml^r Spc^r	diese Arbeit
pSF8	*stpA2*::*neo*-Derivat von pKO3, Cml^r, Kan^r	diese Arbeit
pSF9	trägt *stpA* als *SspI*-Fragment nach PCR*, 1,114 kb, Cml^r	diese Arbeit
pSF10	Φ (*stpA-lacZ*) hyb1-Derivat des pKO3, *lacZ* wurde in die *Nru*I-Schnittstelle von *stpA* eingefügt, Cml^r	diese Arbeit

Amp^r, Cml^r, Kan^r und Spc^r sind Antibiotikaresistenzen gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Spectinomycin. [a]pPD100 ist ein Expressionvektor, der in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegt (Dersch *et al.*, 1994). [b]pHSG575 gehört zu den Klonierungsvektoren, welche ebenfalls in niedriger Kopienzahl vorliegen, beide tragen eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (Takeshita *et al.*, 1987). [c]pUCBM20 und pUC19 sind Klonierungsvektoren, welcher mit einer hohen Kopienzahl in der Zelle vorliegen und eine Ampicillinkassette bzw. eine Chloramphenicolkassette tragen (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). [d]pKO3 dient als Integrationsvektor, der aufgrund seines temperatur-sensitiven Replikationsursprunges zur Erstellung von Genmodifikationen an authentischen Genloci im Chromosom geeignet ist, er trägt eine Chloramphenicol-Resistenzkassette, 30°C stellt für pKO3 die permissive Temperatur, 42°C die nicht-permissive Temperatur dar (Link *et al.*, 1997), *PCR: Polymerase Chain Reaktion

4 Medien und Medienzusätze

4.1 Vollmedien und Minimalmedien

Vollmedien und Minimalmedien wurden nach Silhavy *et al.* (1984), Sambrook *et al.* (1989) und Miller *et al.* (1992) hergestellt. Folgende Medien wurden verwendet:

LB	Luria-Bertani
DYT	Double-Yeast-Trypton
MMA	Minimalmedium A
M9	Minimalmedium mit M9-Salzen

Bei Überexpressionsexperimenten mit Vektoren, die den T7Ø10-Promotor trugen, wurde M9-Medium mit folgenden Endkonzentrationen verwendet:

0,4 %	Glukose
0,4 %	Casaminosäuren
1 mM	$CaCl_2$
1 mM	$MgSO_4$

Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an NaCl wurde die Osmolarität flüssiger Medien variiert. Anschliessend wurde durch Gefrierpunktserniedriegung mit Hilfe eines Osmometers (Wescor, Vapor Pressure Osmometer, Typ 5500) die Osmolarität bestimmt. Zur Herstellung der Festmedien wurde 15 g Agar auf 1 l Flüssigmedium eingewogen. Die eingewogenen Substanzen wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

4.2 Indikatormedien

Zur Unterscheidung der β-Glycosidverwertung wurden Bromthymolblau-Salicin-Platten (Schnetz *et al.*, 1987) verwendet. Zusammensetzung des Indikatormediums auf β-Glycosidverwertung:

22,5 g/l	Antibiotika-Medium 2 (Difco-Laboratories)
4,0 g/l	Agar

Dem autoklavierten Medium wurden zugefügt:

50 ml	einer 10 % sterilfiltrierten Salicinlösung
10 ml	einer 2 % Bromthymolblaulösung in 50 % Ethanol
0,2 N	NaOH

Die Lactoseverwertung wurde mittels Lactose-McConkey-Platten (Miller *et al.*, 1992) untersucht.

50,0 g/l	MacConkey Agar Dehydrated (Difco-Laboratories)

4.3 Zusätze von Antibiotika

Die Identifikation von Bakterien mit der Fähigkeit zur α-Komplementation erfolgte durch den Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität. Hierzu wurde den Agarplatten der Indikatorfarbstoff X-Gal in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugegeben. Zur Induktion des *lac*-Promotors diente IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM.
Sterile Medienzusätze und Antibiotika wurden den autoklavierten und auf 50°C abgekühlten Medien zugesetzt. Folgende Antibiotikakonzentrationen wurden eingesetzt:

	Stammlösung	**Endkonzentration**
Ampicillin	100 mg/ml H_2O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml Ethanol	30 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml H_2O	50 µg/ml
Rifampicin	20 mg/ml Methanol	20 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml H_2O	50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml Ethanol	5 µg/ml

4.4 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolge ausgehend von Einzelkolonien bei 37°C entweder auf Festmedien oder in Flüssigkulturen. Dabei wurden Volumina bis zu 10 ml in Reagenzglasrollern inkubiert, grössere Volumina in Erlenmeyerkolben bei starker Belüftung (220 rpm) angezogen. Kulturen auf Festmedien wurden in temperaturkonstanten Brutschränken inkubiert. Kulturen zur Untersuchung des kältesensitiven Wachstumsverhaltens von *hns* und *stpA*-Mutanten wurden bei 20°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu Ermittlung des Langzeitüberlebensverhaltens wurden Kulturen der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 für 7 Tage in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert und täglich Proben gezogen. Die Lebendzellzahl wurde mittels Ausplattierung auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika für die jeweilige Mutation ermittelt.

4.5 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD_{578}) der Bakteriensuspension in einem Spektralphotometer (Pharmacia LKB, Ultraspec III). Eine OD_{578} von 1 entspricht einer Zelldichte von ca. 10^9 Zellen/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Das jeweilige Wachstumsmedium diente als Referenz.

5 Genetische und molekularbiologische Methoden

5.1 P1*vir*-vermittelte-Transduktion

Die Präparation von Phagenlysaten, ihre Reinigung und Vermehrung sowie Resistenz und Sensitivitätstests erfolgten nach den in Miller *et al.*, (1992) und Silhavy *et al.*, (1984) beschriebenen Methoden (P1*vir*: transduzierender Phage; Laborsammlung). Für die Herstellung eines Phagenlysates aus infizierten Stämmen wurden 50 µl an Starterlysat eingesetzt. Die P1*virvir*-Transduktion erfolgte mit 0,2 ml einer in LB gewachsenen Übernachtkultur und 0,1 ml Phagenlysat. Die Infektion wurde 20 min bei 37°C durchgeführt und durch Ausplattieren der infizierten Zellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika und 200 mM Natriumcitrat abgestoppt.

5.2 DNA-Isolation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* diente die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) oder der Qiagen-Plasmid-Kid (Qiagen, Düsseldorf). Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde ausgehend von 10 ml LB-Kulturen mit Hilfe DNA-bindender Säulen der Firma Qiagen (Qiagen tip 20) gereinigt. Die Konzentration sowie die Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA errechnete sich aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) (Sambrook *et al.*, 1989). Idealerweise sollte der Quotient bei 2 liegen.

5.3 Klonierungstechniken

DNA-Restriktionen wurden mit den entsprechenden Enzymen nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Auftrennung und Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte über 1 %-ige Agarosegele bei 120 Volt. Mittels des GeanClean-Kits (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) wurde die DNA aus Gelstücken eluiert. Dephosphorylierung der Vektorenden und Ligation wurde nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

5.4 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation (Gene-Pulser, Bio-Rad, Hercules, CA USA).
Zur Herstellung modifizierter *stpA*-Allele am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom wurde das temperatursensitive Integrationsplasmid pKO3 genutzt. Gene mit definierten Mutationen wie z.B. das *stpA*-Allel *stpA1::spc* wurden über einen *Pvu*II-Verdau aus dem Plasmid pSF2 herausgeschnitten und in die *Sma*I-Schnittstelle des Plasmid pKO3 kloniert. Mittels Elektroporation wurde das gesamte neu entstandene Plasmid pSF3 in *E. coli*-Zellen transformiert (Link *et al.*, 1997). Die phänotypische Expression der Vektorresistenz erfolgte bei

der für das Integrationsplasmid permissiven Temperatur von 30°C für 1 Stunde. Anschliessend wurde die Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Platten mit Cml (42°C) ausplattiert und weiter bei der für den Vektor nicht-permissiven Temperatur von 42°C inkubiert. Durch die Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur wurde das Plasmid zu einer Rekombination in das *E. coli*-Chromosom gezwungen, da die Replikationsfähigkeit des Integrationsplasmides durch Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur verloren geht. Kolonien, welche nach Inkubation bei 42°C auf den Cml-Platten wuchsen, wurden weiter verwendet. Die durch diese erste Selektion gewonnenen Cml-resistenten Kolonien wurden auf LB-Platten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion der doppelten Rekombination, für das *stpA*-Allel *stpA1::spc* entsprechend Spectinomycin, nicht jedoch Cml, sowie 5 % Sucrose zur Gegenselektion enthielten. Kolonien, welche auf Sucrose-Antibiotika (Spc)-Platten wuchsen, wurden zum Auffinden des doppelten Rekombinationsereignisses auf den Verlust des Vektoranteiles, welcher durch den gleichzeitigen Verlust der der Cml^r aufgezeigt wurde, überprüft. Das doppelte Rekombinationsereigniss lag entsprechend in solchen Bakterien vor, welche nur noch den gewünschten genetischen Marker, z.B. die Spc^r zeigten, jedoch nicht mehr die Cml^r trugen.

5.5 Plasmidkonstruktionen

Definierte Mutationen in *stpA* wurden zunächst auf Plasmiden konstruiert um diese Mutationen anschliessend in das *E. coli*-Chromosom zu transferrieren. Die Integration in das *E. coli*-Chromosom erfolgte in allen Fällen über die Klonierung der unterschiedlichen *stpA*-Allele in das Integrationsplasmid pKO3. In der folgenden Abbildung sind die verwendeten Schnittstellen mit den entsprechenden Antibiotikakassetten eingezeichnet sowie die Position der benutzten Primer.

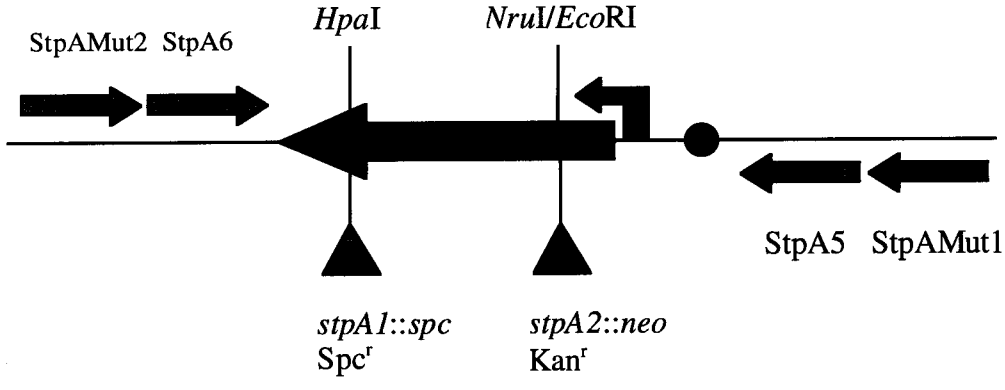


Abbildung 3: Darstellung der Lage der Mutationen *stpA1::spc* und *stpA2::neo* mit den relevanten Schnittstellen. Position der Primer *stpA* Mut1 und *stpA* Mut2, welche genutzt wurden, um das Plasmid pSF9 zu konstruieren. Die Primer *stpA* 5und *stpA* 6 dienten zur

Herstellung einer homologen DNA-Sonde, welche in Southernblot-Untersuchungen zur Bestätigung chromosomaler *stpA*-Mutanten eingesetzt wurde.

pSF1: Das Plasmid pSF1 trägt das komplette *stpA*-Gen sowie 517 bp der Promotorregion und 192 bp der stromabwärts-gelegenen Region, Cml^r

pSF2: In das Plasmid pSF1, welches das *stpA*-Gen (405 bp) sowie einen Teil der *stpA*-Promotorregion trägt (517 bp), wurde in die *Hpa*I-Schnittstelle hinter das 101. Codon eine Spectinomycin-Kassette, die aus einem Ω-Plasmid stammte (Fellay *et al.*, 1987), eingesetzt. Somit erfolgte eine Unterbrechung des *stpA*-Gen im 3´-Bereich.

pSF3: Aus dem Plasmid pSF2 wurde ein 3,1 kb grosses *Pvu*II-Fragment, welches das *stpA*-Gen mit der Spectinomycin-Insertion in der *Hpa*I-Schnittstelle trug, herausgeschnitten und in das mit *Sma*I aufgeschnittene Integrationsplasmid pKO3 eingefügt. Aufgrund seines temperatursensitiven Replikationsursprunges eignet sich das Plasmid pKO3 dazu, auf Plasmiden vorliegende modifizierte Gene in das bakterielle Chromosom zu rekombinieren.

pSF4: Um eine Unterbrechung des *stpA*-Genes in einem vorderen Bereich des Genes zu erzielen, wurde eine Kanamycin-Kassette aus dem Plasmid pBKB 21 mit den Enzymen *Sma*I und *Pvu*II herausgeschnitten und hinter das 17. Codon in die *Nru*I-Schnittstelle des pSF1 inseriert. Das *stpA*-Gen wurde somit 50 bp hinter dem Translationsstart unterbrochen.

pSF5: Das intakte *stpA*-Gen wurde als *Pvu*II-Fragment aus dem Plasmid pSF1 herausgeschnitten und in die *Sma*I-Schnittstelle des pKO3 kloniert.

pSF7: In die *Nru*I-Schnittstelle des auf dem Integrationsplasmid pKO3 vorliegenden *stpA*-Genes wurde eine Spectinomycin-Kassette, welche aus einem pHP45Ω-Plasmid stammte (Fellay *et al.*, 1987), hinter das 17. Codon inseriert.

pSF8: Aus dem Plasmid pSF4 wurde das *stpA*-Gen mit der inserierten Kanamycin-Kassette durch einen *Pvu*II-Verdau herausgeschnitten und in die *Sma*I-Schnittstelle des pKO3 ligiert. Die Konstruktion des Plasmides pSF8 ist in der Abbildung 4 gezeigt.

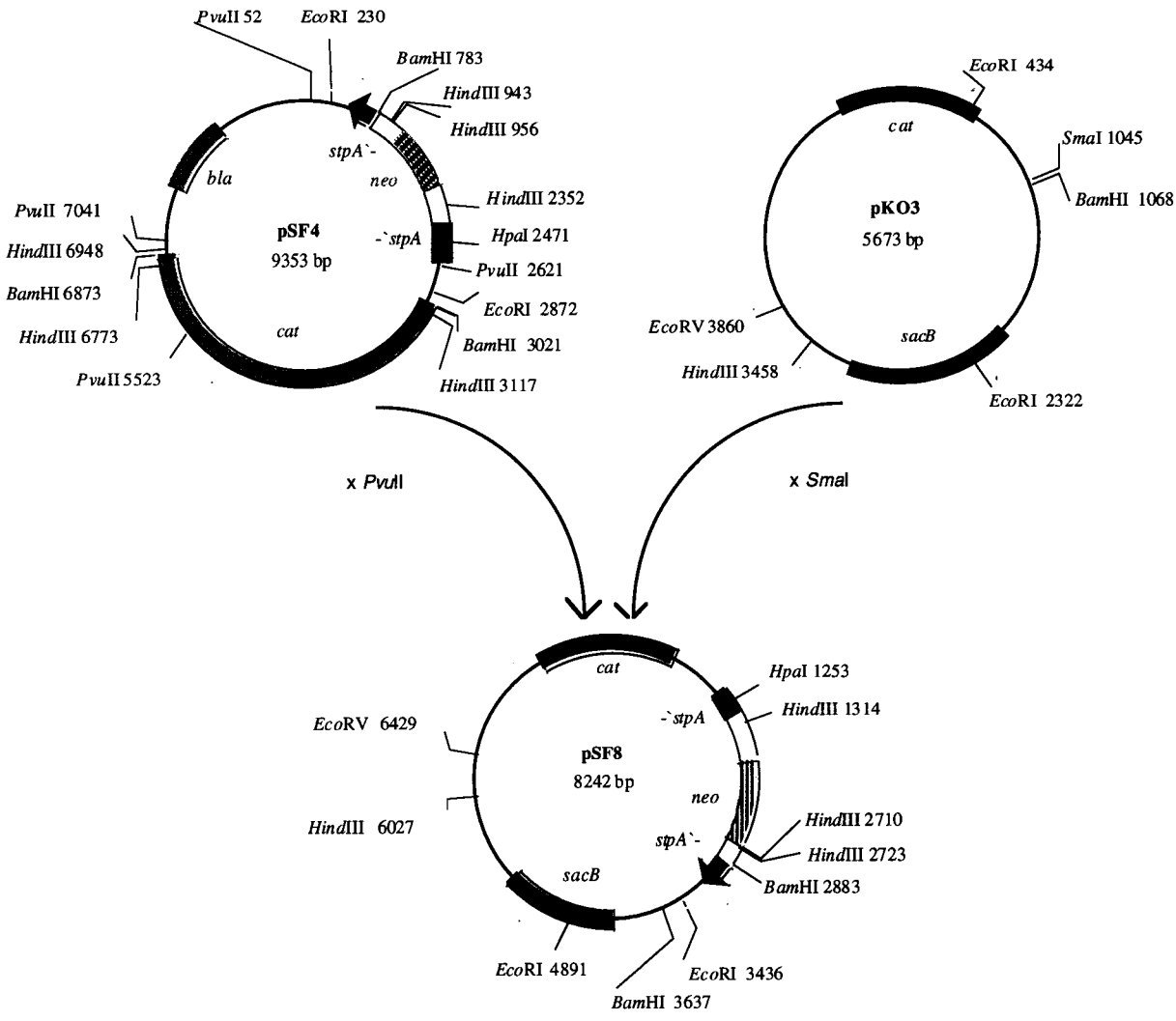


Abbildung 4: Konstruktion des Plasmids pSF8 aus den Plasmiden pSF4 und pKO3

pSF9: Zur Erweiterung der homologen flankierenden Randbereiche der *stpA*-Region für eine erleichterte doppelte Rekombination wurde über PCR mit den Primern *stpA* Mut 1 und *stpA* Mut 2 (Tabelle 3) ein DNA-Fragment amplifiziert, welches an beiden Enden eine *Ssp*I Schnittstelle trug und nach *Ssp*I-Verdau ein 1,114 kb grosses Produkt ergab. Dieses Fragment wurde in die *Sma*I-Schnittstelle des pKO3 eingefügt.

pSF10: Um eine Proteinfusion der zwischen StpA und LacZ zu konstruieren wurde aus dem *lacZ* Reportergenvektor pJL29 (Lucht *et al.*, 1994) über einen *Sma*I und einen *Dra*I-Verdau das *lacZ*-Fragment herausgeschnitten und im richtigen Leseraster in die *Nru*I-Schnittstelle des pSF9 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pSF10 trägt die Φ (*stpA-lacZ*)hyb1 Fusion. Die entstandene Reportergenfusion wurde mittels Sequenzanalyse unter Verwendung der Primer „*lacZ*-40" und „CKO3R" überprüft (Tabelle 3). Die Konstruktion des Plasmides pSF10 ist in Abbildung 5 dargestellt.

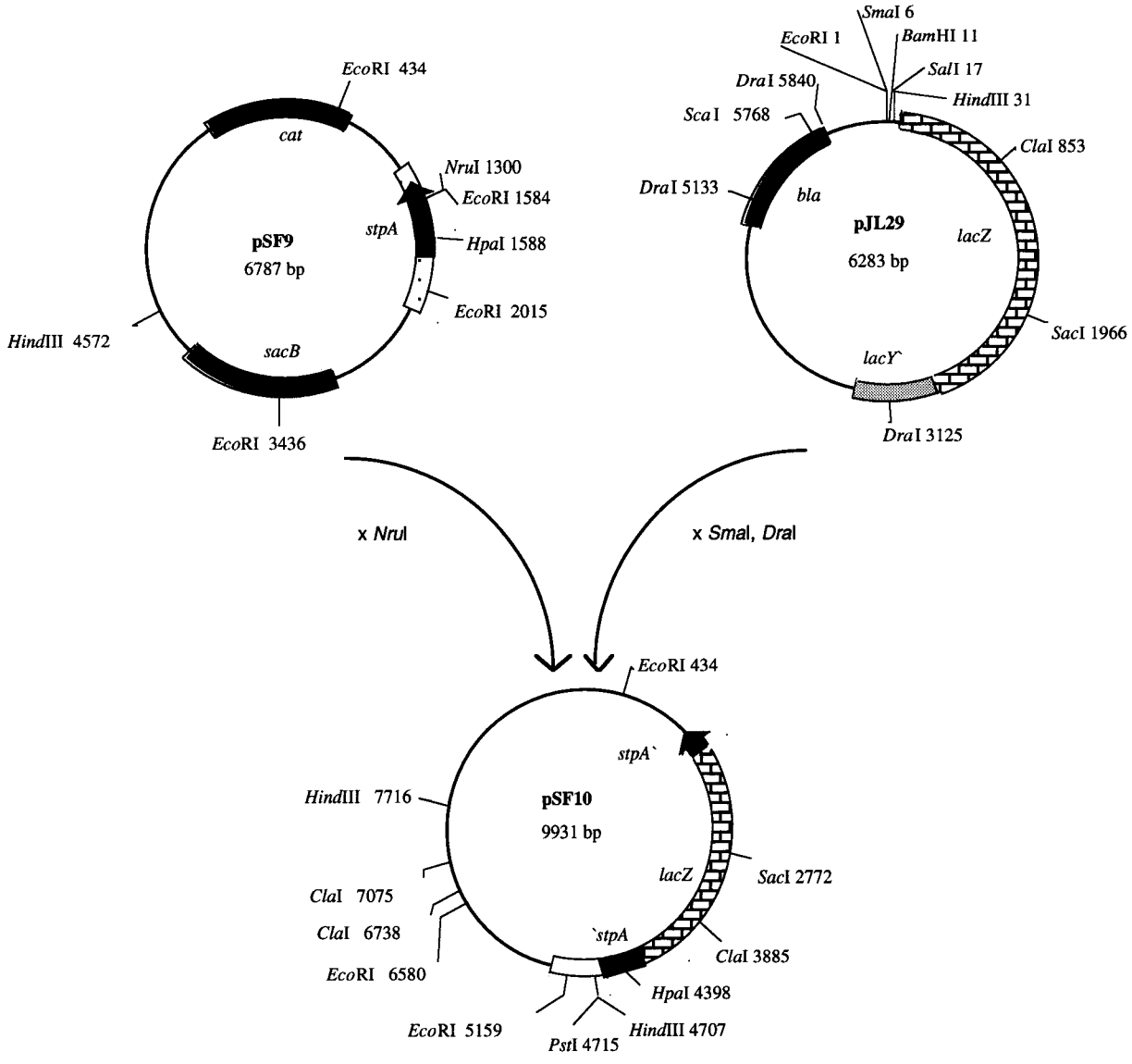


Abbildung 5: Konstruktion des Plasmids pSF10 aus den Plasmiden pJL29 und pSF9

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Sequenz(5`→3`)	Bezeichnung	IRD41
GTTTTCCCAGTCACGAC	*lacZ*-40	+
GAGGATCCGGTCCGCGGCCGC	CKO3	+
GCATTTTCGCATAGCGTATATCGC	*stpA* Mut1	-
CTCAACCCTTGCCGTTAATGCGCC	*stpA* Mut2	-
GGGGGTGAGGTAACGCTA	*stpA* 5	-
GGCTTTGTTGGTGCCGGG	*stpA* 6	-

5.6 Konstruktion von *E. coli* Stämmen

Mittels der Plasmide mit unterschiedlichen *stpA*-Allelen wurden *E. coli*-Stämme konstruiert, welche definierte chromosomale *stpA*-Mutationen trugen. Diese Stämme wurden eingesetz, um den Einfluss der unterschiedlichen *stpA*-Mutationen auf die *E. coli*-Physiologie zu untersuchen bzw. die *stpA*-Regulation näher zu charakterisieren.

SF1, SF2: Zur Konstruktion von SF1 und SF2 wurde das Plasmid pSF3, welches das *stpA*-Gen mit einer Insertion einer Spectinomycin-Kassette in der *Hpa*I-Schnittstelle trägt, in den Stamm EMG2 transformiert. Die phänotypische Expression der Cml-Resistenz erfolgte bei der permissive Temperatur von 30°C. Anschliessend wurden die Bakterien auf vorgewärmte LB-Cml-Platten (42°C) ausgestrichen und bei 42°C inkubiert. Aufgrund des Unvermögens des Vektors, sich bei 42°C zu replizieren, trugen durch die einfache Rekombination des Plasmids pSF3 in das Chromosom alle Cml^r-Kolonien, welche bei 42°C wuchsen, das gesamte Plasmid im *E. coli*-Chromosom. Um durch einen doppelten Rekombinationsschritt den Vektoranteil sowie das intakte *stpA*-Gen aus dem bakteriellen Chromosom zu entfernen und somit nur noch das mutierte *stpA*-Gen zu behalten wurden Cml^r-Kolonien auf Sucrose-Spectinomycin-Platten ausgestrichen. Da der pKO3-Vektor ein *sacB*-Gen trägt, welches ursprünglich aus *Bacillus subtillis* und damit nicht von *E. coli* stammt, erfolgte durch die Expression des *sacB*-Gens eine negative Gegenselektion auf den Vektoranteil, da das *sacB*-Genprodukt, eine Lävanase, aus der in den Platten enthaltenen Sucrose hochpolymere Polysaccharide produziert, welche von *E. coli* nicht wieder abgebaut werden können und aufgrund dieser übermässigen Schleimproduktion toxisch auf *E. coli* wirken. Sucrose wurde den Spectinomycin-Platten in einer Konzentration von 5 % zugesetzt. Spc^r-Kolonien wurden zusätzlich auf Cml-Platten ausgestrichen um sie auf Cml-Sensitivität und damit auf den Verlust des Vektoranteils zu untersuchen. Spc-resistente und Cml-sensitive Kolonien wurden durch Southernblot-Hybridisierung auf das doppelte Rekombinationsereignis überprüft. Mittels P1*vir*-Transduktion wurde die Mutation *stpA1::spc* auf den Stamm MC4100 transferiert sodass der Stamm SF2 entstand, welcher eine Unterbrechung des *stpA*-Gens im 3´-Bereich trägt.

SF10, SF13: Zur Herstellung eines Stammes, welcher eine Unterbrechung des *stpA*-Gens im 5´-Bereich trägt, wurde das Plasmid pSF8 verwendet. Es trägt eine Kanamycin-Kassette in der *Nru*I-Schnittstelle und damit im 5´-Bereich des *stpA*-Gens. Die Konstruktion des Stammes SF10 erfolgte in gleicher Weise wie bereits für SF1 beschrieben. Dabei wurde das Plasmid pSF8 in den Stamm EMG2 transformiert und anschliessend auf doppelte Rekombination selektiert. Kan-resistente und Cml-sensitive Kolonien wurden durch Southernblot-Hybridisierung auf das doppelte Rekombinationsereignis überprüft. Mittels P1*vir*-Transduktion wurde die Mutation *stpA2::neo* auf den Stamm MC4100 übertragen, aus welchem der Stamm SF13 hervorging.

SF20: Dieser Stamm wurde in vielen Wachstumsexperimenten als Doppelmutante eingesetzt. Die *hns206::bla*-Mutation wurde in den Stamm SF13 transduziert und der resultierende Stamm

SF20 trug die Resistenzen Kanamycin und Ampicillin. Sowohl *stpA* als auch *hns* waren durch Insertionen in 5´-Bereichen der Gene unterbrochen.

SF21: Um die Regulation von *stpA* am authentischen Genort zu studieren, wurde mit Hilfe des Plasmids pSF10 ϕ (*stpA-lacZ)* hyb1 eine Proteinfusion zwischen StpA zu LacZ konstruiert. Wie im Folgenden beschrieben war die Vorgehensweise zur Konstruktion von SF21 leicht modifiziert verglichen mit der Konstruktion der Stämme SF1 und SF10. Da der Stamm EMG2 ein intaktes *lacZ* trug musste das Plasmid pSF10 in den Stamm MC4100 transformiert werden, welcher eine Deletion des ganzen *lac*-Operons trägt. Kolonien, die nach Inkubation bei 42°C auf Platten mit Cml und mit X-Gal als Indikator für die *stpA-lacZ*-Fusion Cml-resistent und blau waren, wurden in Flüssigkultur (LB ohne Antibiotika) inkubiert. Nach 3-4 maligen Überimpfschritten wurden Proben entnommen und soweit verdünnt, dass nach Ausplattierung Einzelkolonien sichtbar waren. Diese Einzelkolonien eigneten sich zur Replika-Plattierung sodass eine grössere Anzahl von Kolonien untersucht werden konnte. Kolonien, die sich nach der Replikaplattierung auf LB-Platten mit X-Gal und LB-Platten mit X-Gal und Cml als blau und sensitiv gegen Cml erwiesen wurden in einem Southernblot auf das homologe Rekombinationsereigniss der *stpA-lacZ*-Fusion am authentischen Genort überprüft. Da in diesem Stamm kein durch P1*vir*-Transduktion transportierbarer Marker vorlag, konnte der Stamm SF21 nur als Rezipient für weitere Mutationen in P1*vir*-Transduktionen eingesetzt werden, um Regulationsstudien bezüglich der *stpA*-Induktion durchzuführen.

SF22: Mittels des Plasmids pSF7 konnte ein Stamm konstruiert werden, der anstelle einer Kanamycin-Kassette in der *Nru*I-Schnittstelle eine Spectinomycin-Kassette trug. Die Konstruktion erfolgte analog der Konstruktion des Stammes SF10. Durch P1*vir*-Transduktion wurde das *stpA*-Gen mit der Spectinomycinkassette in der *Nru*-Schnittstelle auf den Stammes GM37 (MC4100ϕ (*proU-lacZ*)hyb2 [λp*lac*Mu15]) übertragen und es entstand Stamm SF26. Basierend auf dem Stamm SF26 entstand der Stamm SF27, welcher eine Kombination des *stpA3*::*spc*-Allels mit der *hns206*::*bla*-Mutation trägt.

5.6.1 Konstruktion der Stämme SF11, SF12, SF18 und SF20

Die unterschiedlichen Mutationen in *stpA* und *hns* wurden ebenfalls in den *E. coli*-Wildtyp W3110 transduziert um ihren Einfluss auf die Überlebensrate zu untersuchen. Als Rezipient diente in allen Fällen SF9-Derivate.

SF11: Basierend auf dem Stamm SF9 erfolgte über Transduktion der *hns206*::*bla*-Mutation aus dem Stamm PD32 in diesen Stamm die Konstruktion des Stammes SF11.

SF12: Ebenfalls auf Grundlage des Stammes SF9 wurde der Stamm SF12 konstruiert. Dieser trug die *stpA*-Mutation *stpA2*::*neo,* als Donor diente der Stamm SF10.

SF18: Der Stamm SF12 diente als Rezipient für die *hns206*::*bla*-Mutation. Das *stpA*-Gen des Stammes SF18 war somit in seinem 5´-Bereich durch eine Kanamycin-Kassette unterbrochen.

Das *hns*-Gen dieses Stammes trug im in seinem 5´-Bereich eine Ampicillin-Kassette, als Donor für die *hns206::bla*-Mutation diente der Stamm PD32.

5.6.2 Konstruktion der Stämme SF39, SF41, SF45, SF64, SF65, SF66 und SF67

In Überlebensexperimenten wurde ebenfalls der Einfluss von Mutationen in *hupA/B* auf die Überlebensrate untersucht. Die Stämme SF39 und SF41 wurden durch P1*vir*-Transduktion der Marker *hupB::neo* und *hupA::cat* in den Stamm MC4100 erstellt, aus einer Kombination dieser Mutationen resultierte der Stamm SF45.
Die Mutation *non*::Tn*10* wurde in die Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 transferiert und der Einfluss der *non*::Tn*10*-Mutation in Kombination mit den bereits in den Stämmen vorliegenden Mutationen auf die Überlebensrate überprüft. Mutationen in den *non-mucoid*-Genen verhindern die Ausbildung eines mucoiden Phänotypen. Aus diesen Transduktionen resultierten die Stämme SF64, SF65, SF66 und SF67.

5.6.3 Konstruktionen zu Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Gene auf die *stpA*-Expression

Der Stamm SF21 bot die Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Gene auf die *stpA*-Expression zu untersuchen. Da die *stpA-lac*Z-Fusion mit keinem selektierbaren Marker verbunden vorlag, wurden selektierbare genetische Marker, die in interessanten Genen vorlagen, mittels P1*vir*-Transduktion in den Stamm SF21 transferiert.

Tabelle 4:Konstruktionen unterschiedlicher *stpA-lac*Z -Fusionen mit verschiedenen Mutationen

Verwendete Stämme	abgeleitet von **SF21** resultierende Stämme
PD 32 (Dersch *et al.*, 1993)	SF24: *hns206::bla*
PD 145 (Dersch *et al.*, 1994)	SF25: *hns205*::Tn*10*
WM2650 (Yasuzawa *et al.*, 1992)	SF34: *fis::neo*
WM 2017 (Koch *et al.*, 1991)	SF47: Doppelmutationen von *himAD*
WM2083, WM2084 (Rouviere-Yaniv, 1990)	SF48: Doppelmutationen von *hupAB*
BK 18 (Kempf, 1991)	SF51: *rpoS359*::Tn*10*
PD 98 (Dersch, 1995)	SF52: *lrp201*::Tn*10*
RM 313 (Sawers *et al.*, 1992)	SF68: *arcA zjf*::Tn*10*
RM 314 (Sawers *et al.*, 1992)	SF69: *arcB zgi*::Tn*10*

5.6.4 Konstruktion und Überprüfung von Stämmen mit Mutationen in *rpoS*

In Langzeitwachstumsexperiementen wurde u.a. der Einfluss von *rpoS* auf die Überlebensrate von *stpA* und *hns*-Doppelmutanten untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine *rpoS359*::Tn*10*-Mutation (Lange & Hengge-Aronis, 1991) in die Stämme PD32, SF13 und SF20 transduziert und dadurch die Stämme SF59, SF60 und SF61 konstruiert. Die Überprüfung der entstandenen Stämme auf ihren *rpoS*-Phänotypen erfolgte über ihre Kataloseaktivität und die Glykogenakkumulation Die Glykogenakkumulation wurde auf Agarplatten mit Zusatz von 1 % Stärke getestet (Latil-Damotte & Lares, 1977). Die Bakterien wurden dazu 2-5 Minuten mit Jod-Dämpfen von crystallinem Jod behandelt. Eine Glykogenakkumulation zeigte sich durch eine Braunfärbung der Kolonien. Die Katalase-Aktivität wurde durch Auftropfen geringer Mengen von 30 %-iger H_2O_2 (Sigma, Deisenhofen) auf die Kolonien und die Beobachtung der explosionsartigen Sauerstoffreisetzung überprüft.

5.7 Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen zur Dokumentation einer veränderten Zellmorpholgie wurden mit einem Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss Oberkoch) durchgeführt. Objektträger, welche mit einem Film aus Agarose (3 %) beschichtet waren dienten als Träger frischer Kulturen. Diese wurden im Phasenkontrast mit einer 1000-fachen Vergrösserung betrachtet.

5.8 Anaerobe Anzucht

Der Einfluss von Mutationen in ArcA/B auf die *stpA*-Expression wurde durch Vergleich der *stpA*-Expression in Zellen nach Anzucht mit und ohne Sauerstoff bestimmt. Die Anzucht erfolgte jeweils in MMA-Medium. Für aerobe Bedingungen wurden die Kulturen SF21, SF68 und SF69 bei 37°C und 220 rpm inkubiert, für das Wachstum ohne Sauerstoff wurden Injektionsflaschen der Firma Ochs (Bovenden), verwendet. Vor der Inokulation wurde das MMA-Medium in den Injektionsflaschen dreimal entgast und anschliessend die Flaschen mit Stickstoff begast. Die mit den Stämmen SF21, SF68 und SF69 beimpften Kulturflaschen wurden bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung der *stpA*-Expression wurden die OD_{578} und die ß-Galaktosidase-Aktivität jeweils in der exponentiellen (bei OD_{578} 0,5) und in der stationären Wachstumsphase (bei OD_{578} 3) bestimmt.

5.9 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Alle in dieser Arbeit durch homologe Rekombination konstruierten *E. coli*-Stämme wurden durch Southern-Blot-Hybridisierung auf ihre korrekte Integration überprüft. Die Herstellung der DNA-Sonde und die Durchführung der Hybridisierung erfolgte mit dem „DIG DNA Labelling and Detection Kit“ (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Als Sonde diente ein 939 bp Fragment des *stpA*-Gens, welches mittels PCR mit den Primern *stpA* 5 und *stpA* 6 (Tabelle 3) amplifiziert wurde.

Zur Southern-Blot-Analyse wurden 5 bis 15 µg chromosomale DNA nach Restriktionsendonuklease-Verdau über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt, mit Hilfe eines Vakuumblotsystems (VacuGene™ XL, Pharmacia LKB) bei 80 mbar Unterdruck auf eine Nylonmembran transferiert (Nytran 13N, Schleicher & Schuel) und durch UV-Bestrahlung kreuzvernetzt (UV-Stratalinker® 2400, Heidelberg). Die chemilumineszente Detektion (Lumigen™ PPD) erfolgte mit Audioradiographiefilmen (Fuji RX). Der DIG-DNA Molecular Weight Marker VII (Boehringer Mannheim) diente als Grössenstandard.

5.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Mit der PCR wurden DNA-Fragmente aus dem *stpA*-Gen nach der Methode von White (1993) in einem Trioblock (Biometra, Göttingen) amplifiziert. 0,1-0,5 µg chromosomale DNA oder 0,001-0,005 µg Plasmid-DNA wurden in einem 50 µl Ansatz mit je 10 pmol Primer, 0,2 mM dNTP`s, 1,5 mM $MgCl_2$ und 1,25 Units *Taq*-Polymerase in 1 x *Taq*-Polymerase-Puffer (Amersham) eingesetzt. Das angewendete Protokoll für die PCR-Reaction lautet: 3 min 95°C; 30 Zyklen (1 min 95°C; 1 min 55°C; je kb des zu amplifizierenden Fragments 1 min 72°C) und 5 min 72°C.

5.11 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung aller PCR-klonierten Fragmente wurde der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit" mit 7-Deaza-dGTP (Amersham) eingesetzt. Die dazu verwendeten Primer (Tabelle 3) trugen an ihrem 5`-Ende eine Infrarotfarbstoff-Markierung (IRD-41, MWG, Ebersberg). Die Reaktionsprodukte wurden auf einem LI-COR DNA-Sequenzer (Modell 4000, MWG) analysiert.

