
Die hyperosmotische Stressantwort von *Escherichia coli* – von der Proteomanalyse zu einzelnen Komponenten

**Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Stephanie Anna Kögl
aus Thaining**

München im April 2008

1. Gutachterin: Prof. Dr. Kirsten Jung, LMU München

Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann, LMU München

Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München

Promotionsgesuch eingereicht am 29. April 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Generelle Mechanismen der Osmoadaptation</i>	1
1.2	<i>Anpassung von Escherichia coli an hyperosmotischen Stress</i>	3
1.3	<i>Wahrnehmung von osmotischem Stress und Regulationsmechanismen von Stressantworten</i>	6
1.4	<i>Aufgabenstellung</i>	10
2	Material und Methoden	11
2.1	<i>Materialien</i>	11
2.2	<i>Stämme, Plasmide und Oligonukleotide</i>	12
2.3	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	15
2.3.1	Kultivierungsverfahren	15
2.3.2	Phänotypische Untersuchungen	15
2.3.2.1	Überlebenstest bei hohen Salzkonzentrationen.....	15
2.3.2.2	Untersuchung der Beweglichkeit.....	16
2.3.2.3	Quantifizierung der Biofilmbildung.....	16
2.3.2.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	16
2.4	<i>Molekularbiologische und genetische Methoden</i>	17
2.4.1	Konstruktion der Mutanten	17
2.4.2	Plasmidisolierung	18
2.4.3	Modifikation von DNA.....	18
2.4.4	Isolierung genomischer DNA	18
2.4.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	18
2.4.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	19
2.4.7	Anreicherung von DNA mittels Butanolfällung	19
2.4.8	P1-Phagenlysatpräparation und P1-Transduktion	19
2.4.9	Präparation kompetenter Zellen und Transformation	20
2.4.10	Plasmidkonstruktion	20
2.4.11	DNA-Sequenzanalyse.....	21
2.4.12	Markierung von DNA.....	21
2.4.13	Isolierung von RNA	21
2.4.14	Northern-Blotting und Hybridisierung	22
2.5	<i>Biochemische und analytische Methoden</i>	22
2.5.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.5.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	23
2.5.3	Analyse des cytoplasmatischen Proteoms durch 2D-Gelelektrophorese	24
2.5.3.1	Herstellung der Zellextrakte für die Proteomanalyse	24
2.5.3.2	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	24
2.5.3.3	Zweite Dimension: SDS-Page.....	25
2.5.3.4	Coomassiefärbung nach Weber und Osborn (1969)	25
2.5.3.5	Auswertung mit Hilfe des Programms PDQuest	25
2.5.4	BAC/SDS-Gelelektrophorese.....	26
2.5.4.1	Zellaufschluss und Präparation von Membranen mit dem Zellaufschlussgerät.....	26
2.5.4.2	16-BAC/SDS-PAGE	26
2.5.5	Proteinbestimmungen	28
2.5.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.5.5.2	Proteinbestimmung nach Peterson	28
2.5.6	Bestimmung der Osmolalität von LB- und K10-Medium	28
2.5.7	Analyse von Proteininteraktionen <i>in vivo</i>	29
2.5.7.1	Quervernetzung mit Formaldehyd.....	29
2.5.7.2	Zellaufschluss	29
2.5.7.3	Gelfiltration	29
2.5.7.4	Analyse der Fraktionen.....	29
2.5.8	<i>In vivo</i> -Radikalmessung.....	30

2.5.9	Bestimmung des intrazellulären Trehalosegehaltes	30
2.5.9.1	Trehalase-Präparation	30
2.5.9.2	Trehalosenachweis	31
2.6	<i>Biophysikalische Methoden</i>	31
2.6.1	Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehalts	31
2.6.2	MALDI-TOF	32
3	Ergebnisse	33
3.1	<i>Veränderungen im Proteom von E. coli bei Kultivierung in Minimalmedium</i>	33
3.1.1	Proteomveränderungen während der osmotischen Stressadaptation unter aeroben Bedingungen	33
3.1.2	Proteomveränderungen während der Salzstressadaptation unter anaeroben Bedingungen	38
3.1.3	Zeitlicher Verlauf der Stressantwort	40
3.1.4	Proteomanalysen im alkalischen pI-Bereich	43
3.1.5	Einfluss von Glycinbetain auf die Proteomveränderungen bei osmotischem Stress	44
3.1.6	Veränderungen im Membranproteom	47
3.2	<i>Einfluss der Kaliumaufnahme auf die Osmoadaptation</i>	50
3.2.1	Bedeutung der Kaliumaufnahme bei der osmotischen Stressreaktion in Minimalmedium	50
3.2.2	Bedeutung der Kaliumaufnahme bei der osmotischen Stressreaktion in Komplexmedium	54
3.3	<i>Veränderungen der Proteininteraktionen bei osmotischem Stress</i>	59
3.4	<i>Veränderungen im Periplasma bei osmotischem Stress</i>	63
3.4.1	Nachweis der Plasmolyse durch periplasmatisches GFP (grün fluoreszierendes Protein)	64
3.4.2	Untersuchung der Veränderung der Lokalisation der Peptidbindende Proteine OppA und DppA bei osmotischem Stress	65
3.5	<i>Zusammenhang zwischen Radikalbildung und osmotischer Stressantwort</i>	67
3.5.1	Nachweis der Radikalbildung	68
3.5.2	Rolle der Radikalbildung während der Salzstressadaptation	70
3.5.3	Osmoadaptation in Katalase- und Superoxiddismutase-Mutanten	75
3.6	<i>Bedeutung von TreF bei der Regulation der intrazellulären Trehalosekonzentration</i>	76
3.7	<i>Bedeutung identifizierter Proteine bei der Osmoadaptation</i>	80
3.7.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>dppA</i> -Mutante	80
3.7.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>hdhA</i> -Mutante	82
4	Diskussion	86
4.1	<i>Proteomveränderungen bei osmotischem Stress</i>	86
4.2	<i>Einfluss der Kaliumaufnahme auf die Proteomveränderungen bei Salzstress in Minimal- und Komplexmedium</i>	92
4.3	<i>Verstärkung der osmotischen Stressreaktion durch Radikale</i>	95
4.4	<i>Interaktionsstudien und Veränderungen im Periplasma bei osmotischem Stress</i>	98
4.5	<i>Bedeutung von HdhA bei der Osmoadaptation</i>	99
4.6	<i>Bedeutung von TreF bei der Regulation der intrazellulären Trehalosekonzentration</i>	101
4.7	<i>Abschließendes Modell der Osmoadaptation in E. coli</i>	103
5	Zusammenfassung	105
6	Literaturverzeichnis	107
Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
16-BAC	Benzyldimethyl- <i>n</i> -hexadecylammonium-chlorid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulphonat
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton (analog kDa)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HED	Hydroxyethyldisulfid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
K _M	Michaelis-Konstante
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Tris/Glycin
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Generelle Mechanismen der Osmoadaptation

Für jede lebende Zelle, egal welcher Art, ist es entscheidend, sich an Veränderungen der Umgebungsmolalität anzupassen. Eukaryotische Zellen eines multizellulären Organismus oder einzellige Organismen wie Archaeen oder Bakterien haben Mechanismen entwickelt, um diese Veränderungen zu sensieren. Die Wahrnehmung einer Osmolalitätsänderung löst zelluläre Prozesse zur Kompensation aus. Treten Störungen des Regulationssystems auf, ist das sowohl in Einzellern, wie auch in komplexen eukaryotischen Systemen fatal. In einzelligen Organismen zählt die Osmoadaptation zu den wichtigsten Faktoren für die Fitness der Zelle und damit für das Überleben. Der Osmoadaptationsprozess ist ein globales Prinzip der Biologie des Lebens.

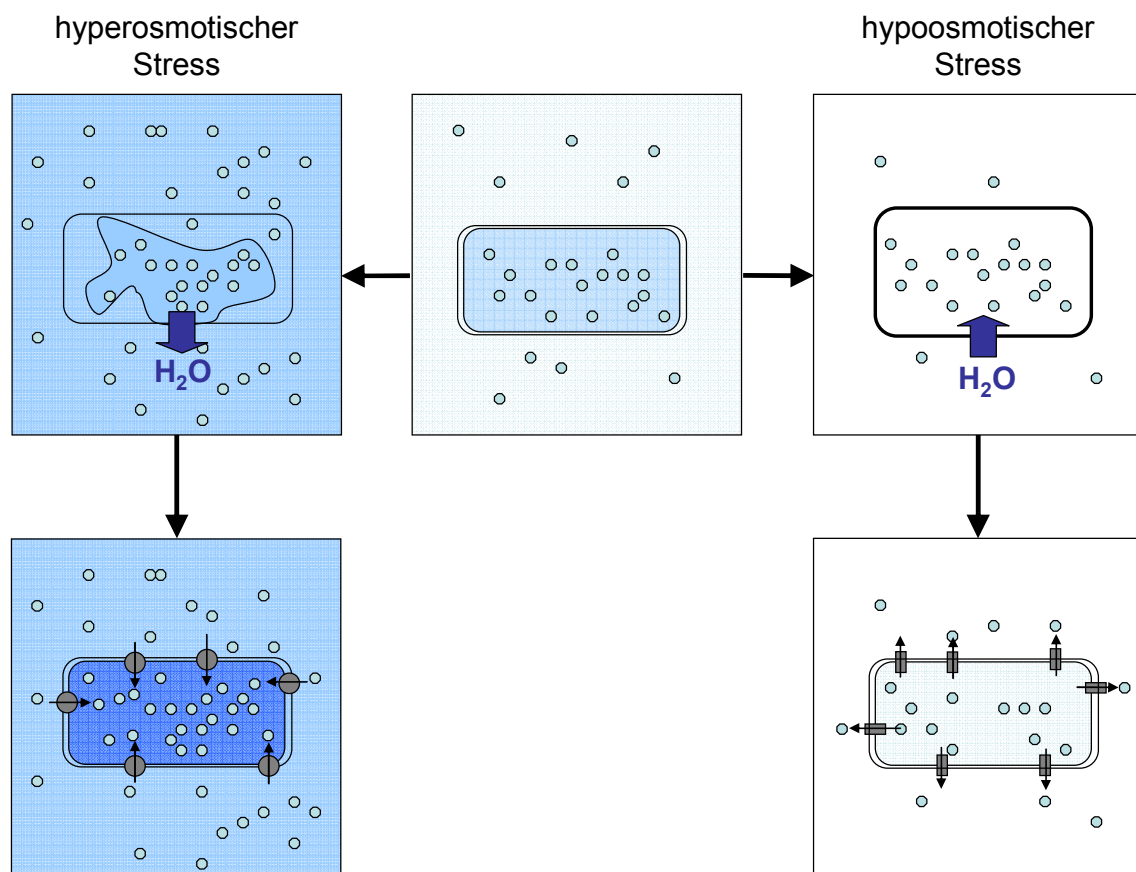


Abb. 1.1: Auswirkungen von osmotischem Stress auf eine bakterielle Zelle. Im Gleichgewichtszustand (Mitte) ist die intrazelluläre Osmolalität im Gegensatz zur extrazellulären erhöht. Dadurch entsteht ein Druck im Inneren der Zelle, der Turgor. Hyperosmotischer Stress (linke Seite) führt zu raschem Wasserverlust der Zelle und damit zur Plasmolyse. Die Zelle reagiert darauf mit der Aufnahme von Soluten, die von einem passiven Wassereinstrom begleitet ist. Unter hypoosmotischen Bedingungen (rechte Seite) strömt sofort Wasser entgegen des Konzentrationsgefälles in die Zelle ein. Dadurch schwillt die Zelle an. Dies löst die Öffnung mechanosensitiver Kanäle aus, die die umgehende Freisetzung von Soluten und Wasser kanalisieren.

Da biologische Membranen wasserdurchlässig, aber nicht permeabel für andere Solute sind, führen Veränderungen der Osmolalität zu hyperosmotischem oder hypoosmotischem Stress (Abb. 1.1). Während die Konsequenz von hypoosmotischem Stress rasches Einströmen von Wasser in die Zelle ist, und dadurch ein Anschwellen der Zelle verursacht wird, resultiert hyperosmotischer Stress in Wasserverlust, einem Schrumpfen der Zelle und in einer Verstärkung der dichten Packung der Makromoleküle im Cytoplasma, dem sogenannten „molecular crowding“. (Cayley and Record, 2003)

Hypoosmotischer Stress kann beispielsweise bei Bodenorganismen durch eine starke Verdünnung der extrazellulären Flüssigkeit durch starke Regenfälle entstehen. Der schnelle Wassereinfluss entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle wird hauptsächlich durch die Öffnung mechanosensitiver Kanäle kompensiert. Diese ermöglichen bei hypoosmotischem Stress einen schnellen Efflux von niedermolekularen Verbindungen. Fehlen diese Kanäle, kann eine Erniedrigung der Umgebungsmolalität zur Zellyse führen (Pivetti *et al.*, 2003).