5.12 Retardationsexperimente

In Mobility-Shift-Analysen wurde die Bindung von gereinigtem StpA und H-NS an bestimmte DNA-Fragmente untersucht. Die Bindungsstudien wurden in Anlehnung an Dersch *et al.*, (1993) durchgeführt. Dazu wurden DNA-Fragmente mit den gereinigten Proteinen inkubiert und die gebildeten DNA-Proteinkomplexe auf einem Agarosegel analysiert.
Die Bindung der Proteine an die DNA erfolge in 20 µl Reaktionsansätzen in Band-Shift-Puffer (10 mM Tris-HCl pH7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 5 % Glycerin; 80 mM NaCl) mit aufsteigenden Mengen an gereinigtem Protein und 1 µg geschnittenem Plasmid. Die Reaktionsansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein 1 %-iges Agarosegel ohne Zugabe von Farbmarkern aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolge in 0,5 % Tris-Borat-EDTA-Puffer bei 100 V (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Fragmente wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Um unterschiedliche Bindungsaffinitäten des StpA-Proteins zu studieren wurde das Plasmid pSK3, welches den *stpA*-Promotor trägt, mit *Nru*I verdaut und das Plasmid pOS7, das die *proU*-Promotorregion trägt, mit *Bgl*I geschnitten und jeweils mit gereinigtem StpA inkubiert.

6 Biochemische Methoden

6.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Protein-Assay-Kit II (BioRad, München) durchgeführt. Diese Bestimmung basiert auf der Methode von Bradford (1976). Es wurden geeignete Verdünnungen der Proben gewählt, welche anhand einer mit BSA gefertigten Eichgerade photometrisch bestimmt werden konnten, und diese 5 min mit dem Farbstoffreagenz inkubiert. Die anschliessende Absorptionsmessung der Proben bei 595 nm wurde in einem Spektralphotometer durchgeführt. Als Referenz diente BSA, welches in bekannten Konzentrationen von 1 bis 15 µg zur Ermittlung einer Eichgerade eingesetzt wurde.

6.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode nach Laemmli (1970) angewendet. Die Herstellung von Ganzzellextrakten erfolgte aus 1 ml Kultur (OD_{578} ca. 1) durch Abzentrifugieren und Aufnahme in 50 µl SDS-Probenpuffer (60 mM Tris pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,001 % Bromphenolblau). Es folgte eine 5 minütige Denaturierung bei 95°C. Um die chromosomale DNA zu scheren wurden die Proben 15 min intensiv geschüttelt, weiterhin wurde 1 µl Benzonase™ (Merck, Darmstadt) zum Verdau der chromosomalen DNA zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Etwa 50 µg Protein wurden auf ein 15 %-iges Minigel (6,0 x 8,0 x 0,1 cm) aufgetragen und elektrophoretisch bei einer Laufzeit von 1 Stunde und 30 mA getrennt. Als Grössenstandard zur Bestimmung der Molekulargewichte diente der Dalton-Marker VII-L für SDS-Gelelektrophorese der Firma Sigma (14-70 kDa). Anschliessend wurden die Gele in Comassie™ Brilliant Blue G250 Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt und mit einer Lösung aus Methanol:H_2O:Essigsäure im Verhältnis 45:45:10 entfärbt.

6.3 Überproduktion von StpA und mit dem T7∅10-Promotor/T7-RNA-Polymerase-System

Die Überexpression von StpA unter der Kontrolle des T7∅10-Promotors erfolge zur Vermeidung von Kontaminationen des StpA-Proteins mit H-NS im Bakterienstamm GF3 (*hns*) nach der Methode von Tabor & Richardson, (1985) und Studier *et al.*, (1990). Der Stämme GF3 trägt eine chromosomale Kopie des Strukturgens für die T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen von *lacPO*. Dazu wurden Übernachtkulturen von GF3 mit dem Überexpressionsplasmid pSK3 in M9-Medium mit 10 mM $CaCl_2$, 0,4 % Glucose, 0,5

% Casaminosäuren (Difco, Augsburg), 1 mM $MgSO_2$ und 25 µl/ml Cml angezogen, 1:100 im gleichen Medium verdünnt und bis zu einer OD_{578} von 0,5 wachsen gelassen. Den exponentiell wachsenden Kulturen wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. IPTG induziert das vom *lacPO*-Promotor kontrollierte, chromosomal codierte Gen für die T7-RNA-Polymerase. Anschliessend wurde Rifampicin (Merck, Darmstadt) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und weiter bei 37°C inkubiert. Rifampicin hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase und führt zum Transkriptionsstop aller bakteriellen Gene, wogegen die T7-RNA-Polymerase von Rifampicin unbeeinflusst bleibt und das unter dem T7-Promotor stehende Gen stark exprimiert wird. 30 min nach der Rifampicinzugabe wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 9.500 x g geerntet.
Zur Überprüfung der Überexpression wurden die Zellen in 1/10 des Ausgangsvolumen in 1 x Probenpuffer resuspendiert und nach 5 minütigem Kochen auf ein 15 % -iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrollen wurden jeweils uninduzierte Proben, die ansonsten analog der induzierten Proben behandelt wurden, mit aufgetragen.

6.4 Reinigung von StpA

Die Reinigung von StpA erfolgte leicht modifiziert nach der Methode von Dersch *et al.*, (1993). Hiezu wurden insgesamt 20 l Zellkultur des Stammes GF3 mit dem Überproduktionsplasmid pSK3 angezogen. Die Überproduktion erfolgte wie unter 6.3 beschrieben. Der Reinigungsvorgang wurde ausschliesslich bei 4°C durchgeführt. Zum Auftrag, Waschen und Eluieren dienten Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT) und Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT, 1 M NaCl), welche durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse variierende NaCl-Konzentration erzeugten.
Nach der Überproduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 9.500 x g geerntet und in 1/10 des Ausgangsvolumens in Puffer A aufgenommen. Die Bakterien wurden mittels einer „French-Press" (3 Durchgänge, Druck der French-Press-Kammer 100 Mpa) aufgebrochen und anschliessend mit 9.500 x g zentrifugiert um intakt gebliebene Zellen vom Zellysat abzutrennen. Der Überstand wurde danach bei 27.000 x g abzentrifugiert um göbere Zellpartikel zu entfernen.

6.4.1 Reinigung von StpA

Die gewonnene Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A äquilibriert Heparinsäule (HiTrap®, 5 ml) aufgetragen. Nach dem Auftrag der Proteinlösung mit 30 ml 100 mM NaCl wurde die Säule mit 40 ml 100 mM NaCl und 30 ml 500 mM NaCl mit einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Das Protein wurde mit einem Einstufenschritt durch Waschen mit 40 ml 600 mM NaCl von der Säule eluiert und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Das durch die Verwendung der Heparinsäule vorgereinigte StpA-Protein wurde über Nacht gegen 5 l Puffer A dialysiert.

Als weiterer Reinigungsschritt diente eine Affinitätschromatographie unter Verwendung einer ds-DNA-Cellulosesäule (1 x 10 cm, Pharmacia Freiburg). Der Auftrag erfolgte mit 20 ml 100 mM NaCl auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule. Die Säule wurde mit 30 ml 350 mM NaCl mit einer Flussrate von 0,2 ml/min gewaschen, die Elution von StpA erfolgte ebenfalls in einem Einstufenschritt mit einer Salzkonzentration von 600 mM NaCl.

6.5 Herstellung eines StpA spezifischen Antiserums

Ein Kaninchen (Nr. 186) wurde mit 100 µg reinem, nativen StpA in 300 µl Phosphatpuffer mit 500 µg Adjuvans (AdjuPrime Immune-Modulator, Pierce) am 1., 2., 3., 8., 15., 29., 38., 52. und 66. Tag immunisiert. Die Blutabnahme erfolgte am 81. Tag. Die Blutzellen wurden nach einer Koagulationszeit von 2 h bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Serum vom Blutkuchen getrennt. Die Spezifität des StpA-Antiserums wurde durch Westen-Blotting mit $StpA^+$ und $StpA^-$-Zellextrakten getestet.

6.6 Immunologischer Nachweis von StpA

Um StpA immunologisch nachzuweisen wurden $StpA^+$, $H\text{-}NS^+$, $H\text{-}NS^-$ und $StpA^-$-Proben auf einem 15 %-igem SDS-Gel nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) aufgetrennt und elektrophoretisch (1 h, 100 V, 0,2 mA) auf eine Immobilon-P, 0,45 µm Membran (Millipore) geblottet. Für die immunologische Reaktion des StpA-Proteins mit spezifischen StpA-Antikörpern wurde die Membran nach Abblocken mit 5 % Milchpulver in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 % Tween) mit dem StpA-spezifischen Antiserum in einer Verdünnung von 1:10-1:100 im gleichen Puffer inkubiert. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit einem sekundären Antikörper, einem Ziegen-Anti-Kaninchen alkalischen Phosphatase-Konjungat (Sigma, Deisenhofen), gebunden, und anschliessend farblich mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitro-BlueTetrazoliumchlorid (NBT) in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$) nachgewiesen.

6.7 Präparation von äusseren Membran-Proteinen

Zur Analyse des Einflusses von StpA und H-NS auf die Zellmembranzusammensetzung wurden Membranpräparationen durchgeführt (Graeme-Cook *et al.*, 1989). Vor der endgültigen Ernte wurden die Zellen zur Entfernung störender Schleimpartikel einmal in physiologischer NaCl 15 min. bei 9.500 x g gewaschen. Die *E. coli*-Zellen wurden durch dreimaliges „French-Pressen" aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch zweimaliges Zentrifugieren bei 9.500 x g sedimentiert. Anschliessend wurden die Zellhüllen durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 31.000 x g (Kontron, Rotor SA300) vom Zellextrakt abgetrennt. Durch vorsichtige Zugabe von aqua dest. wurden die inneren Membrananteile in Lösung gebracht, während die äusseren Membranbestandteile durch erneute Zentrifugation wieder ausgefällt wurden. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt um die äusseren Membrananteile anzureichern. Das erhaltene Pellet wurde in ca. 100 µl 1 fach Probenpuffer 5 min. aufgekocht. Die Analyse der

äusseren Membranzusammensetzung in unterschiedlichen Stämmen erfolgte durch Auftrag der Proben auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel und Anfärbung mit Choomassie Brilliant Blue.

6.8 β-Galaktosidase-Enzymtest

Die *stpA-lacZ*-Fusionsstämme ermöglichten eine Charakterisierung der Regulation des *stpA*-Gens. Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte wie in Miller *et al.*, (1992) beschrieben. Hierzu wurden 50-200 µl Zellen mit 2 Tropfen Chloroform und 1 Tropfen 0,1 % SDS permeabilisiert und nach 5 minütiger Lyse bei Raumtemperatur auf 2 ml mit Z-Puffer (Miller *et al.*, 1992) aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,4 ml ONPG (4 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet und nach Gelbfärbung mit 1 ml Natriumcarbonat gestoppt. Die Extinktion der Gelbfärbung wurde photometrisch nach Abzentrifugieren der Zellreste bei 420 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz diente ein Testansatz, dem keine Zellen, nur das Wachstumsmedium zugegeben wurde. Die Berechnung der spezifischen enzymatischen β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$A_{(\beta\text{-Gal})} = \frac{OD_{420} \times 6{,}75\ \mu mol}{OD_{600} \times V \times t}$$

wobei $A_{(\beta\text{-Gal})}$ = spezifische Aktivität der β-Galaktosidase in µmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro min und mg Protein angegeben [µmol x min^{-1} x mg^{-1}] wird. Die Gleichung setzt sich aus dem Absorptionskoeffizienten von $\varepsilon = 4700 M^{-1} \times cm^{-1}$ bei 420 nm für gespaltenes ONPG zusammen.

OD_{420}	=	Optische Dichte bei 420 nm von β-Galaktosidase-Messungen
OD_{600}	=	Optische Dichte bei 600 nm der Zellsuspension , OD von 1 entspricht einer Proteinkonzentration von 107 µg/ml (Miller *et al.*, 1992)
V	=	Volumen der eingesetzten Zellsuspension in ml
t	=	Zeit der Enzymreaktion in min

Alle in dieser Arbeit angegebenen Enzymaktivitäten sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Die entsprechenden Kontrollreaktionen wurden immer gleichzeitig mit den zu untersuchenden Reaktionen gemessen.

7 Computeranalysen

Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) am National Center for Biotechnology Informations (NCBI) über das World Wide Web (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.

IV. Ergebnisse

Zur Gewährleistung einer dynamischen Genregulation spielen DNA-Bindeproteine in der Bakterienzelle eine wichtige Rolle, da sie sowohl für die Kompaktierung als auch für die Flexibilität des Genoms verantwortlich sind. H-NS liegt als eines der häufigsten DNA-Bindeproteine in der *E. coli* Zelle vor. Auffällige strukturelle Ähnlichkeiten zwischen H-NS und dem StpA-Protein warfen die Frage nach funktionellen Übereinstimmungen zwischen den beiden nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteinen auf. Zu diesem Zweck wurde *stpA* genauer charakterisiert und funktionell mit *hns* verglichen. Auf dem *E. coli*-Chromosom liegt *stpA* bei 60,27 Minuten, benachbart von zwei offenen Leserahmen. Distal von *stpA* befindet sich der Leserahmen für das Gen *ygaP*, proximal liegt der Leserahmen für das Gen *ygaW*. Die Funktion beider Gene ist bislang ungeklärt.

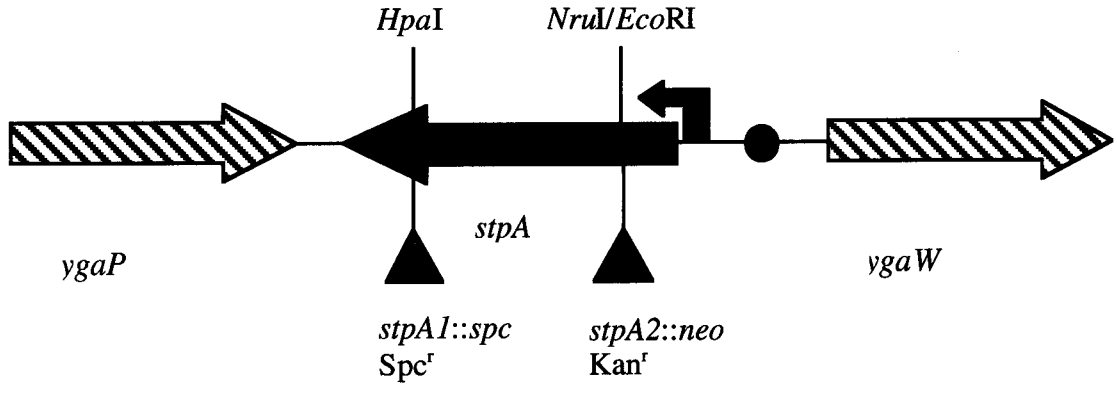


Abbildung 6: *stpA*-Organisation innerhalb des *E. coli*-Chromosoms

1 Konstruktion chromosomaler *stpA*-Mutationen

Die Konstruktion von *stpA*-Mutationen im *E. coli*-Chromosom am authentischen Genort dienten zur Funktionsaufklärung von *stpA*. Als Ausgangsplasmid zur Konstruktion definierter *stpA*-Mutationen stand das *stpA*$^+$-Plasmid pSF1 zur Verfügung, welches auf einem pUCBM20-Plasmid vorlag. Das Plasmid pSF1 trägt das 405 bp grosse *stpA*-Gen sowie 517 bp der Promotorregion stromaufwärts des *stpA*-Gens. Im Gegensatz zu *hns*, welches ohne Beeinträchtigungen der Zelle nicht auf ein Plasmid mit hoher Kopienzahl kloniert werden kann (Dersch *et al.*, 1994), ist es möglich, *stpA* sowohl auf Vektoren mit hoher als auch mit niedriger Kopienzahl zu klonieren und in der Zelle zu expremieren.

1.1 Konstruktion definierter *stpA*-Mutantion

In das intakte *stpA*-Gen wurde eine Spectinomycin-Kassette (Fellay *et al.*,1987) in die *Hpa*I-Schnittstelle hinter das 101 von 135 Codons inseriert, woraus das Plasmid pSF2 resultierte. Die Spectinomycin-Kassette trägt an den 5` und 3`-Enden Transkriptions und Translationsterminatoren, sodass ein Überlesen der Kassette verhindert wird. Das *stpA*-Gen trägt durch diese Insertion eine Unterbrechung im 3´-Bereich. Diese Mutation wurde über einen *Pvu*II-Verdau aus dem Plasmid pSF2 geschnitten und das erhaltene Fragment in die *Sma*I-Schnittstelle des Integrationsplasmid pKO3 (Link *et al.*, 1997) kloniert. Dieses Plasmid pSF3 trägt somit die *stpA*-Mutation *stpA1::spc* im 3´-Bereich des *stpA*-Gens auf einem Rekombinationsplasmid (III.5.5). Um eine Unterbrechung des *stpA*-Gens im 5´-Bereich des Gens zu erhalten wurde aus dem Plasmid pBKB21 (Kempf, 1991) die Kanamycin-Kassette über einen *Pvu*II-Verdau herausgeschnitten und in die *Nru*I-Schnittstelle des Plasmids pSF1 kloniert, daraus resultierte das Plasmid pSF4. Da die *Nru*I-Schnittstelle im 17 Codon des *stpA*-Gens liegt erfolgte eine Unterbrechung in unmittelbarere Nähe des Translationsstartpunktes. Diese Mutation des *stpA*-Gens wurde ebenfalls über einen *Pvu*II-Verdau aus dem Plasmid pSF4 herausgeschnitten und in die *Sma*I-Schnittstelle des Integrationsplasmid pKO3 kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pSF8 (III.5.5) trug das Allel *stpA2::neo* mit einer Unterbrechung im 5´-Bereich des *stpA*-Gens (Abbildung 4).
Somit wurden, analog zu Mutationskonstruktionen in *hns* (Dersch *et al.*, 1994), in unterschiedlichen Bereichen des *stpA*-Gens Insertionen erstellt um das chromosomale *stpA*-Gen an definierten Stellen zu unterbrechen. Ob diese *stpA*-Mutationen Auswirkungen auf die Genregulation in *E. coli* besitzen, wurde durch physiologische Experimente untersucht.

1.2 Transfer der *stpA*-Mutationen an authentische Genorte im *E. coli*-Chromosom

Alle auf Plasmiden vorliegenden *stpA*-Konstrukte konnten über Klonierung auf das Plasmid pKO3 (Link *et al.*, 1997) an den authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom transferiert werden (III.5.4). Die pKO3-Derivate pSF3und pSF8 wurden in *E. coli*-Stämme transformiert und bei 42°C inkubiert. Aufgrund des temperatursensitiven Replikationsursprunges des Plasmids pKO3 integrierten die Plasmide pSF3 und pSF8 über einen einfachen Rekombinationsschritt und Selektion auf Cml-Resistenz in das *E. coli*-Chromosom. Somit entstanden chromosomale Konstrukte, die jeweils sowohl eine Kopie des intakten *stpA*-Gens als auch das modifizierte *stpA*-Gen enthielten sowie den Vektoranteil des pKO3-Plasmides. Um einen zweiten Rekombinationsschritt mit Verlust des intakten *stpA*-Gens sowie des Vektoranteiles zu bewirken, und nur noch die modifizierte Kopie des *stpA*-Gens am authentischen Genort zu behalten, wurden die Cml-resistenten Kolonien in mehreren Inkubationsschritten auf LB-Sucrose-Platten ausplattiert

und auf die Insertionskassette im *stpA*-Gen selektiert. Mögliche Klone wurden auf ihre Sensitivität gegen Cml getestet , welche den Verlust des Vektoranteils und des intakten *stpA*-Gens anzeigte.

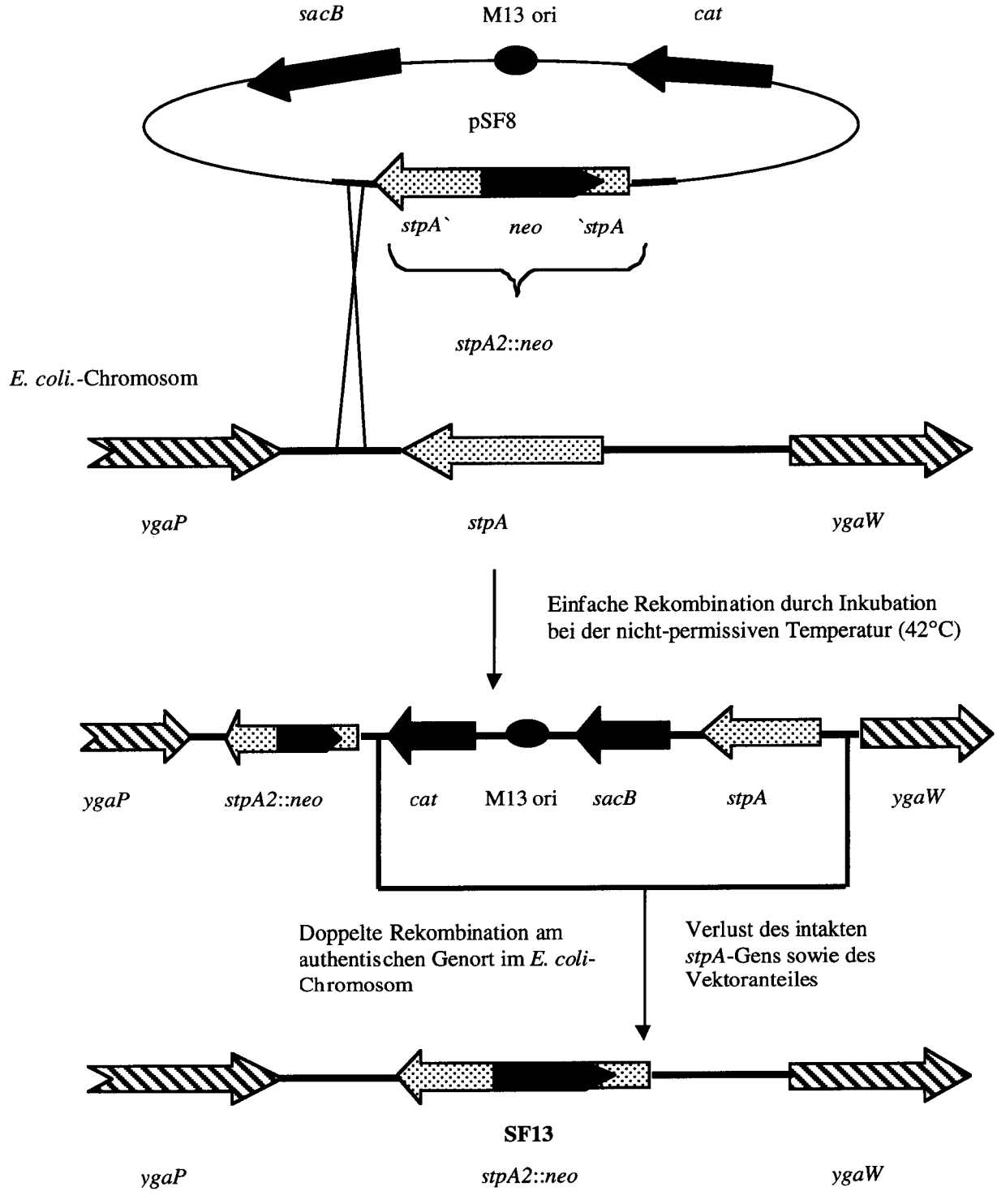


Abbildung 7: Schema der homologen Rekombination mit Hilfe des pKO3-Rekombinationssystem zur Konstruktion definierter Mutationen am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom.

Nach Bestätigung des Kolonie-Phänotypes anhand der eingesetzten Antibiotika-Marker zur Konstruktion einer chromosomalen *stpA*-Mutante, wurde die korrekte Insertion der Konstrukte am authentischen Genort durch Southernblot-Analyse überprüft. Der Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *Eco*RV ergab für den *E. coli* Wildtyp eine Bande von 8 kb. Der Stamm SF13, welcher eine chromosomale *stpA2::neo*-Mutation enthielt, wurde durch den gleichen *Eco*RV-Restriktionsverdau dreimal geschnitten. Es entstanden Fragmente von 5,5, 1,3 und 2,8 kb, da in der Kanamycinkassette ebenfalls zwei *Eco*RV-Schnittstellen enthalten waren. Insgesamt wurde durch die Kanamycinkassette ein ein zusätzliches DNA-Fragment von 1,6 kb in den Stamm SF13 eingebracht. Als Sonde diente ein markiertes DNA-Fragment, welches durch die Primer *stpA* 5 und *stpA* 6 amplifiziert wurde. Die Primer lagen jeweils vor bzw. hinter dem *stpA*-Gen (siehe auch Abbildung 3). Mittels der homologen Rekombination des Plasmides pSF8 an den authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom entstand damit der Stamm SF10 mit einer Unterbrechung des *stpA*-Gens im 5´-Bereich. Durch P1*vir*-vermittelte Transduktion wurden *stpA*-Mutationen mit Mutationen in weiteren Genen wie z. B. *hns* kombiniert. Der Einfluss von *stpA* auf das Bakterienwachstum wurde in physiologischen Experimenten untersucht, die Resultate sind im Folgenden dargestellt.

2 Struktur und Funktionsvergleiche zwischen StpA und H-NS

StpA wurde neben seiner Fähigkeit zur Suppression eines splicing-defekten *td*-Phänotyps (Zhang and Belfort, 1992; Zhang *et al.,* 1995) aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten zu H-NS entdeckt (Zhang *et al.,* 1996). Ähnlich wie H-NS handelt sich bei StpA um ein Protein von 15,3 kDa, welches aus 134 Aminosäuren aufgebaut ist. StpA aus *E. coli* zeigt zu dem DNA-Bindeprotein H-NS aus *E. coli* eine Proteinsequenzidentität von 58 %. Solch auffallende strukturelle Ähnlichkeiten deuten auf Analogien der Funktionen zwischen StpA und H-NS hin.

2.1 Funktionelle Vergleiche zwischen StpA und H-NS

2.1.1 Einfluss von *stpA* auf das Bakterienwachstum

Allgemeine Parameter, wie z. B. das bakterielle Wachstum bei 37°C, dienten dazu, die Beteiligung von StpA an Wachstumsvorgängen zu bestimmen. Dazu wurden die *stpA*-Mutante (SF13) und die *stpA/hns*-Doppelmutante SF20 in Wachstumsversuchen mit den Stämmen PD32 und dem *E. coli* Wildtyp MC4100 verglichen. Durch bereits vorliegende Daten war bekannt, dass *hns* Einfluss auf die Wachstumsrate sowohl bei 37°C als auch besonders in der Kälte nimmt (Dersch *et al.,* 1994).

2.1.1.1 Geringer Einfluss von *stpA* auf das bakterielle Wachstum bei 37°C

Nach Konstruktion einer chromosomalen *stpA*-Mutante sowie einer *stpA/hns*-Doppelmutante folgte die Untersuchung, ob diese Stämme, im Vergleich zu dem *E. coli*-Ausgangsstamm MC4100 und der chromosomalen *hns*-Mutante PD32, eine veränderte Wachstumsrate bei 37°C aufweisen. Dazu wurden die Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 in LB-Medium bei 37°C inkubiert. Durch stündliche Probennahme und Messung der OD_{578} der unterschiedlichen Kulturen konnte das Bakterienwachstum verfolgt werden, die erhaltene Wachstumskurve für das Wachstum bei 37°C ist in der Abbildung 8 dargestellt.

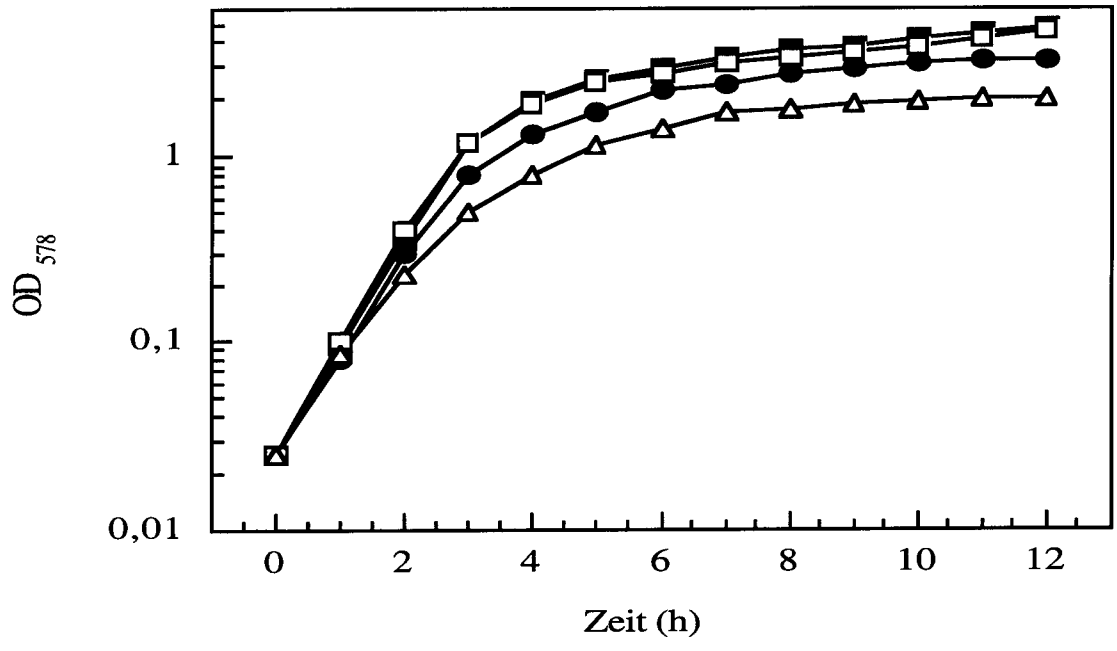


Abbildung 8: Vergleich der Wachstumskurven bei 37°C

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 *hns206::bla* (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 *stpA2::neo* (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 *hns206::bla*; *stpA2::neo* (*stpA*, *hns* Δ)

Der Stamm SF13, welcher nur die chromosomale *stpA*-Mutation im 5´-Bereich des Gens trägt, verhält sich bei einer Wachstumstemperatur von 37°C wie der *E. coli*-Wildtypstamm MC4100. Weiterhin konnten bei 37°C nur geringe Wachstumsunterschiede der *hns*-Mutante PD32 im Vergleich zum Wildtyp MC4100 beobachtet werden. Diese Unterschiede verstärken sich in der *stpA/hns*-Doppelmutante SF20. Ein Ausfall von StpA allein beeinträchtigt demnach das Bakterienwachstum bei 37°C nicht, der gleichzeitige Verlust beider DNA-Bindeproteine StpA und H-NS äussert sich jedoch in einem verringerten Wachstumsvermögen bei 37°C.

2.1.1.2 Einfluss von *stpA* und *hns* auf das Wachstums bei 18°C

In einem weiteren Wachstumsversuch, bei einer Inkubationstemperatur von 18°C und einer Inkubationszeit von drei Tagen, folgte die Untersuchung, ob *stpA* an der Kälteadaptation von *E. coli* beteiligt ist. Die Inkubation über 80 Stunden erfolgte bei 18°C, die Probenentnahme erfolgte in einem grösseren Zeitraum im Abstand von zwei Stunden über Tag, der Verlauf des Wachstums wurde ebenfalls über die Ermittlung der OD_{578} verfolgt.

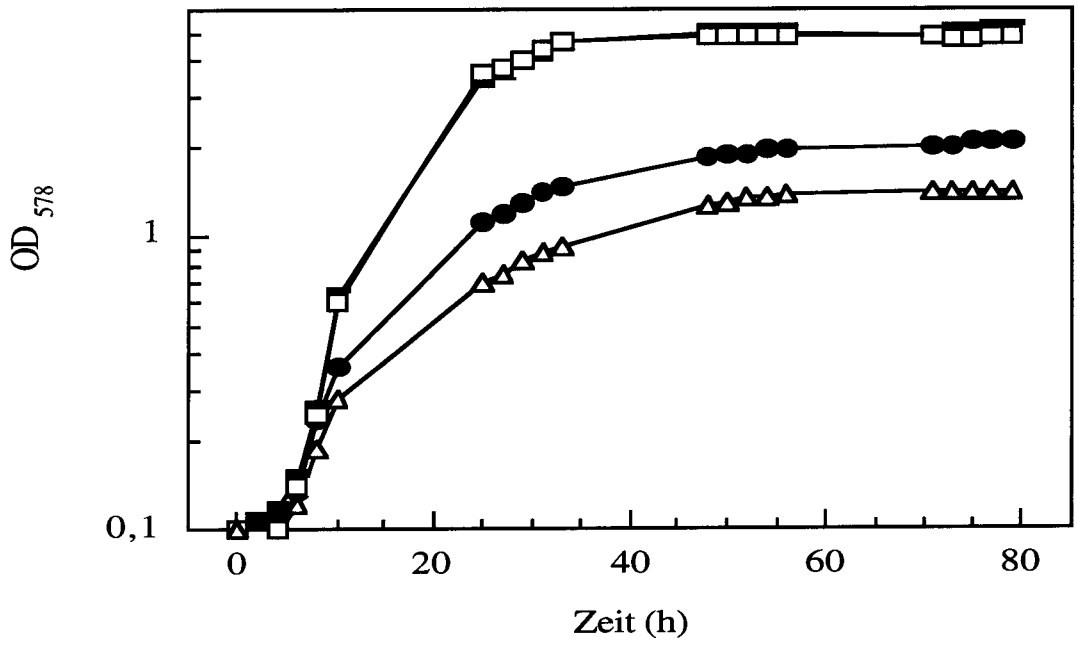


Abbildung 9: Vergleich der Wachstumskurven bei 18°C

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 *hns206::bla* (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 *stpA2::neo* (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 *hns206::bla*; *stpA2::neo* (*stpA*, *hns* Δ)

Das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Stämme bei 18°C ist vergleichbar dem Wachstumsverlauf bei 37°C (Abb. 8), Unterschiede im Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme sind jedoch deutlicher sichtbar. Auch bei 18°C zeigen Mutationen in *stpA* keine direkte Beeinflussung des Wachstumsverhalten im Vergleich zu MC4100. Beide Stämme besitzen bei 18°C eine Verdopplungszeit von 5 h. Die Verdopplungsszeit für den Stamm PD32 verlängert sich auf 10 h bei einer Wachstumstemperatur von 20°C. Dieser Wachstumsdefekt verstärkt sich bei 18°C ebenfalls durch die gleichzeitige Anwesenheit einer *hns* und *stpA*-Mutation, der Stamm SF20 besitzt bei 18°C eine Verdopplungszeit von 20 h. Ein additiver Effekt auf die Wachstumsrate zwischen *hns* und *stpA* kann also auch bei 18°C beobachtet werden. Der Unterschied im Wachstumsverhalten von PD32 und SF20 tritt bei 18°C stärker hervor als bei 37°C.

Beide Wachstumsexperimente zeigen nur einen geringen Einfluss von *stpA* alleine auf das Wachstumsverhalten, additive Effekte in einer *stpa/hns* Doppelmutante im Vergleich zu einer Mutation in *hns* alleine sind jedoch deutlich erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass einige Proteine für ihre vollständige Regulation ein geregeltes Zusammenspiel von *stpA* und *hns* benötigen.

2.1.2 Beteiligung von *stpA* an der Regulation des *proU*-Operons und des *bgl*-Operons

Das *proU*-Operon von *E. coli* besteht aus den Strukturgenen *proV*, *proW* und *proX*, es transportiert unter Salzstress die osmotische Schutzsubstanz Glycin-Betain in die Zelle (Lucht & Bremer, 1994). H-NS ist wesentlich an der Regulation von *proU* beteiligt. Es kann an eine interne Region im *proV*-Gen binden und somit das *proU*-Operon reprimieren.
Eine weitere Funktion von H-NS liegt in der Repression des kryptischen *bgl*-Operons, welches für die Verwertung von ß-Glykosiden verantwortlich ist (May *et al.*, 1996).
Für beide Modellsysteme wurde einerseits eine Beteiligung von *stpA* an der Regulation untersucht und weiterhin untersucht, ob *stpA* *hns*-Phänotypen bezüglich der Repression des *proU*-Operons und des *bgl*-Operons komplementieren und damit *hns* funktionell ersetzten kann.

2.1.2.1 Einfluss von *stpA* auf das *proU*-Operon

Das durch erhöhte Osmolarität induzierbare *proU*-Operon unterliegt einer Repression durch H-NS, dabei bindet H-NS an interne regulatorische Elemente. Mutationen in *hns* führen daher zu einer Derepression des *proU*-Operons. Im Folgenden wurde untersucht, ob StpA *hns*-Phänotypen im Bezug auf die Kontrolle des *proU*-Operons komplementieren und damit Funktionen von H-NS übernehmen kann.

Um die Repression des *proU*-Operons durch StpA zu testen wurde einem Stamm mit einer chromosomalen *proU-lacZ*-Fusion durch P1*vir*-Transduktion eine *hns206::bla*-Mutation hinzugefügt (SF32: ϕ (*proU-lacZ*)*hyb2* [λp*lac*Mu15]. Anschliessend wurden in diesen Stamm Plasmide mit hoher (pSF1) und niedriger (pSK3) Kopienzahl transformiert, die das *stpA*-Gen trugen. Als Kontrolle dienten die Vektoren pUCBM20 bzw. pPD100. Um einen Vergleich zwischen *stpA* und *hns* zu gewährleisten wurden das Plasmid pPD3, welches das funktionelle *hns*-Gen auf einem niedrig-Kopienzahl-Plasmid trug, ebenfalls in das Komplementations-Experiment eingesetzt. Die Expression des *proU*-Operons unter der Wirkung des jeweiligen Plasmids konnte anhand der gebildeten ß-Galaktosidase verfolgt werden. Der Nachweis der ß-Galaktosidase erfolgte qualitativ über Lactose-McConkey-Platten.
H-NS reprimiert das *proU*-Operon ohne Zugabe von NaCl vollständig, ein *hns*$^+$-Stamm mit einer chromosomalen *proU-lacZ*-Fusion (GM37) wächst auf einem geeigneten Nachweismedium (McConkey) mit farblosen Kolonien. Liegt in diesem Stamm eine *hns206::bla*-Mutation vor (SF32), zeigen die Kolonien aufgrund der Derepression des *proU*-Operons eine Rotfärbung. Die

Komplementation des Stammes SF32 durch *stpA* auf Plasmiden variiert in Abhängigkeit von der Kopienzahl der Plasmide. Trägt ein multi-Kopienzahl Plasmid das *stpA*-Gen (pSF1), so ist es in der Lage, auf das *proU*-Operon wirkende regulatorische Einflüsse von *hns* zu ersetzen, und die Repression des *proU*-Operons wieder herzustellen. Die Repression des *proU*-Operons erfolgt dabei in einer Weise vergleichbar der Einwirkung durch das *hns*-Plasmid pPD3, welches als positive Kontrolle dient. Eine niedrigere Konzentration von StpA, welche nach Transformation mit einem niedrig-Kopienzahl-Plasmid erreicht wird (pSK3), führt zu einer unvollständigen Repression des *proU*-Operons, was an der hellroten Farbe der Kolonien abzulesen ist. Die Komplementation des Stammes SF32 mit den Kontrollplasmiden pUCBM20 bzw. pPD100 zeigt keine Repression des *proU*-Operons, die Kolonien bleiben weiterhin rot.