Im Gegenteil dazu verursacht hyperosmotischer Stress einen passiven Verlust von Wasser. Als Konsequenz kommt es zur Inhibierung zahlreicher physiologischer Prozesse (Meury, 1988; Roth *et al.*, 1985a; Roth *et al.*, 1985b; Walter *et al.*, 1987). Diese beinhalten z.B. die Aufnahme von Nährstoffen, die DNA-Replikation und die Proteinbiosynthese. Prinzipiell existieren zwei Strategien, um den starken Wasserverlust und die nachteiligen Konsequenzen von hyperosmotischem Stress auszugleichen. Einige extrem halophile Organismen wie *Halobacteria* und *Haloanaerobiales* widerstehen den hohen Salzkonzentrationen in ihren Habitaten durch die sogenannte „salt-in“-Strategie (Galinski und Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998). Dabei werden anorganische Ionen, hauptsächlich K^+ und Cl^- , akkumuliert, bis die intrazelluläre Salzkonzentration mit der externen Konzentration vergleichbar ist. Diese Strategie ist nur in wenigen, hoch spezialisierten Organismen anzutreffen. Dabei muss die gesamte Zellmaschinerie auf die hohen Salzkonzentrationen im Cytoplasma abgestimmt sein (Britton *et al.*, 2006; Eisenberg *et al.*, 1992). Das Proteom von halophilen Organismen zeichnet sich deshalb, wie für *Halobacterium sp.* gezeigt, durch eine erhöhte Anzahl negativ geladener Aminosäuren auf Proteinoberflächen bei einer gleichzeitigen Erniedrigung der Hydrophobizität aus (Kennedy *et al.*, 2001). Außerdem führt die starke Spezialisierung dieser Organismen dazu, dass sie größtenteils unfähig sind, bei einer Salinität von < 2 M NaCl zu wachsen (Kamekura, 1998).

Die sehr viel weiter verbreitete Strategie, die von Organismen in allen drei Domänen des Lebens, einschließlich höherer Organismen wie Tieren und Pflanzen, genutzt wird, ist die „salt-out“-Strategie. Dabei werden kleine organische Verbindungen, die als kompatible Solute bezeichnet werden, produziert oder aus der Umgebung aufgenommen, um die Unterschiede in den Osmolalitäten der zwei Kompartimente auszugleichen (Wood *et al.*, 2001). Diese Verbindungen können in mehrere Gruppen eingeteilt werden: Polyole und Derivate, Zucker und

Derivate, Aminosäuren und Derivate, Betaine, Ectoin und modifizierte Peptide (Galinski, 1995). Hohe cytoplasmatische Konzentrationen dieser Verbindungen gleichen nicht nur die Osmolalität von intra- und extrazellulärem Raum aus, ohne mit dem Metabolismus der Zelle zu interferieren, sie haben auch zusätzliche, günstige Eigenschaften. Beispielsweise ist bekannt, dass die weitverbreiteten kompatiblen Solute Glycinbetain und Trehalose die Proteinstruktur und -stabilität positiv beeinflussen und die Löslichkeit von Proteinen erhöhen. Diese Wirkung erklärt gleichzeitig auch die Schutzfunktion dieser Solute bei Kälte- aber auch Hitzestress (Borges *et al.*, 2002; Cánovas *et al.*, 2003; Ignatova und Gierasch, 2007; Kandror *et al.*, 2002). Beispiele für andere kompatible Solute, die in diversen Organismen nachgewiesen werden konnten, sind Glutamat, Prolin, Alanin, Glucosylglycerol und Ectoin (Roberts, 2005).

Es ist bekannt, dass neben kompatiblen Soluten auch kleine Proteine, sogenannte Hydrophiline, in osmotisch gestressten Zellen akkumulieren. Die Charakteristika dieser Proteine sind ein hoher Glycinanteil (> 6 %) gepaart mit einer hohen Hydrophobizität. Für einige dieser Hydrophiline konnte gezeigt werden, dass sie eine generell stabilisierende Wirkung haben und der Aggregation anderer Proteine nach Dehydrierung entgegenwirken (Chakrabortee *et al.*, 2007). Entsprechende Sequenzen finden sich in Pflanzen (LEA: late embryogenesis proteins), *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Die genaue Funktion dieser Proteine ist in Mikroorganismen noch nicht näher untersucht.

1.2 Anpassung von *Escherichia coli* an hyperosmotischen Stress

E. coli ist ein Modellorganismus für Gram-negative Bakterien. Seit Jahrzehnten wird *E. coli* in Bezug auf den Metabolismus, die Physiologie und die molekularen Mechanismen zahlreicher Zellprozesse untersucht. Nah verwandt sind die bedeutenden, human- und tierpathogenen Stämme *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.* und *E. coli* EHEC, die Krankheiten wie Durchfälle, Ruhr und Typhus verursachen.

Alle diese oben genannten Spezies können sowohl in den verschiedenen Teilen des Säugetier-Gastrointestinaltrakts als auch außerhalb des Wirts überleben. Die Konsequenz daraus ist, dass sie mit starken Veränderungen der Sauerstoffverfügbarkeit, wechselnden pH-Werten, von sauren Bedingungen im Magen (pH 1-3) bis zu alkalischen Bedingungen im Dünndarm, und mit schnellen Veränderungen der Salzkonzentration und/oder der Osmolalität *per se* umzugehen haben. Eine effiziente Adaptation an diese Änderungen der extrazellulären Osmolalität ist ein bedeutender Faktor für die erfolgreiche Proliferation dieser Bakterien im Darm des Wirtes. Deutlich wird das unter anderem darin, dass *E. coli* sich über einen extrem weiten extrazellulären Osmolalitätsbereich vermehren kann (von ≤ 0.02 bis > 2 Osm) (Cayley and Record, 2003). Es wird angenommen, dass die osmoregulatorische Kapazität z. B. *E. coli* dabei hilft, Infektionen in Menschen und Tieren zu verursachen (Culham *et al.*, 2001).