Die in Abbildung 10 gezeigten Ergebnisse bestätigen den beschriebenen Einflüsse von Plasmid-codierten *stpA* bzw. *hns* nach Einsatz der Versuchsansätze in einem ß-Galaktosidase-Assays

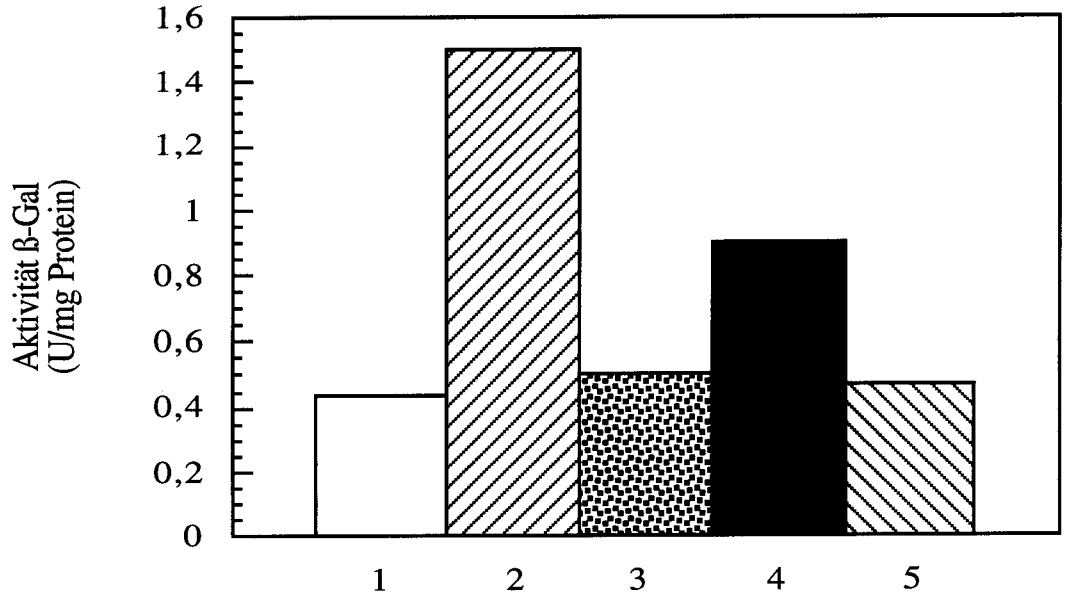


Abbildung 10: Repression von *proU* durch StpA

Spur 1: GM37 (MC4100 ϕ (*proU-lacZ*)*hyb2* [λp*lac*Mu15], Spur 2: SF32 (MC4100 ϕ (*proU-lacZ*)*hyb2* [λp*lac*Mu15] *hns206*::*bla*), Spur 3: SF32 komplementiert mit pPD3 (low-copy; *hns*$^+$), Spur 4: SF32 komplementiert mit pSK3 (low-copy; *stpA*$^+$), Spur 5: SF32 komplementiert mit pSF1 (high-copy; *stpA*$^+$)

In einem *hns*$^+$-Hintergrund liegt das Basalniveau der *proU-lacZ*-Fusion bei 0,44 MillerU/mg Protein (Spur 1). Die Einführung einer *hns206*::*bla*-Mutation führt zu einer Derepression des *proU-lacZ*-Operons, welche an einem Anstieg der ß-Gal-Aktivität um das 3,5-fache auf einen Wert von

1,5 MillerU erkennbar ist (Spur 2). Die Komplementation der *hns*-Mutation durch das low-copy *hns*-Plasmid pPD3 reprimiert das *proU*-Operon vollständig auf das ursprüngliche Basalniveau (Spur 3), ebenso ersetzt das *stpA* high-copy Plasmid pSF1 diese Funktion (Spur 5). Hingegen können geringere Konzentrationen von StpA, welche durch die Einführung des low-copy-Plasmides pSK3 produziert werden, den *hns*-Phänotyp nur unvollständig ausgleichen (Spur 4).

2.1.2.2 Das kryptische *bgl*-Operon unterliegt einer Regulation durch *stpA*

Ein weiterer *hns*-Phänotyp wird durch die Derepression des kryptischen *bgl*-Operons deutlich. Das *bgl*-Operon codiert für Gene, welche für die Verwertung von aromatischen ß-Glykosiden, wie z.B. Salicin, verantwortlich sind. Hier spielt H-NS ebenfalls eine Rolle bei der Regulation. Die Repression bzw. die Derepression dieses Operons in einem *hns*-Stamm kann durch Platten dargestellt werden, die als Substrat Salicin, und als Indikator für die Salicinverwertung Bromthymolblau enthalten. Komplementiert man einen *hns*-Stamm mit unterschiedlichen *stpA*$^+$-Plasmiden wird erneut der Zusammenhang zwischen der Kopienzahl des Vektors und damit der intrazellulären StpA-Konzentration und dem Grad der Repression des *bgl*-Operons deutlich.
Blaue Kolonien auf BS-Platten zeigen eine Repression des *bgl*-Operons an, durch die Derepression dieses Operons in einer *hns*-Mutante kommt es aufgrund des Indikatorumschlages nach Salicinverwertung zu einer Gelbfärbung. Es wird deutlich, dass StpA in Abhängigkeit von seiner Konzentration in der Zelle die Repression des *bgl*-Operons in unterschiedlichem Ausmass komplementieren kann. Im Vergleich zu einem low-copy *hns* Plasmid (pPD3), welches das *bgl*-Operon in einem *hns*-Stamm vollständig reprimiert kann ein low-copy *stpA*-Plasmid (pSK3) den *hns*-Phänotyp nur unvollständig ausgleichen, eine vollständige Komplementierung des *bgl*-Operons wird wiederum nur durch das multi-copy *stpA* Plasmid (pSF1) erreicht. Mittels dieser Testverfahren erfolgte der qualitative Nachweis, dass StpA funktionelle Ausfälle von H-NS bei der Regulation des *bgl*-Operons ebenfalls komplementieren kann. Um die vollständige Funktion von H-NS zu ersetzen, muss StpA jedoch in höherer Konzentration in der Zelle vorliegen, als im Vergleich zur vollständigen Funktion von H-NS bezüglich der Repression des *bgl*-Operons notwendig ist.

2.1.2.3 Auswirkungen unterschiedlicher *stpA*-Mutationen auf die Repression des *proU*-Operons

Für das *proU*-Operon und das *bgl*-Operon konnte der qualitative bzw. quantitative Beweis für die Komplementation einer *hns*-Mutation durch *stpA* erbracht werden. Die Ermittlung der ß-Galaktosidase-Aktivität durch die *proU-lacZ*-Fusion gibt Auskunft über die Bedeutung unterschiedlicher chromosomaler *stpA*-Mutationen auf die Repressionsfähigkeit von StpA. In einem ß-Galaktosidase-Assay wurde die *proU-lacZ*-Fusion unter dem Einfluss unterschiedlicher chromosomaler *stpA* (*stpA1::spc; stpA3::spc*) und *hns* (*hns205*::Tn*10; hns206::bla*)-Mutationen

vermessen. Die spezifische ß-Galaktosidase-Aktivität wurde aus Stationärphase-Kulturen der unterschiedlichen Stämme bestimmt.

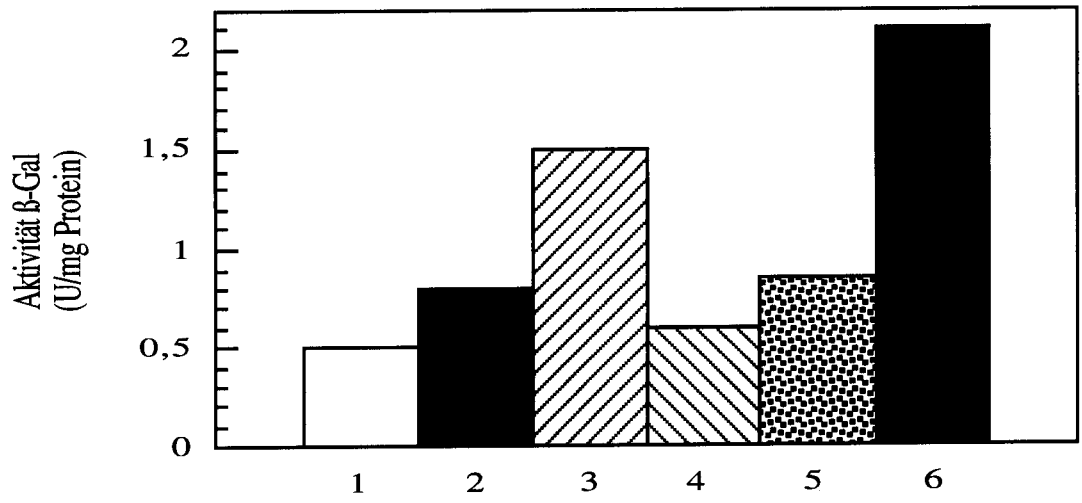


Abbildung 11: Einfluss chromosomaler Mutationen in *stpA* und *hns* auf die *proU-lacZ*-Expression

Spur 1: GM37 (MC4100 ϕ(*proU-lacZ*)*hyb2* [λ*plac*Mu15]), Spur 2: SF8 (GM37 *hns205::*Tn*10*), Spur 3: SF32 (GM37 *hns206::bla*), Spur 4: SF6 (GM37 *stpA1::spc*), Spur 5: SF26 (GM37 *stpA3::spc*), Spur 6: SF27 (GM37 *stpA3::spc*; *hns206::bla*)

Mutationen in *hns* wirken sich entsprechend ihrer Lokalisation auf die Repression von *proU* aus. Im Vergleich zu einem *hns*$^+$-Stamm (Spur 1) mit einem Basalniveau der *proU-lacZ*-Expression von 0,5 MillerU/ mg Protein, schwächt eine Insertionen im hinteren Bereich von *hns* (Spur 2) die Repression des *proU*-Operons in einem geringeren Masse (0,8 MillerU), als eine Mutation im 5´-Bereich (1,5 MillerU) von *hns* (Spur 3). Eine ähnliche, jedoch schwächer verlaufende Auswirkung wird deutlich, wenn Mutationen in unterschiedlichen Positionen von *stpA* liegen. Auch hier zeigt eine Mutation, die im 5´-Bereich des Gens liegt, eine stärkere Auswirkung (0,9 MillerU) auf die Repression von *proU* (Spur 5), als eine Mutation im 3´-Bereich von *stpA*, die nicht zu einer Derepression des *proU*-Operons (Spur 4) im Vergleich zum *hns*$^+$-Stamm (Spur 1) führt. Eine Beteiligung beider Proteine an der Regulation wird besonders nach einer Kombination beider Mutationen, jeweils in 5´-Bereichen der Gene (Spur 6), deutlich. Die ß-Galaktosidase-Aktivität und damit die *proU*-Aktivität ist um ein fünf-faches verstärkt im Vergleich zum Wildtyp. Durch die *hns206::bla*-Mutation alleine steigt die ß-Galaktosidase-Aktivität um ein drei-faches an. Zur

vollständigen Repression des *proU*-Operons ist dementsprechend die Beteiligung beider DNA-Bindeproteine erforderlich.

2.1.2.4 Mutationen in *stpA* und *hns* verändern dieOsmosensität der Zelle

Das *proU*-Operon reagiert auf unterschiedliche Osmolaritäten, wobei seine Transkription mit steigender Osmolarität zunimmt. Mutationen in *hns* führen zu einer veränderten Anpassung an steigende Osmolaritäten. Die Salz-induzierte *proU*-Expression geht dabei nicht verloren, sie steigt jedoch auf ein höheres Transkriptionsniveau an. Mutationen in *hns* täuschen damit der Zelle eine höhere Salzkonzentration vor (Higgins *et al.*, 1988), als tatsächlich vorliegt. Da *stpA* sowohl in der Lage ist, an regulatorische Bereiche des *proU*-Operons zu binden (III.3.3.1) als auch funktionell auf *proU* reprimierend zu wirken (III.2.1.2.1), wurde untersucht, ob chromosomale Mutationen in *stpA* ebenfalls die Korrelation zwischen Transkriptionsstärke und tatsächlicher Osmolarität verändern. Auch hierbei wurde die *proU-lacZ*-Expression über die Bildung der ß-Galaktosidase verfolgt. Dazu wurde die ß-Galaktosidase-Aktivität aus Stationärphase-Kulturen der Stämme GM37, SF32, SF26 und SF27 nach Inkubation mit variierenden Konzentrationen an NaCl bestimmt

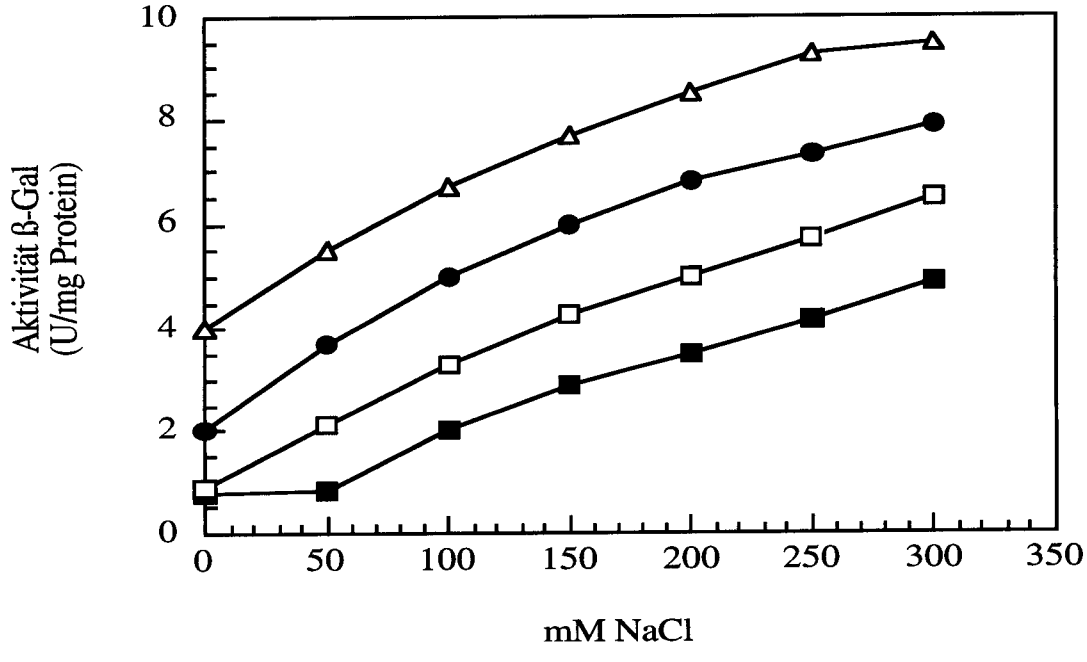


Abbildung 12: Veränderte Osmosensität durch Mutationen in *hns* und *stpA*

GM37 (MC4100 ϕ(*proU-lacZ*)hyb2 [λp*lac*Mu15]), *stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); SF32 (GM37 *stpA*$^+$, *hns* ●); SF26 (GM37 *stpA*, *hns*$^+$ □); SF27 (GM37 *stpA*, *hns* Δ)

Ein Anstieg der Salz-Konzentration führt in allen Kulturen zu einem Anstieg der *proU*-Transkription. Dabei bewirken in dem *hns*$^+$-Stamm GM37 erst Osmolaritäten höher als 50 mM NaCl eine verstärkte *proU*-Transkription. Sowohl Mutationen in *stpA* als auch in *hns* täuschen der Zelle eine höhere Osmolarität vor. Mutationen in *stpA* führen durchschnittlich zu einer Erhöhung der *proU*-Expression um 30%, eine Erhöhung um ca. 60% erfolgt durch die Mutation in *hns*. Die Beteiligung beider Proteine an der *proU*-Regulation führt zu der deutlichsten Verschiebung der ursprünglichen Korrelation zwischen Osmolarität und *proU*-Transkription. In der *stpA/hns*-Doppelmutationen des Stammes SF27 verdoppelt sich die *proU*-Expression. Die lineare Abhängigkeit beider Parameter geht jedoch weder durch Mutationen in *stpA* noch in *hns* verloren. Neben der eigentlichen Repression des *proU*-Operons (III.2.1.2) erfüllt *stpA* auch Funktionen, die an der Salz-korrelierten Expression des *proU*-Operons beteiligt sind.

3 Das StpA-Protein

Neben genetischen Untersuchungen wurde das StpA-Protein in Bindeassays eingesetzt, um die Bindungsaffinitäten des Proteins an unterschiedlichen DNA-Bereichen zu ermitteln. Ähnliche Untersuchungen, mit gereinigtem H-NS Protein in kompetetiven Band-Shift-Assays, ergaben Bindungsaffinitäten von H-NS zur *hns*-Promotorregion und zu der *proU*-Promotorregion (Lucht *et al.*, 1994). Mittels eines geeigneten Überproduktions und Reinigungsverfahrens (Dersch *et al.*, 1993) wurde das StpA-Protein isoliert (III.6.4.1), und stand für Bindungsstudien zur Verfügung. Das gereinigte StpA-Protein fand weiterhin Verwendung zur Gewinnung eines StpA-Antiserums.

3.1 Überexpression und Reinigung von StpA

Die Überproduktion von StpA erfolgte ausgehend von 20 l des Überexpressionsplasmides pSK3 im Stamm GF3, wie unter III.6.3 beschrieben. Zur Überproduktion des Proteins fand das T7∅10-Promotor/T7-RNA-Polymerase-System (Studier *et al.*,1990) Verwendung. Als Kontrolle für die Überproduktion dienten Proben, welche nicht mit IPTG induziert wurden.
Die Reinigung der Zellextrakte erfolgte über Affinitätschromatographie (III.6.4). Zur Vorreinigung diente eine Heparinsäule. Die endgültige Reinigung des StpA-Proteins erfolgte über eine dsDNA-Cellulose-Matrix (Spassky & Buc, 1977). StpA wurde mittels eines Stufen-Reinigungsverfahren von der Matrix eluiert. Die Überproduktion des StpA-Proteins sowie das Ergebnis der Reinigung sind in Abbildung 13 dargestellt.

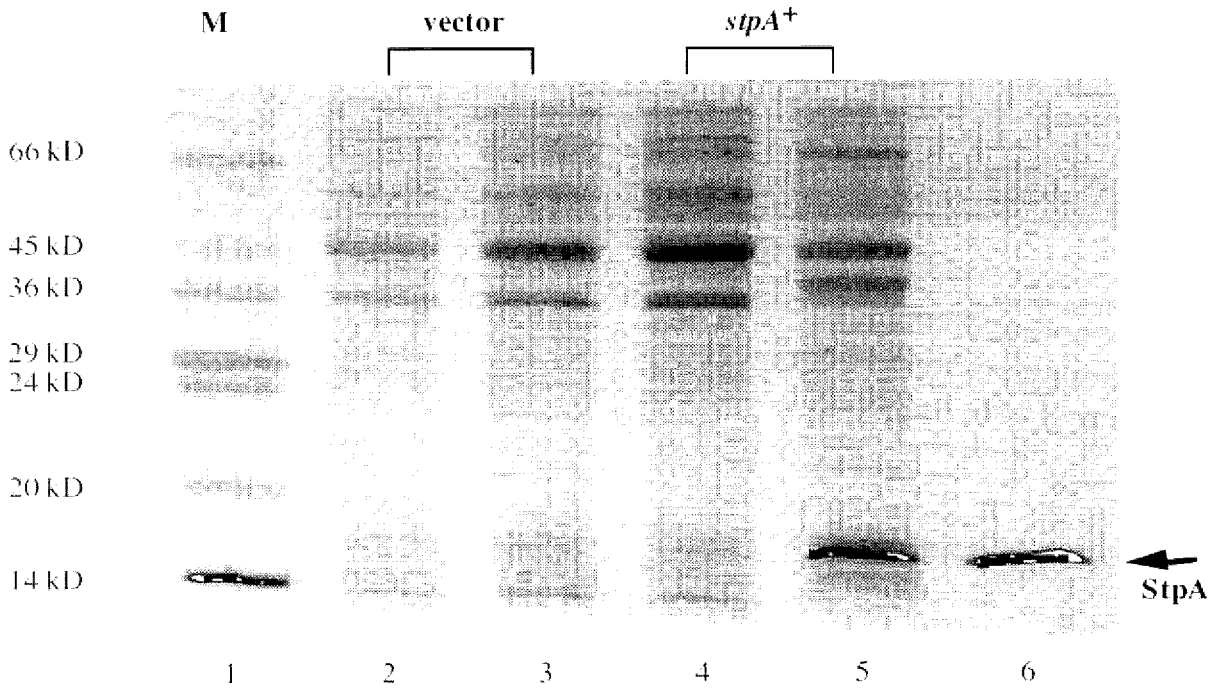


Abbildung 13: Überproduktion und Reinigung von StpA

Die Darstellung erfolgt auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel
Spur 1: Kilodaltonmarker; Spur 2: Gesamtzellextrakt GF3 mit dem Überexpressionsplasmid pPD100 nicht induziert; Spur 3: Gesamtzellextrakt GF3 mit pPD100 nach Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 4: Gesamtzellextrakt GF3 mit dem *stpA*-Überexpressionsplasmid pSK3 nicht induziert; Spur 5: Gesamtzellextrakt GF3 mit dem *stpA*-Überexpressionsplasmid pSK3 mit 1 mM IPTG induziert; StpA nach Reinigung über Affinitätschromatographie.

Die Induktion des Stammes GF3, welcher nur das Überproduktionsplasmid pPD100 ohne das *stpA*-Gen trägt, führt weder ohne (Spur 2) noch nach Zugabe von 1 mM IPTG (Spur 3) zu einer vermehrten Bildung von StpA. Auch in der nicht induzierten Probe des Stammes GF3, welcher das *stpA*-Überproduktionsplasmid pSK3 trägt, ist keine gesteigerte StpA-Produktion erkennbar (Spur 4). Die Induktion des Stammes GF3, welcher das Plasmid pSK3 trägt, mit 1 mM IPTG, lässt hingegen eine deutliche Bildung von StpA erkennen (Spur 5). Nach Reinigung dieser Kultur (III.6.4.1) konnte das StpA-Protein als sauberes Protein in der Coomassie-Färbung dargestellt werden (Spur 6) und stand mit einer Ausbeute von 0,3 µg/µl zur Verfügung.

3.2 Gewinnung und Überprüfung eines Antiserums gegen StpA

Die Gewinnung eines Antiserums gegen StpA erfolgte durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem gereinigten StpA-Protein (III.3.2). Anschliessend fanden Ganzzell-Extrakte der Stämme MC4100 (*hns*$^+$, *stpA*$^+$), PD32 (*hns*), SF13 (*stpA*) und SF20 (*stpA*, *hns*) Verwendung, um das gewonnene StpA-Antiserum in einem Westernblot auf seine Spezifität zu testen (III.6.6). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:100 eingesetzt.

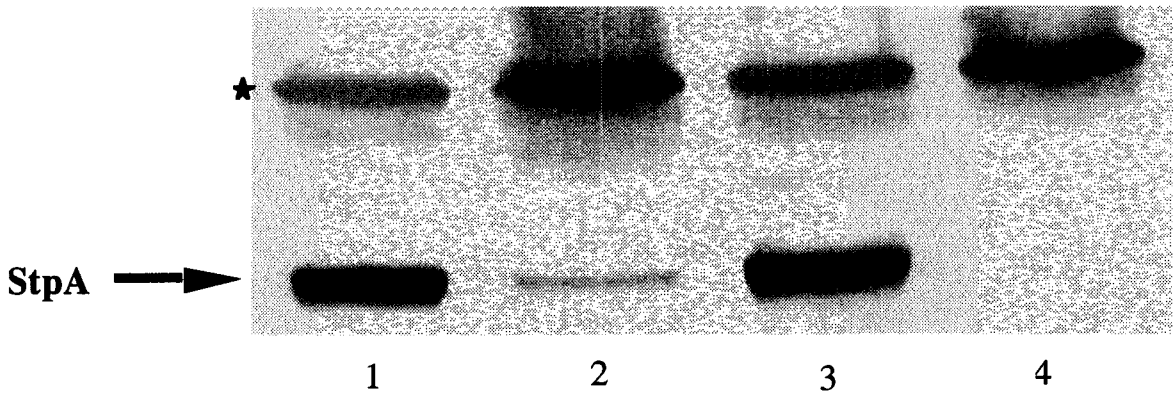


Abbildung 14: Westernblot mit StpA-Antiserum

Der Auftrag der Ganzzellextrakte erfolgte auf einem 15 % igen SDS-Polyacrylamidgel
Spur 1: Ganzzellextrakt MC4100 (StpA$^+$, H-NS$^+$); Spur 2: Ganzzellextrakt PD32 (StpA$^+$, H-NS$^-$); Spur 3: Ganzzellextrakt SF13 (StpA$^-$, H-NS$^+$); Spur 4: Ganzzellextrakt SF20 (StpA$^-$, H-NS$^-$); ★: unspezifische Bande, die in allen Proben mit dem StpA-Antikörper kreuzreagiert

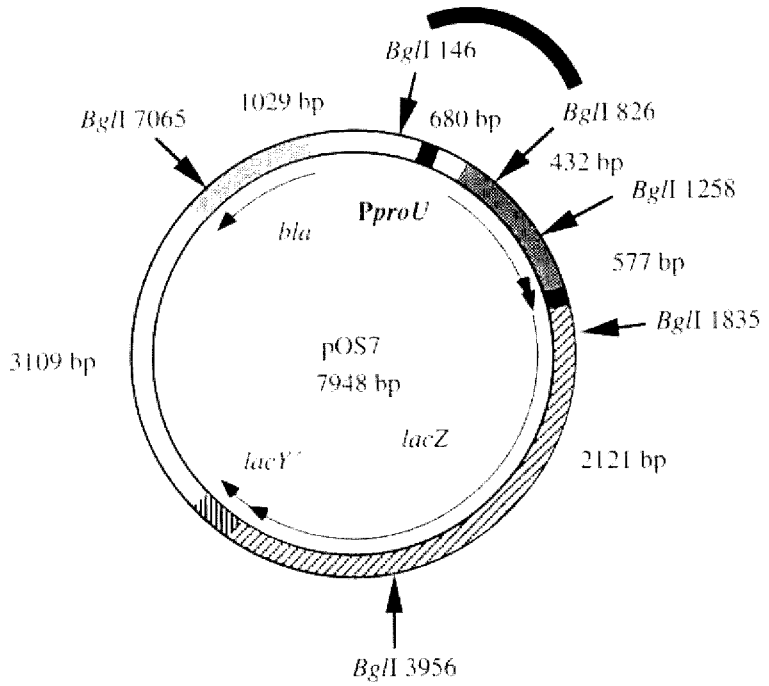
In den Stämmen MC4100 (Spur 1) und SF13 (Spur 3) kommt es aufgrund der ausgeprägten Homologie von StpA zu H-NS zu Kreuzreaktionen. Obwohl der Stamm SF13 eine chromosomale *stpA*-Mutation trägt, kann aufgrund der Kreuzreaktion von H-NS mittels des StpA-Antiserums kein Unterschied zwischen einem *stpA*$^+$ und einem *stpA*-Stamm beobachtet werden. Die Ausbildung eines spezifischen Reaktionsproduktes unterbleibt lediglich in Stamm SF20, dem sowohl das StpA als auch das H-NS-Protein fehlt (Spur 4). Anhand einer zusätzlichen Bande aufgrund einer unspezifischen Kreuzreaktion wird deutlich, dass in allen Spuren ungefähr gleiche Mengen an Ganzzellextrakt aufgetragen wurden. StpA liegt nur in geringer Menge in der Zelle vor, dies ist deutlich an der schwachen Bande im Stamm PD32 erkennbar (Spur 2). Da H-NS in weit grösserer Menge in der Zelle vorliegt, ist gegen H-NS ein sehr viel stärkeres Signal zu beobachten als gegen StpA. In der Stationärphase liegen in der *E. coli*-Zelle ca. 9000 H-NS-Kopien vor (Spassky *et al.*, 1984), im Vergleich dazu expremiert die Zelle nur 1:10 der Menge an StpA-Protein (Talukder *et al.*, 1999).

3.3 Einsatz von StpA in Bandshift-Experimenten

3.3.1 StpA bindet an die *proU*-Promotorregion

Um die Bindung von StpA an die *proU*-Pomotorregion zu testen, wurde das Plasmid pOS7 zusammen mit gereinigtem StpA in kompetetive Band-Shift-Assays eingesetzt. Dieses Plasmid trägt den *proU*-Promotor sowie alle *cis*-regulatorischen Elemente, welche für die Osmoregulation des *proU*-Operons notwendig sind (May *et al.*, 1989).

A)



B)

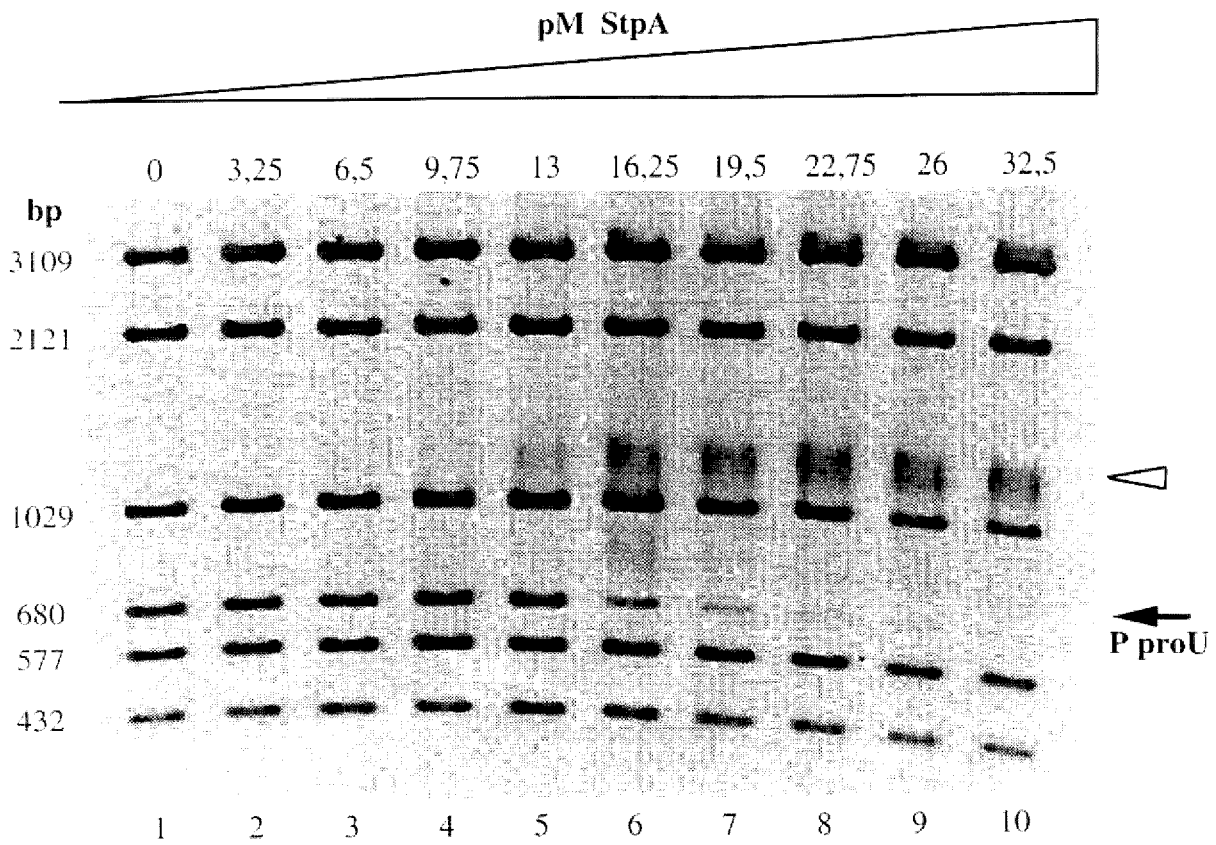


Abbildung 15: Interaktion von StpA mit der regulatorischen Region von *proU*

A: Restriktionskarte des Plasmids pOS7 nach *Bgl*I-Verdau

B: Mobility-Shift-Assay nach Inkubation von 3,25-32,5 pM StpA mit 1 µg *Bgl*I verdautem Plasmid pOS7 (Spur 2-10). Zur Orientierung diente ein Reaktionsansatz, der nur geschnittenes Plasmid, aber kein Protein enthielt (Spur 1). Die *proU*-Promotorregion liegt auf einem 680 bp grossen Fragment (schwarzer Pfeil), nach Bindung von StpA verschwindet dieses Fragment und es bilden sich stattdessen verschmierte Banden im höher-molekularen Bereich (heller Pfeil).

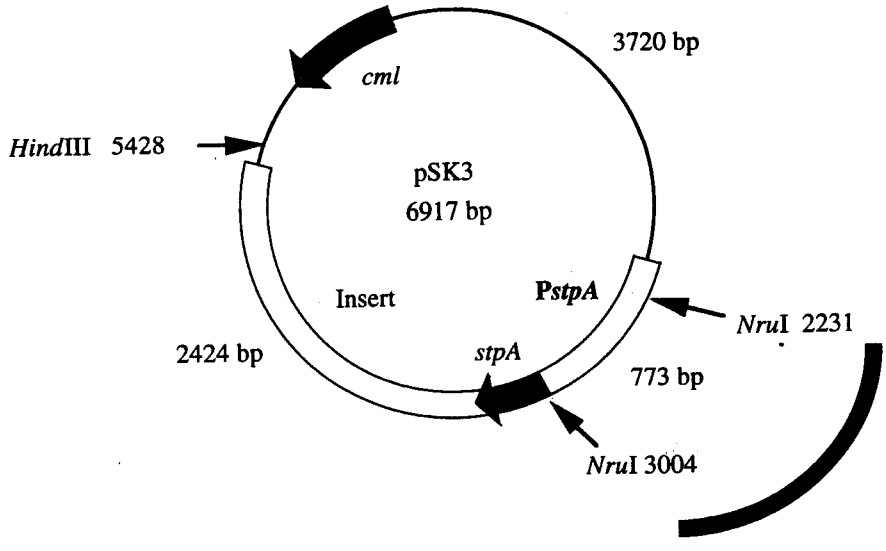
Nach Verdau mit *Bgl*I entstanden sechs unterschiedlich grosse DNA-Fragmente, die *proU*-Region befand sich auf einem 680 bp grossen Fragment (15A). Je analysiertem Ansatz wurden 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt und mit aufsteigenden Konzentrationen (3,25-32,5 pM) gereinigtem StpA-Protein 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindungsstudien wurden in Anlehnung an Dersch *et al.*, (1993) durchgeführt

StpA zeigt eine spezifische Bindungsaffinität an die *proU*-Promotorregion. Das 680 bp-Fragment, welches die *proU* Promotor-Region trägt (schwarzer Pfeil), zeigt als erstes ein verändertes Wanderungsverhalten im Agarosegel aufgrund der Bildung von DNA-Protein-Komplexen. Eine Konzentration von 16,25 pM StpA (Spur 6) reicht zur Ausbildung dieses Komplexes aus (heller Pfeil). Das kompetetive Band-Shift-Experiment zeigt, dass StpA spezifisch mit der regulatorischen Region von *proU* interagiert, und bestätigt damit die genetische Beobachtung, dass *stpA* an der Regulation des *proU*-Operons beteiligt ist (IV.2.1.2).

3.3.2 StpA bindet mit hoher Affinität an den eigenen Promotor

In einem weiteren Retardationsexperiment wurde das Bindungsverhalten von gereinigtem StpA an die eigene Promotorregion untersucht. Verwendet wurde dabei das Plasmid pSK3, welches die *stpA*-Promotorregion trägt. Nach Verdau des Plasmids mit den Enzymen *Hind*III und *Nru*I ergaben sich drei DNA-Fragmente, die *stpA*-Promotorregion war auf einem 773 bp grossen Fragment lokalisiert (16A). Die Inkubation von je 1 µg geschnittener DNA mit aufsteigenden Konzentrationen (3,25-32,5 pM) StpA-Protein erfolgte bei Raumtemperatur.