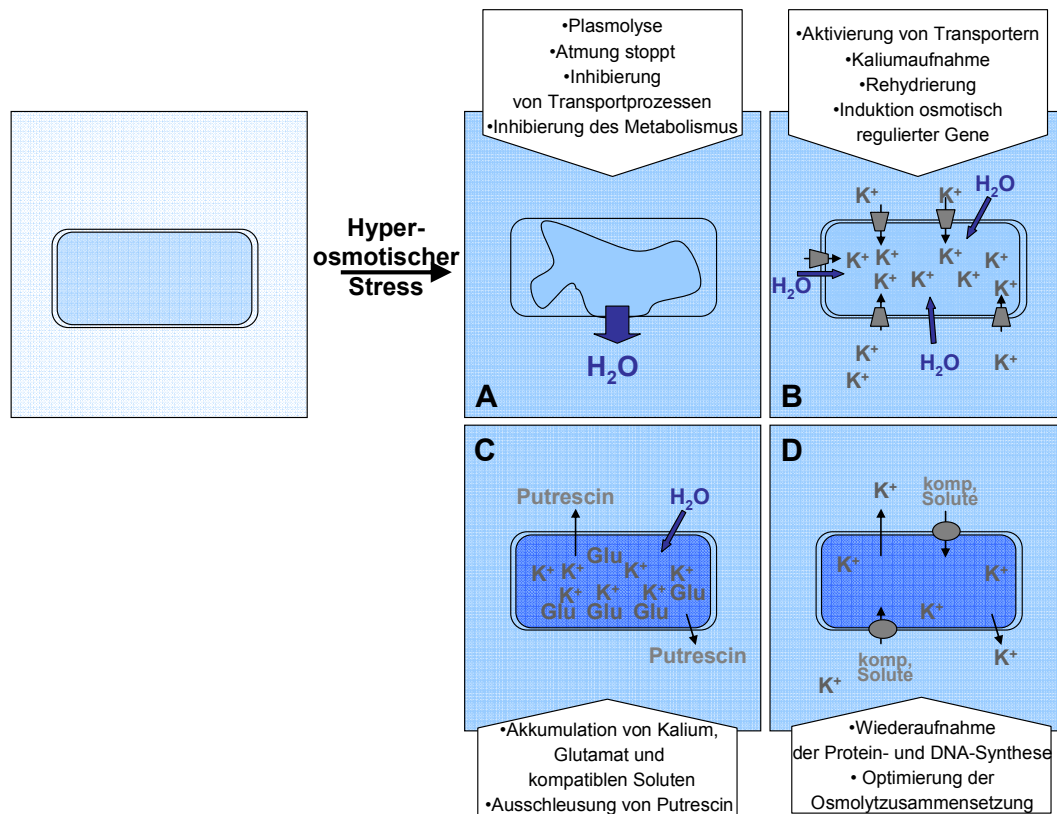


Abb. 1.2: Der Verlauf der Adaptation an hyperosmotischen Stress in *E. coli*. Sofort nach einer Erhöhung der extrazellulären Osmolarität verliert die Zelle Wasser und zentrale Prozesse werden inhibiert (A). Innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Minuten nach der Erhöhung wird K^+ aufgenommen, um eine Rehydrierung zu ermöglichen (B). In den nächsten Minuten wird Glutamat akkumuliert und Putrescin ausgeschleust (C). Danach folgt eine Phase in der zentrale Prozesse in der Zelle wieder aufgenommen werden und die Osmolytzusammensetzung optimiert wird (D). Zur genauen Beschreibung der Abläufe siehe Text.

Die einzelnen Schritte des Prozesses der Osmoadaptation sind für *E. coli* bereits sehr gut untersucht. Nach einer plötzlichen Zunahme der extrazellulären Osmolarität verliert die Zelle rasch Wasser und schrumpft (Abb. 1.2A). Der Turgor, der für Pflanzen und die meisten Bakterien eine unerlässliche Voraussetzung für Zellwachstum und Zellteilung ist, wird vermindert. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Atmung aussetzt, der intrazelluläre pH-Wert ansteigt und ein Großteil der Transport- und Stoffwechselprozesse stoppt (Dinnbier *et al.*, 1988; Grothe *et al.*, 1986; Houssin *et al.*, 1991). Die Hemmung der enzymatischen Funktionen wird durch die erhöhte intrazelluläre Osmolarität, ausgelöst durch die Plasmolyse, verursacht. Die erste Reaktion der Zelle beinhaltet die Aktivierung der sekundären Transporter TrkH und TrkG (Abb. 1.2B). Beide Transporter werden konstitutiv exprimiert und katalysieren die rasche K^+ -Aufnahme direkt nach der Erhöhung der extrazellulären Solutkonzentration (Meury *et al.*, 1985; Schlösser *et al.* 1992). Die intrazelluläre Osmolarität steigt an und Wasser fließt passiv, entlang des Konzentrationsgradienten, in die Zelle und stellt den Zellturgor wieder her. Um die positiven Ladungen der Kaliumionen auszugleichen, wird temporär Glutamat als kompatibles Solut akkumuliert (Abb. 1.2C). Dabei spielen zwei Mechanismen eine Rolle. Erstens wird Glutamat verstärkt durch die Enzyme Glutamatdehydrogenase und Glutaminsynthase

produziert, und zweitens wird der Abbau von Glutamat reduziert (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994). Zum weiteren Ladungsausgleich wird innerhalb der ersten 5-10 Minuten nach Erhöhung der Osmolalität das positiv geladene Polyamin Putrescin ausgeschleust (Munro *et al.*, 1972). Im folgenden Zeitraum, der bis zu einer Stunde umfassen kann, wird die interne Solutzusammensetzung optimiert, um eine Wiederaufnahme von Zellwachstum und Metabolismus zu ermöglichen (Abb. 1.2D). Da hohe intrazelluläre K^+ -Konzentrationen Proteinstabilität und -funktion beeinträchtigen, werden geladene Verbindungen und Ionen gegen leicht lösliche, ungeladene oder zwitterionische Substanzen ausgetauscht. Die Art der akkumulierten kompatiblen Solute ist abhängig vom umgebenden Medium. *E. coli* kann beispielsweise Solute wie Prolin, Glycinbetain oder Cholin, eine Vorstufe des Glycinbetains, nutzen. Die entsprechenden Transportsysteme werden bei osmotischem Stress hochreguliert. Gut untersuchte Systeme sind z. B. der ABC-Transporter ProU und die sekundären Transporter ProP and BetT. ProU ist ein ATP-abhängiger Transporter für Prolinbetain, Prolin und Glycinbetain und besteht aus der ATPase Untereinheit ProV, dem membranintegrierten Protein ProW und dem periplasmatischen Bindeprotein ProX. ProP ist dagegen ein sekundärer Transporter mit einer überlappenden Substratspezifität. Beide Systeme sind sowohl auf Expressions- als auch auf Aktivitätsebene reguliert (Bremer and Krämer, 2000; Csonka and Epstein, 1996). Hohe K^+ -Konzentrationen verstärken die Transkription des *proU*-Operons und gleichzeitig die Aktivität des entsprechenden Transporters.

E. coli kann Glycinbetain auch aus Cholin herstellen. Cholin wird durch den osmoregulierten Transporter BetT aufgenommen und wird dann über zwei enzymatische Schritte, die durch die Enzyme BetA und BetB katalysiert werden, zu Glycinbetain umgesetzt (Bremer and Krämer, 2000). Wenn keine dieser kompatiblen Solute verfügbar sind, produziert *E. coli* das Disaccharid Trehalose aus zwei Molekülen Glukose mithilfe der Enzyme OtsA und OtsB (Giaever *et al.*, 1988) (Abb. 1.3). Da im Verlauf dieser Arbeit weitergehende Untersuchungen zum Trehalosemetabolismus durchgeführt wurden, soll auf diesen kurz genauer eingegangen werden. Trehalose kann unter hyperosmotischen Bedingungen nicht aus der Umgebung aufgenommen werden, da das spezifische Transportsystem (TreB) unter diesen Bedingungen inhibiert ist (Rimmele and Boos, 1994). Wenn Trehalose in der Umgebung vorhanden ist, wird diese zuerst im Periplasma durch TreA in zwei Moleküle Glukose gespalten und dann die Glukose aufgenommen. TreA akkumuliert bei erhöhter Osmolalität im Periplasma (Repoila und Gutierrez, 1991). Im Cytoplasma von *E. coli* gibt es zwei Enzyme mit nachgewiesener Trehalase-Aktivität: TreC und TreF. Wenn Trehalose als Kohlenstoffquelle genutzt wird, dient TreC zur Spaltung von Trehalose. TreF akkumuliert unter hyperosmotischen Stressbedingungen (Boos *et al.*, 1987; Horlacher *et al.*, 1996). Die genaue Funktion und Regulation von TreF sind bis jetzt unbekannt.