A)



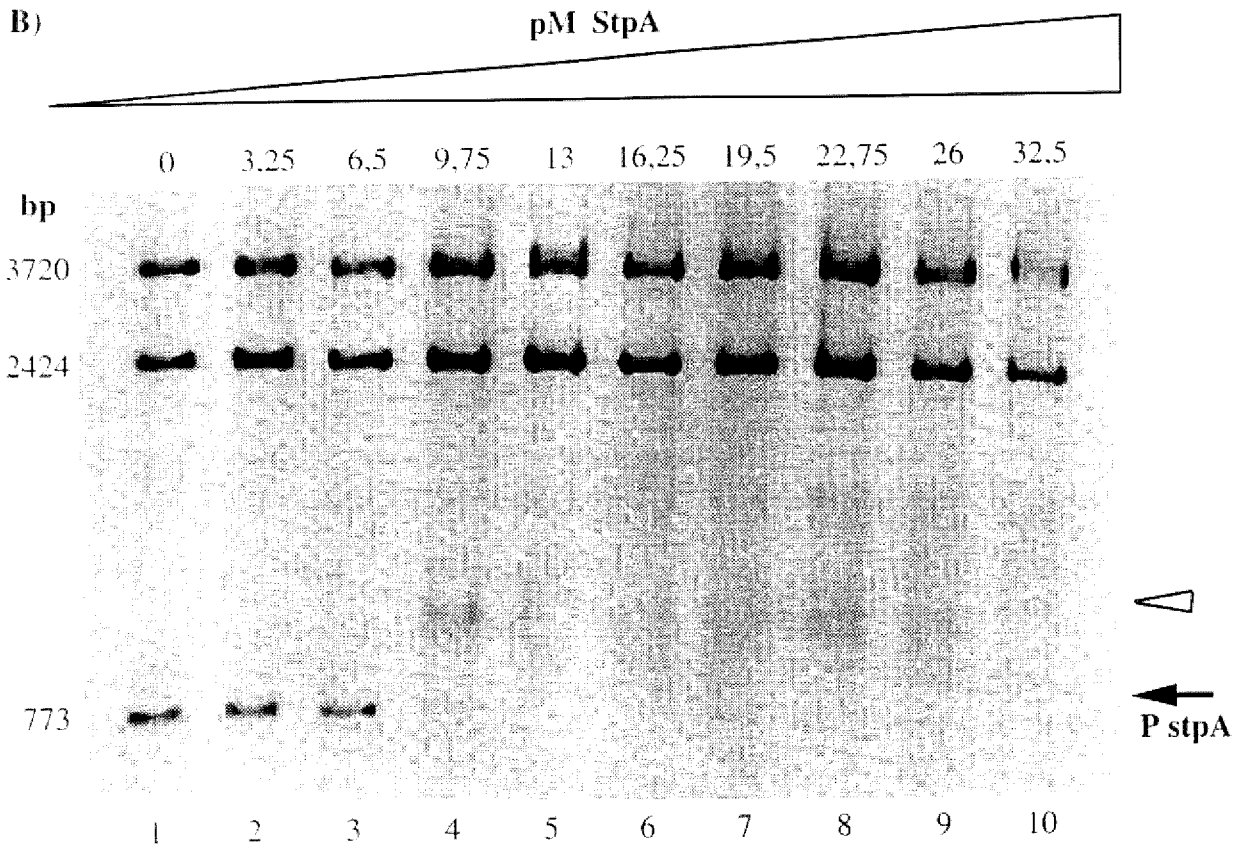


Abbildung 16: Interaktion von StpA mit der regulatorischen Region des eigenen Strukturgens

A: Restriktionskarte des Plasmids pSK3 nach *Hind*III und *Nru*I-Verdau
B: Mobility-Shift-Assay nach Inkubation von 3,25-32,5 pM StpA mit 1 µg *Hind*III und *Nru*I verdautem Plasmid pSK3 (Spur 2-10). Zum Vergleich diente ein Reaktionsansatz, der nur geschnittenes Plasmid, aber kein Protein enthielt (Spur 1). Die *stpA*-Promotorregion liegt auf einem 773 bp grossen Fragment (schwarzer Pfeil), nach Bindung geringer Mengen an gereinigtem StpA-Protein verschwindet diese Bande und zeigt ein verändertes Laufverhalten (heller Pfeil).

Schon geringe Mengen an StpA-Protein binden mit hoher Affinität an den eigenen Promotor (schwarzer Pfeil). Im Gegensatz zur Interaktion mit der *proU*-Promotorregion führt bereits eine Konzentration von 9,75 pM StpA (Spur 4) zu einem völlig veränderten Laufverhalten (heller Pfeil). Die hohe Spezifität der Bindung des StpA-Proteins an seinen eigenen Promotor wird dadurch deutlich, dass andere Fragmente des Plasmides pSK3 nicht mit dem gereinigten StpA-Protein reagieren.

Die Band-Shift Experimente zeigen, dass StpA in spezifischer Weise sowohl mit der *proU*-Promotorregion als auch mit der *stpA*-Promotorregion reagiert. Dabei ist eine grössere Bindungsaffinität des StpA-Proteins zu der eigenen Promotorregion als zu der *proU*-Promotorregion zu erkennen.

4 Untersuchungen zur *stpA*-Expression

4.1 Konstruktion einer *stpA-lacZ*-Fusion

Die Regulation der *stpA*-Expression wurde über eine Reportergen-Fusion zu dem *lacZ*-Gen untersucht. Zur Konstruktion einer Fusion zwischen der Promotorregion des *stpA*-Gens und dem *lacZ*-Gen diente das Plasmid pSF9 (III.5.5). Aus dem *lacZ*-Reportergenplasmid pJL29 lies sich das *lacZ*-Gen über einen *Sma*I und *Dra*I-Verdau so herausschneiden, dass es in die *Nru*I-Schnittstelle des *stpA*-Gens auf dem vorliegenden Plasmid pSF9 eingefügt werden konnte. Somit entstand das Plasmid pSF10 (III.5.5), mit einer Reportergenfusion zwischen *stpA* und dem *lacZ*-Gen (Abbildung 4). Aufgrund des temperatursensitiven Replikationsursprunges des Plasmid pSF10 diente dieses Plasmid zur Konstruktion einer chromosomalen *stpA-lacZ*-Fusion. Zunächst wurde das Plasmid pSF10 in die E. coli-Zelle transformiert, und bei der nicht-permissiven Temperatur von 42°C inkubiert. Dadurch erfolgte die einfache Rekombination des Plasmides in das *E. coli*-Chromosom. Dieses Ereigniss stellte sich durch blaue, Cml^r-Kolonien auf Cml-X-Gal-Platten dar. Die Untersuchung auf Kolonien, welche nach mehreren Inkubationsschritten in LB-Medium den Vektoranteil, sowie das intakte *stpA*-Gen verloren haben, erfolgte durch einen Screen nach blauen, Cml^s-Kolonien. Diese wurden zusätzlich in einem Southern-Blot auf die korrekte Insertion überprüft.
Mit Hilfe der *stpA-lacZ*-Fusion am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom (SF21) wurde die *stpA*-Regulation, sowie die Beteiligung weiterer Faktoren an der *stpA*-Expression, untersucht. Wichtige Fragen waren dabei die Beteiligung von *hns* sowie weiterer DNA-Bindeproteine an der *stpA*-Expression. Zusätzlich wurde der Einfluss der Wachstumsphasen sowie verschiedener Umweltfaktoren, welche zu einer StpA-Expression führen, untersucht.

4.2 *stpA* unterliegt einer negativen Autoregulation und einer Kontrolle durch H-NS

Untersuchungen zu *hns* haben gezeigt, dass *hns* einer negativen Autoregulation unterliegt (Dersch *et al.*, 1993). Die Beobachtung, dass StpA an den eigenen Promotor bindet, lässt darauf schliessen, dass es ebenfalls an der eigenen Regulation beteiligt ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu *hns* wurde untersucht, ob StpA gleichfalls die eigene Expression reguliert. Darüber hinaus wurde geklärt, ob StpA einer Regulation durch H-NS unterliegt. Zur Untersuchung der Autoregulation wurde der *stpA-lacZ*-Fusionsstamm SF21 (III.5.6.1) mit dem $stpA^+$-Plasmid pSF1 komplementiert und die ß-Galaktosidase-Aktivität aus Stationärphase-Kulturen bestimmt. Um den Einfluss von H-NS auf die *stpA*-Expression zu überprüfen wurden die chromosomalen Mutationen *hns205*::Tn*10* und *hns206*::*bla* mittels P1*vir*-Transduktion auf den Stamm SF21 übertragen und ebenfalls die ß-Galaktosidase-Aktivität aus Stationärphase-Kulturen ermittelt

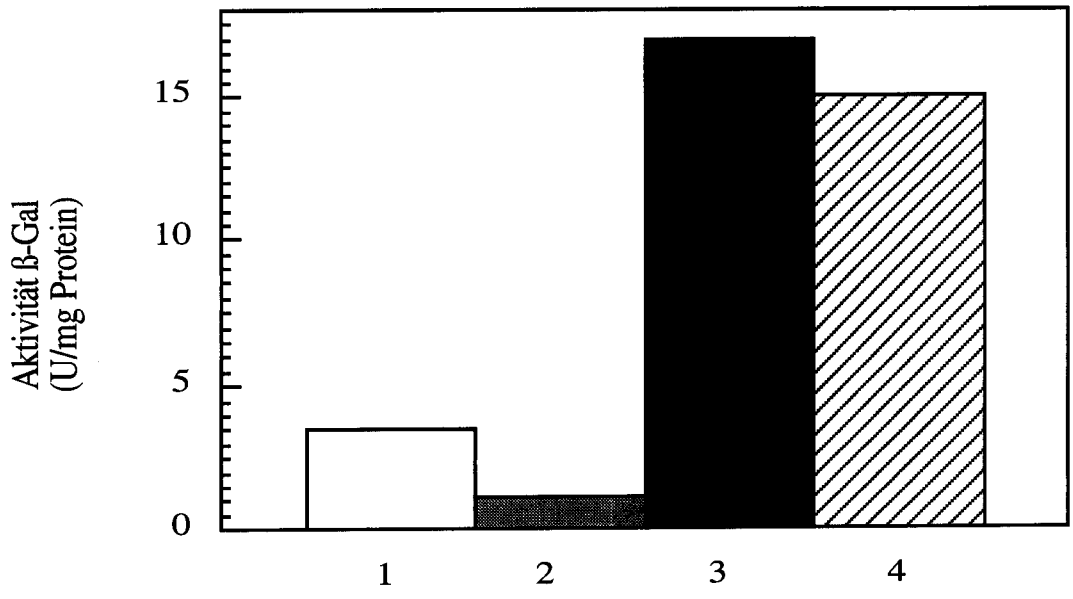


Abbildung 17: Regulation der *stpA*-Expression

Spur 1: SF21 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1; Spur 2: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pSF1 (high-copy *stpA*+); Spur 3: SF24 (*hns206::bla*); Spur 4: SF25 (*hns205*::Tn*10*)

Unter dem Einfluss des Plasmides pSF1 (*stpA*$^+$) nimmt die ß-Galaktosidase-Aktivität der *stpA-lacZ*-Fusion auf 30% des Basallevels ab (Spur 2), dies bedeutet dass StpA die eigene Expression reprimiert. Im Vergleich dazu liegt das Basalniveau der *stpA-lacZ*-Fusion bei 4 MillerU/ mg Protein (Spur 1). Chromosomale Mutationen in *hns* führen zu einer stark gesteigerten *stpA*-Expression, dabei wirkt sich eine Mutation im 5´-Bereich (Spur 3) deutlicher in einer gesteigerten *stpA*-Expression aus als eine Mutation im 3´-Bereich (Spur 4) von *hns*. Mutationen in *hns* verstärken die *stpA*-Expression um ca. das vier-fache. Durch Bindung von StpA bzw. H-NS unterliegt der *stpA*-Promotor einer negativen Autoregulation bzw. einer Repression durch H-NS.

4.3 Autoregulation der *stpA*-Expression

Die negative Autoregulation von *stpA* wurde in ebenfalls in Komplementationsexperimenten untersucht. Dazu wurde der Stamm SF21 mit Plasmiden transformiert, welche das *stpA*-Gen in unterschiedlicher Kopienzahl trugen. Da sowohl das intakte *stpA*-Gen (pSK3, pSF1) als auch unterschiedliche Mutationen in *stpA* (pSF2, pSF4) auf den Plasmiden vorlagen, konnte eine direkte Korrelation zwischen Menge an gebildetem StpA und Einfluss der Mutation auf die *stpA*-

Expression untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen Menge an exprimiertem StpA einerseits sowie Lokalisation der *stpA*-Mutation andererseits ist in Abbildung 18 zusammengefasst.

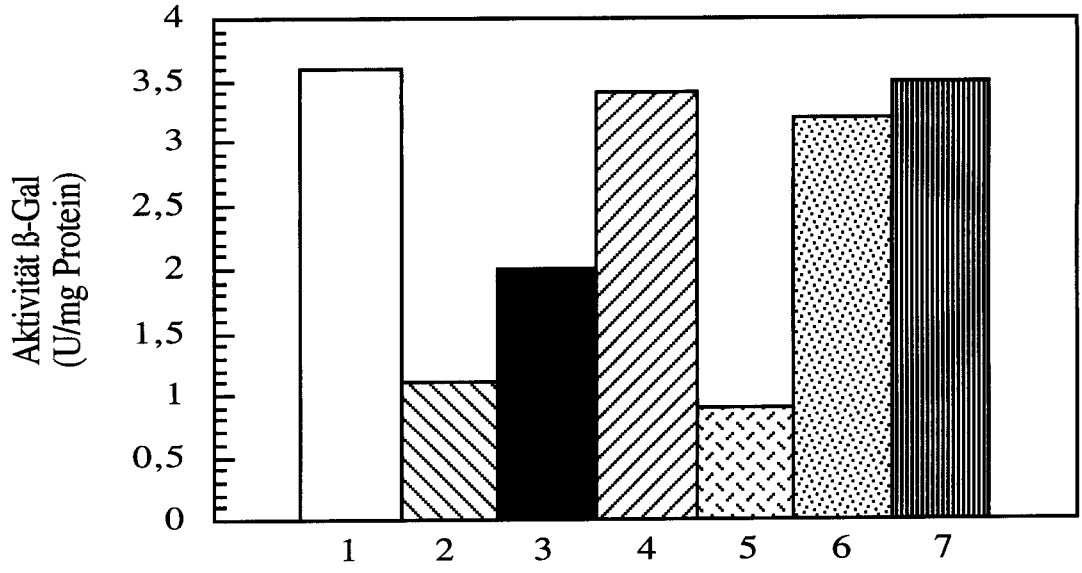


Abbildung 18: Repression der *stpA*-Expression

Spur 1: SF21 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1, komplementiert mit pPD100 (Vektor); Spur 2: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pPD3 (low-copy *hns*$^+$); Spur 3: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pSK3 (low-copy *stpA*$^+$); Spur 4: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pRMK55 (Vektor); Spur 5: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pSF1 (high-copy *stpA*$^+$); Spur 6: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pSF2 (*stpa1::spc*); Spur 7: Komplementation von SF21 mit dem Plasmid pSF4 (*stpA2::neo*)

Durch die Komplementationsexperimente konnte eine negative Autoregulation von *stpA* durch das eigene Genprodukt beobachtet werden. Eine Transformation des Stammes SF21 mit den Plasmiden pPD100 (Kontrolle low-copy, Spur 1) bzw. pRMK55 (Kontrolle high-copy, Spur 4) bewirkte keine Repression der *stpA*-Expression, in beiden Versuchsansätzen wurde eine *stpA*-Basal-Expression von ca. 3,5 MillerU/mg Protein erreicht. Eine deutliche Repression der *stpA*-Expression bewirkten das low-copy *hns*-Plasmid pPD3 (Spur 2) sowie das high-copy *stpA*-Plasmid pSF1 (Spur 5), die *stpA*-Expression wurde durch das Vorhandensein der funktionellen Gene um das drei-fache verringert. Dabei bewirkt das Vorliegen eines multi-copy *stpA*-Plasmides (pSF1) eine vergleichbare Repression wie ein low-copy *hns*-Plasmid (pPD3). Eine geringe Beeinflussung der *stpA*-Expression wurde durch das low-copy *stpA*-Plasmid pSK3 (Spur 3) erzeugt, im Vergleich zur Kontrolle ist das Expressionsniveau um ca. ein Drittel verringert. Es wird deutlich, dass bezüglich der Repression des *stpA*-Promotors die DNA-Bindeproteine StpA und H-

NS Unterschiede im Grad ihrer Funktion aufweisen, bzw. dass höhere Konzentrationen an StpA benötigt werden, um die gleiche Repression des *stpA*-Promotors zu bewirken wie H-NS. Ob Mutationen im 3´- oder 5´-Bereich von *stpA* liegen, übt nur einen geringen Einfluss auf die Fähigkeit des zur Repression des eigenen Promotors aus, sowohl die *stpA*-Mutation *stpa1::spc* im 3´-Bereich des Gens (Spur 6) als auch die Mutation *stpA2::neo* im 5´-Bereich des Gens (Spur 7) besitzen beide nicht mehr die Fähigkeit zur negativen Autoregulation, die *stpA*-Expression erreicht in beiden Kulturen ca. den Wert einer nicht-komplementierten Kultur.

4.4 Die Induktion von *stpA* erfolgt am Übergang der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase

Viele DNA-Bindeproteine, darunter auch H-NS, sind stationärphaseninduziert (Dersch *et al.*, 1993), daher wurde mit Hilfe der *stpA-lacZ*-Fusion im Stamm SF21 der Induktionszeitpunkt der *stpA*-Expression untersucht. Aus 100 ml LB-Kulturen wurden stündlich Proben genommen und neben der OD_{578} parallel auch die ß-Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

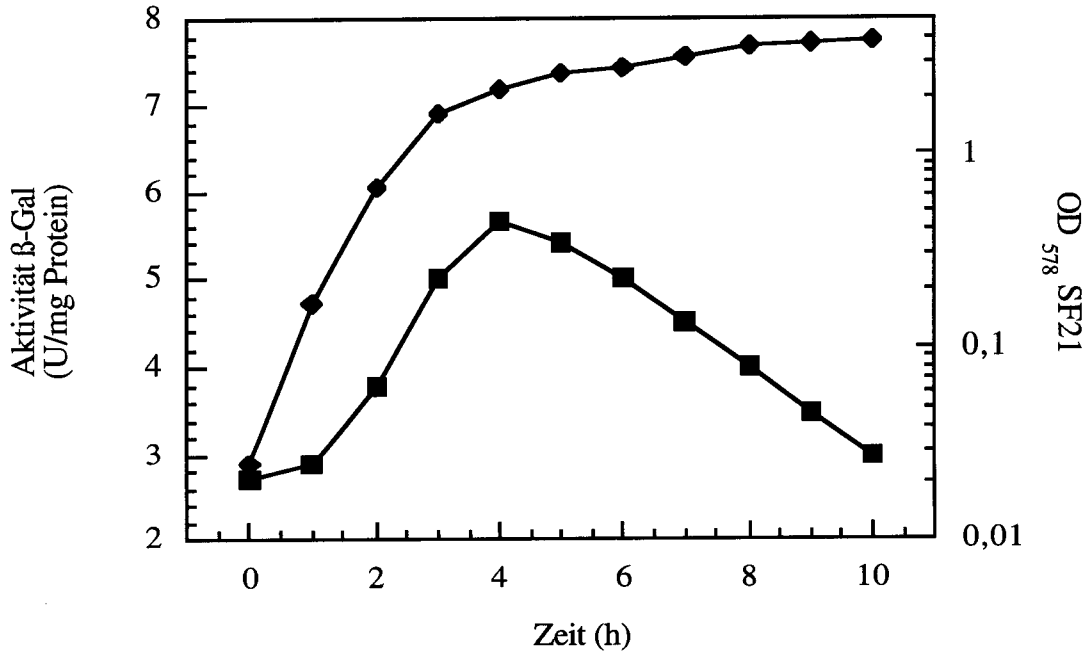


Abbildung 19: Induktion von *stpA* in LB-Medium

SF21 OD_{578} (◆); SF21 Aktivität ß-Galaktosidase (■)

Anhand des Vergleichs der *stpA*-Expression zur Wachstumskurve wird deutlich, dass beim Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Wachstumsphase eine transiente Anschaltung der *stpA*-Expression zu beobachten ist, welche sich in einer Verdopplung der Expression auf 6 MillerU/ mg Protein äussert. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase fällt die *stpA*-Expression wieder fast auf das Ausgangsniveau von 3 MillerU/mg Protein ab.

Durch das zusätzliche Einfügen einer chromosomalen *hns206::bla*-Mutation in den Stamm SF21 und die erneute Beobachtung der *stpA*-Expression im Verlauf der Wachstumskurve wurde ein möglicher Einfluss von H-NS auf den Zeitpunkt der *stpA*-Expression untersucht. In Abbildung 20 wird der Einfluss von H-NS auf die *stpA*-Expression dargestellt.

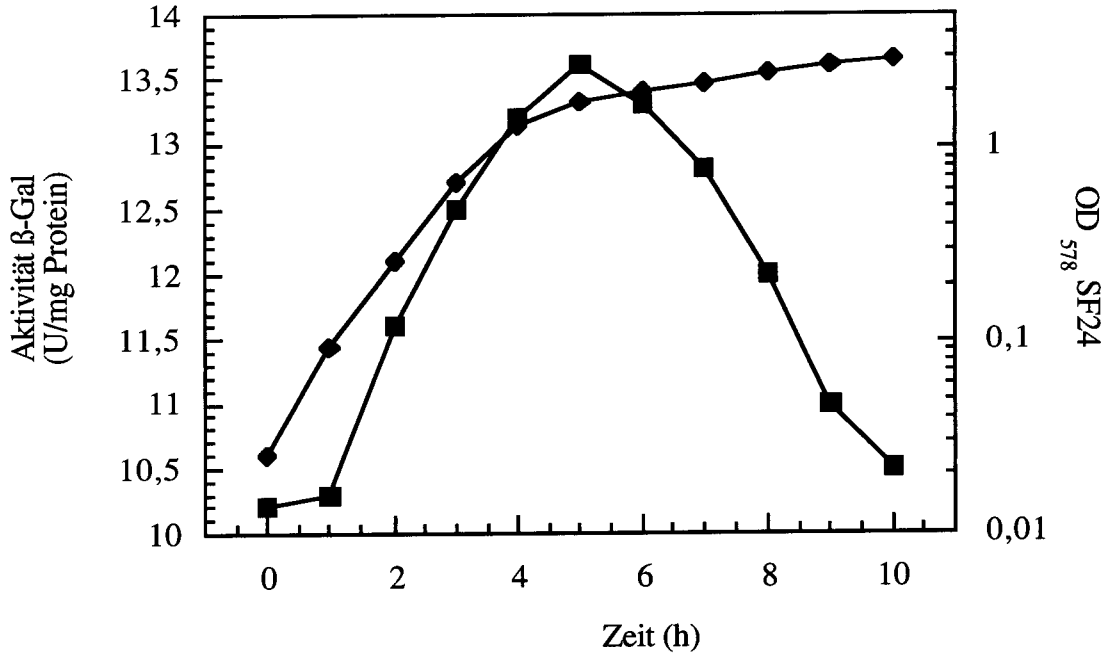


Abbildung 20: Induktion von *stpA* in einem *hns*-Stamm

SF24 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1 (*hns206::bla*), OD $_{578}$ (◆); SF24 Aktivität ß-Galaktosidase (■)

Auch in diesem Versuch wird die transiente Induktion der *stpA*-Expression sichtbar, H-NS nimmt also keinen Einfluss auf den Zeitpunkt der *stpA*-Induktion. Der Einfluss von H-NS zeigt sich aufgrund der reprimierenden Wirkung auf den *stpA*-Promotor lediglich in einer Verstärkung der *stpA*-Expression. Im Vergleich zu einem *hns*$^+$-Stamm ist die Stärke der *stpA*-Transkription in einem *hns*-Stamm ausgehend von einem Basallevel von 10 MillerU/ mg Protein auf einen Wert von

13,5 MillerU/ mg Protein nach der transienten Anschaltung gesteigert. Durch einen Vergleich der Induktionsexperimente wird die Repression der *stpA*-Expression durch H-NS ebenfalls bestätigt (siehe auch IV.4.1), ein Einfluss von H-NS auf die zeitliche Ausprägung der *stpA*-Expression kann jedoch nicht beobachtet werden.

4.4.1 Die Abnahme der *stpA*-Expression lässt sich auf Proteinebene verfolgen

Die Daten, welche auf Transkriptionsebene eine transiente Anschaltung des *stpA*-Gens beschreiben, lassen sich auf Proteinebene mit Hilfe des StpA-Antiserums im Westernblot ebenfalls bestätigen. Entlang der Wachstumskurve wurden ausgehend von Ganzzellextrakten des Stammes PD32 ($StpA^+$, $H\text{-}NS^-$) Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen, und auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel (III.6.2) aufgetragen. Die Bildung von StpA zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde anschliessend in einem Westernblot (III.6.6) durch Inkubation mit dem StpA-Antiserum ermittelt.

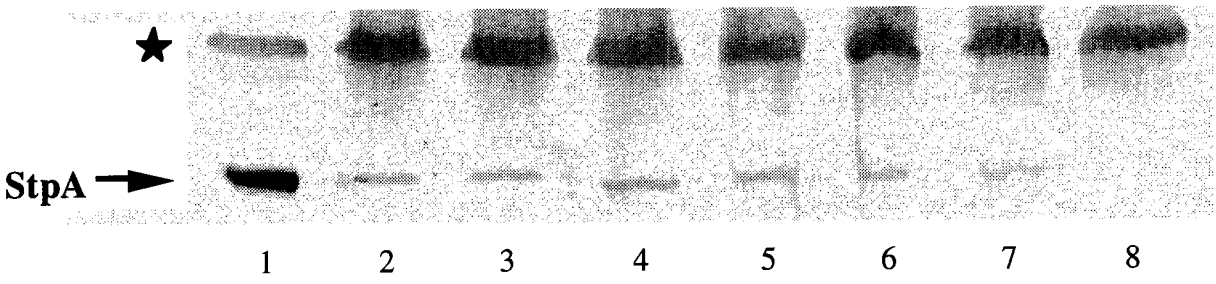


Abbildung 21: Nachweis der StpA-Bildung im Verlauf der Wachstumskurve

Spur 1: MC4100 ($StpA^+$, $H\text{-}NS^+$), OD $_{578}$ 1; Spur 2: PD32 ($H\text{-}NS^-$, $StpA^+$), OD $_{578}$ 1; Spur 3: PD32 OD $_{578}$ 0,5; Spur 4: PD32 OD $_{578}$ 1; Spur 5: PD32 OD $_{578}$ 1,5; Spur 6: PD32 OD $_{578}$ 2; Spur 7: PD32 OD $_{578}$ 2,5; Spur 8: PD32 OD $_{578}$ 3; ★: unspezifische Kreuzreaktion mit dem StpA-Antikörper

Alle Proben wurden mit dem StpA-Antiserum inkubiert. Um Kreuzreaktionen des StpA-Antikörpers mit H-NS zu verhindern, wurden die Proben anhand eines $StpA^-$-Stammes (PD32) ermittelt. Der Westernblot zeigt in Analogie zu den Wachstumsexperimenten, dass zum Ende der Stationärphase die Bildung von StpA vermindert wird, da Reaktionsprodukte zwischen StpA mit dem StpA-Antiserum ab einer OD $_{578}$ von 2.5 schwächer werden (Spur 2-7) und bei einer OD $_{578}$ von 3 nicht mehr nachweisbar sind (Spur 8). In Spur 1 ist zur Orientierung ein Ganzzellextrakt des Stammes MC4100 aufgetragen, durch die Kreuzreaktion des StpA-Antiserums mit H-NS ist eine deutliche Bande auf der Höhe der Proteine StpA und H-NS sichtbar.

4.5 Einfluss von H-NS, IHF, HU, Fis, Lrp und RpoS auf die *stpA*-Expression

Neben H-NS spielen weitere Proteine wie IHF, Fis, Lrp, RpoS und HU, welche ebenfalls durch DNA-Bindung auf die Genexpression Einfluss nehmen, in der *E. coli*-Zelle eine wichtige Rolle (Bertin *et al.*, 1999; Laurent-Winter *et al.*, 1997). Um ihren Einfluss auf die Expression von *stpA* zu ermitteln, wurden über P1*vir*-Transduktion im Stamm SF21 Mutationen in den entsprechenden Genen erstellt (III.5.6.3). Proteine mit einen Dimeren Aufbau wie z.B. HU oder IHF wurden in beiden Untereinheiten mutiert. Die Auswirkung der Mutationen auf die *stpA*-Expression erfolgte anhand der Bestimmung der ß-Galaktosidase-Aktivität. Die unterschiedlichen Kulturen wurden sowohl in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578} von 1 als auch in der stationären Wachstumsphase (OD_{578} von 3) ermittelt. In der Abbildung 22 sind die Ergebnisse nach Messung bei einer OD von 1 dargestellt, im Vergleich zu Messungen von Stationärphase-Kulturen war kein Unterschied in der *stpA*-Expression erkennbar.

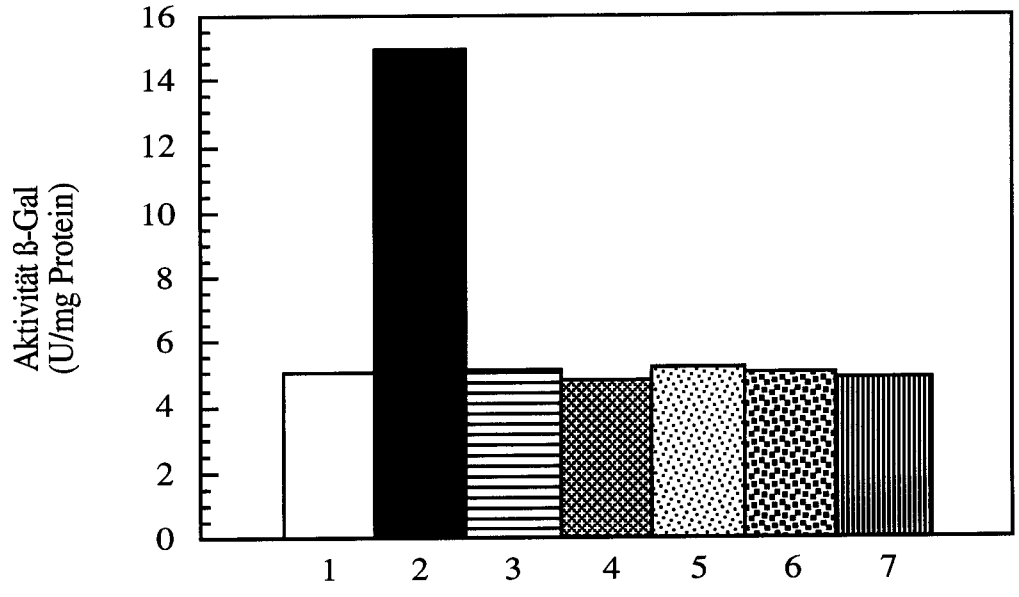


Abbildung 22: *stpA*-Expression in Mutanten von H-NS, IHF, HU, Lrp und RpoS

Spur 1: SF21 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1; Spur 2: SF24 (SF21, *hns206::bla*); Spur 3: SF51 (SF21, *rpoS359*::Tn*10*); Spur 4: SF52 (SF21, *lrp201*::Tn*10*); Spur 5: SF34 (SF21, *fis::neo*); SF47 (SF21, *ihfA::tet*; *ihfD::cat*); SF48 (SF21, *hupA::cat*; *hupB::neo*)

Im Vergleich zu dem Stamm SF21 ohne zusätzliche Mutationen steigt durch die Mutation *hns206::bla* die *stpA*-Expression um das drei-fache an. Während H-NS die *stpA*-Expression deutlich reprimiert, lassen sich keine Auswirkung durch die Einführung unterschiedlicher

Mutationen in weiteren histon-ähnlichen Proteinen in den Stamm SF21 nachweisen. Die Versuche ergaben sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase ein identisches Ergebniss. IHF, HU, Fis, Lrp und RpoS sind nicht direkt an der Regulation von *stpA* beteiligt. Mutationen in diesen Proteinen wirken sich nicht auf die *stpA*-Expression aus (Spur 3-7). Ein spezifischer Einfluss geht somit nur von H-NS auf die *stpA*-Expression aus (Spur 2).

4.5.1 Beteiligung von ArcA/B an der *stpA*-Regulation

Computer unterstütze Analysen ergaben im Promotorbereich von *stpA* drei mögliche Bindebereiche für den Respondregulator ArcA (Collins *et al.*,1999). Der Komplex aus ArcA/B ist an der Vermittlung des Redoxpotentials beteiligt. Dabei misst die membrangebundene Sensorkinase ArcB den Elektronenfluss und unterliegt dabei einer Autophosphorylation. Der Phosphatrest wird auf ArcA übertragen, wodurch der phosphorylierte Respondsregulator ArcA dann die Fähigkeit zur DNA-Bindung erlangt, was wiederum Auswirkung auf unterschiedliche Promotoren ausübt. Zur Untersuchung des Einflusses von ArcA auf den *stpA*-Promotor wurden Mutationen in *arcA* und *arcB* über P1*vir*-Transduktion in den Stamm SF21 transduziert (III.5.6.5), und sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen die *stpA*-Expression bestimmt.

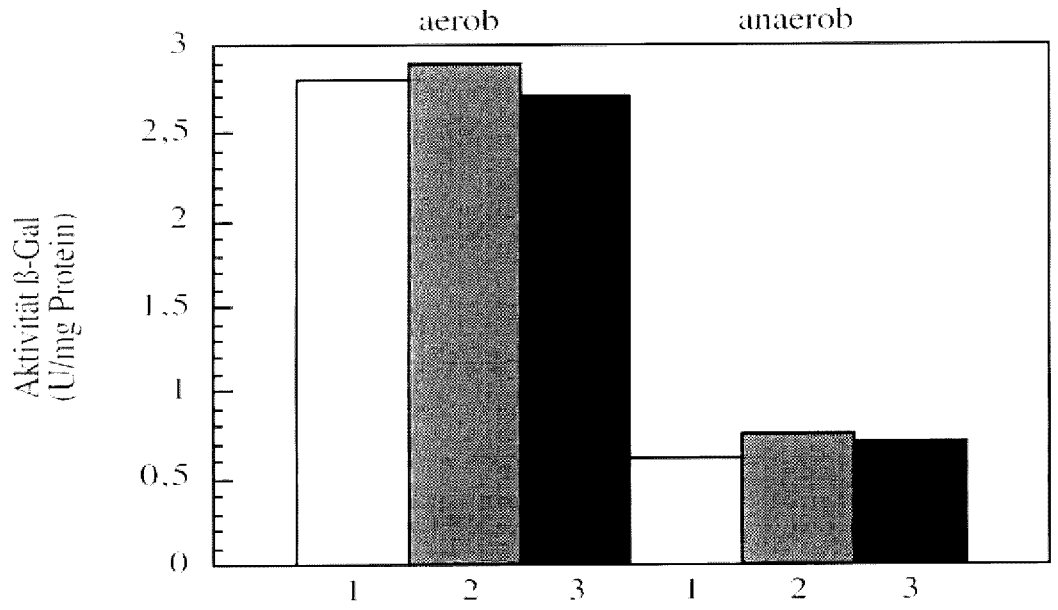


Abbildung 23: Einfluss von Mutationen in ArcA/B auf die *stpA*-Expression

Spur 1: SF21 ϕ(*stpA-lac* Zihyb1; Spur 2: SF68 (SF21, *arcAzjj*::Tn*10*); Spur 3: SF69 (SF21, *arcBzgi*::Tn*10*); aerob

Spur 4: SF21 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1; Spur 5: SF68 (SF21, *arcAzjj*::Tn*10*); Spur 6: SF69 (SF21, *arcBzgi*::Tn*10*); anaerob

Wie in Abbildung 23 dargestellt, wirken sich Mutationen in ArcA/B weder reprimierend noch verstärkend auf die *stpA*-Expression aus. Wenngleich eine Bindung an den *stpA*-Promotor aufgrund der Bindemotive nicht völlig ausgeschlossen werden kann, wirkt sie sich jedoch nicht auf die Stärke der *stpA*-Expression aus. Unabhängig von Mutationen in *arcA/B* wirkt sich die Inkubation des Stammes SF21 unter oxischen bzw. anoxischen Bedingungen auf die Expressionsstärke aus, da die Kultivierung der Bakterien unter anoxischen Bedingungen die *stpA*-Expression auf ein Drittel verringert. Da die Unterschiede in der *stpA*-Expression unabhängig von den Mutationen in a*rcA/B* sind, müssen sich andere Faktoren auf die Expressionsstärke auswirken.

4.5.2 Einfluss von Umweltbedingungen auf die *stpA*-Expression

DNA-Bindeproteine verleihen Bakterien u. a. die Fähigkeit, ihre Genexpression auf variierende Umweltbedingungen einzustellen. Durch veränderte Kulturbedingungen des Stammes SF21 wurde der Einfluss einzelner Umweltreize auf die *stpA*-Expression überprüft. Aufgrund der Induktion von *stpA* in der Stationärphase wurde der Stamm SF21 mit Bedingungen konfrontiert, die unter Wachstumslimitationen oder Stress, u.a. besonders in der Stationärphase, auftreten.

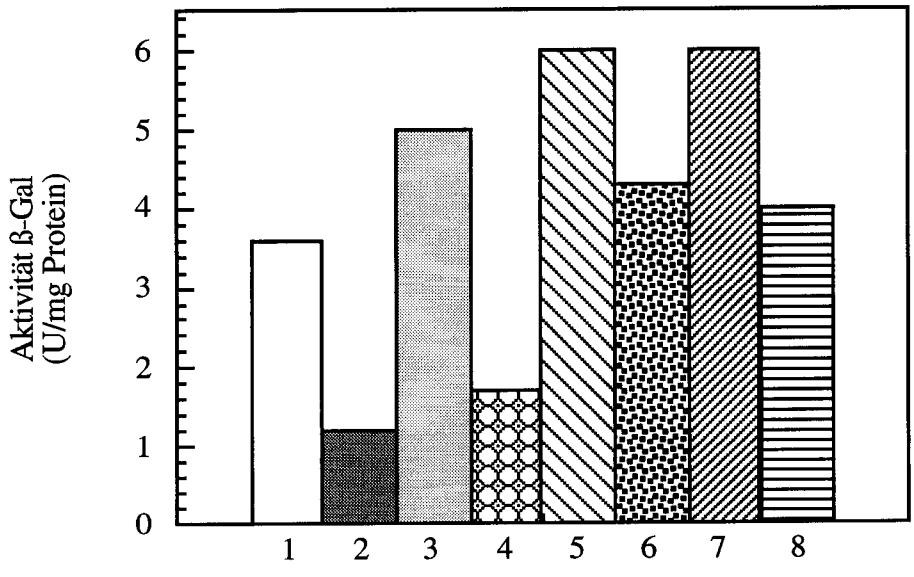


Abbildung 24: *stpA*-Expression unter variierenden Umweltbedingungen

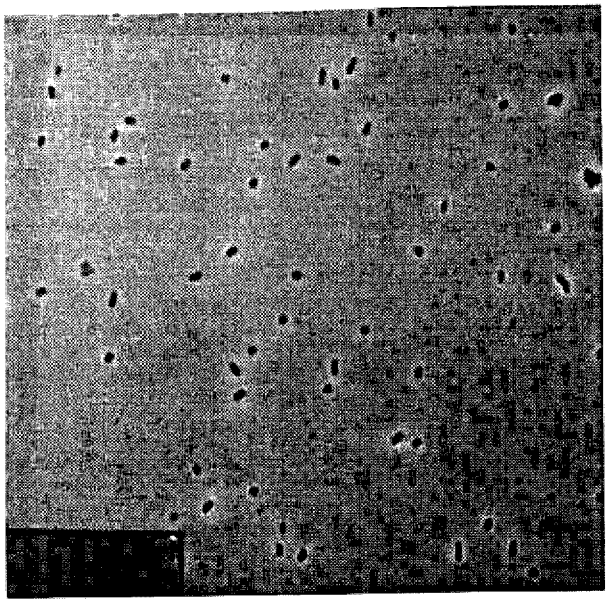
Spur 1: SF21 ϕ(*stpA-lacZ*)hyb1 aerob; Spur 2: SF21 anaerob; Spur 3: SF21 1,5 mM H_2O_2; Spur 4: SF21 12°C; Spur 5: SF21 45°C; Spur 6: SF21 4 % EtOH; Spur 7: SF21 0,3 mM NaCl; Spur 8: SF21 unter Glucoselimitation

Im Vergleich zu der *stpA*-Expression unter Standard-Kultivierungsbedingungen (37°C, 220 rpm, LB-Medium; Spur 1) wird eine Steigerung der *stpA*-Expression durch Inkubation bei 45°C (Spur 5) und durch Zugabe von 0,3 mM NaCl (Spur 7) beobachtet, die ß-Galaktosidase-Aktivität verdoppelt sich. Deutlich reprimierend auf die Expression wirkt sich die Inkubation im Anoxischen (Spur 2) und bei 12°C (Spur 4) aus, unter beiden Kultivierungsbedingungen sinkt die ß-Galaktosidase-Aktivität um ca. das drei-fache ab. Wachstumsbedingungen mit 1,5 mM H_2O_2 (Spur 3), 4 % EtOH (Spur 6) und unter Glukoselimitation (Spur 8) üben nur einen geringen Einfluss auf die Expressionsstärke aus.