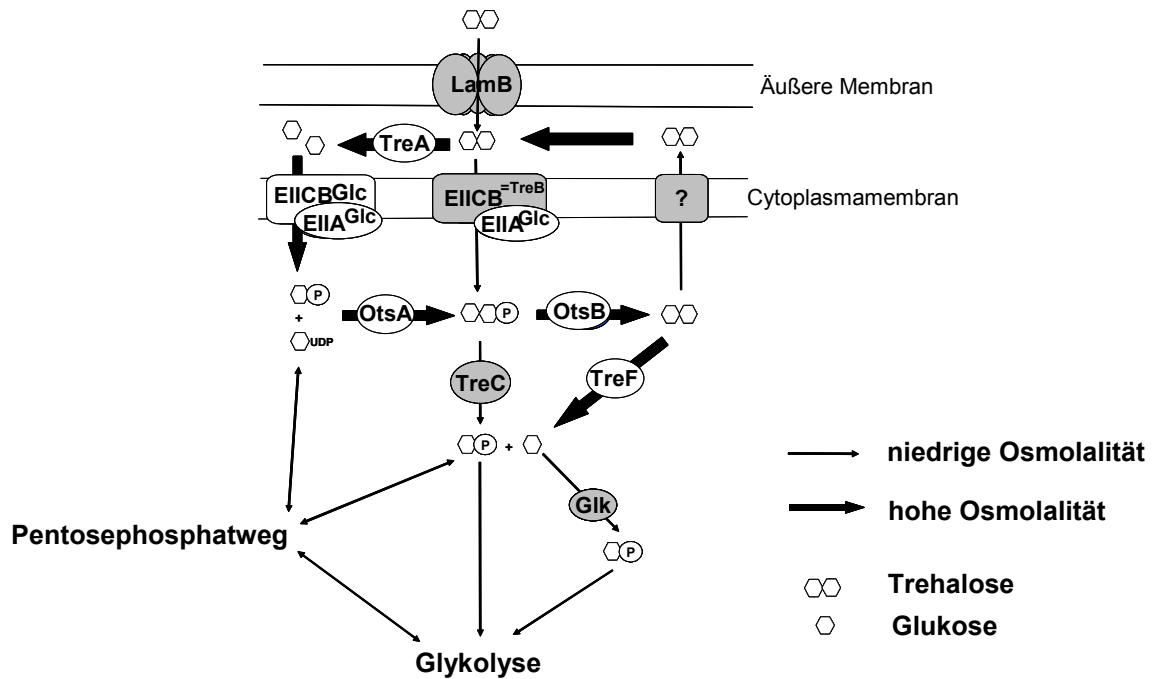


Abb. 1.3: Trehalose-Metabolismus in *E. coli*. Adaptiert nach Purvis *et al.* (2005) und Rimmele und Boos (1994). Erläuterung siehe Text.

1.3 Wahrnehmung von osmotischem Stress und Regulationsmechanismen von Stressantworten

Obwohl die prinzipiellen Prozesse des Osmoadaptationsprozesses in *E. coli* gut untersucht sind, bleibt die Frage offen, wie die Veränderungen der Osmolalität sensiert werden. Außerdem ist weiterhin unklar, wie die erhaltenen Signale zu Transkriptionsregulatoren oder anderen alternativen Empfängern weitergeleitet werden. Der größte Teil der Studien, die die Frage nach Art und Verarbeitung der Signale behandeln, wurde an osmoregulierten Transportproteinen durchgeführt. Sowohl die Transporter ProP aus *E. coli* (ein Protonen/Solut-Symporter), BetP aus *Corynebacterium glutamicum* (ein Na⁺/Solut-Symporter) als auch OpuA aus *Lactococcus lactis* (ein ABC-Transporter) führen zwei Funktionen aus (Racher *et al.*, 1999; Ruebenhagen *et al.*, 2000; van der Heide und Poolman, 2000). Sie können die Veränderung der Osmolarität sensieren und gleichzeitig die Transportaktivität entsprechend anpassen und damit auf den Reiz reagieren. Das bedeutet, dass diese Proteine die sensierende, weiterleitende und antwortende Funktion in einem Makromolekül vereinen (Wood *et al.*, 2001). Folglich steigt die Aktivität von ProP mit der extrazellulären Osmolalität an, während die meisten anderen membranlokalisierten Prozesse, wie Atmung oder Transportprozesse, inhibiert werden (Racher *et al.*, 1999). Man geht momentan davon aus, dass ProP auf Veränderungen der Ionenstärke und/oder auf eine erhöhte Dichte der Makromoleküle im Cytoplasma reagiert (Culham *et al.*, 2003). Ein möglicher Kandidat für die sensierende Domäne ist die cytoplasmatische,

carboxyterminale Aminosäurefolge, die eine homodimere, antiparallele, α -helikale „Coiled-coil“-Struktur bilden kann. Untersuchungen mit veränderten Proteinen in denen diese Struktur betroffen war, deuten darauf hin, dass dieser Teil des Proteins für die osmotische Regulation bei leicht erhöhten Osmolalitäten wichtig ist. Gleichzeitig wird die Aktivität von ProP auch durch die Phospholipid-Zusammensetzung der Membran beeinflusst. Dabei spielt vor allem der Cardiolipingehalt eine Rolle (Tsatskis *et al.*, 2005).

Ein weiteres gut untersuchtes Transportsystem ist BetP, ein hochaffiner Transporter für das kompatible Solut Glycinbetain in *C. glutamicum*. Im Falle von hyperosmotischem Stress sensiert BetP die erhöhte intrazelluläre K^+ -Konzentration. Die Konzentration dient als Maß der Hypertonizität. Es handelt sich bei BetP also eher um einen Chemo- als um einen Osmosensor (Morbach and Krämer, 2003). BetP wird auch bei Kältestress aktiviert. Aber das Signal, das unter diesen Bedingungen erkannt wird, sind Veränderungen des physikalischen Zustands der Membran, verursacht durch eine veränderte Lipidzusammensetzung (Özcan *et al.*, 2007).

Durch die Untersuchungen an diesen augenscheinlich einfachen Systemen haben sich in den letzten Jahren Ideen entwickelt, wie Veränderungen der Osmolalität sensiert werden können. Potentielle Signale sind Veränderungen der Konzentration spezieller Solute inner- oder außerhalb der Zelle, „molecular crowding“ oder Veränderungen des Membranzustands.

Typische Sensorsysteme für Umweltreize in Bakterien sind Zweikomponentensysteme, bestehend aus einer meist membranintegrierten Sensorkinase und einem cytoplasmatischen Antwortregulator. Der Antwortregulator kann an DNA binden und dann direkt als Transkriptionsregulator agieren. Im Moment ist für vier dieser Systeme aus verschiedenen Organismen bekannt, dass sie an der Sensierung von hyperosmotischem Stress beteiligt sind.