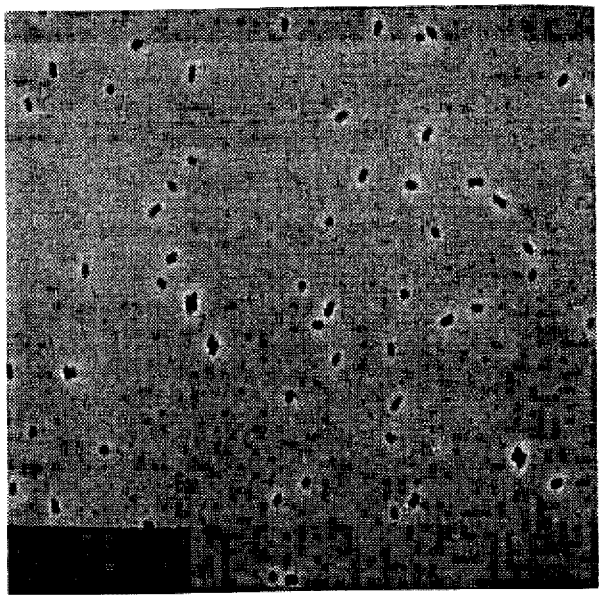
5 Wachstum in einer verlängerten Stationärphase

5.1 Veränderungen der Zellmorphologie durch Mutationen in *stpA* und *hns*

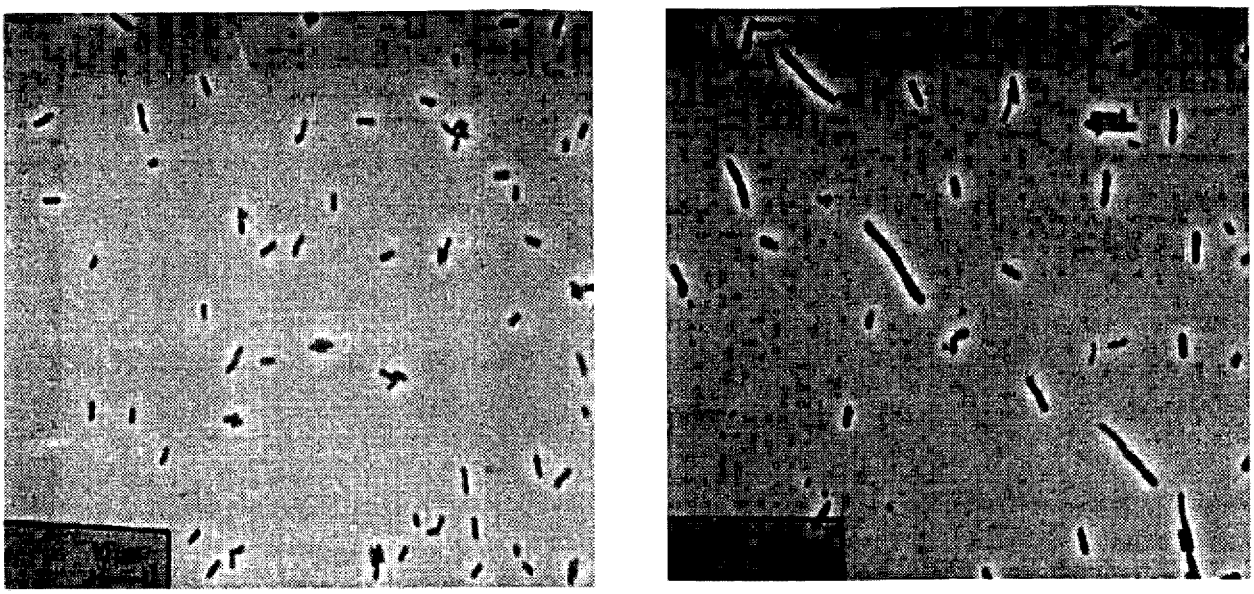
Defekte in stationärphasen-induzierten DNA-Bindeproteinen wirken sich häufig auf die Zellmorphologie aus (Lazar *et al.*, 1998). Daher wurden Zellen mit Mutationen in *stpA*, *hns* oder in beiden Genen mikroskopisch auf Veränderungen ihrer Zellform betrachtet. Dazu wurden Kulturen der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 sowohl aus der exponentiellen Wachstumsphase als auch aus der stationären Wachstumsphase bei einer 100-fachen Vergrösserung, nach Anzucht in LB-Medium, mikroskopiert. Da in der exponentiellen Wachstumsphase zwar morphologische Unterschiede sichtbar, die Ausprägungen der zellulären Veränderungen der unterschiedlichen Stämme jedoch in der stationären Wachstumsphase verstärkt ausgeprägt waren, sind in Abbildung 25 nur die Aufnahmen der stationärphase-Kulturen dargestellt, welche deutliche morphologische Unterschiede aufweisen.



A



C



B D

Abbildung 25: Morphologische Untersuchungen von stationärphasen-Zellen mit Mutationen in *stpA*, *hns* sowie Doppelmutationen

A: MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$); B: PD32 (*stpA*$^+$, *hns*); C: SF13 (*stpA*, *hns*$^+$); D: SF20 (*stpA*, *hns*)

E. coli Zellen, welche die Stationärphase erreicht haben, sind von ihrer Zellform fast als oval anzusehen. Die Abbildung des *E. coli*-Wildtyps MC4100 zeigt ein typisches Bild von *E. coli*-Zellen in der Stationärphase mit kurzen, stark abgerundeten, ursprünglich stäbchenförmigen Zellen. Der Stamm SF13, welcher eine chromosomale *stpA*-Mutation trägt besitzt keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu MC4100, die Zellmorphologie erscheint ebenfalls als kurze Stäbchen. PD32-Zellen mit einer *hns206::bla*-Mutation weisen ein Erscheinungsbild mit leicht verlängerten Zellen auf, der Unterschied zu dem *E. coli*-Wildtyp MC4100 ist jedoch marginal. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, welche eine Doppelmutation sowohl in *stpA* als auch in *hns* aufweisen eine signifikant verlängerte Zellform, die Längenunterschiede variieren dabei von zwei-fach bis acht-fach, weiterhin scheint die Doppelmutation Einfluss auf die Zellteilung auszuüben da einige Bakterien scheinbar in einer unvollständigen Zellteilung einbegriffen sind da sie filamentöse Formen ausbilden. Doppelmutationen in *stpA* und *hns* wirken sich drastisch auf die Zellmorphologie aus, die Unterschiede sind besonders in der Stationärphase deutlich sichtbar. Beim Wachstum während der exponentiellen Wachstumsphase zeigen alle Stämme eine längere Zellform im Vergleich zum Wachstum in der stationären Phase sodass Unterschiede zwischen der Doppelmutante und dem Wildtyp kaum sichtbar werden.

5.2 Auswirkungen von Mutationen in *stpA* und *hns* auf das Überleben in Langzeit-Wachstumsexperimenten

5.2.1 Mutationen in *stpA* und *hns* beeinflussen das Langszeitwachstum stärker als Mutationen in *hupAB*

Allgemein treten Überlebensdefekte nach Inkubation in einer verlängerten Stationärphase oft bei Stämmen mit Defekten in DNA-Bindeproteinen auf (Kolter *et al.*, 1993). Der *hns*-Mutationsstamm PD32 zeigt in Langzeitwachstumsexperimenten ebenfalls eine deutlich verminderte Lebensfähigkeit im Vergleich zum *E. coli*-Wildtyp MC4100. In Plattierungsversuchen wurde der zusätzliche Einfluss von *stpA* auf das Überleben in einer verlängerten Stationärphase untersucht. In 100 ml Erlenmeyerkolben wurden die Stämme MC4100, PD32, SF13, SF39, SF41, SF45 und SF20 über einen Zeitraum von sieben Tagen inkubiert und täglich Proben genommen. Die Überlebensrate wurde durch Ausplattierung und Bestimmung der Lebendzellzahl ermittelt. Der Vergleich der Überlebensraten während des Wachstums in einer verlängerten Stationärphase zwischen Stämmen mit Mutationen in *hns* bzw. *stpA* oder Mutationen in *hupA* bzw. *hupB* ist in Abbildung 26 gezeigt.

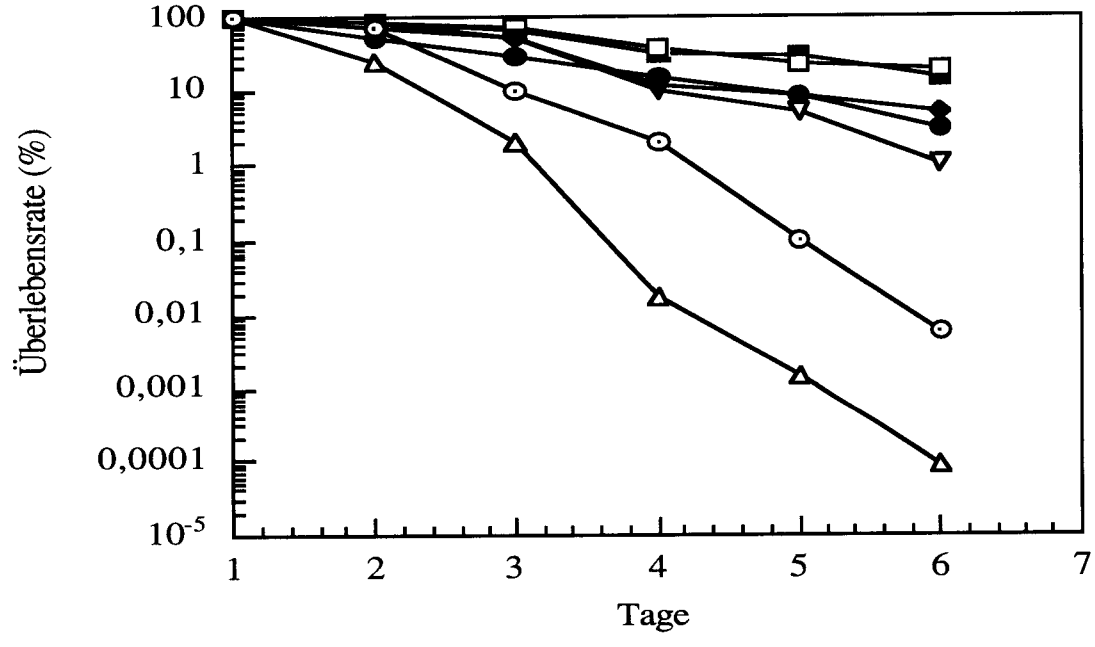


Abbildung 26: Vergleich der Überlebensrate von *hupAB* und *stpA/hns*-Mutanten nach Inkubation in einer verlängerten Stationärphase

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 (*stpA*, *hns* Δ); SF41 (*hupA* ∇); SF39 (*hupB* ◆); SF45 (*hupAB* ⊙)

Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen sinken die Überlebensraten des *E. coli*-Wildtypstamm MC4100 und der *stpA*-Mutante SF13 auf ca. 10 % ab. Der Stamm PD32 zeigt noch eine Überlebensrate von 3%. Ähnlich wie der Stamm PD32 verhält sich die *hupB*-Mutante. Mit einer um 99% verringerten Lebendzellzahl überlebt die *hupA*-Mutante. Im Wachstum deutlich verringert liegt die *hupAB*-Doppelmutante, die Überlebensrate liegt bei 0,01%. Im Vergleich zu dem Stamm SF45 mit einer Doppelmutation in *hupAB* sind die Überlebenseigenschaften der *stpA/hns*-Doppelmutante deutlich schlechter, hier beträgt die Überlebensrate im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp MC4100 nur noch 0,0001%. Doppelmutationen in *stpA* und *hns* wirken sich auf die Überlebensrate um das einhundert-fache schwerwiegender aus als Doppelmutationen in den *hupAB*-Genen. Claret *et al.*, (1997) beobachteten in Wachstumsexperimenten, bei welchen Zellen mit Mutationen in *hupA, hupB* oder in beiden Untereinheiten des DNA-Bindeproteins HU in einer verlängerten Stationärphase inkubiert wurden, ebenfalls drastische Überlebensdefekte bei der *hupAB*-Doppelmutante und dokumentierte damit die Beteiligung von HU an Vorgängen in der Stationärphase.

5.2.2 Überlebensverhalten von *stpA* und *hns*-Mutanten

Um den Einfluss der Gene *stpA* und *hns* auf das Überleben in der Stationärphase genauer zu untersuchen, wurde in mehreren Wachstumsversuchen die Lebendzellzahl der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 durch tägliche Probennahme über einen Zeitraum von sieben Tagen und Ausplattierung bestimmt.

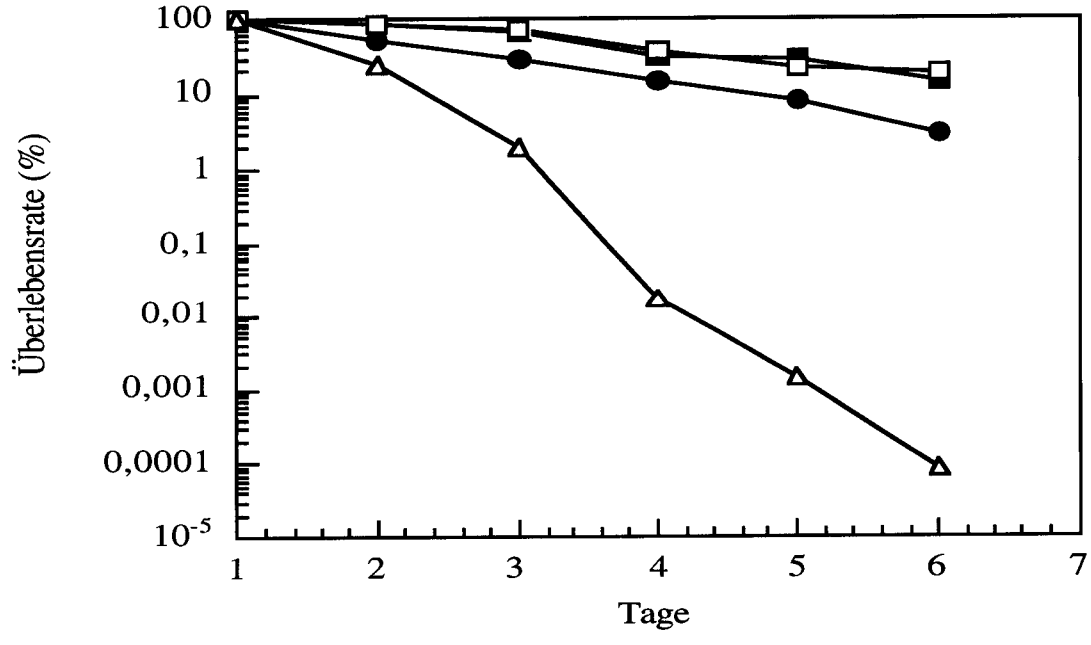


Abbildung 27: Überlebensraten der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 (*stpA*, *hns* Δ)

Mutationen in *stpA* und *hns* führen zu einem drastischen Verlust der Überlebensfähigkeit nach verlängerter Inkubation in der Stationärphase, da Zellen mit Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen im Vergleich zu einem *E. coli*-Wildtyp nur eine Überlebensrate von 0,0001% aufweisen. Diese Auswirkung lässt sich nicht durch eine Addition der Einzelmutationen erklären, da Mutationen in *stpA* sich im Vergleich zum MC4100 nicht auf das Wachstumsverhalten auswirken, und Mutationen in *hns* im Vergleich zur Doppelmutante nur zu einem Überlebensverlust von 3% führen. Offensichtlich unterliegen wichtige Regulationen der Stationärphase einer gemeinsamen Kontrolle durch StpA und H-NS, welche nach einem Ausfall beider Proteine nicht mehr kompensiert werden können.

5.2.3 Komplementation des Überlebensdefekt durch Plasmid-codiertes *stpA* und *hns*

Um die Anwesenheit von funktionsfähigem *stpA* und *hns* als Voraussetzung für die Überlebensfähigkeit zu verifizieren, wurden Komplementationsversuche durchgeführt. Der Doppelmutationsstamm SF20 wurde jeweils mit dem Plasmid pPD3 (low-copy *hns*$^+$), pSK3 (low-copy *stpA*$^+$) und pPD100 (low-copy Kontrolle) transformiert und erneut in einem Langzeit-Wachstumsversuch auf die Überlebensraten überprüft.

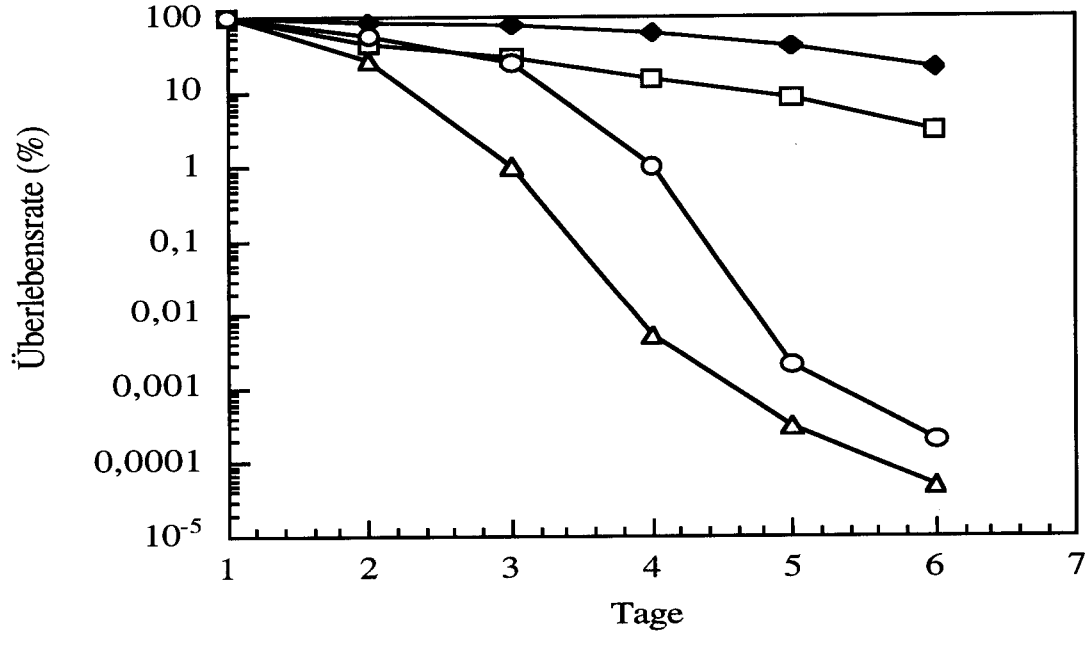


Abbildung 28: Spezifische Beteiligung von *stpA* und *hns* am Langzeit-Überleben

SF20/pSK3 (*stpA*$^+$ □); SF20/pPD3 (*hns*$^+$ ●); SF20/pPD100 (○); SF20 (*stpA*, *hns* Δ)

Der Stamm SF20, welche die Doppelmutation in *stpA* und *hns* trägt, ist in seiner Überlebensfähigkeit drastisch eingeschränkt (IV.5.2.2). Liegt im Stamm SF20 jedoch eine Kopie des *stpA*-Gens auf einem Vektor vor, so verhält sich dieser Stamm in seiner Überlebensfähigkeit ähnlich wie eine chromosomale *hns*-Mutante. Komplementation von SF20 mit einem Plasmid-kodierten *hns*-Gen führt zu einem Überlebensverhalten, welches sich ähnlich verhält wie ein *E. coli* Wildtyp, da eine chromosomale *stpA*-Mutationen sich nicht auf das Überleben auswirkt, wie bereits in Abbildung 26 gezeigt wurde. Der Stamm SF20, welcher mit dem Plasmid pPD100 transformiert wurde, verhält sich in seinem Überlebensverhalten ähnlich wie der Stamm SF20, wenngleich sein Überlebensverhalten besser ausgebildet ist. Durch die Komplementierbarkeit des Überlebensdefektes durch low-copy *stpA* bzw. *hns*-Plasmide kann die Beteiligung der Gene *stpA* und *hns* an wichtigen Funktionen in der Stationärphase gezeigt werden. Das Unvermögen eines Stammes mit Defekten in beiden DNA-Bindeproteinen, während Inkubation in einer verlängerten Stationärphase mit gleicher Überlebensrate zu wachsen wie ein Wildtyp-*E. coli*-Stamm, ist daher direkt mit der Funktion der Gene *stpA* und *hns* korreliert.

5.2.4 Der Überlebensdefekt des Stammes SF20 ist kein Stamm-spezifisches Phänomen

Allelische Variationen in unterschiedlichen Stämmen können zu einem abgewandelten Wachstumsverhalten führen (Chang *et al.*, 1999). Ob das stationärphase-Verhalten der Doppelmutante SF20 spezifisch in Derivaten des MC4100 vorkommt, oder sich unspezifisch auch für weitere *E. coli*-Stämme beobachten lässt, wurde durch Transduktion der Mutationen in einen anderen *E. coli*-Stamm getestet. Der Stamm W3110 diente in P1*vir*-Transduktionen für die *stpA2*::*neo* und die *hns206*::*bla* Mutation als Rezipient, auf gleiche Weise wurde die Doppelmutante SF18 erstellt. Wie die Derivate des Stamms MC4100 wurden die W3110-Derivate einem Langzeitwachstums-Experiment unterzogen, der Vergleich der Überlebensraten ist in Abbildung 29 dargestellt.

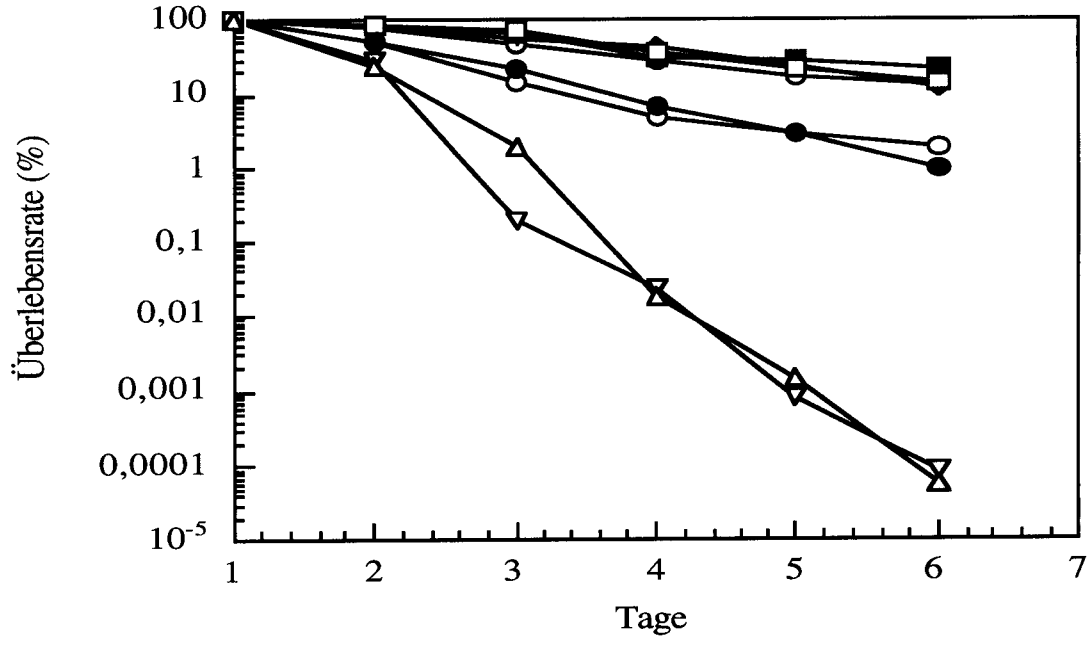


Abbildung 29: Vergleich des Überlebensverhaltens von MC4100 und W3110-Derivaten

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 (*stpA*, *hns* Δ)
W3110 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ◆); SF11 (*stpA*$^+$, *hns* O); SF12 (*stpA*, *hns*$^+$ ⊙); SF18 (*stpA*, *hns* ∇)

Beide *E. coli*-Derivate unterscheiden sich im Bezug auf das Überlebensverhalten der unterschiedlichen Mutanten beim Wachstum in der verlängerten Stationärphase nicht. Die verminderte Überlebensfähigkeit des Stammes SF20 bzw. SF18 beruht somit nicht auf einem Stamm-spezifischen Phänomen, sondern auf dem spezifischen Ausfall der beiden DNA-Bindeproteine *stpA* und *hns*.

5.2.5 Suppressormutanten mit verbesserter Überlebensfunktion

In Wachstumsexperimenten konnte wiederholt beobachtet werden, dass die Population des Stammes SF20 (*stpA, hns*) im Verlauf einer Inkubation während der Stationärphase inhomogen wurde. Neben den ursprünglich wenigen Kolonien mit einem mucoiden Kolonie-Phänotyp, welcher für *hns*-Mutanten typisch ist, traten in grösserer Anzahl nicht mucoide Kolonien auf, die sich nach Testung auf ihre ß-Glucosidverwertung, als Nachweis des H-NS$^-$-Phänotyps, immer noch als *hns*-Mutanten erwiesen. Diese Kolonien mit Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen, aber ohne die typische mucoide *hns*-Kolonie-Morphologie, zeigten in der SF20 Kultur während der Inkubation in der verlängerten Stationärphase wieder das normale Überlebensverhalten, welches ähnlich dem MC4100 war. Dieses Phänomen wird auch als GASP „Growth advantage in

stationary-phase" (Zambrano and Kolter, 1996) bezeichnet. Um dieses für die *stpA/hns*-Kultur untypische Wachstumsverhalten zu differenzieren, wurden die unterschiedlichen mucoiden und nicht-mucoiden Koloniearten gereinigt, und zum Vergleich neben den Ausgangsstämmen MC4100, PD32, SF13 und SF20 in einem Überlebenstest analysiert. Abbildung 30 zeigt das Überlebensverhalten der unterschiedlichen *stpA/hns*-Doppelmutanten, dargestellt ist nur eine repräsentative Anzahl der typischen Wachstumsrevertanten.

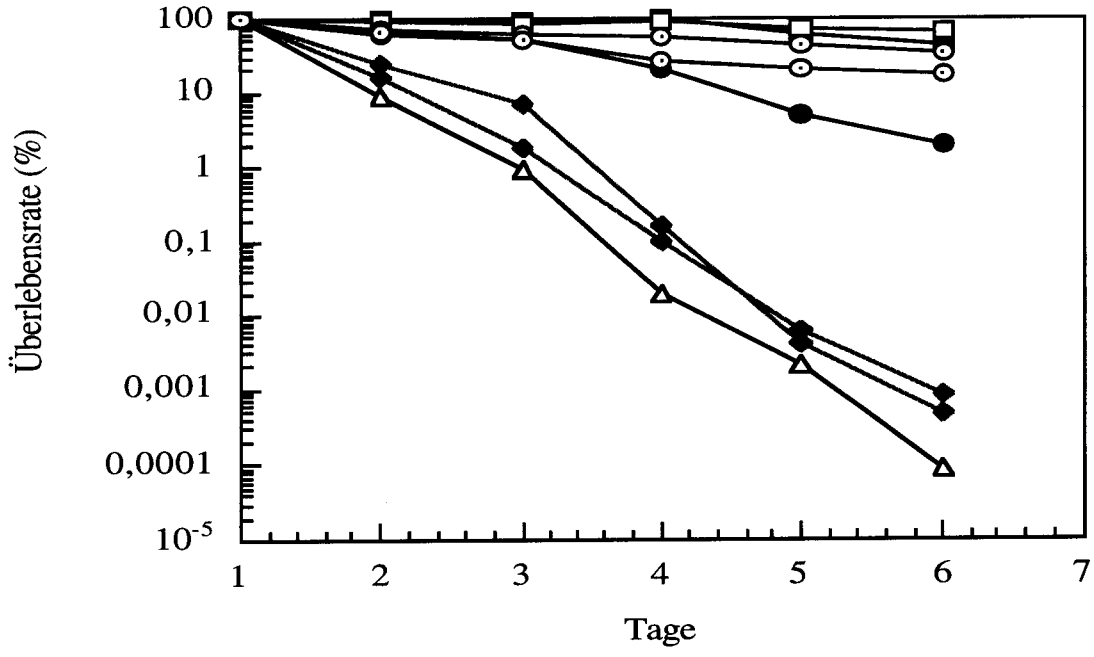


Abbildung 30: Überlebensmutanten im Wachstumsvergleich

MC4100 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$ ■); PD32 (*stpA*$^+$, *hns* ●); SF13 (*stpA*, *hns*$^+$ □); SF20 (*stpA*, *hns* Δ)
nicht mucoide Kolonien (⦿); mucoide Kolonien (◆)

Dargestellt sind nur zwei typische Vertreter jeweils der mucoiden und nicht-mucoiden Koloniearten mit unterschielichem Überlebensverhalten. Verlängerte Inkubation in einer Stationärphase führt zum Auftreten von Suppressormutanten. Durch Testung auf die Glucosidverwertung wurde sichergestellt, dass es sich in allen Fällen um Zellen mit Mutationen in *hns* handelte, weiterhin blieben die Resistenzen gegen die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin bestehen, welche zum Ausschalten der Gene *stpA* und *hns* benutz wurden. Dies zeigt, dass die beobachteten Suppressormutanten weiterhin Mutationen in *stpA* und *hns* tragen und nicht durch Spontanmutationen in *hns* entstanden sind. Die mucoiden Kolonien verhalten sich in ihrer Überlebensfähigkeit ähnlich wie die Doppelmutante. Die nicht mehr mucoiden Kolonien überleben die verlängerte Stationärphase mit einer Überlebensrate vergleichbar dem Wildtyp und stellen sich

somit als Suppressormutanten dar. Da die *stpA* und *hns* Mutationen bestehen blieben kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen in anderen Genen zu einem wiederhergestellten Wachstumsverhalten der nicht mehr mucoiden Kolonien geführt haben.

5.2.6 Überlebens-Suppressormutanten tragen keine Mutationen in *rpoS*

Lange Inkubationszeiten in der Stationärphase werden durch den stationärphasen Sigmafaktor σS reguliert (Lange and Hengge-Aronis, 1991). Zellen, welche einen Wachstumsdefekt in der Stationärphase aufweisen, tragen häufig Mutationen in *rpoS*. Aus diesem Grunde wurden sowohl die Mutanten als auch die Suppressormutanten (siehe Abbildung 29) auf Mutationen hinsichtlich des *rpoS*-Gens untersucht. Mutationen in *rpoS* können physiologisch durch einen Katalase bzw. Glykogen-Test nachgewiesen werden. Sowohl die Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 sowie die in Versuch IV.5.2.5 beobachteten Suppressormutanten reagierten in gleicher Weise auf H_2O_2 mit O_2-Freisetzung und waren weiterhin in der Lage, Glykogen zu akkumulieren.
Neben der physiologischen Untersuchung auf Veränderungen in RpoS wurden mit Hilfe eines RpoS-Antikörpers Zellextrakte von zwei mucoiden und nicht mehr mucoiden Kolonien auf Veränderungen ihres RpoS-Gehaltes auf Proteinebene untersucht.

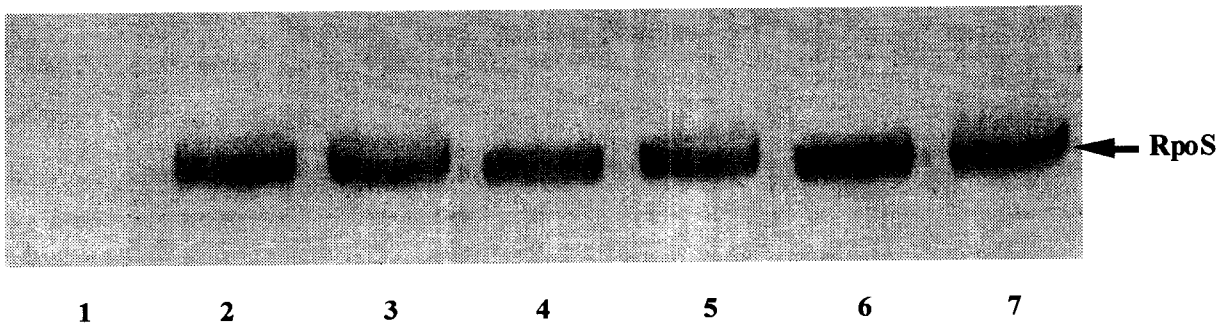


Abbildung 31: Vergleich der Suppressormutanten in einem Westernblot

Für den Westernblot wurden Ganzzellextrakte der verschiedenen Stämme aufgetragen und mit dem RpoS-Antiserum inkubiert
Spur 1: BK18 (*rpoS359*::Tn*10);* Spur 2: MC4100 (*rpoS*$^+$); Spur 3: SF20 (*rpoS*$^+$); Spur 4: Surviver # 1 mucoid; Spur 5: Surviver # 1 nicht-mucoid; Spur 6: Surviver # 2 mucoid; Spur 7: Surviver # 2 nicht- mucoid;

Der Westernblot bestätigt das aus den physiologischen Untersuchungen gewonnene Ergebniss. Deutliche Unterschiede in der RpoS-Konzentration sind innerhalb der unterschiedlichen Ganzzellextrakte nicht zu sehen. Speziell zwischen den verglichenen mucoiden (Spur 4 und Spur 6) bzw. den nicht mucoiden Suppressormutanten (Spur 5 und Spur 7), welche sich durch einen Verlust des Wachstumsdefektes auszeichnen, ist kein Unterschied zu beobachten. Deutlich wird ebenfalls, dass es sich bei dem Stamm BK18 um eine *rpoS*-Mutante handelt (Spur 1).
Somit zeigte keiner der in den Langzeit-Wachstumsexprimenten eingesetzen Bakterienstämme Mutationen in *rpoS*. Für die Suppressormutanten konnten also zusätzliche Mutationen in *rpoS* als Ursache für das wiederhergestellte Überlebensverhalten ausgeschlossen werden.

5.2.6.1 Mutationen in *rpoS* und *non-mucoid*-Genen zeigen keinen Einfluss auf das Langzeit-Überlebensverhalten

Da H-NS an der *rpoS*-Regulation beteiligt ist und weiterhin Zellen mit einem *hns*-Phänotyp eine mucoide Zellmorphologie aufweisen, wurde der Einfluss von Mutationen in *rpoS* und Genen, welche an der Ausprägung eines mucoiden Phänotypen beteiligt sind (*non-mucoid*-Genen), auf das Überlebensverhalten untersucht. Über P1*vir*-Transduktion wurden die Mutationen *rpoS*::Tn*10* und *non*::Tn*10* in die Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 übertragen, und diese anschliessend in einem Überlebensexperiment auf verändertes Wachstumsverhalten untersucht.

Das Anschalten von Mechanismen in der Stationärphase, welche die Zelle vor Stressituationen oder Wachstumslimitationen schützt werden von dem Sigmafaktor *rpoS* kontrolliert. H-NS ist ebenfalls an der Regulation vieler stationärphasen und umwelt-induzierter Gene beteiligt, zusätzlich wirkt es reprimierend auf *rpoS*. Die vollständige Regulation einiger Gene unterliegt also sowohl einer Kontrolle durch RpoS als auch von H-NS. Doppelmutationen in diesen Genen, möglicherweise in Kombination mit *stpA*, könnten zu einem veränderten Wachstumsverhalten während der Stationärphase führen. In Abbildung 32 wird der zusätzliche Einfluss von Mutationen in *rpoS* auf die Überlebensrate der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 gezeigt.

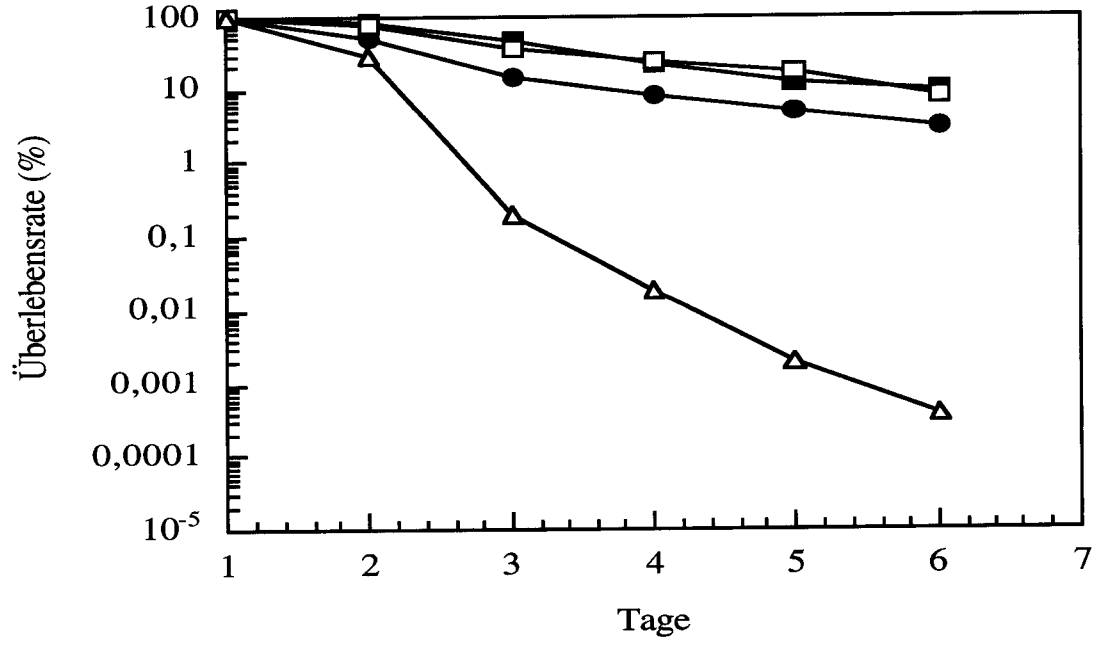


Abbildung 32: Überlebensverhalten nach zusätzlicher Einbringung einer *rpoS*359::Tn*10*-Mutation

SF58 (MC4100 *rpoS359*::Tn*10* ■); SF59 (PD32 *rpoS359*::Tn*10* ●); SF60 (SF13 *rpoS359*::Tn*10* □); SF61 (SF20 *rpoS359*::Tn*10* Δ)

Im Vergleich zur Überlebensrate der einzelnen Stämme ohne die zusätzliche Mutationen in *rpoS* (Abbildung 26) ist kein Unterschied nach Einbringen der *rpoS359*::Tn*10*-Mutation festzustellen. In diesem Experiment verändert demnach eine zusätzliche *rpoS*-Mutation nicht den bereits bestehenden Überlebens-Phänotyp durch Mutationen in den DNA-Bindeproteinen *stpA* und *hns*.

Die extreme Schleimbildung in *hns*-Zellen kann Einfluss auf das Wachstumsverhalten nehmen, da eine unkontrollierte Schleimbildung eine korrekte Zellteilung beeinträchtigt. Oft wird beobachtet, dass Bakterien nach langen Inkubationsphasen in Hungerzuständen durch Störungen in ihrem Kolonie-Bildungsvermögen nicht mehr anwachsen können, jedoch nicht abgestorben sind. Das verminderte Wachstumsverhalten beruht oft auf einem Zellteilungsdefekt, welcher aufgrund hoher Polysaccharidproduktionen und damit extremer Schleimbildung beeinflusst sein kann. Das Wachstumsverhalten der Stämme nach Einbringen einer zusätzlichen *non*::Tn*10*-Mutation wird in Abbildung 33 dargestellt.

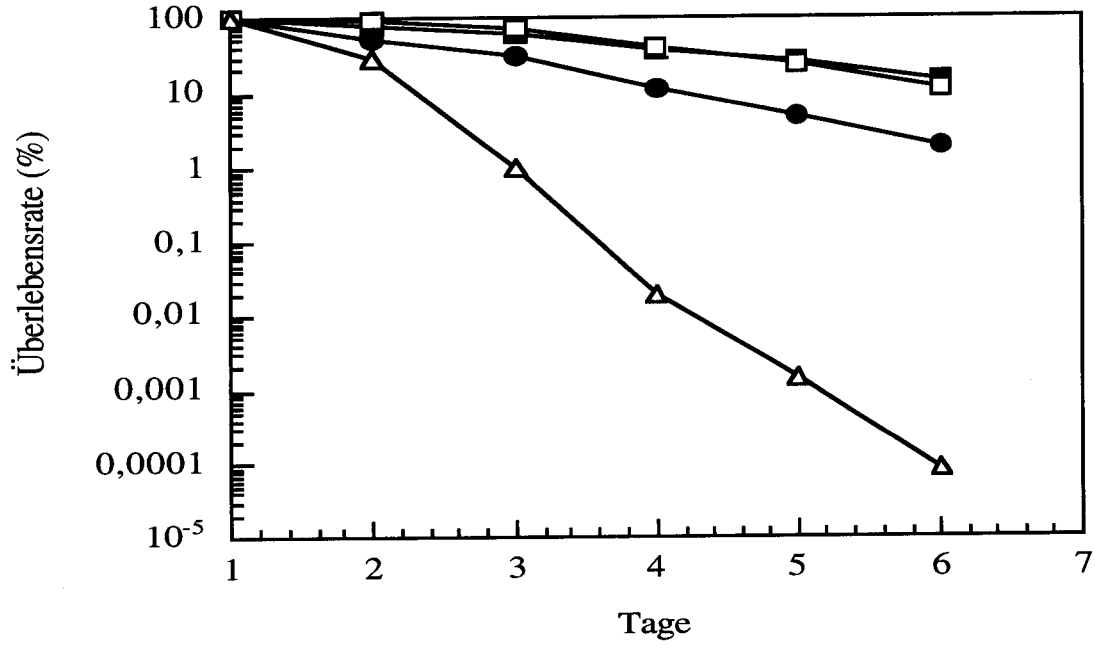


Abbildung 33: Überlebensverhalten nach zusätzlicher Einbringung einer *non*::Tn*10*-Mutation

SF64 (MC4100 *non*::Tn*10* ■); SF65 (PD32 *non*::Tn*10* ●); SF66 (SF13 *non*::Tn*10* □); SF67 (SF20 *non*::Tn*10* Δ)

Im Vergleich zur Abbildung 29 zeigt auch die zusätzliche Einbringung einer *non*::Tn*10*-Mutation keinen Einfluss auf die Überlebensrate. Weder zusätzliche Mutationen in *rpoS*, noch in Genen, welche die Polysaccharid-Bildung beeinflussen, wirken sich, in Kombination mit Mutationen in *stpA* und *hns* auf das Überlebensverhalten aus.
Die getesteten Parameter *rpoS* und *non-mucoid*-Gene beeinflussen das drastische Absterben von *stpA/hns*-Doppelmutanten nach einer verlängerten Inkubation in der Stationärphase nicht.

5.3 Regulation von *ompW*, *ompX* und *dps* durch H-NS

Ursachen für einen drastischen Verlust der Überlebensfähigkeit in Langzeitwachstumsexperimenten stellen häufig Membranveränderungen der betroffenen Bakterien dar (Lazar *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurden aus den Stämmen MC4100, PD32, SF13 und SF20 Präparationen der äusseren Zellmembran vorgenommen (III.6.7) und auf einem 15 %-igem SDS-Polyacrylamid Gel analysiert. Abbildung 34A zeigt Membranpräparationen der Stämme MC4100, PD32, SF13 und SF20 sowie die Komplementation des Stammes PD32 mit den Plasmiden pPD3 bzw. pSK3. In Abbildung 34B ist ein Vergleich der Membranpräparationen aus MC4100 bzw. W3110-Derivaten dargestellt.

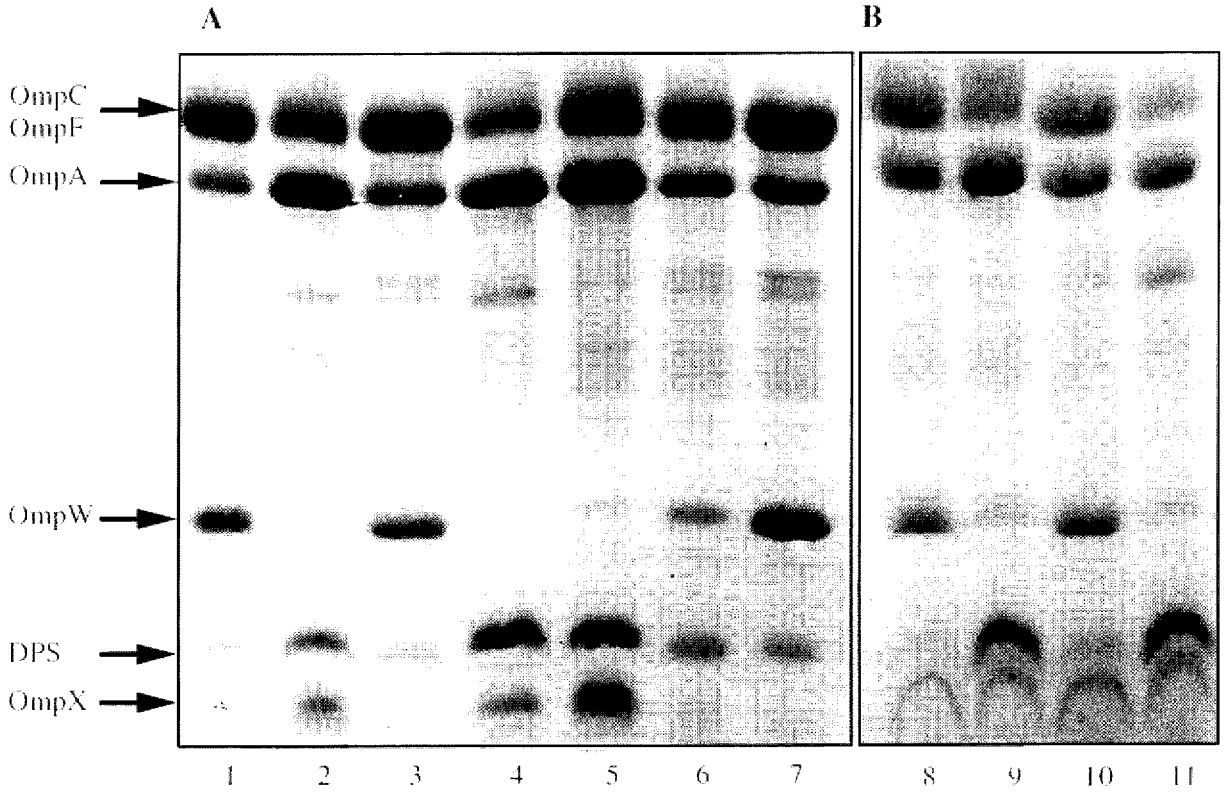


Abbildung 34: Präparationen der äusseren Membran aus stationärphase-Kulturen

A: Spur 1: MC4100; Spur 2: PD32; Spur 3: SF13; Spur 4: SF20; Spur 5: PD32/pPD100; Spur 6: PD32/pSK3 (*stpA*$^+$); Spur 7: PD32/pPD3 (*hns*$^+$)

B: Präparationen der äusseren Membranen aus MC4100 und W3110-Derivaten
Spur 8: W3110 (*stpA*$^+$, *hns*$^+$); Spur 9: SF11 (*stpA*$^+$, *hns*); Spur 10: SF12 (*stpA*, *hns*$^+$), Spur 11: SF18 (*stpA*, *hns*)

Nach Präparation der äusseren Membran werden drei prominente bereits bekannte Banden sichtbar. Die Proteine OmpC und OmpF werden durch ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamid Gel nicht getrennt und laufen in einer Bande (40 kDa). Mit einem Molekulargewicht von 37 kDa wandert das Protein OmpA. OmpC und OmpF dienen als Porine und werden durch Salz reguliert. Als zusätzliche Bande in *hns*$^+$-Stämmen trat ein Protein von 22 kDa auf. Die Ansequenzierung des N-Terminus ergab, dass es sich bei diesem Protein um OmpW handelte. OmpW tritt nur in Präparationen eines *hns*$^+$-Stammes auf, sei es in MC4100-Derivaten (34A: Spur 1: MC4100 und Spur 3: SF13, beide *hns*$^+$), oder in den W3110-Derivaten (34B: Spur 8: W3110 und Spur 10: SF12). Beim Vergleich der beiden Stamm-Derivate fällt jedoch auf, dass in W3110-Derivaten auch in den *hns*-Stämmen SF11 und SF18 (34B: Spur 9 und Spur 11) die Bildung von OmpW nicht völlig unterbleibt sondern geringe Konzentrationen des Proteins weiterhin gebildet werden. Im Gegensatz dazu wird in *hns*-Derivaten des Stammes MC4100 PD32 und SF20 (34A: Spur 2 und Spur 4) kein OmpW gebildet. OmpW gehört demnach zu den wenigen Proteinen, welche einem positiven Einfluss durch *hns* unterliegen, da die meisten Gene durch H-NS transkriptionell reprimiert werden. Neben der OmpW-Bande treten zwei weitere Banden auf, die ebenfalls einer Regulation durch H-NS unterliegen. Die N-terminale Ansequenzierung der beiden Protein identifizierte das grössere Protein als DPS, welches ein Molekulargewicht von 19 kDa besitzt, und das kleinere Protein als OmpX mit einem Molekulargewicht von 16,5 kDa. Die Bildung beider Proteine ist in den *hns*-Stämmen PD32 und SF20 (34A: Spur 2 und Spur 4) deutlich gesteigert. Im Gegensatz zu OmpW, dessen Bildung durch H-NS aktiviert wird, unterliegen die Proteine DPS und OmpX demnach einer Repression durch H-NS. In einem *hns*-Stamm ist das low-copy *hns*-Plasmid pPD3 vollständig in der Lage, den positiven Einfluss von H-NS auf die OmpW-Bildung zu ersetzten, und die Bildung der Proteine DPS und OmpX zu reprimieren (34A: Spur 7). Der Einfluss des low-copy *stpA*-Plasmid pSK3 reicht nur zu einer unvollständigen Bildung von OmpW und Repression von DPS und OmpX (34A: Spur 6) aus. Die Komplementation des Stammes PD32 mit dem Vektor pPD100 verändert das Proteinmuster nach Membranpräparation des Stammes nicht, im Vergleich zu PD32 ohne den Vektor pPD100 (34A: Spur 5). Der Einfluss der chromosomalen *hns*-Mutation kann also durch Plasmid-codiertes *hns* vollständig ersetzt werden, geringe Konzentrationen an *stpA* führen nur zu einer unvollständigen Komplementierung des *hns*-Phänotypes. StpA kann die Funktion von *hns* an der Regulation der Proteine OmpW, OmpX und Dps zwar partiell komplementieren, chromosomale Mutationen in *stpA* zeigen jedoch keinen Einfluss auf die Bildung dieser Proteine. Durch die Korrelation der Bildung von OmpW bzw. Repression von DPS und OmpX durch Komplementierung des Stammes PD32 mit Plasmid-codiertem *hns* kann der Einfluss von H-NS auf die Regulation dieser Proteine verifiziert werden.

V. Diskussion

DNA-Bindeproteine wie StpA und H-NS stellen in der *E. coli* Zelle eine Einheit mit sowohl kompaktierender als auch regulierender Funktion dar (Bertin *et al.*, 1999; Drlica *et al.*, 1987; Luger *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu H-NS, dessen Funktionen seit Jahren intensiv erforscht werden, ist über die Beteiligung von StpA an physiologischen Vorgängen und dem Einfluss auf die Genexpression bei *E. coli* wenig bekannt. Seine strukturellen und funktionellen Homologien zu H-NS weisen StpA als einen molekularen „back-up" von H-NS aus, da StpA in der Lage ist, einige *hns*-Phänotypen, zumindest partiell, zu komplementieren (Shi & Bennet, 1994; Williams *et al.*, 1996). Darüberhinaus wirkt StpA als RNA-Chaperon und erfüllt spezifische Aufgaben beim RNA-Assembly (Zhang *et al.*, 1995; Clodi *et al.*, 1999; Negroni & Buc, 1999).

1 Einfluss von Mutationen in *stpA* und *hns* auf physiologische Parameter in *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chromosomale Mutationen in *stpA* erstellt,und ihr Einfluss auf das bakterielle Wachstum und auf die Regulation des *proU*-Operon sowie des *bgl*-Operons untersucht. Um einen direkten Vergleich zu Mutationen in *hns* zu ziehen, welche sich sowohl im 3´- (*hns205*::Tn*10*, Higgins *et al.*, 1988) als auch im 5´-Bereich von *hns* (*hns206*::*bla*, Dersch *et al.*, 1993) befinden, wurden Antibiotikakassetten ebenfalls sowohl im 5´- (*stpA2*::*neo*) als auch im 3´-Bereich (*stpA1*::*spc*) von *stpA* inseriert. Durch eine Kombination der unterschiedlichen Mutationen in *hns* und *stpA* entstanden Stämme mit Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen. Mutationen in DNA-Bindeproteinen wirken sich pleiotroph auf die bakterielle Zelle aus, da diese an der Regulation von globalen Vorgänge wie Rekombination, Transkription und Transposition beteiligt sind (Williams & Rimsky, 1997; Donato *et al.*, 1997; Dri *et al.*, 1991; Gerard *et al.*, 1999). Aufgrund ihres meist unspezifischen Bindungsverhalten können sich die Proteine untereinander in ihrer Funktion häufig ersetzen.

Weder *stpA* noch *hns* sind essentell für das bakterielle Wachstum, da Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen unabhängig voneinander nicht lethal für die *E. coli* Zelle sind. Dabei zeigen Mutationen in *hns* jedoch weitreichendere Auswirkungen auf die Physiologie der bakteriellen Zelle im Vergleich zu Mutationen in *stpA*. Auch das Vorliegen von Doppelmutation in *stpA* und *hns* kann von der bakteriellen Zelle toleriert werden, wenngleich sich Doppelmutationen in einem deutlich verlangsamten Wachstum äussern.

1.1 Bakterielles Wachstum

Der Einfluss von Mutationen in *hns* wurde bereits vielfältig untersucht, und eine Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstums durch Mutationen in *hns* festgestellt (Yasuzawa *et al.*, 1992; Dersch *et al.*, 1993). Dabei wirken sich Mutationen in verschiedenen Domänen von *hns* unterschiedlich auf die Wachstumsrate von *E. coli* aus. Eine stärkere Beeinträchtigung geht

von der Mutation *hns206::bla* des Stammes PD32 aus, welcher eine Mutation im N-Terminus des H-NS-Proteins trägt (Atlung *et al.*, 1997; Dersch *et al.*, 1994).
Mutationen in *hns* wirken sich besonders auf das Wachstum in der Kälte aus, da *hns* zu dem Kälteregulon von *E. coli* gehört und an der Expression von Genen beteiligt ist, welche der Zelle Schutz vor Gefrierschäden bieten (Dersch *et al.*, 1994; La Taena *et al.*, 1991). H-NS trägt in seiner Promotorregion Sequenzen, welche von dem Transkriptionsaktivator CspA erkannt werden, dieser fungiert als ein übergeordneter Modulator des Kälteregulons (Brandi *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Mutationen in *hns* führen Mutationen in *stpA* nur zu einer geringen Beeinträchtigung des bakteriellen Wachstum, sowohl bei 37°C als auch in der Kälte. In der Promotorregion von *stpA* ist die Y-Box, welche als Sequenzmotiv für die Bindung des Kälteschockproteins CspA fungiert, nicht lokalisiert. Damit sprechen sowohl physiologische als auch Sequenzdaten dafür, dass *stpA,* im Gegensatz zu *hns,* nicht zum Kälteregulon von *E. coli* gehört.
Im Gegensatz zu *hns* zeigen Mutationen in *stpA* nur geringfügige Auswirkungen auf das bakterielle Wachstum. Ein leichter Effekt auf die Wachstumsrate geht allenfalls von der *stpA2::neo*-Mutation des Stammes SF13 aus, welche im 5´-Bereich von *stpA* lokalisiert ist. Veränderungen im 3«-Bereich von *stpA* beeinträchtigen das bakterielle Wachstum nicht. Sowohl bei 37°C als auch bei 18°C ist nur eine leichte Wachstumseinschränkung des Stammes SF13 (*stpA2::neo*) sichtbar. H-NS ist in der Lage, Ausfälle von StpA, welche zu einer Wachstumseinschränkung führen könnten, zu komplementieren. Somit ist es schwierig, in einer *stpA*-Mutante den tatsächlichen Einfluss von *stpA* auf die *E. coli*-Physiologie zu bewerten, da in den meisten Fällen die Auswirkungen der *stpA*-Mutation durch H-NS überdeckt werden. Erst in einer *stpA/hns*-Doppelmutante wird der Ersatz des einen Proteins durch das andere Protein verhindert. Dies führt dazu, dass Mutationen in den beiden DNA-Bindeproteinen StpA und H-NS gleichzeitig deutlichere Effekte zeigen, als eine Addition der Effekte der Einzelmutationen ergeben würden. Diese Beobachtung tritt besonders bei einer Wachstumstemperatur von 18°C auf, wobei sich, im Vergleich zu einem Wildtypstamm, die Verdopplungszeit des Doppelmutantenstammes SF20 von 5 h auf 20 h vervierfacht, im Vergleich zum Stamm PD32 verdoppelt sich die Generationszeit des Stammes SF20 von 10 h auf 20 h. Wenngleich auch StpA scheinbar nicht zum Kälteregulon von *E. coli* gehört und nicht direkt einen Schutz des bakteriellen Wachstum bei niedrigen Temperaturen vermittelt, zeigt ein Ausfall beider DNA-Bindeproteine gleichzeitig einen kältesensitiveren Phänotypen als Mutationen in *hns* alleine. Möglicherweise benötigen andere Gene des Kälteregulons zu ihrer Regulation eine gemeinsame oder zumindest gleizeitige Funktion von StpA und H-NS.
Eine Komplementation des Ausfalles von StpA bzw. H-NS ist in Stämmen mit Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen nicht gegeben, daher wirken sich Doppelmutationen in s*tpA* und *hns* gleichzeitig deutlich stärker aus als die jeweiligen Einzelmutationen. In Ergänzung dazu haben Untersuchungen mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese ergeben, dass in einer StpA/H-NS-Doppelmutante, im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutationen, ein verändertes Proteinmuster vorliegt (Laurent-Winter *et al.*, 1997). Bislang sind noch keine Proteine

identifiziert, die in ihrer Regulation alleine von StpA abhängen. Eine gemeinsame Wirkung von StpA und H-NS ist bislang für das *proU*-Operon, das *bgl*-Operon, das Maltose-Regulon und das *pap*-Operon beschrieben (Free *et al.*, 1998; Johannson *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Beteiligung von StpA an Wachstumsvorgängen ebenfalls der Einfluss von StpA auf das *proU* und das *bgl*-Operon näher charakterisiert.

1.2 Einfluss von *stpA* auf das *proU*-Operon

Das *proU*-Operon, welches aus den Strukturgenen *proV*, *proW* und *proX* besteht, codiert in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* für ein Aufnahmesystem der osmotischen Schutzsubstanz Glycin-Betain (Owen-Hughes *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1988; Gowrishankar & Manna, 1996; Haardt *et al.*, 1995; May *et al.*, 1990; Lucht & Bremer, 1994). Unter nieder-osmolaren Umständen reprimiert H-NS die Expression von *proU*, unter erhöhter Osmolarität hingegen steigt die Transkription des *proU*-Operons an (Lucht *et al.*, 1994).
Durch Bindung an regulatorische Sequenzen kann H-NS als „transkriptioneller silencer" wirken, indem es einerseits die Prozessivität der RNA-Polymerase beeinträchtigt (Ueguchi & Mizuno, 1993; McGovern *et al.*, 1994), und andererseits dieDNA-Topologie beeinflusst. Diese Topologieveränderung kann zu einer veränderten Bindeeffiziens der RNA-Polymerase oder anderer regulatorischer Faktoren an die DNA führen (Tupper *et al.*, 1994; Owen-Hughes *et al.*, 1992). Ca. 200 bp vom Transkriptionsstart des *proU*-Operons entfernt ist eine regulatorische Sequenz lokalisiert, welche als downstream regulatory element (DRE) bezeichnet wird. Das DRE enthält AT-reiche Sequenzen und ist als gebogene DNA charakterisiert (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Durch die Bindung von H-NS an das DRE wird das *proU*-Operon bei niedrieger Osmolarität reprimiert (Lucht *et al.*, 1994; Owen-Hughes *et al.*, 1992).
Bei erhöhter Osmolarität wird die Oligomerisierung von H-NS durch die Akkumulation von Kalium-Ionen, welche als Primärantwort auf einen osmotischen Schock in *E. coli* gebildet werden, gestört. Vermutlich führt dieser Kalium-Anstieg zu einer geringeren Bindeaffinität von H-NS an das DRE (Tippner & Wagner, 1995). Weiterhin reagiert die Transkription des *proU*-Operons auf Änderungen im Supercoiling der DNA, die u.a. durch eine erhöhte Osmolarität ausgelösst werden (Ni Bhriain *et al.*, 1989; Hsieh *et al.*, 1991). Daher wirkt sich eine erhöhte Osmolarität zusätzlich über eine Zunahme des negativen Supercoils auf regulatorische Bereiche des *proU*-Operons aus (Higgins *et al.*, 1988). Durch diese veränderte DNA-Topologie vermag die RNA-Polymerase effektiver an den *proU*-Promotor zu binden, was in einer gesteigerten Transkriptionsrate resultiert (Higgins *et al.*, 1988; Rajkumari *et al.*, 1996).
Mutationen in *hns* führen zu einer Dereprimierung des *proU*-Operons. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Mutationen in der regulatorischen Region des *proU*-Operons einen höheren Grad der Derepression aufweisen als Mutationen in *hns* alleine (Fletscher & Csonka, 1995). Dies spricht dafür, dass *hns* nicht die einzige regulatorische Komponente des *proU*-Operons darstellt (Jordi *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Bindestudien und physiologische Experimente gezeigt werden, dass StpA an das *proU*-Operon bindet, und damit

ebenfalls an der Regulation der *proU*-Expression beteiligt ist. Mutationen im 5´-Bereich von *stpA* führen im Vergleich zu Mutationen in *hns* ebenfalls zu einer deutlichen Dereprimierung des *proU*-Operons, wohingegen Mutationen im 3´-Bereich von *stpA* sich nicht auf die Expression von *proU* auswirken. Da die *stpA*-Mutation *stpA*3::*spc* zu einer gesteigerten Expression des *proU*-Operons führt, liegt die funktionelle Domäne für die *proU*-Regulation oder zumindest Interaktion also im 5«-Bereich von *stpA*. Die Domänenstruktur von StpA ist vergleichbar mit H-NS. Der N-Terminus übernimmt Funktionen der Dimerisierung, die DNA-Bindedomäne ist im C-Terminus lokalisiert (Shindo *et al.*, 1999; Cusick & Belfort, 1998). Möglicherweise unterstützt StpA Funktionen von H-NS bezüglich der Regulation des *proU*-Operons, indem es zur Heterodimerbildung zwischen StpA und H-NS kommt. Dadurch wirken sich Mutationen im C-Terminus des StpA-Proteins nicht auf die Repressionsfähigkeit bezüglich des *proU*-Operons aus, da die StpA-DNA-Bindedomäne zur Repression nicht benötigt wird, sondern diese Funktion stattdessen möglicherweise von H-NS übernommen wird.
Beim Wachstum in Medien mit steigender Osmolarität ist die *proU*-Expression in Stämmen mit Mutationen in *stpA* und *hns* nicht der tatsächlich-vorliegenden Osmolarität angepasst. Stattdessen reagieren die Zellen mit einer *proU*-Expression, als ob höhere Osmolaritäten vorliegen würden. Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen gleichzeitig zeigen in allen Experimenten den stärksten Einfluss auf das *proU*-Operon. Dies unterstreicht das koordinierte Zusammenwirken von StpA und H-NS. Damit kann StpA als eine regulatorische Komponente an der *proU*-Regulation identifiziert werden.
Eine Dereprimierung des *proU*-Operons aufgrund einer Mutation in *hns* kann durch Plasmid-codiertes *stpA*, in Abhängigkeit von seiner gebildeten Menge, komplementiert werden. Dadurch besitzt StpA bezüglich der Wiederherstellung der Repression des *proU*-Promotors eine deutliche Funktion als molekularer „back-up" für H-NS. Durch Band-Shift Assays konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass StpA mit hoher Affinität spezifisch an den *proU*-Promotor bindet. Für H-NS konnte zusätzlich in Foot-print-Experimenten von Dersch (1995) und Lucht *et al.* (1994) eine Bindung an AT-reiche Sequenzen im *proU*-Promotorbereich gezeigt werden. Da also beide Proteine an die *proU*-Promotorregion binden, kann die Repression des *proU*-Operons möglicherweise nicht nur durch eine Heterodimerbildung von StpA und H-NS hervorgerufen werden, sondern auch durch direkte Bindung beider Proteine unabhängig voneinander an regulatorische Sequenzen des *proU*-Promotors bedingt sein.

1.3 Repression des *bgl*-Operons durch *stpA*

Die Nutzung von aromatischen ß-Glykoside, wie z.B. Salicin oder Arbutin, erfolgt durch Genprodukte des *bgl*-Operons (Schnetz *et al.*, 1987). Normalerweise ist dieses Operon kryptisch, da in der Natur viele toxische ß-Glykoside vorkommen, deren Verwertung zu einer Schädigung von *E. coli* führen würden. Es wurde beobachtet, dass in pathogenen *E. coli*-Stämmen das *bgl*-Operon häufig exprimiert wird . Das *bgl*-Operon reagiert in geringem Masse auf lokale Veränderungen im DNA-Supercoiling mit einer Veränderung seiner

Transkriptionsrate (Pruss *et al.*, 1982). Durch Interaktion mit der *bgl*-Promotorregion ist H-NS massgeblich an der Kontrolle dieses Operons beteiligt (Mukerji & Mahadevan, 1997; Lejeune & Danchin, 1990). Durch seine Bindung an flankierende Sequenzen des *bgl*-Operons wird aufgrund der gebildeten Nukleoproteinkomplexen eine Transkription verhindert (Schnetz, 1995; Schnetz & Wang, 1996). Das DNA-Bindeprotein Fis bindet ebenfalls an den Promotor und repimiert dadurch zusätzlich zu H-NS die *bgl*-Transkription.

Durch Plasmid-codiertes *stpA* kann das *bgl*-Operon in einer *hns*-Mutante vollständig reprimiert werden. Bei der Dereprimierung des *bgl*-Operons in einer *hns*-Mutante wirkt sich eine Mutation im 5´-Bereich von *hns* in einer vollständigen Dereprimierung aus, Mutationen im 3´-Bereich führen hingegen nur zu einer unvollständigen Dereprimierung des *bgl*-Operons (Ohta *et al.*, 1999). Diese Beobachtung veranlasste Free *et al.* (1998) zu einer Untersuchung der Beteiligung von StpA an der *bgl*-Regulation. Sie postulierten, dass StpA als ein Adapter für dass unvollständige H-NS-Protein anzusehen ist. Im Falle der *hns205*::Tn*10*-Mutation wird ein verkürztes H-NS-Protein gebildet, welches im C-Terminus eine Mutation in der DNA-Bindedomäne trägt (Dersch *et al.*, 1994). Diese Mutation äussert sich nicht in einer vollständigen Derepression des *bgl*-Operons. Da StpA im Falle der Regulation des *bgl*-Operons als molekularer „back-up" für H-NS fungiert, und *hns*-Phänotypen komplementieren kann, wurde geschlossen, dass StpA im Falle eines C-terminal verkürzten H-NS-Proteins, wie es in der *hns205*::Tn*10*-Mutation vorliegt, die DNA-Bindedomänenfunktion ersetzen kann, und somit als Adapter in der *bgl*-Repression wirkt (Free *et al.*, 1998). Diese Beobachtung konnte von Ohta *et al.* (1999) nicht bestätigt werden, sie postulierten stattdessen eine Beteiligung von *rpoS* an der *bgl*-Regulation und mutmasten eine unterschiedliche Senisitivtät des intakten H-NS-Proteins im Vergleich zu dem C-terminal verkürzten H-NS-Protein in der Wirkung auf *rpoS*. Ob dabei eine direkte Beteiligung von *rpoS* vorliegt, oder die Wirkung auf eine neues, bislang nicht identifiziertes Protein in der *bgl*-Regulation auftritt, konnten die Experimente bislang nicht klären. Es bleibt also weiterhin unklar, ob StpA, dass zweifelsfrei an der *bgl*-Repression beteiligt ist, durch eine direkte Bindung an regulatorische Sequenzen auf das *bgl*-Operon wirkt, oder seinen Einfluss durch Heterodimerbildung mit dem H-NS-Protein in Form eines molekularen Adapters ausübt.

Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten ein Zusammenwirken von StpA und H-NS bei der Repression des *proU* bzw. des *bgl*-Operons nachweisen. Weiterhin ist StpA in der Lage, *hns*-Phänotypen bezüglich der Regulation des *proU*-Operons und des *bgl*-Operons zumindest partiell zu komplementieren, und wird daher in diesen Fällen zurecht als molekularer „back-up" für *hns* bezeichnet (Williams *et al.*, 1996; Shi & Bennett, 1994).

In welcher Art die genaue Regulation erfolgt ist noch nicht geklärt, weiterhin ist noch wenig bekannt über die Beteiligung von StpA an der Repression dieser Promotoren. Eine Bindung von StpA an Promotorsequenzen konnte bislang nur für das *proU*-Operon, im Rahmen dieser Arbeit, durch Bandshift-Assays nachgewiesen werden.

2 Regulation der *stpA*-Expression

Die Expression von DNA-Bindeproteine ist häufig in Korrelation zu der Wachstumskurve reguliert (Talukder *et al.*, 1999). Neben einer wachstumsphasen-abhängigen Expression werden die Proteine HU, Fis, Lrp, H-NS und IHF ebenfalls durch ihr eigenes Genprodukt negativ autoreguliert (Claret & Rouvière-Yaniv, 1996; Falconi *et al.*, 1996; Dersch *et al.*, 1993; Landgraf *et al.*, 1996; Rice, 1997). Das Fis-Protein wird als einziges DNA-Bindeprotein ausschliesslich in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, während die Fis-Bildung beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase komplett eingestellt wird (Falconi *et al.*, 1996). In geringen Mengen wird auch Lrp in der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, Lrp ist jedoch auch noch in der stationären Wachstumsphase vorhanden (Bhagwat *et al.*, 1997). Eine transiente Anschaltung beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase erfolgt bei HU (Painbeni *et al.*, 1993). IHF wird vermehrt in der frühen stationären Wachstumsphase gebildet (Rice, 1997). Ein Protein, welches nur in der Stationärphase in grossen Mengen gebildet wird, ist Dps (Almiron *et al.*, 1992), es macht den Hauptbestandteil der Gesamtproteinmenge in der Stationärphase aus. Über *hns-lacZ*-Fusionen konnte von Dersch *et al.*, (1993) eine verstärkte Bildung und Akkumulation von H-NS in der Stationärphase nachgewiesen werden, welche in Einklang mit Beobachtungen von Spassky *et al.* (1984) stand. In Northern-Blot-Experimenten beobachteten Free & Dormann (1995) jedoch eine transiente Anschaltung der *hns*-Expression beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase mit einem Abfall der *hns*-mRNA-Menge in der Stationärphase. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der Konstruktion der *hns*-Reportergen-Fusion liegen. Die von Dersch *et al.* (1993) verwendete *hns-lacZ*-Fusion liegt nicht am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom vor, sondern wurde in die *attB*-Stelle des Phagen Lamda inseriert. Damit könnten mögliche regulatorische Elemente aus der authentischen *hns*-Genregion fehlen, welche für die korrekte Regulation der *hns*-Expression notwendig sind.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *stpA-lacZ*-Fusion konstruiert, welche am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom integriert ist, und damit alle regulatorischen Komponeneten beinhaltet. Mittels dieser *stpA*-Reportergenfusion konnte eine transiente Anschaltung der *stpA*-Expression beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase beobachtet werden, welche im Verlauf der stationären Wachstumsphase dann wieder auf ein niedrigeres Niveau abfällt. Diese Beobachtung wurde ebenfalls über Westernblotexperimente mittels eines Anti-StpA-Antikörpers bestätigt. Das StpA-Protein wird beim Übergang zur stationären Wachstumsphase gebildet, zum Ende der stationären Wachstumsphase ist StpA im Westernblot jedoch nicht mehr nachweisbar. Weiterhin konnte in Komplementationsversuchen eine negative Autoregulation der *stpA*-Expression durch Plasmid-codiertes *stpA* beobachtet werden. Auch H-NS führt zu einer Repression der *stpA*-Expression, dagegen ist in einer *hns*-Mutante die *stpA*-Expression deutlich erhöht. Zu übereinstimmenden Ergebnissen kamen auch Untersuchungen von Free & Dorman, (1997); Sonden & Uhlin, (1996) und Zhang *et al.* (1996). Sie beobachteten ebenfalls eine transiente Anschaltung der

stpA-Expression beim Übergang zur stationären Wachstumsphase, sowie eine negative Autoregulation und eine Repression durch H-NS. Somit liegt mit der *stpA-lacZ*-Fusion am authentischen Genort eine geeignete Reportergenfusion vor, um regulatorische Einflüsse auf die *stpA*-Expression zu messen.

2.1 Einfluss weiterer DNA-Bindeproteine auf die *stpA*-Expression

DNA-Bindeproteine sind häufig an der Regulation von Genen beteiligt, welche auf Umwelteinflüsse reagieren. Sie bilden damit eine wichtige Schnittstelle zwischen der bakteriellen Zelle und dem sie umgebenden Habitat (Bewley *et al.*, 1998; Atlung & Ingmer, 1997; Hayat & Mancarella, 1995; Schmid, 1990). Bei der Reaktion auf Umweltreize und der Vermittlung ihrer Signale agieren die DNA-Bindeproteine nicht nur unabhängig voneinander, sondern üben auf ihre Zielgene sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte aus. Komplexe aus HU, IHF und Fis aktivieren die Initiation der Replikation am *oriC* (Gille *et al.*, 1991; Goosen & van de Putte, 1995; Shindo *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1994; Hwang & Kornberg, 1992). Fis und H-NS aktivieren beide die homologe Rekombination (Landy *et al.*, 1993). Die Transposition des Phagen Mu wird positiv sowohl durch HU als auch von IHF beeinflusst (Wada *et al.*, 1989; Lavoie & Chaconas, 1994), während H-NS die aktivierende Wirkung von IHF auf die Transposition aufhebt (Kano *et al.*, 1993). Die von H-NS und HU inhibierende Auswirkung auf das *hin*-System wird von IHF suprimiert (Goshima *et al.*, 1994). Antagonistische Effekte gehen von Fis und H-NS auf die rRNA-Synthese aus (Afflerbach *et al.*, 1999). Aufgrund ihres eher unspezifischen DNA-Bindeverhalten können sich DNA-Bindeproteine in ihrer Funktion teilweise untereinander ersetzen. Dabei wird eine Komplementation von HU-spezifischen Funktionen durch IHF diskutiert (Pettijohn 1988), weiterhin ist StpA als ein molekulare „back-up" für H-NS bekannt (Sonden & Uhlin, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Neben der Beeinflussung gleicher Zielgene sind DNA-Bindeproteine auch gegenseitg an ihrer Regulation beteiligt. Fis aktiviert die Expression von *hns* (Falconi *et al.*, 1996) und *hupA*, reprimiert jedoch die *hupB*-Expression (Claret & Rouvière-Yaniv, 1996). Die Bildung des StpA-Proteins wird durch Lrp aktiviert (Sonden & Uhlin, 1996) und von H-NS reprimiert (Free & Dorman, 1997). Zur Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Proteinverhältnisses wird die *hns*-Expression ebenfalls negativ von StpA reguliert (Zhang *et al.*, 1996). Dieses komplizierte Netzwerk verdeutlicht die Einbindung der DNA-Bindeproteine in vielfältige Regulationsmuster.