Das KdpDE-System aus *E. coli*, das die intrazelluläre K^+ -Konzentration reguliert, war eines der ersten Zweikomponentensysteme mit einer nachgewiesenen osmosensorischen Funktion. Aber der Einfluss von Osmolaritätsänderungen auf das System sind limitiert, da der Hauptzweck dieses Systems die Regulation der hochaffinen P-Typ-ATPase KdpFABC unter K^+ -Limitation ist (Jung *et al.*, 2001b). Ein anderes Sensorsystem in *E. coli* ist das EnvZ/OmpR-System. Die Kinase EnvZ und das DNA-bindende Protein OmpR regulieren die Transkription der Gene *ompF* und *ompC* in Abhängigkeit von der Mediumosmolalität (Pratt und Silhavy, 1995). Beide Gene kodieren für Porine in der äußeren Membran von *E. coli*. Während bei erhöhter Osmolarität die Transkription von *ompC* erhöht wird, wird die Transkription von *ompF* vermindert. Die Porine OmpC und OmpF haben unterschiedliche Porendurchmesser (OmpF: ≈ 1.16 nm; OmpC: ≈ 1.06 nm) und die Diffusionsraten von Substraten unterscheiden sich um den Faktor 10 (Csonka, 1989; Nikaido und Vaara, 1985). Das System spielt nach jetzigem Wissensstand allerdings eine eher untergeordnete Rolle bei der Osmoadaptation wie auch bei der Regulation der Porinzusammensetzung (Batchelor und Goulian, 2006; Kanamaru und Mizuno, 1992).

Ein osmoreguliertes Zweikomponentensystem mit einem globalen Einfluss auf die Zellphysiologie in *C. glutamicum*, das MtrAB-System, reguliert unter anderem die Gene *betP*, *proP* und *lcoP*, die für Transporter für kompatible Solute kodieren (Möker *et al.*, 2004). Es wird postuliert, dass die Sensorkinase MtrB über cytoplasmatisch lokalisierte Domänen direkt Hypertonizität wahrnimmt, da die Funktion unabhängig vom zugegebenen Osmolyt war (Möker *et al.*, 2007).

Neben spezifischen Stressreaktionen auf einen speziellen Stimulus antworten Bakterien auf die meisten Stressbedingungen mit der Auslösung einer generellen Stressantwort (Ishihama, 2000). Das globale Stress-Regulon wird durch die Akkumulation des alternativen Stress-Sigmafaktors RpoS (δ^S) induziert. Die Auslösung dieser generellen Stressantwort resultiert in einem weitreichenden Schutz („cross-protection“) der Zelle vor unterschiedlichsten Umweltstressoren. Die Induktion des Regulons findet z. B. bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, bei osmotischem Stress oder bei niedriger Temperatur statt (Abb. 1.4). Die allgemeine Schutzfunktion wird auch in der erhöhten Resistenz von Zellen der stationären Phase gegenüber Hitze, Oxidationsmitteln z.B. H_2O_2 , Veränderungen des pH-Werts und hyperosmotischem Stress deutlich (Hengge-Aronis, 2002).

Durch Vergleiche von Expressionsmustern im Wildtyp und in *rpoS*-Mutanten, beruhend auf Transkriptom-Analysen oder zufälligen *lacZ*-Fusionen unter verschiedenen Bedingungen, konnten über 100 Gene identifiziert werden, die durch RpoS reguliert werden (Patten *et al.*, 2004; Schellhorn *et al.*, 2004). Andere Studien sprechen von einer indirekten oder direkten Regulation von bis zu 10 % der *E. coli*-Gene durch RpoS (Weber *et al.*, 2005). Die Regulation des globalen Regulators selbst passiert auf mehreren Ebenen (Abb. 1.4). Zum einen wird die Effizienz der *rpoS*-mRNA-Translation durch verschiedene Stress-Sensierungsmechanismen, wie kleine regulatorische RNAs und dem Hfq-Protein kontrolliert (Repoila *et al.*, 2003), zum anderen unterliegt die Stabilität des Proteins RpoS einer strikten Regulation (Becker *et al.*, 1999; Klauck *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2001).

Bei erhöhter, extrazellulärer Osmolarität wird die RpoS-Menge hauptsächlich auf der posttranskriptionellen Ebene durch eine verminderte Proteolyse reguliert. Gleichzeitig konnte eine erhöhte *rpoS*-mRNA-Translation nachgewiesen werden (Hengge-Aronis, 2002; Lange and Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996).

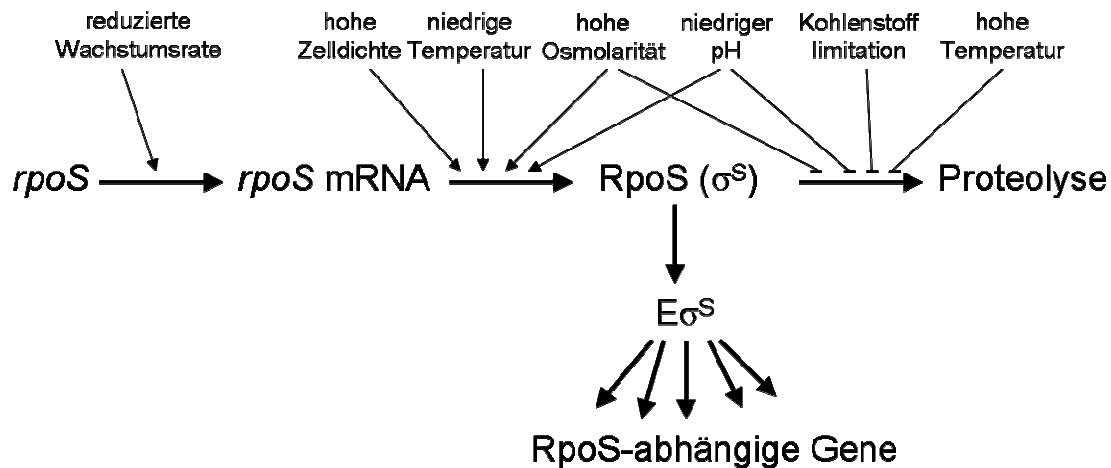


Abb. 1.4: Regulationsebenen von RpoS. Die zelluläre Menge an RpoS kann durch Stimulation der *rpoS*-Transkription, Translation oder durch Inhibierung der RpoS-Proteolyse erhöht werden. Unter hyperosmotischen Stressbedingungen wird durch eine kombinatorische Regulation auf der Ebene der Translation und Proteolyse die Menge an RpoS innerhalb weniger Minuten stark erhöht. Unter erhöhter Osmolalität steigt die RpoS-Halbwertszeit von 2-3 min auf 50 min an (nach Hengge-Aronis, 2002).

Die generelle Stressantwort ist in den meisten Fällen nicht ausreichend, um bestimmten Stressbedingungen über einen längeren Zeitraum zu widerstehen. Folglich sind zusätzlich spezifische Stressantworten nötig, um die allgemeine Stressantwort passend der Bedingungen zu modulieren und so letztendlich ein Überleben zu ermöglichen. Dies wird auch darin deutlich, dass die meisten RpoS-abhängigen Gene hochspezifisch reguliert sind, und nur unter bestimmten Stressbedingungen exprimiert werden. Weitere regulatorische Faktoren, die z. B. in das RpoS-Regulon eingreifen sind cAMP-CAP (cyclic AMP-cAMP receptor protein) und Lrp (leucine-responsive regulatory protein) (Colland *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 1993; Marschall *et al.*, 1998; Metzner *et al.*, 2004; Tani *et al.*, 2003).

Weitere mögliche Signalmechanismen zur Auslösung spezifischer Stressreaktionen sind Veränderungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die Vermittlung über kleine Verbindungen oder Ionen, sogenannten „second messenger“. Während globale Veränderungen der Protein-Protein-Wechselwirkungen erst in dieser Arbeit initial untersucht worden sind, gibt es bereits Untersuchungen zur Rolle kleiner Moleküle bei der Osmoadaptation.

Ein potentieller Kandidat ist dabei K^+ , da es innerhalb von Millisekunden nach hyperosmotischem Stress in *E. coli* akkumuliert (siehe 1.2). Einige regulatorische Funktionen dieses Ions auf transkriptioneller Ebene wurden bereits nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Expression des *proU*-Operons prinzipiell von der intrazellulären Akkumulation von K^+ -Ionen abhängt (Sutherland *et al.*, 1986). *proU* kodiert für einen Transporter für die kompatiblen Solute Glycinbetain und Prolin. Weiterhin konnte bereits nachgewiesen werden, dass der osmotisch regulierte Promotor von *osmY* durch Zugabe von K^+ -Glutamat *in vitro* induziert wird. Dies war bei Zugabe der kompatiblen Solute Trehalose und Glycinbetain nicht der Fall (Lee und Gralla, 2004).

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Weiterleitung des Reizes „osmotischer Stress“ könnte die Akkumulation von Sauerstoffradikalen in *E. coli* nach Erhöhung der extrazellulären Osmolarität sein. Es wurde bereits postuliert, dass hyperosmotischer Stress in *E. coli* mit einer Erhöhung der Sauerstoffradikale in der Zelle einhergeht (Smirnova *et al.*, 2000). Eine erhöhte Radikalbildung konnte z. B. in Pflanzen unter entsprechenden Bedingungen schon nachgewiesen werden (Seel *et al.*, 1991). Weiterhin wurde eine regulatorische Funktion von Radikalen bei der Osmoadaptation sowohl in Leberzellen als auch in Nierenzellen gezeigt (Reinehr *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass neben der offensichtlichen Bedeutung des globalen Stressregulators RpoS andere Signalmechanismen der Osmoadaptation in *E. coli* ungeklärt sind. Um mögliche Mechanismen aufzuklären ist es notwendig, beteiligte Proteine durch globale Analysen zu identifizieren, und daraus Ideen für ein weiteres Vorgehen abzuleiten. Andere potentielle Ansatzpunkte sind die Veränderungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Untersuchung der potentiellen Funktion kleiner Verbindungen und Moleküle bei der Signalübertragung.

1.4 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Veränderungen im Proteom von *Escherichia coli* im zeitlichen Verlauf der Osmoadaptation aufgezeigt, beteiligte Proteine identifiziert und bisher unbekannte Komponenten der Osmostressantwort näher charakterisiert werden.

Dazu werden die Veränderungen im Proteom unter aeroben und anaeroben Bedingungen sowie bei osmotischem und Salzstress untersucht. Stressregulierte Proteine werden durch Massenspektrometrie identifiziert. Ein weiteres Ziel ist die Untersuchung des Einflusses von kompatiblen Soluten auf die Veränderungen des Proteoms. Veränderungen der Proteininteraktionen infolge von Salzstress sollen mit einer zu etablierenden Methodik detektiert werden.

Der Effekt der transienten Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration auf den nachfolgenden Osmoadaptationsprozess soll auf Proteomebene analysiert werden. Weiterhin sollen sowohl die Bedeutung von Sauerstoffradikalen bei der Osmoadaptation als auch die Rolle einzelner identifizierter Proteine im Anpassungsprozess näher untersucht werden. Insbesondere soll die Rolle der cytoplasmatischen Trehalase TreF genauer charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In dieser Arbeit fanden folgende Materialien Verwendung:

[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
2Log DNA Leiter (0,1-10 kb)	New England Biolabs (Frankfurt)
Broad Range Protein Standard	New England Biolabs (Frankfurt)
DNA-Polymerase	GeneCraft (Köln)
DNeasy-Tissue-Kit	Qiagen (Hilden)
monoklonaler αRpoS -Antikörper	NeoClone (Madison, USA)
Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phusion-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Nucleotide Removal-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraction-Kit	Qiagen (Hilden)
Quick and Easy Gene Deletion Kit	Gene Bridges (Heidelberg)
Rediprime™ II-Kit	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt)
SeeBlue Plus2 Pre-stained-Proteinstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Trypsin	Promega (Mannheim)
Ziege-anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper-AP	Biomol (Hamburg)
Ziege-anti-(Maus-IgG)-Antikörper-AP	Biomol (Hamburg)
ZipTip μC18	Millipore (Eschborn)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad *pro analysis* (p. a.) bezogen.

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

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

Tab. 2.1: Verwendete Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
MG1655	Wildtyp	Blattner <i>et al.</i> , 1997
CS12	MC4100 (F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL thi rbsR</i>) <i>malTc ΔmalQ</i> Φ(<i>malP-lacZ</i>) <i>malS malZ Δara714...leu::Tn10</i>	Prinz <i>et al.</i> , 1996
FRAG1	F ⁻ <i>thi lacZ gal rha</i>	Stumpe und Bakker, 1997
HS996	F ⁻ <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	ResGen; Invitrogen Corporation (Karlsruhe)
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 λ⁻ relA1 Δ(lac-proAB)</i> / F ⁻ <i>traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
JW328	BW25113 <i>katE::Cm^R</i>	J. Winter, TU München
LB650	<i>ΔtrkH::Cam^R ΔtrkG::Kan^R ΔkdpFABC5 trkD1</i> F ⁻ <i>thi lacZ gal rha</i>	Stumpe und Bakker, 1997
QC2476	MG1655 <i>katE::Tn10 katG::Tn10</i>	Touati Lab, Marseille, France, www2.ijm.jussieu.fr/touati/
QC6083	MG1655 <i>katE::Tn10 katG::Tn10 ΔlacI-Z sodA49</i> <i>sodB::MudPR3 zij:minikan-omega</i>	Touati Lab, Marseille, France, www2.ijm.jussieu.fr/touati/
RHo60	MC4100 (F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL thi rbsR</i>) <i>treF::Kan^R</i>	Horlacher <i>et al.</i> , 1996
SK2	MG1655 <i>dppA::Kan^R</i>	Diese Arbeit
SK3	MG1655 <i>ΔdppA</i>	Diese Arbeit
SK4	MG1655 <i>oppA::Kan^R</i>	Diese Arbeit
SK5	MG1655 <i>ΔoppA</i>	Diese Arbeit
SK6	MG1655 <i>katE::Cm^R</i>	Diese Arbeit
SKRH060	MG1655 <i>treF::Kan^R</i>	Diese Arbeit
VH1Δ <i>hdhA</i>	MG1655 <i>hdhA::Kan^R</i>	Hofer, 2007