Mit Hilfe der *stpA-lacZ*-Fusion am authentischen Genort im *E. coli*-Chromosom wurde der Einfluss von HU, IHF, Fis, Lrp und H-NS auf die *stpA*-Expression bestimmt. Einzig Mutationen in *hns* wirken sich auf die *stpA*-Expression aus. Im Vergleich zu einem hns^+-Stamm ist in einer *hns*-Mutante die *stpA*-Expression um ein dreifaches verstärkt. Dabei wird nur ein geringer Unterschied in der Auswirkung von Mutationen im 5´ bzw. 3´-Bereich von *hns* auf die *stpA*-Expression beobachtet. Die *stpA*-Expression wird also deutlich durch H-NS reprimiert. StpA und H-NS sind damit nochmals in einem separaten Netzwerk integriert, innerhalb dessen

sie jeweils ihre eigene Expression negativ autoregulieren, und sich reprimierend auf die Expression des Anderen auswirken.

2.2 Umwelteinflüsse

Die Topologie bakterieller DNA wird durch verschiedene Umweltstimuli, wie z.B. Temperatur, Osmolarität, Sauerstoffverfügbarkeit und das Nährstoffangebot, beeinflusst (Dorman & Bhriain, 1993; Dorman *et al.*, 1989; Drlica, 1992; Higgins, 1990; Higgins *et al.*, 1987). Topologie-sensitive-Promotoren reagieren auf diese Reize häufig mit einer veränderten Transkription, sodass sich unterschiedliche Habitate und Wachstumsbedingungen indirekt auf die Genregulation auswirken. Über die Vermittlung der Umweltsignale ist noch sehr wenig bekannt, vermutlich dienen einerseits Zwei-Komponentensysteme bei der Reizweitergabe, andererseits werden regulatorische Proteine durch Umweltstimuli modifiziert.

Das Chromatin liegt in der bakteriellen Zelle in einem negativen supercoil-Zustand vor. Dies verleiht der Zelle Energie zum Aufschmelzen der DNA und erleichtert somit Vorgänge wie z.B. Replikation und Transkription. Der Grad des Supercoilings wird durch die ATP-abhängige Gyrase und die Topoisomerase I reguliert. Veränderungen des Supercoilings wirken sich vielfältig auf die Expression aus. So können sich regulatorische Elemente des Promotors in ihrer Orientierung zueinander ändern, und damit besser oder schlechter für die RNA-Polymerase zugänglich sein (Wang & Syvanen, 1992). Zusätzlich können *cis*-regulatorische Elemente in die Nähe eines Promotors gebracht werden, und dadurch einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss ausüben (Travers, 1990).

DNA-Bindeproteine wirken sich als strukturgebende Komponente ebenfalls auf die DNA-Topologie und auf das Supercoiling aus. Ein Beispiel hierfür ist das bereits beschriebene *proU*-Operon. Neben einer Regulation durch die DNA-Bindeproteine H-NS und StpA sind auch topologische Veränderung an der Modulation des *proU*-Promotors beteiligt (Jordi *et al.*, 1997; Ueguchi & Mizuno, 1993; Higgins *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1991). Die *proU*-Promotorregion weist einen 16 bp-Spacer auf, welcher sich nicht in einem optimalen Windungsstadium befindet (Dombroski *et al.*, 1996), und damit sensitiv auf lokale Veränderungen reagiert. Die durch einen Salzschock induzierte Zunahme des negativen Supercoilings steigert die freie Energie,und dadurch die Fähigkeit der Strangtrennung, es kommt zu einer verstärkten Transkription des *proU*-Operons (Dorman, 1991). Eine Kombination unterschiedlicher Faktoren führt zu einer gesteigerten Expression des *proU*-Operons unter hochosmolaren Bedingungen. Die Beobachtung, dass Mutationen in *hns* und *stpA* zu einer gesteigerten *proU*-Expression, vergleichbar wie unter hoch-osmolaren Bedingungen, führen, lassen vermuten, dass die Bindung der Proteine StpA und H-NS die Repression des *proU*-Operons durch eine zumindest teilweise veränderte DNA-Topologie bedingen.

Ein Temperaturanstieg äussert sich in einer Zunahme der freien Energie (Goldstein & Drlica, 1984; Tse-Ding *et al.*, 1997). Die allgemeine Zunahme der freien Energie durch Inkubation unter einer erhöhten Wachstumstemperatur führt damit ebenfalls zu einer Zunahme des

negativen Supercoilings. Eine Veränderung im Energiehaushalt der bakteriellen Zelle, welche z.B. mit einer anoxischen Anzucht oder mit einem veränderten Nährstoffangebot einhergeht, beeinflusst ebenfalls den Energiezustand der bakteriellen Zelle, und damit die ATP-abhängige Gyrasefunktion (Hsieh *et al.*, 1991; Balke & Gralla, 1987). Daher kommt es unter anoxischen Wachstumsbedingungen oder einer Nährstofflimitation zu einer Abnahme der freien Energie, und damit zu einer Verringerung des negativen Supercoilings (Dorman *et al.*, 1988).
Auch die *stpA*-Expression reagiert auf verschiedene Umweltreize mit einer veränderten Transkriptionsrate. Die Inkubation der *stpA-lacZ*-Fusion in Wachstumsversuchen unter verschiedenen Umweltbedingungen führt unter Anaerobiose und niedriger Temperatur zu einer verminderten *stpA*-Expression, Salzschock und hohe Temperaturen hingegen steigern die Expressionsrate. Somit entsteht eine interessante Verknüpfung: Die Expression des DNA-Bindeproteins StpA reagiert einerseits auf Veränderungen des Habitates mit einer veränderten Expressionsrate, und moduliert andererseits, zumindest in Kombination mit H-NS selber, durch u.a. Veränderungen des Supercoilings (Tupper *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996) die Expression von Systemen, welche auf DNA-Topologie-Veränderungen aufgrund unterschiedlicher Umweltreize mit einer veränderten Transkriptionsrate reagieren, wie z.B. das *proU* Operon.

3 Spezifische Funktionen von StpA

Neben seiner Eigenschaft als molekularer „back-up" für *hns* besitzt das StpA-Protein weiterhin spezifische Funktionen beim RNA-Assembly (Zhang *et al.*, 1995; Clodi *et al.*, 1999; Cusick & Belfort, 1998;). Proteine, welche beim RNA-Assembly die Bildung thermodynamisch ungünstiger Strukturen verhindern oder auflösen, werden als RNA-Chaperone bezeichnet (Herschlag, 1995). Durch unspezifische RNA-Bindung aktiviert StpA Prozesse, wie z.B. das Annealing komplementärer RNA-Moleküle und das Splicing des *td*-Introns. Dabei ist StpA nicht aktiv am RNA-Assembly beteiligt, sondern es begünstigt im Vorfeld des katalytischen Schrittes die Positionierung der Reaktionspartner (Zhang *et al.*, 1995). Die Annealing-Aktivität ist in der C-terminalen Domäne von StpA lokalisiert (Cusick & Belfort, 1998). Clodi *et al.* (1999) konnten zeigen, dass StpA, im Gegensatz zu seiner Entdeckung als wichtige funktionelle Einheit beim Splicing von Introns der Gruppe I, eine effizientere Funktion beim Splicing von Exon-Intron-Übergängen besitzt. Ein HIV-Nukleokapsid-Protein, NCp7, welches einen bedeutenden Anteil des reversen Transkriptionskomplexes ausmacht, kann *in vitro* durch StpA ersetzt werden (Negroni & Buc, 1999). NCp7 bindet an die RNA, und begünstigt durch Strang-Annealing und Strang-Austausch Rekombinationsvorgänge. StpA begünstigt diese Reaktionen *in vitro* in einer vergleichbaren Weise wie Ncp7.
Die Fähigkeit, falsch gefaltete Strukturen aufzulösen oder zu verhindern, stellt eine wichtige Vorraussetzung für das Überleben unter unterschiedlichen Umweltbedingungen, wie z.B. Temperaturunterschiede, dar. Auch H-NS besitzt in Ansätzen die Fähigkeit, als RNA-Chaperon zu wirken (Cusick & Belfort, 1998). Seine Effizienz liegt dabei jedoch um mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als im Vergleich zu StpA. Somit stellt die spezifische Funktion von

StpA als RNA-Chaperon eine wichtige Komponente für das Überleben von *E. coli* in unterschiedlichen Habitaten dar, und erweitert das Wirkungsspektrum von StpA neben seiner Funktion als molekularer „back-up" für H-NS.

4 Überleben in der Stationärphase

DNA-Bindeproteine werden im Verlauf der Wachstumsphase exprimiert, und unterliegen häufig einer verstärkten Transkription beim Übergang zur Stationärphase (Talukder *et al.*, 1999; Dersch *et al.*, 1993; Free & Dorman, 1995). Das Wachstum in der Stationärphase stellt besondere Ansprüche an die *E. coli* Zelle, da sie einer Vielzahl von zum Teil ungünstigen Umwelteinflüssen, wie z.B. Nährstofflimitation oder oxidativem Stress, ausgesetzt ist (Kolter *et al.*, 1993; Hengge-Aronis, 1996). Im Gegensatz zu gram-positiven Mikroorganismen, die durch den Prozess der Sporulation gut gegenüber verschiedensten Umwelteinflüssen geschützt sind, müssen gram-negative Bakterien zum Überleben unter ungünstigen Wachstumsbedingungen spezielle Abwehrstrategien gegenüber Stressituationen, wie z.B. oxidativem, osmotischem oder UV-Stress, Nährstofflimitationen sowie Temperaturschwankungen, ausbilden (Farewell *et al.*, 1998). In der bakteriellen Zelle steigt als Reaktion auf diese Stresseinwirkungen der Gehalt an Proteinen, welche einen Schutzmechanismus vor Schäden durch Oxidation, UV-Strahlung, steigender Osmolarität und Temperatur darstellen. Die veränderte Expression von mehr als 30 Proteinen, den post-exponentiellen Proteinen (Pex-Proteine), wird durch den stationärphasen-Sigmafaktor RpoS reguliert (Loewen *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 1998; Muffler *et al.*, 1997).
Viele Gene, die in der Stationärphase exprimiert werden, unterliegen einer gemeinsamen Kontrolle durch H-NS und RpoS (Bouvier *et al.*, 1998). RpoS selber unterliegt einem komplexen Regulationswerk, an dem auch H-NS beteiligt ist. Sowohl auf Transkriptions als auch auf Translationsebene wirkt H-NS reprimierend auf RpoS, weiterhin beeinflusst H-NS die Stabilität des RpoS-Proteins (Barth *et al.*, 1995; Yamashino *et al.*, 1995; Robbe-Saule *et al.*, 1997). Die reprimiernde Wirkung von H-NS auf die *rpoS*-Expression kann durch einen Anti-Antisense-Mechanismus von der DsrA-RNA aufgehoben werden (Lease *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 1998; Sledjeski *et al.*, 1996). Das HF1-Protein aktiviert die Translation von *rpoS* durch Interaktion mit H-NS (Brown & Elliot, 1997; Muffler *et al.*, 1997). Eine weitere regulatorische RNA, die OxyS-RNA, bindet an das HF1-Protein und reprimiert damit die Translation von *rpoS* (Zhang *et al.*, 1998). Zusätzlich wirkt sich der cAMP-CRP-Komplex positiv und ppGpp negativ auf die *rpoS*-Expression aus. Ein Einfluss von StpA auf die *rpoS*-Regulation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

4.1 Einfluss von StpA und H-NS auf das Überleben in der Stationärphase

Beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase verändern die Bakterien aufgrund von Zellteilungen ohne eine gleichzeitge Zunahme der Masse, ihre

Zellmorphologie insofern, dass sich die stäbchenförmigen Bakterien abrunden und kleiner werden (Lange & Hengge-Aronis, 1991). Mikroskopische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten eine deutliche Auswirkung von Mutationen in *stpA* und *hns* auf die Zellmorphologie nachweisen. Die gemeinsame Funktion beider DNA-Bindeproteine scheint eine wichtige Rolle in der Ausprägung der Zellmorphologie zu spielen, da *E. coli*-Zellen mit Defekten in *stpA* und *hns* gleichzeitig nicht mehr das typische Abrundungsverhalten zeigen, sondern eine elongierte Zellform ausbilden. Möglicherweise wird die Zellteilung durch eine gemeinsame Funktion von StpA und H-NS beeinflusst, sodass in Zellen mit Mutationen in beiden DNA-Bindeproteinen das Auftreten von elongierten, teilweise zusammenhängenden bakteriellen Zellen beobachtet werden kann. Gerade in der Stationärphase unterliegt die Zellwandzusammensetzung einer Reihe von Veränderungen mit einer veränderte Fluidität der äusseren Membran (Chang & Cronan, 1999).

Auch das Überleben in einer verlängerten Stationärphase untersteht dem Einfluss von DNA-Bindeproteinen. Mutationen in DNA-Bindeproteinen, wie z.B. HU, führen zu einer verminderten Überlebensrate von *E. coli* beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase (Claret & Rouviere-Yaniv, 1997). Dabei wirken sich Mutationen in den beiden Untereinheiten von HU unterschiedlich auf die Überlebensrate aus, Mutationen in beiden Untereinheiten gleichzeitig führen jedoch zu einem drastischen Überlebensverlust beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase. Da HU essentielle Funktionen bei der Rekombination übernimmt, vermutet man eine verminderte Reparatur in Stämmen mit Mutationen in beiden HU-Untereinheiten. P. Dersch (1995) konnte in ihrer Dissertation ebenfalls zeigen, dass Mutationen in *hns* die bakterielle Überlebensfähigkeit in einer verlängerten Stationärphase vermindern. Mutationen in *stpA* alleine zeigen hingegen keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit. In Analogie zu HU zeigen Doppelmutationen in *stpA* und *hns* jedoch drastische Auswirkungen auf die Überlebensrate, die im Vergleich zu einem Wildtypstamm um bis zu 6 Zehnerpotenzen abnimmt. Bislang ist jedoch noch völlig unklar, welche Proteine, speziell in der Stationärphase einer gemeinsamen Regulation durch *stpA* und *hns* unterliegen. Auch Johannson & Uhlin (1999) stellten eine Beteiligung von *stpA* und *hns* am Überleben in einer verlängerten Stationärphase fest. In Stämmen mit Mutationen in *hns* beobachteten sie einen deutlichen Überlebensdefekt, der im Gegensatz zu der Überlebensrate des Stammes PD32 jedoch deutlicher ausgeprägt war. Sie vermuteten, dass das Fehlen von H-NS zu einem gesteigerten Abbau von StpA durch die Lon-Protease führen könnte, und damit in einer *hns*-Mutante gleichsam auch eine verminderte Konzentration an StpA vorliegt. Der Überlebensunterschied zwischen der *hns*-Mutante und der *hns*/*stpA*-Doppelmutante fiel in ihren Experimenten nur gering aus. Die Ursache für die beobachtete Diskrepanz im Überlebensverhalten von Stämmen mit Mutationen in *hns* und *stpA* bei Experimenten von Johannson & Uhlin (1999) im Vergleich zu den Überlebensexperimenten in dieser Arbeit ist nicht geklärt, möglicherweise können Unterschiede im jeweils verwendeten Stammhintergrund eine Rolle spielen.

Die Zellzahl einer Kultur spiegelt immer nur den Wachstumsdurchschnitt der Kultur wieder. Wählt man jedoch Bedingungen, die eine Wachstumslimitation für die Kultur darstellen, so

kann man Mutanten isolieren, die besser an die limitierende Wachstumssituation angepasst sind, und daher einen Wachstumsvorteil erfahren (Kolter *et al.*, 1993). Zambrano & Kolter (1996) definierten für diese Wachstumsmutanten den Begriff „GASP" (Growth advantage in stationary phase). Auch bei Langzeitwachstumsexperimenten mit Stämmen, welche Mutationen in *stpA* und *hns* trugen, konnten im Rahmen dieser Arbeit solche Wachstumssuppressormutanten beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Doppelmutantenstamm mit einem drastisch eingeschränkten Überlebensverhalten, zeigen die Wachstumsmutanten Überlebensraten, welche den Überlebensraten eines Wildtypstammes gleichkommen. Phänotypisch lassen sich die Suppressormutanten durch einen Verlust des für *hns*-Mutanten typischen mucoiden Phänotypen charakterisieren. Physiologisch und genetisch lassen sich für diese Wachstumsmutanten jedoch immer noch die Mutationen in *stpA* und *hns* nachweisen. Damit ist ausgeschlossen, dass lediglich weitere Mutationen in *hns* zu einem gesteigerten Überlebensverhalten geführt haben. Da Mutationen in *rpoS* eine Vielzahl von Genen betreffen, welche in der Stationärphase exprimiert werden, lag die Vermutung nahe, dass Mutationen in *rpoS* zu einem gesteigerten Überleben geführt haben könnten. Sowohl durch physiologische als auch durch Protein-biochemische Nachweise konnte eine Mutation in *rpoS* als Ursache für die Entstehung von Suppressormutanten jedoch ausgeschlossen werden. Auch Johannson & Uhlin (1999) beobachteten in ihren Langzeitwachstumsexperimenten Wachstumsmutanten, welche eine deutlich verbesserte Überlebensrate aufwiesen. Dabei analysierten sie jedoch die Wachstumsmutanten in der *hns*-Mutante, und nicht in der *stpA/hns*-Doppelmutante. Sie stellten fest, dass bei *hns*-Mutanten mit einer deutlich verbesserten Überlebensrate Mutationen in *stpA* auftreten, die zu einer Resistenz gegenüber dem Abbau des StpA-Proteins durch die Lon-Protease führen. In ihrer *hns/stpA*-Doppelmutante konnten sie jedoch keine Wachstumsmutanten mit einer verbesserten Überlebensfähigkeit feststellen.

Um den genetische Ursprung der Wachstumsmutanten näher zu charakterisieren, welcher mit der verbesserten Überlebensfähigkeit der *stpA/hns*-Doppelmutante zusammenhängt, wurden zusätzliche Mutationen in *rpoS* und in *non-mucoid*-Genen eingeführt, welche einen möglichen Einfluss auf das Überlebensverhalten ausüben können. Aufgrund des Verlustes des für *hns*-Mutationen typischen mucoiden Phänotyps der Wachstumsmutanten wurde zunächst der Einfluss von *non-mucoid*-Genen auf die Überlebensfähigkeit untersucht. In Überlebensexperimenten mit Stämmen, welche Mutationen in *stpA*, *hns* und in *non-mucoid*-Genen trugen, konnte jedoch keine veränderte Überlebensrate festgestellt werden. Damit haben zusätzliche Mutationen in Genen, welche die Ausbildung eines mucoiden Phänotypen verhindern, nicht zu der Bildung von Wachstumsmutanten mit einer verbesserten Überlebensfähigkeit geführt. Die Schleimbildung in *E. coli* wird neben den *non-mucoid*-Genen auch von den Regulatorproteinen RcsA und RcsB beeinflusst. H-NS reprimiert die Bildung von RcsA und inhibiert damit die Bildung der Colansäure, welche für die Ausbildung eines mucoiden Phänotypes verantwortlich ist (Ebel & Trempy, 1999; Sledjewski & Gottesman, 1995). Diese Gene stellen weitere Ansatzpunkte dar, welche im Rahmen einer Charakterisierung zum Verlust des mucoiden Phänotypes untersucht werden könnten.

Die Einführung einer zusätzlichen Mutation in *rpoS* führte ebenfalls nicht zu einer veränderten Überlebensfähigkeit der *stpA/hns*-Doppelmutante beim Wachstum in einer verlängerten Stationärphase. Johannson & Uhlin (1999) konnten in ihren Langzeitwachstumsexperimenten jedoch einen Einfluss von *rpoS* auf die Überlebensrate einer *stpA/hns*-Doppelmutante feststellen. Möglicherweise bedingen die verwendeten unterschiedlichen Stammhintergründe die unterschiedlichen Beobachtungen.

Gene, die verstärkt in der stationären Wachstumsphase exprimiert werden, sind wichtig für das Überleben von *E. coli* in der Stationärphase. Mutationen in solchen Stationärphase-induzierten-Genen könnten die Ursache für das Auftreten von Wachstumsmutanten mit einer verbesserten Überlebensfähigkeit darstellen. Das universelle Stressprotein UspB wird vermehrt in der stationären Wachstumsphase gebildet, und steht unter der Kontrolle von RpoS. Es verleiht der bakteriellen Zelle eine vermehrte Resistenz gegenüber unterschiedlichen Stresseinflüssen (Farewell *et al.*, 1998). Auch das Protein-Chaperon SurA übt eine wichtige Funktion für das Überleben von Mikroorganismen in der Stationärphase aus (Lazar *et al.*, 1998). Mutation in dem Gen *ssnA*, welches ebenfalls in der Stationärphase gebildet wird, führen zu einer verlangsamten Abnahme der Überlebensrate (Yamada *et al.*, 1999). Die genaue Funktion von *ssnA* ist noch nicht bekannt, aber Mutationen in *ssnA* führen, ähnlich wie Mutationen in *stpA* und *hns*, zu einer veränderten Zellmorphologie. Das Gen *yhhP* ist allgemein für das Wachstum von *E. coli* notwendig. In der Stationärphase beeinflusst es die Stabilität von RpoS, und damit das Überlebensverhalten in einer verlängerten Stationärphase (Yamashino *et al.*, 1998). Unter C-Limitation wird ebenfalls vermehrt das Gen *csiD* exprimiert, es steht ausschliesslich unter der Kontrolle von RpoS (Marschall *et al.*, 1998). Möglicherweise könnten „gain of funktion"-Mutationen der Gene *uspB, surA, csiD* und *yhhP* oder eine „loss of funktion"-Mutation in *ssnA* für das Entstehen von Wachstumsmutanten mit einer verbesserten Überlebensrate verantwortlich sein. Eine genaue Analyse des Proteinmusters aus Stationärphasekulturen der Stämme mit Mutationen in *stpA* oder *hns* wird möglicherweise die Fragen nach der Ursache für das Auftreten von Wachstumsmutanten einerseits und der drastischen Auswirkung von Mutationen in den DNA-Bindeproteinen StpA und H-NS auf die Überlebensrate andererseits klären.

4.2 Regulation von *ompW*, *ompX* und *dps* durch H-NS

Da sich Stämme mit Mutationen in den beiden DNA-Bindeproteinen *stpA* und *hns* in ihrem Überlebensverhalten drastisch von Stämmen mit Mutationen in *hns* alleine unterschieden, und eine deutlich veränderte Zellmorphologie aufwiesen, wurden Zellextrakte, und besonders Präparationen der äusseren Membran der Stämme PD32 (*hns*) und SF20 (*stpA*, *hns*) verglichen, und auf ein unterschiedliches Proteinmuster untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede bezüglich des Proteinmusters zwischen der *hns*-Mutante und der *stpA/hns*-Doppelmutante, die einem bestimmten Protein eine gemeinsame Kontrolle von *stpA* und *hns* zugeordnet hätten, ermittelt werden. Stattdessen wurden drei Proteine, OmpW, OmpX und

Dps, gefunden, von welchen bislang noch nicht bekannt war, dass sie unter der Kontrolle von H-NS stehen. In Präparationen der äusseren Membran wurde eine positive Regulation des Proteins OmpW, sowie eine negative Regulation der Proteine OmpX und Dps, durch H-NS festgestellt.

4.2.1 OmpW

Die Expression der meisten Gene , welche unter einer Kontrolle von H-NS stehen, wird von H-NS reprimiert, da H-NS in vielen Fällen als transkriptioneller Repressor oder Silencer der Genexpression wirkt (Atlung *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1999; Williams & Rimsky, 1997). Für OmpW konnte jedoch ein positiver Einfluss von H-NS auf die Bildung des Proteins nachgewiesen werden, wobei der Kontrollmechanismus jedoch noch unklar ist.
Das monocistronisch für *ompW* codierende Gen liegt auf dem *E. coli*-Chromosom bei 28,28 Minuten. Das OmpW-Protein besitzt eine molekulare Masse von 22,8 kDa, es ist in der äusseren Membran lokalisiert (Molloy *et al.*, 1998). Vermutlich wird zunächst ein Precursor von 24 kDa synthetisiert und anschliessend prozessiert (Jalakumari & Manning, 1990), eine Funktion für OmpW war lange Zeit unbekannt. Proteine mit hoher Sequenzhomologie zu OmpW aus *E. coli* sind auch in *Pseudomonas oleovorans* und *Vibrio cholerae* zu finden. Sequenzhomologie-Vergleiche zeigten eine 45%-ige Homologie zu dem *alkL*-Gen aus dem *alkBFGHJKL*-Operon von *Pseudomonas oleovorans*, welches für eine Untereinheit einer Alkohol-Dehydrogenase codiert (van Beilen *et al.*, 1992). Mutationen des *alkL*-Gens zeigen keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate von *Pseudomonas oleovorans*. Inkubiert man das aus *E. coli* isolierte OmpW-Protein bei 37°C und 95°C, zeigt es eine Hitzemodifikation mit einer veränderten elektrophoretischen Mobilität, ähnlich dem Protein Omp21 aus *Comamonas acidovorans* (Baldermann *et al.*, 1998). Das Omp21-Protein zeigt eine 30%-ige Sequenzidentität zu OmpW. In *Vibrio cholerae* liegt *ompW* unmittelbar upstream von dem Gen für das Regulatorprotein HapR und wirkt sehr immunogen (Jobling & Holmes, 1997). Seine Funktion dort ist jedoch unbekannt.
Sengupta *et al.* (1998) fanden in einer Pilus-Präparation von *Vibrio cholerae* ebenfalls ein Protein mit einer vollständigen Homologie zu OmpW, und ordneten diesem OmpW-Protein eine Funktion als Pilus zu. Diese Funktion konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei bei dem Auftreten des OmpW-homologen Proteins um eine Verunreinigung der Piluspräparation mit Proteinen der äusseren Membran. Erst kürzlich konnten Pilsl *et al.* (1999) dem OmpW-Protein aus *E. coli* eine Funktion als Rezeptor für das Colicin S4 zuordnen. Zellen mit Mutationen in *ompW* erwiesen sich als resistent gegenüber dem Colicin. Diese Resistenz kann durch die Komplementation mit Plasmid-codiertem *ompW* wieder hergestellt werden. Im Gegensatz zu OmpW-Homologen aus *Pseudomonas oleovorans, Vibrio cholerae* und OmpW aus *E. coli*K5, welches Pils *et al.* (1999) zur Isolation von OmpW benutzten, wird in dem in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stamm MC4100 eine deutlich grössere Menge an OmpW produziert. Unterschiedliche Proteinmengen

eines vergleichbaren Proteins aus unterschiedlichen Stämmen sind jedoch nicht ungewöhnlich, und können allel-spezifische Variationen darstellen.

4.2.2 OmpX

Durch Präparationen der äusseren Membran konnte eine weitere Korrelation in der Regulation eines membranständigen Proteins durch H-NS beobachtet werden. Das Protein OmpX steht unter einer negativen Kontrolle durch H-NS, möglicherweise wirkt H-NS als Repressor der *ompX*-Genexpression.

Das Gen *ompX* ist von zwei offenen Leserahmen mit bislang unbekannter Funktion flankiert, es codiert für ein 16,5 kDa grosses integrales Membranprotein, welches aus einem 20 kDa Vorläuferprotein prozessiert wird. Im N-Terminus besitzt es eine Signalsequenz. Die Überproduktion von OmpX reprimiert die Bildung von OmpC und OmpF, was zu einer verminderten Aufnahme von ß-Laktamen und damit zu einer Resistenz gegenüber ß-Laktamantibiotika führt (de Kort *et al.*, 1995). Innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* besitzt auch *Klebsiella pneumonia* ein Protein mit 86% Sequenzidentität und *Enterobacter cloacae* ein Protein mit 84% Sequenzidentität zu OmpX aus *E. coli,* diese sind ebenfalls in der Membran lokalisiert. Die Überproduktion von OmpX führt zur Bildung eines opportunistischen, invasiven Keims, welcher in Epithelzellen eindringen kann (de Kort *et al.*, 1999). Somit zeichnet sich OmpX als Virulenzfaktor aus. Seine N-terminale Schleife bildet an der bakteriellen Oberfläche ein IgG erkennbares Epitop (de Kort *et al.*, 1998). In *Yersinia enterocolitica* ist ebenfalls ein Protein gefunden worden, welches 45% Sequenzidentität zu OmpX besitzt (Mecsas *et al.*, 1995). In *Salmonella enteritidis* bildet *ompX* zusammen mit dem *sfbABC*-Operon einen Pathogenitätsfaktor, der als ABC-Transporter zur Aufnahme von Eisen dient (Pattery *et al.*, 1999). Kristallographische Untersuchungen des OmpX-Proteins durch Vogt & Schulz (1999) ergaben ein Modell, bei dem die konservierten Bereiche in der Membran lokalisiert sind, und Bereiche, die in den Extrazellularraum hinausragen, sehr variabel sind. Diese variabelen Bereiche sind für die Interaktion zwischen Wirt und Bakterium zuständig.

H-NS ist vielfach an der Repression von Genen, welche eine Rolle in der Virulenz von Bakterien spielen, beteiligt. Der Virulenzfaktor *ompX* steht somit in Einklang mit weiteren Virulenzfaktoren, die von H-NS repremiert werden (Bertin *et al.*, 1994; Palchaudhuri *et al.*, 1998; Prosseda *et al.*, 1998; Robbe-Saule *et al.*, 1997).

4.2.3 Dps

In einer Stationärphasenkultur dominiert das sequenzunspezifische DNA-Bindeprotein Dps in der Gesamtproteinmenge (Talukder *et al.*, 1999). Es wird u.a. durch Nährstofflimitation am Übergang zur Stationärphase, und ebenfalls durch osmotischen und oxidativen Stress induziert. Dps steht unter einer gemeinsamen Kontrolle durch den Stationärphasensigmafaktor RpoS (Lomovskaya *et al.*, 1994) und dem *oxyR*-Regulon (Michan *et al.*, 1999), weiterhin wird es durch das Chaperon DnaK reguliert (Rockabrand *et al.*, 1998). In Präparationen der äusseren

Membran wurde für Dps eine negative Kontrolle durch H-NS festgestellt. Lomovskaya *et al.* (1994) fanden das Dps-Protein als Spot auf einem 2-dimensionalen Gel, welches nach früheren Daten zu einem membranständigen Protein gehörte. Da das Dps-Protein einen Hauptbestandteil der Gesamtproteinmenge einer Stationärphasekultur ausmacht, könnte das Vorliegen von Dps in Membranfraktionen jedoch auch durch eine Verunreinigung der äusseren Membranpräparation mit Gesamtzellprotein bedingt sein. Die Art der Beeinflussung der *dps*-Regulation durch H-NS ist unklar, möglich ist eine direkte Beteiligung von H-NS an der Repression des Proteins, andereseits könnte auch ein indirekter Regulationseffekt durch RpoS vorliegen, da RpoS selber einer Repression durch H-NS unterliegt. In einer *hns*-Mutante kommt es zu einer verstärkten Expression von RpoS, die sich möglicherweise in einer ebenfalls gesteigerten Aktivierung der *dps*-Expression auswirken könnte.
Die codierende Region für *dps* ist auf dem *E. coli*-Chromosom bei 18,27 Minuten lokalisiert, und codiert für ein 19 kDa grosses DNA-Bindeprotein. Flankiert ist es stromaufwärts von einem offenen Leserahmen mit unbekannter Funktion, stromabwärts ist das Gen *gluH* lokalisiert, welches zu einem Operon mit Funktionen im Glutamintransport gehört.
Durch die Bindung von Dps in der Stationärphase an das bakterielle Chromosom wird die DNA vor oxidativen Schäden geschützt. Dabei wirkt Dps als Bakterioferritin und bindet durch seine negative Ladung im Inneren des Proteins Eisenionen, die durch Bildung von freien Radikalen durch die Fenton-Reaktion zu Schäden an der DNA durch Strangbrüche führen könnten (Grant *et al.*, 1998; Martinez & Kolter, 1997). Die Eisenionen befinden sich gleichsam in einer „Falle" und werden an weiteren schädlichen Reaktionen gehindert. Neben dem Dps-Protein gibt es in *Bacillus subtilis* ein weiteres Dps-analoges Protein, das MrgA-Protein, welches den Ausfall von Dps komplementieren kann (Antelmann *et al.*, 1997; Chen & Helmann, 1995). Es besitzt 20% Sequenzidentität zu Dps aus *E. coli.*

5 Evolutionäre Aspekte

DNA-Bindeproteine erfüllen einerseits als strukturgebende Komponente des bakteriellen Chromatins, sowie als globale Modulatoren der Genexpression wichtige Funktionen innerhalb der Prokaryonten. Besonders hoch konserviert sind die funktionellen Domänen im N-Terminus und im C-Terminus der Proteine. Es gibt Annahmen, dass ein H-NS/StpA-ähnliches Protein von einem Vorläufer der *Enterobacteriaceae* aufgenommen wurde, und sich innerhalb dieser Familie durch eine Genduplikation zu H-NS-ähnlichen bzw. StpA-ähnlichen Proteinen entwickelte (Atlung & Ingmer, 1997). Auf welche Art H-NS-ähnliche Proteine sich neben den *Enterobacteriaceae* auch in anderen Bakterien entwickelten, ist noch unklar. Möglicherweise hat ein horizontaler Gentransfer unter verschiedenen Mikroorgansismen stattgefunden.
Zwischen den Paralogen StpA und H-NS besteht ein ähnliches Verhältniss wie zwischen HUα und HUβ (Dorman *et al.*, 1999). Sieht man die Untereinheiten des HU-Proteins als getrennte Einzelkomponenten an, so treten folgende Gemeinsamkeiten zu StpA und H-NS auf: Beide Proteinepartner können Homo und Heterodimere ausbilden, und sind bei ihren Funktionen an

der Erfüllung ähnlicher Aufgaben beteiligt. Weiterhin zeigen StpA und H-NS bezüglich des Abbaus durch die Lon-Protease ein vergleichbares Muster zu den Untereinheiten des HU-Proteins, da die einzelnen Proteinpartner eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Lon-Protease besitzen (Bonnefoy *et al.*, 1993).

Die einzelnen Proteinpartner üben einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachtum von *E. coli,* speziell das Überleben in einer verlängerten Stationärphase, aus. Die gemeinsame Funktion von HUαβ bzw. H-NS/StpA ist jedoch fundamental für das Überleben in der Stationärphase. In ihrer Regulation unterliegen beide Proteinpartner einer negativen Autoregulation und werden zusätzlich von verschiedenen Faktoren beeinflusst und unabhängig voneinander exprimiert. Das unterschiedliche Verteilungsmuster der Expression von *stpA* bzw. *hns* und von *hupA* bzw. *hupB* gewährleistet eine bessere Anpasssung der *E. coli*-Zelle an wechselnde Umwelt- und Wachstumssituationen. Ähnlichkeiten ergeben sich auch aus ihrem DNA-Bindeverhalten. Für beide Proteinpartner besteht kein klar definiertes Sequenz-Bindemotiv, jedoch eine Präferrenz für gebogene DNA-Abschnitte. Für HU lässt sich kein spezifisches Bindemotiv nachweisen, wenngleich für H-NS/StpA ein schwaches Kernbindemotiv, TWTG-GR-P, zwischen dem 108. und 116. Aminosäurerest zu finden ist, dieses Kernbindemotiv wiederholt sich auch innerhalb der übrigen H-NS-ähnlichen Protein (Dorman *et al.*, 1999).

Auch die Entwicklung der Proteinpartner HUαβ bzw. H-NS/StpA ist in den unterschiedlichen Bakteriengruppen ähnlich verlaufen. Eine vergleichbare Zusammensetzung dieser DNA-Bindeproteine findet sich neben *E. coli* auch in *Shigella flexneri, Salmonella typhimurium* und *Erwinia chrysanthemi*, hier findet man ebenfalls H-NS und StpA-ähnliche Proteine, sowie eine entsprechende Verteilung für die Untereinheiten von HU. Während in gram-positiven Bakterien keine Paralogen zu StpA und H-NS auftreten, besitz *Haemophilus influenzae* ein StpA/H-NS vergleichbares Protein sowie das *hupA*-Gen. In *Pseudomonas aeruginosa* liegt hingegen nur das *hupB*-Gen vor (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). In *B. subtilis* liegt ein HU-Protein vor, welches jedoch phylogenetisch getrennt von HU aus gram-negativen Bakterien einzuordnen ist (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Der Einsatz unterschiedlicher Proteingruppen zur Ausübung ähnliche Funktionen, wie z.B. H-NS/StpA bzw. HU, ermöglicht Bakterien eine grössere Flexibilität, welche gerade bei der Reaktion auf rasch wechselnde Umweltbedingungen von Vorteil ist.

Über die Funktionen von StpA wird langsam mehr bekannt, wenngleich bisher noch kein Gen isoliert worden ist, welches ausschliesslich von StpA reguliert wird. Auch über gemeinsame Funktionen von H-NS und StpA ist noch wenig bekannt, aber es wird deutlich, dass in vielen Fällen H-NS nicht unabhängig von StpA an der Genregulation beteiligt ist, und dass Ausfälle in beiden DNA-Bindeproteinen deutlich schwerwiegendere Auswirkungen auf die Zellphysiologie besitzen als Mutationen in *hns* alleine. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine gemeinsame Funktion von StpA und H-NS wichtig ist, zum einen für das Wachstum von *E. coli*, speziell in einer verlängerten Stationärphase, und zum anderen für die Regulation des *proU* und des *bgl*-Operons.

VI. Literatur

Afflerbach, H., Schroder, O. and Wagner, R. (1998). Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*. Mol. Microbiol. 28, 641-653.

Afflerbach, H., Schroder, O. and Wagner, R. (1999). Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and Fis regulate *E. coli RrnB* P1 promoter activity. J. Mol. Biol. 286, 339-353.

Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D. and Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. EMBO J. 8, 3931.

Andera, L., Schneider, G. J. and Geiduschek, E. P. (1994). An analysis of subunit exchange in the dimeric DNA-binding and DNA- bending protein, TF1. Biochimie 76, 933-940.

Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A. and Hecker, M. (1997). Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 179, 7251-7256.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E. and Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10148-10152.

Arents, G. and Moudrianakis, E. N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11170-11174.

Atlung, T., Sund, S., Olesen, K. and Brondsted, L. (1996). The histone-like protein H-NS acts as a transcriptional repressor for expression of the anaerobic and growth phase activator AppY of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178, 3418-3425.

Atlung, T. and Ingmer, H. (1997). H-NS: A modulator of environmentally regulated gene expression. Mol. Microbiol. 24, 7-17.

Bachmann, B. J. (1987). Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds. (Washington, D. C.: American Society for Microbiology), pp. 1190-1219.

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

Baldermann, C., Lupas, A., Lubieniecki, J. and Engelhardt, H. (1998). The regulated outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded beta-sheet proteins by its sequence and properties. J. Bacteriol. 180, 3741-3749.

Balke, V. L. and Gralla, J. D. (1987). Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169, 4499-4506.

Barron, A., Jung, J. U. and Villarejo, M. (1987). Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262, 11841-11846.

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 sigmaS and many sigmaS-dependent genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177, 3455-3464.

Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Miller, R., DiCesare, J. L., Haff, L. and Atlas, R. M. (1990). Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. Mol. Cell. Probes 4, 353-365.

Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L. and Atlas, R. M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. Appl. Environ. Microbiol. 56, 307-314.

Belikov, S. and Karpov, V. (1998). Linker histones: paradigm lost but questions remain. FEBS Lett. 441, 161-164.

Bertin, P., Terao, E., Lee, E. H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A. and Collatz, E. (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176, 5537-5540.

Bertin, P., Benhabiles, N., Krin, E., Laurent-Winter, C., Tendeng, C., Turlin, E., Thomas, A., Danchin, A. and Brasseur, R. (1999). The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 31, 319-329.

Bewley, C. A., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M. (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27, 105-131.

Bhagwat, S. P., Rice, M. R., Matthews, R. G. and Blumenthal, R. M. (1997). Use of an inducible regulatory protein to identify members of a regulon: application to the regulon controlled by the leucine- responsive regulatory protein (Lrp) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179, 6254-6263.

Bianchi, M. E., Falciola, L., Ferrari, S. and Lilley, D. M. (1992). The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. EMBO J. 11, 1055-1063.
Bianchi, M. E. (1994). Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1: a kinked relationship. Mol. Microbiol. 14, 1-5.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, 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.

Bonnefoy, E. and Rouviere-Yaniv, J. (1992). HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to *oriC*. EMBO J. 11, 4489-4496.

Bonnefoy, E., Takahashi, M. and Yaniv, J. R. (1994). DNA-binding parameters of the HU protein of *Escherichia coli* to cruciform DNA. J. Mol. Biol. 242, 116-129.

Bouvier, J., Gordia, S., Kampmann, G., Lange, R., Hengge-Aronis, R. and Gutierrez, C. (1998). Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, Lrp and H-NS on transcription of the gene *osmC*. Mol. Microbiol. 28, 971-980.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C. O. and Pon, C. L. (1999). Massive presence of the *Escherichia coli* 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions. EMBO J. 18, 1653-1659.

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.

Buggy, J. J., Sganga, M. W. and Bauer, C. E. (1994). Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 176, 6936-6943.

Candrian, U., Furrer, B., Hofelein, C., Meyer, R., Jermini, M. and Luthy, J. (1991). Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. Int. J. Food Microbiol. 12, 339-351.

Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promotors in *Escherichia coli* using the bacteriophage Lambda and Mu. J. Mol. Biol. 104, 541-555.

Cashel, M. and Rudd, K. E. (1987). The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger, eds.: American Society for Microbiology, Washington, D.C.).

Chang, Y. Y. and Cronan, J. E. (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 33, 249-259.

Chen, L. and Helmann, J. D. (1995). *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps (PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. Mol. Microbiol. 18, 295-300.

Claret, L. and Rouviere-Yaniv, J. (1996). Regulation of HU alpha and HU beta by CRP and Fis in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 263, 126-139.

Claret, L. and Rouviere-Yaniv, J. (1997). Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. J. Mol. Biol. 273, 93-104.

Clodi, E., Semrad, K. and Schroeder, R. (1999). Assaying RNA chaperone activity *in vivo* using a novel RNA folding trap. EMBO J. 18, 3776-3782.

Collins, R., Ford, R., Bullough, P. and Derrick, J. (1999). A weight matrix for binding recognition by the redox-response regulator Arc-P of *E. coli*. Mol. Microbiol. 32, 217-221.

Craig, N. and Nash, H. A. (1984). *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. Cell 39, 707-716.

Cusick, M. E. and Belfort, M. (1998). Domain structure and RNA annealing activity of the *Escherichia coli* regulatory protein StpA. Mol. Microbiol. 28, 847-857.

Dattananda, C. S., Rajkumari, K. and Gowrishankar, J. (1991). Multiple mechanisms contribute to osmotic inducibility of *proU* operon expression in *Escherichia coli*: demonstration of two osmoresponsive promoters and of a negative regulatory element within the first structural gene. J. Bacteriol. 173, 7481-7490.

De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. and Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli* : role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. Mol. Microbiol. 32, 1198-1211.

de Kort, G., van der Bent-Klootwijk, P., van Boxtel, R. A. and van de Klundert, J. A. (1995). Effects of mutations and deletions on expression of the *Enterobacter cloacae ompX* gene. FEMS Microbiol. Lett. 130, 63-68.

de Kort, G., van der Bent-Klootwijk, P. and van de Klundert, J. A. (1998). Immuno-detection of the virulence determinant OmpX at the cell surface of *Enterobacter cloacae.* FEMS Microbiol. Lett. 158, 115-120.

de Kort, G., Salimans, M. M., van der Bent-Klootwijk, P., van Heest, C., van Bussel, M. J. and van de Klundert, J. A. (1999). Glycosylation of the *Enterobacter cloacae* outer membrane protein OmpX in eukaryotic cells. FEMS Microbiol. Lett. 177, 305-311.

Dersch, P., Schmidt, K. and Bremer, E. (1993). Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. Mol. Microbiol. 8, 875-889.

Dersch, P., Kneip, S. and Bremer, E. (1994). The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. Mol. Gen. Genet. 245, 255-259.

Dersch, P., Fsihi, H. and Bremer, E. (1994). Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli.* FEMS Microbiol. Lett. 123, 19-26.

Dersch, P. (1995). Molekularbiologische Charakterisierung des nukleoid-assoziierten DNA-Bindeproteins H-NS aus *Escherichia coli* K-12. Dissertation Universität Konstanz.

Ditto, M. D., Roberts, D. and Weisberg, R. A. (1994). Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 176, 3738-3748.

Dombroski, A. J., Johnson, B. D., Lonetto, M. and Gross, C. A. (1996). The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8858-8862.

Donato, G. M., Lelivelt, M. J. and Kawula, T. H. (1997). Promoter-specific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS. J. Bacteriol. 179, 6618-6625.

Donato, G. M. and Kawula, T. H. (1998). Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein FliG causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in *Escherichia coli.* J. Biol. Chem. 273, 24030-24036.

Donato, G. M. and Kawula, T. H. (1999). Phenotypic analysis of random *hns* mutations differentiate DNA-binding activity from properties of *fimA* promoter inversion modulation and bacterial motility. J. Bacteriol. 181, 941-948.

Dorman, C. J., Hinton, J. C. and Free, A. (1999). Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid- associated proteins in bacteria. Trends Microbiol. 7, 124-128.

Dorman, C. J., Barr, G. C., Ni Bhriain, N. and Higgins, C. F. (1988). DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. J. Bacteriol. 170.

Dorman, C. J., Lynch, A. S., Bhriain, N. and Higgins, C. F. (1989). DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the *tolC* locus. Mol. Microbiol. 3, 531-540.

Dorman, C. J., Bhriain, N. and Higgins, C. F. (1990). DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 3, 531-540.

Dorman, C. J. (1991). DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. Infect. Immun. 745-749.

Dorman, C. J. and NiBhriain, N. (1993). DNA topology and bacterial virulence gene regulation. Trends in Microbiol. 1, 92-99.

Dri, A.-M., Rouvière-Yaniv, J. and Moreau, P. L. (1991). Inhibition of cell division in *hupA* and *hupB* mutant bacteria lacking HU protein. J. Bactertiol. 173, 2852-2863.

Dri, A. M., Moreau, P. L. and Rouviere-Yaniv, J. (1992). Role of the histone-like proteins OsmZ and HU in homologous recombination. Gene 120, 11-16.

Drlica, K. and Rouvière-Yaniv, J. (1987). Histone-like proteins of bacteria. Microbiol. Rev. 51, 301-319.
Drlica, K. (1992). Control of bacterial DNA supercoiling. Mol. Microbiol. 6, 425-433.

Dürrenberger, M., LaTaena, A., Citro, G., Venanzi, F., C.O., G. and Pon, C. L. (1991). *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is localized in the nucleoid. Res. Microbiol. 142, 373-380.

Ebel, W. and Trempy, J. E. (1999). *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. J. Bacteriol. 181, 577-584.

Eppstein, W. (1986). Osmoregulation by potassium transport in *E. coli*. FEMS Microbiol. Rev. 39, 73-78.

Falciola, L., Murchie, A. I., Lilley, D. M. and Bianchi, M. (1994). Mutational analysis of the DNA binding domain A of chromosomal protein HMG1. Nucleic Acids Res. 22, 285-292.

Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C. O. and Pon, C. L. (1996). Antagonistic involvement of Fis and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. Mol. Microbiol. 19, 965-975.

Farewell, A., Kvint, K. and Nystrom, T. (1998). *uspB*, a new sigmaS-regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. J. Bacteriol. 180, 6140-6147.

Fellay, R., Frey, J. and Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. Gene 52, 147-154.

Ferguson, G. P., Creighton, R. I., Nikolaev, Y. and Booth, I. R. (1998). Importance of RpoS and Dps in survival of exposure of both exponential- and stationary-phase *Escherichia coli* cells to the electrophile N-ethylmaleimide. J. Bacteriol. 180, 1030-1036.

Ferrario, M., Ernsting, B. R., Borst, D. W., Wiese, D. E., 2nd, Blumenthal, R. M. and Matthews, R. G. (1995). The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. J. Bacteriol. 177, 103-113.

Flashner, Y. and Gralla, J. D. (1988). DNA dynamic flexibility and protein recognition: differential stimulation by bacterial histone-like protein HU. Cell 54, 713-721.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. and et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269, 496-512.

Fletcher, S. A. and Csonka, L. N. (1995). Fine-structure deletion analysis of the transcriptional silencer of the *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 177, 4508-4513.

Forsman, K., Sonden, B., Goransson, M. and Uhlin, B. E. (1992). Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9880-9884.

Free, A. and Dorman, C. J. (1995). Coupling of *Escherichia coli hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. Mol. Microbiol. 18, 101-113.

Free, A. and Dorman, C. J. (1997). The *Escherichia coli stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. J. Bacteriol. 179, 909-918.

Free, A., Williams, R. M. and Dorman, C. J. (1998). The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 994-997.

Gerard, F., Dri, A. M. and Moreau, P. L. (1999). Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. Microbiology 145, 1547-1562.

Gille, H., Egan, J. B., Roth, A. and Messer, W. (1991). The Fis protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 19, 4167-4172.

Goldstein, E. and Drlica, K. (1984). Regulation of DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4046-4050.

Goodman, S. D. and Nash, H. A. (1989). Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. Nature 341, 251-257.

Goosen, N. and van de Putte, P. (1995). The regulation of transcription initiation by integration host factor. Mol. Microbiol. 16, 1-7.

Göransson, M., Sonden, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K. and Uhlin, B. E. (1990). Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. Nature 344, 682-685.

Goshima, N., Kano, Y., Tanaka, H., Kohno, K., Iwaki, T. and Imamoto, F. (1994). IHF supresses the inhibitory effect of H-NS on HU function in the *hin* inversion system. Gene 141, 17-23.

Gowrishankar, J. and Manna, D. (1996). How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? A review and a model. Genetica 97, 363-378.

Goyard, S. and Bertin, P. (1997). Characterization of BpH3, an H-NS-like protein in *Bordetella pertussis*. Mol. Microbiol. 24, 815-823.

Graeme-Cook, K. A., May, G., Bremer, E. and Higgins, C. F. (1989). Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. Mol. Microbiol. 3, 1287-1294.

Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R. and Hogle, J. M. (1998). The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. Nat. Struct. Biol. 5, 294-303.

Grosschedl, R., Giese, K. and Pagel, J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. Trends Genet. 10, 94-100.

Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. and Bremer, E. (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. 246, 783-786.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hayat, M. A. and Mancarella, D. A. (1995). Nucleoid proteins. Micron. 26, 461-480.

Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: SigmaS as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 21, 887-893.

Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. Curr. Opin. Microbiol. 2, 148-152.

Herschlag, D. (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. J. Biol. Chem. 270, 20871-20874.

Higgins, C. F., Cairney, J., Stirling, D. A., Sutherland, L. and Booth, I. R. (1987). Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? TIBS 12, 339-344.

Higgins, C. F., Sutherland, L., Cairney, J. and Booth, I. R. (1987). The osmotically regulated *proU* locus of *Salmonella typhimurium* encodes a periplasmic betaine-binding protein. J. Gen. Microbiol. 133, 305-310.

Higgins, C. F., Hyde, S. C., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Gill, D. R. and Gallagher, M. P. (1990). Binding protein-dependent transport systems. J. Bioenerg. Biomembr. 22, 571-592.

Higgins, C. F. (1990). DNA supercoiling, chromatin structure and the regulation of gene expression. Antonie van Leeuwenhoek 58.

Higgins, C. F. (1991). Stability and degradation of mRNA. Curr. Opin. Cell. Biol. 3, 1013-1018.

Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. and Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. Cell 52, 569-584.

Higgins, C. F., Hinton, J. C., Hulton, C. S., Owen-Hughes, T., Pavitt, G. D. and Seirafi, A. (1990). Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? Mol. Microbiol. 4, 2007-2012.

Hodges-Garcia, Y., Hagerman, P. J. and Pettijohn, D. E. (1989). DNA ring closure mediated by protein HU. J. Biol. Chem. 264, 14621-14623.

Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. and Kustu, S. (1990). The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. Cell 63, 11-22.

Hsieh, L.-S., Rouviere-Yaniv, J. and Drlica, K. (1991). Bacterial DNA supercoiling and (ATP)/(ADP) ratio: changes associated with salt shock. J. Bacteriol. 173, 3914-3917.

Huck, L. G., Dorn, C. R. and Angrick, E. J. (1995). DNA probe for detection of serogroup O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 25, 277-287.

Hulton, C. S., Seirafi, A., Hinton, J. C. D., Sidebotham, J. M., Wadell, L., Pavitt, G. D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. and Higgins, C. F. (1990). Histone-like protein H1 (H-NS), supercoiling and gene expression in bacteria. Cell 63, 631-642.

Hwang, D. S. and Kornberg, A. (1992). Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. J. Biol. Chem. 267, 23083-23086.

Jobling, M. G. and Holmes, R. K. (1997). Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. Mol. Microbiol. 26, 1023-1034.

Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E. and Uhlin, B. E. (1998). H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 6117-6125.

Johansson, J. and Uhlin, B. E. (1999). Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10776-10781.

Jordi, B. J., Fielder, A. E., Burns, C. M., Hinton, J. C., Dover, N., Ussery, D. W. and Higgins, C. F. (1997). DNA binding is not sufficient for H-NS-mediated repression of *proU* expression. J. Biol. Chem. 272, 12083-12090.

Jordi, B. J., Owen-Hughes, T. A., Hulton, C. S. and Higgins, C. F. (1995). DNA twist, flexibility and transcription of the osmoregulated *proU* promoter of *Salmonella typhimurium*. EMBO J.14, 5690-700.

Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C. and Mertens, G. (1985). G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. Cell 41, 771-780.

Kappes, R., M. (1997). Molekulare und physiologische Charakterisierung von Transportsystemen für die Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *B. subtillis*. Dissertation Universität Marburg.

Kano, Y., Wada, M., Nagase, T. and Imamoto, F. (1986). Genetic characterization of the gene *hupB* encoding the HU-1 protein of *Escherichia coli*. Gene 45, 37-44.

Kano, Y., Goshima, N., Wada, M. and Imamoto, F. (1989). Participation of *hup* gene product in replicative transposition of Mu phage in *Escherichia coli*. Gene 76, 353-358.

Kano, Y., Ogawa, T., Ogura, T., Hiraga, S., Okazaki, T. and Imamoto, F. (1991). Participation of the histone-like protein HU and of IHF in minichromosomal maintenance in *Escherichia coli*. Gene 103, 25-30.

Kano, Y., Yasuzawa, K., Tanaka, H. and Imamoto, F. (1993). Propagation of phage Mu in IHF-deficient *Escherichia coli* in the absence of the H-NS histone-like protein. Gene 126, 93-97.

Kaufmann, A. Stierhof, Y. D. and Henning, U. (1994). New outer membran-associated protease of *E. coli* K-12. J. Bacteriol. 176, 359-367.

Kellenberger, E. and Arnold-Schulz-Gahmen, B. (1992). Chromatins of low-protein content: special features of their compaction and condensation. FEMS Microbiol. Lett. 79, 361-370.

Kempf, B. (1991). Studien zur osmotisch regulierten *proU*-Transkription in *Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Konstanz.

Koch, C. O., Ninnemann, O., Fuss, H. and Kahmann, R. (1991). The N-terminal part of the *E. coli* DNA-binding protein Fis is essential for stimulating site-specific DNA inversion but is not required for specifc DNA binding. Nucleic Acids Res. 19, 5915-5922.

Köhler, P. and Marahiel, M., A. (1997). Association of the histone-like protein HBsu with the nucleoid of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 179, 2060-2064.

Kolter, R., Siegele, D. A. and Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. Annu. Rev. Microbiol. 47, 855-874.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Landgraf, J. R., Levinthal, M. and Danchin, A. (1994). The role of H-NS in one carbon metabolism. Biochimie 76, 1063-1070.

Landgraf, J. R., Wu, J. and Calvo, J. M. (1996). Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178, 6930-6936.

Landy, A. (1993). Mechanistic and structural complexity in the site-specific recombination pathways of Int and FLP. Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 699-707.

Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigmaS. J. Bacteriol. 173, 4474-4481.

Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5, 49-59.

La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O. (1991). Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10907-10911.

Latil-Damotte, M. and Lares, C. (1977). Relative order of *glg* mutations affecting glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 150, 325-328.

Laurent-Winter, C., Ngo, S., Danchin, A. and Bertin, P. (1997). Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response-identification of targets by two-dimensional electrophoresis. Eur. J. Biochem. 244, 767-773.

Lavoie, B. D. and Chaconas, G. (1994). A second high affinity HU binding site in the phage Mu transpososome. J. Biol. Chem. 269, 15571-15576.

Lazar, S. W., Almiron, M., Tormo, A. and Kolter, R. (1998). Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. J. Bacteriol. 180, 5704-5711.

Lease, R. A., Cusick, M. E. and Belfort, M. (1998). Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12456-12461.

Lejeune, P. and Danchin, A. (1990). Mutations in the *bglY* gene increase the frequency of spontaneous deletions in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 360-363.

Lewis, D. E., Geanacopoulos, M. and Adhya, S. (1999). Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at *gal* promoters in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 31, 451-461.

Li, S. and Waters, R. (1998). *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. J. Bacteriol. 180, 3750-3756.

Lin, R., D'Ari, R. and Newman, E. B. (1992). Lambda p*lac*Mu insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. J. Bacteriol. 174, 1948-1955.

Link, A. J., Phillips, D. and Church, G. M. (1997). Methods for generating pre*cis*e deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. 179, 6228-6237.

Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. and Sparling, R. (1998). Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 44, 707-717.

Lomovskaya, O. L., Kidwell, J. P. and Matin, A. (1994). Characterization of the sigma 38-dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB*. J. Bacteriol. 176, 3928-3935.

Lu, J., Kobayashi, R. and Brill, S. J. (1996). Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. J. Biol. Chem. 271, 33678-33685.

Lucht, J. M. and Bremer, E. (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system *proU*. FEMS Microbiol. Rev. 14, 3-20.

Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. and Bremer, E. (1994). Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 269, 6578-6586.

Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M. M. and Richmond, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. J. Mol. Biol. 272, 301-311.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389, 251-260.

Majdalani, N., Cunning, 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, 12462-12467.

Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. and Hengge-Aronis, R. (1998). Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigmaS and requires activation by cAMP-CRP. J. Mol. Biol. 276, 339-353.

Martinez, A. and Kolter, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. J. Bacteriol. 179, 5188-5194.

May, G., Faatz, E., Villarejo, M. and Bremer, E. (1986). Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. 205, 225-233.

May, G., Dersch, P., Haardt, M., Middendorf, A. and Bremer, E. (1990). The *osmZ* (*bglY*) gene encodes the DNA-binding protein H-NS (H1a), a component of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid. Mol. Gen. Genet. 224, 81-90.

McGovern, V., Higgins, N. P., Chiz, R. S. and Jaworski, A. (1994). H-NS overexpression induces an artificial stationary phase by silencing global transcription. Biochimie 76, 1019-1029.

Mecsas, J., Welch, R., Erickson, J. W. and Gross, C. A. (1995). Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including ail of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 177, 799-804.

Michan, C., Manchado, M., Dorado, G. and Pueyo, C. (1999). *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. J. Bacteriol. 181, 2759-2764.

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y).

Mojica, F. J. and Higgins, C. F. (1997). *In vivo* supercoiling of plasmid and chromosomal DNA in an *Escherichia coli hns* mutant. J. Bacteriol. 179, 3528-3533.

Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. and Gooley, A. A. (1998). Extraction

of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 19, 837-844.

Morisato, D. and Kleckner, N. (1987). Tn*10* transposition and circle formation *in vitro*. Cell 51, 101-111.

Muela, A., Arana, I., Justo, J. I., Seco, C. and Barcina, I. (1999). Changes in DNA content and cellular death during a starvation-survival process of *Escherichia coli* in river water. Microb. Ecol. 37, 62-69.

Muffler, A., Traulsen, D. D., Fischer, D., Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1997). 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, 297-300.

Mukerji, M. and Mahadevan, S. (1997). Characterization of the negative elements involved in silencing the *bgl* operon of *Escherichia coli*: possible roles for DNA gyrase, H-NS, and CRP-cAMP in regulation. Mol. Microbiol. 24, 617-627.

Nakamura, K., Yahagi, S., Yamazaki, T. and Yamane, K. (1999). *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBsu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the *Alu* domain of small cytoplasmic RNA. J. Biol. Chem. 274, 13569-13576.

Nash, H. A. and Granston, A. E. (1991). Similarity between the DNA-binding domains of IHF protein and TFIID protein. Cell 67, 1037-1038.

Negroni, M. and Buc, H. (1999). Recombination during reverse transcription: an evaluation of the role of the nucleocapsid protein. J. Mol. Biol. 286, 15-31.

Newman, E. B., D'Ari, R. and Lin, R. T. (1992). The leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a raison d'etre. Cell 68, 617-619.

Ni Bhriain, N., Dorman, C. J. and Higgins, C. F. (1989). An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. MM 3, 933-942.

Nilsson, L., Vijgenboom, E., van Drunen, C., Vanet, A. and Bosch, L. (1992). Fis-dependent *trans* activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under varios growth conditions. J. Bacteriol. 174, 921-929.

Ninnemann, O., Koch, C. and Kahmann, R. (1992). The *E. coli* promoter is subject to stringent control and autoregulation. EMBO J. 11, 1075-1083.

Norris, V., Turnock, G. and Sigee, D. (1996). The *Escherichia coli* enzoskeleton. Mol. Microbiol. 19, 197-204.

Oberto, J. and Rouviere-Yaniv, J. (1996). *Serratia marcescens* contains a heterodimeric HU protein like *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 178, 293-297.

Ogawa, T., Wada, M., Kano, Y., Imamoto, F. and Okazaki, T. (1989). DNA replication in *Escherichia coli* mutants that lack protein HU. J. Bacteriol. 171, 5672-5679.

Oh, T., J. and Kim, I., G. (1999). Identification of genetic factors altering the SOS induction of DNA damage-inducible *yebG* gene in *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett. 177, 271-277.

Ohta, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1999). *rpoS* function is essential for *bgl* silencing caused by C-terminally truncated H-NS in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181, 6278-6283.

Owen-Hughes, T. A., Pavitt, G. D., Santos, D. S., Sidebotham, J. M., Hulton, C. S., Hinton, J. C. and Higgins, C. F. (1992). The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. Cell 71, 255-265.

Painbeni, E., Mouray, E., Gottesman, S. and Rouviere-Yaniv, J. (1993). An imbalance of HU synthesis induces mucoidy in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 234, 1021-1037.

Painbeni, E., Caroff, M. and Rouviere-Yaniv, J. (1997). Alterations of the outer membrane composition in *Escherichia coli* lacking the histone-like protein HU. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6712-6717.

Palchaudhuri, S., Tominna, B. and Leon, M. A. (1998). H-NS regulates DNA repair in *Shigella*. J. Bacteriol. 180, 5260-5062.

Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T. and Kadonaga, J. T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. Annu. Rev. Biochem. 63, 265-297.

Pattery, T., Hernalsteens, J. P. and De Greve, H. (1999). Identification and molecular characterization of a novel *Salmonella enteritidis* pathogenicity islet encoding an ABC transporter. Mol. Microbiol. 33, 791-805.

Paull, T. T., Haykinson, M. J. and Johnson, R. C. (1994). HU and functional analogs in eukaryotes promote Hin invertasome assembly. Biochimie 76, 992-1004.

Pettijohn, D. E. (1988). Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. J. Biol. Chem. 263, 12793-12796.

Pil, P. M. and Lippard, S. J. (1992). Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug *cis*platin. Science 256, 234-237.

Pilsl, H., Smajs, D. and Braun, V. (1999). Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. J. Bacteriol. 181, 3578-3581.

Platko, J. V., Willins, D. A. and Calvo, J. M. (1990). The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. J. Bacteriol. 172, 4563-4570.

Porter, M. E. and Dorman, C. J. (1994). A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. Journal of Bacteriology 176, 4187-4191.

Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. and Silhavy, T. J. (1996). From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 20, 911-917.

Preobrajenskaya, O., Boullard, A., Boubrik, F., Schnarr, M. and Rouviere-Yaniv, J. (1994). The protein HU can displace the LexA repressor from its DNA-binding sites. Mol. Microbiol. 13, 459-467.

Prosseda, G., Fradiani, P. A., Di Lorenzo, M., Falconi, M., Micheli, G., Casalino, M., Nicoletti, M. and Colonna, B. (1998). A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 149, 15-25.

Quay, S. C., Dick, T. E. and Oxender, D. L. (1977). Role of transport systems in amino acid metabolism: leucine toxicity and the branched-chain amino acid transport systems. J. Bacteriol. 129, 1257-1265.

Rajkumari, K., Kusano, S., Ishihama, A., Mizuno, T. and Gowrishankar, J. (1996). Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription *in vitro* from osmotically regulated P1 and P2 promoters of *proU* in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 178, 4176-4181.

Reeve, J. N. (1992). Molecular biology of methanogens. Annu. Rev. Microbiol. 46, 165-191.

Rice, P. A. (1997). Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 86-93.

Robbe-Saule, V., Schaeffer, F., Kowarz, L. and Norel, F. (1997). Relationships between H-NS, sigmaS, SpvR and growth phase in the control of *spvR*, the regulatory gene of the *Salmonella* plasmid virulence operon. Mol. Gen. Genet. 256, 333-347.

Rockabrand, D., Livers, K., Austin, T., Kaiser, R., Jensen, D., Burgess, R. and Blum, P. (1998). Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 180, 846-854.

Roth, A., Urmoneit, B. and Messer, W. (1994). Functions of histone-like proteins in the initiation of DNA replication at *oriC* of *Escherichia coli.* Biochimie 76, 917-923.

Rouviere-Yaniv, J., Yaniv, M. and Germond, J. E. (1979). *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. Cell 17, 265-274.

Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. and Germond, J. E. (1987). *Escherichia coli* DNA binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. Cell 17, 265-274.

Rouvière-Yaniv, J. (1990). Localization of the HU protein on the *Escherichia coli* nucleoid. In Cold Spring Habour Symposium: (Cold Spring Harbour Press), pp. 439-446.

Rouvière-Yaniv, J., Bonnefoy, E. and Huisman, O. (1990). Regulation of the HU synthesis in *E. coli.* In: The bacterial chromosome, K. R. Drlica, M., ed.: (American Society of Microbiology, Washington, D.C.), pp. 239-247.

Safo, M. K., Yang, W. Z., Corselli, L., Cramton, S. E., Yuan, H. S. and Johnson, R. C. (1997). The transactivation region of the Fis protein that controls site-specific DNA inversion contains extended mobile beta-hairpin arms. EMBO J.16, 6860-6873.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. E. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, Second edition Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y).

Sandman, K., Grayling, R. A., Dobrinski, B., Lurz, R. and Reeve, J. N. (1994). Growth-phase-dependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fervidus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12624-12628.

Schmid, M. B. (1990). More than just "histone-like" proteins. Cell 63, 451-453.

Schnetz, (1995). Silencing of *Escherichia coli bgl* promotor by flanking sequence elements. EMBO J. 14, 2545-2550.
Schnetz, K., Tolocyki, C. and Rak, B. (1987). b-glucoside (*bgl*) operon of *E. coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization and possible evolutionary relationsship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. J. Bacteriol. 169, 2579-2590.

Schnetz, K. and Wang, J.C. (1996). Silencing of *Escherichia coli bgl* promotor: Effects of template supercoiling and cell extracts on promotor activity *in vitro*. Nucleic Acids Res. 24, 2422-2429.

Sengupta, T. K., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, S., Hall, R. H., Sathyamoorthy, V. and Ghose, A. C. (1998). Characterization of a 20-kDa pilus protein expressed by a diarrheogenic strain of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol. Lett. 160, 183-189.
Shellman, V. L. and Pettijohn, D. E. (1991). Introduction of proteins into living bacterial cells: distribution of labeled HU protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173, 3059-3074.

Shi, X. and Bennett, G. N. (1994). Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176, 6769-6775.

Shindo, H., Furubayashi, A., Shimizu, M., Miyake, M. and Imamoto, F. (1992). Preferential binding of E.coli histone-like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. Nucleic Acids Res. 20, 1553-1558.

Shindo, H., Ohnuki, A., Ginba, H., Katoh, E., Ueguchi, C., Mizuno, T. and Yamazaki, T. (1999). Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy. FEBS Lett. 455, 63-69.

Silhavy, T. J., Berman, M. L. and Enquist, L. W. (1984). Experiments with gene fusions: (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Slauch, J. M. and Silhavy, T. J. (1989). Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 210, 281-292.

Slauch, J. M. and Silhavy, T. J. (1991). *cis*-acting *ompF* mutations that result in *OmpR*-dependent constitutive expression. J. Bacteriol. 173, 4039-4048.

Sledjeski, D. and Gottesman, S. (1995). A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcsA* gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 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.

Sonden, B. and Uhlin, B. E. (1996). Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. EMBO J. 15, 4970-4980.

Spassky, A. and Buc, H. C. (1977). Physio-chemical properties of a DNA binding protein: *Escherichia coli* factor H1. Eur. J. Biochem. 81, 79-90.

Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. and Buc, H. (1984). H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*. Nucleic Acids Res. 12, 5321-5340.

Spurio, R., Durrenberger, M., Falconi, M., La Teana, A., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O. (1992). Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. Mol. Gen. Genet. 231, 201-211.

Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O. (1997). The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. EMBO J. 16, 1795-1805.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods of Enzymol. 158, 60-89.

Tabassum, R., Sandman, K. M. and Reeve, J. N. (1992). HMt, a histone-related protein from *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. J. Bacteriol. 174, 7890-7895.

Tabor, S. and Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1074-1078.

Talukder A. A., Akira I., Akiko N., Susumu U. and Akira I. (1999). Growth-phase dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. J. Bacteriol. 181, 6361-6370.

Takeshita, S., Sato, M., Tabo, M., Masahasi, W. and Hashimoto-Gothoh, T. (1987). High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α-complementation and chloramphenicol- or kanamycin resistence selection. Gene 61, 63-74.

Tanaka, I., Appelt, K., Dijk, J., White, S. W. and Wilson, K. S. (1984). 3-Å resolution structure of a protein with histone-like properties in prokaryotes. Nature 310, 376-381.

Thompson, J. F. and Landy, A. (1988). Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to l site-specific recombination complexes. Nucleic Acids Res. 16, 9687-9705.

Timchenko, T., Bailone, A. and Devoret, R. (1996). Btcd, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in *Escherichia coli* for H-NS, a bacterial nucleoid protein. EMBO J. 15, 3986-3992.

Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C. and Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. Mol. Microbiol. 11, 589-604.

Tippner, D. and Wagner, R. (1995). Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites. J. Biol. Chem. 270, 22243-22247.

Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacryamidgels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Travers, A. A. (1990). Why bend DNA? Cell 60, 177-180.

Tremethick, D. J. and Molloy, P. L. (1988). Effects of high mobility group proteins 1 and 2 on initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II in vitro. Nucleic Acids Res. 16, 11107-11123.

Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P. and Hansen, J. C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. Mol Cell Biol 18, 4629-4638.

Tse-Dinh, Y. C., Qi, H., and Menzel, R. (1997). DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. Trends Microbiol. 5, 323-326.

Tsui, P., Huang, L. and Freundlich, M. (1991). Integration host factor binds specifically to multiple sites in the *ompB* promoter of *Escherichia coli* and inhibits transcription. J. Bacteriol. 173, 5800-5807.

Tupper, A. E., Owen Hughes, T. A., Ussery, D. W., Santos, D. S., Ferguson, D., Sidebotham, J. M., Hinton, J. and Higgins, C. F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. EMBO J. 13, 258-268.

Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K. and Mizuno, T. (1996). Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. J. Mol. Biol. 263, 149-162.

Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T. and Mizuno, T. (1997). Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. J. Mol. Biol. 274, 145-151.

Ulitzur, S., Matin, A., Fraley, C. and Meighen, E. (1997). H-NS protein represses transcription of the *lux* systems of *Vibrio Fischeri* and other luminous bacteria cloned into *Escherichia coli*. Curr. Microbiol. 35, 336-342.

Ussery, D. W., Hinton, J. C., Jordi, B. J., Granum, P. E., Seirafi, A., Stephen, R. J., Tupper, A. E., Berridge, G., Sidebotham, J. M. and Higgins, C. F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS. Biochimie 76, 968-980.

van Beilen, J. B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. and Witholt, B. (1992). DNA sequence determination and functional characterisation of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. Mol. Microbiol. 6, 3121-3136.

Vogt, J. and Schulz, G. E. (1999). The structure of the outer membran protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. Structure 7, 1301-1309.

Wada, M., Kutsukake, K., Komano, T., Imamoto, F. and Kano, Y. (1989). Participation of the *hup* gene product in site-specific DNA inversion in *Escherichia coli*. Gene 76, 345-352.

Wang, Q. and Calvo, J. M. (1993). Lrp, a global regulatory protein of *E. coli*, binds cooperativley to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. J. Mol. Biol. 229, 306-318.

Wang, J. Y., and Syvanen, M. (1992). DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. Mol. Microbiol. 6, 1861-1866.

Watt, F. and Molloy, P. L. (1988). High mobility group proteins 1 and 2 stimulate binding of a specific transcription factor to the adenovirus major late promoter. Nucleic Acids Res. 16, 1471-1486.

White, B., A. (1993). PCR-protocols. Methods in molecular biology, 15.

White-Ziegler, C. A., Angus Hill, M. L., Braaten, B. A., van der Woude, M. W. and Low, D. A. (1998). Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. Mol. Microbiol. 28, 1121-1137.

Williams, R. M., Rimsky, S. and Buc, H. (1996). Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. J. Bacteriol. 178, 4335-4343.

Williams, R. M. and Rimsky, S. (1997). Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. FEMS Microbiol. Lett. 156, 175-185.

Yamada, H., Muramatsu, S. and Mizuno, T. (1990). An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. J. Biochem. 108, 420-425.

Yamada, H., Yoshida, T., Tanaka, K., Sasakawa, C. and Mizuno, T. (1991). Molecular analysis of the *Escherichia coli hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. Mol. Gen. Genet. 230, 332-336.

Yamada, M., Talukder, A. A. and Nitta, T. (1999). Characterization of the *ssnA* gene, which is involved in the decline of cell viability at the beginning of stationary phase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181, 1838-1846.

Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H. and Hiraga, S. (1995). Characterization of the *smtA* gene encoding an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 133, 59-63.

Yamanaka, K., Fang, L. and Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. Mol. Microbiol. 27, 247-255.

Yamashino, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigmaS, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. EMBO J.14, 594-602.

Yamashino, T., Isomura, M., Ueguchi, C. and Mizuno, T. (1998). The *yhhP* gene encoding a small ubiquitous protein is fundamental for normal cell growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 2257-2261.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

Yasuzawa, K., Hayashi, N., Goshima, N., Kohno, K., Imamoto, F. and Kano, Y. (1992). Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. Gene 122, 9-15.

Zambrano, M. M. and Kolter, R. (1996). GASPing for life in stationary phase. Cell 86, 181-184.

Zhang, A. and Belfort, M. (1992). Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. Nucleic Acids Res. 20, 6735.

Zhang, A., Derbyshire, V., Salvo, J. L. and Belfort, M. (1995). *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*. RNA 1, 783-793.

Zhang, A., Rimsky, S., Reaban, M. E., Buc, H. and Belfort, M. (1996). *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. EMBO J.15, 1340-1349.

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. and Storz, G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the *hfq* (HF-I) protein. EMBO J. 17, 6061-6018.

Zuber, F., Kotlarz, D., Rimsky, S. and Buc, H. (1994). Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. Mol. Microbiol. 12, 231-240.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, Januar 2000 Sabine Finken-Henn