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Referenz
FRT-PGK-gb2- <i>neo</i> -FRT	Kan ^R	FRT-gb2- <i>neo</i> -FRT	Gene Bridges, Heidelberg
pBAD-RR- <i>gfp</i> (p8754)	Amp ^R	pBAD24 RR(<i>torA</i>) <i>gfp</i>	Santini <i>et al.</i> , 2000
pBAD-RR- <i>gfp-dppA</i>	Amp ^R	pBAD-RR- <i>gfp dppA</i>	Bauer, 2007
pBAD-RR- <i>gfp-oppA</i>	Amp ^R	pBAD-RR- <i>gfp oppA</i>	Bauer, 2007
pCP20	Amp ^R , Cm ^R	FLP ⁺ , λ cl857 ⁺ , λ pR, Rep ^{ts}	Cherepaniv und Wackernagel, 1995
pRedET	Tet ^R	Red/ET Expressionsplasmid <i>red$\gamma$$\beta$arecA</i> Operon	Gene Bridges, Heidelberg
pRS415	Amp ^R	<i>bla lacZ-A</i>	Simons <i>et al.</i> , 1987
pRS <i>hdhA</i> reg3	Amp ^R	pRS415 Δ <i>lacZ-A hdhA</i>	Diese Arbeit
ptre11	Amp ^R	pBR322 <i>treA</i>	M. Ehrmann, Universität Duisburg

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
<i>ahpC</i> Sonde antisense	TTAGATTTTACCAACCAGGTCC	
<i>ahpC</i> Sonde sense	TTATGTCCTTGATTAACACC	
<i>dps</i> antisense	TTATTCCATGTTAGACTCGATAAAC	
<i>dps</i> sense	ATGAGTACCGCTAAATTAGTTAAATC	
<i>katE</i> Sonde antisense	TTCGGTATAGAACTTGGTGGC	
<i>katE</i> Sonde sense	AACGAAAAGAACCCACATCAGC	Sondenherstellung
<i>katG</i> Sonde antisense	TTAACATCCAGATCCGGTTCC	
<i>katG</i> Sonde sense	ATGAGCACGTCAGACGA AT	
<i>osmC</i> Sonde antisense	TTACGATTTCAACTGGTAATCC	
<i>osmC</i> Sonde sense	ATGACAATCCATAAGAAAGG	
<i>osmY</i> antisense	TTACTTAGTTTTTCAGATCATTTTTAACG	
<i>osmY</i> sense	ATGACTATGACAAGACTGAAGATTC	

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
<i>otsA</i> antisense	CTACGCAAGCTTTGGAAAGGTAGC	
<i>otsA</i> sense	ATGAGTCGTTTAGTCGTAGTATCTAAC	
<i>proX</i> antisense	TTACTTCTGCACTGCCAGCGCCTC	Sondenherstellung
<i>proX</i> sense	ATGCGACATAGCGTACTTTTTGCG	
<i>sodA</i> Sonde antisense	AACGTGCCGCTGCTTCGTCCC	
<i>sodA</i> Sonde sense	ATGAGCTATACCCTGCCATCC	
<i>hdhA</i> regNcolsense	ATGCGACCATGGCCACACTTGAT	Klonierung von <i>hdhA</i>
<i>hdhA</i> regBamHlas	GCATTGAGGATCCGGGTCCGTGT	
<i>del-oppA</i> -lower	ATAAAAATCAGACACCGTGGAGCAGGACACTCCT GCCCCACGTATTGGCATAATACGACTCACTATAGG GCTC	Erstellung von Deletionen
<i>del-oppA</i> -upper	TACACATGCTGGTTAATACCAGTAATTATAATGAG GGAGTCCAAAAACAAATTAACCCTCACTAAAGGG CG	
<i>del-dppA</i> -upper	AACCCACTGCAAAGGGTAAAACAACAAACATCAC AATTGGAGCAGAATAAATTAACCCTCACTAAAGGG CG	
<i>del-dppA</i> -lower	GAGCGCATCAGGCATTTTTGCCTTTGCCATCAGTC TTGTATGGCTTTTAATAATACGACTCACTATAGGG CTC	
<i>del-check-oppA</i> -upper	TACGTAACGATAAAGTAACC	Überprüfung von Deletionen
<i>del-check-oppA</i> -lower	AAATACTGTGTCATGATCGG	
<i>del-check-dppA</i> -upper	TCATAACGTTGACCCGACCG	
<i>del-check-dppA</i> -lower	CGCTGCACGCAGAGGCACAG	
Primer 2 ¹	CGAGACTAGTGAGACGTGCTAC	
Primer 3 ¹	TATCAGGACATAGCGTTGGCTACC	

¹ Quick and Easy Gene Deletion Kit

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierungsverfahren

Die Kultivierung der in Tab 2.1 aufgeführten Stämme erfolgte in Luria-Bertani (LB)-Medium [1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt] oder in KML-Medium [1 % (w/v) KCl, 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt]. Als Minimalmedium wurde ein phosphatgepuffertes Medium nach Epstein und Kim (1971) eingesetzt, das 1 mg/l Thiamin und 0,4 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle enthielt. Die Bezeichnung der Minimalmedien erfolgte gemäß der K^+ -Konzentration in mM. Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 µg/ml (Ampicillin, Carbenicillin), 50 bzw. 15 µg/ml (Kanamycin), 34 µg/ml (Chloramphenicol) oder 3 µg/ml (Tetracyclin) zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig bei 37 °C, aerob in Schüttelkolben oder in einem 5 l-Fermenter (Biostat B, Sartorius, Göttingen) unter Belüftung, und anaerob in komplett gefüllten Schraubflaschen oder im Fermenter ohne Begasung. Vor Beimpfung wurde das Medium im Fermenter bei anaeroben Kultivierungen für 10 min mit Stickstoff durchgast, um Sauerstoff zu entfernen. Die anaeroben Kulturen wurden durch langsames Rühren durchmischt. Die Abwesenheit von Sauerstoff wurde in Vorversuchen durch Zugabe des Redoxindikators Metylenblau (2 mg/l) überprüft. Anaerobe Kulturen wurden mit, an diese Bedingungen adaptierten, Vorkulturen beimpft. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Ultrospec2100*pro* Photometer (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die verschiedenen stressinduzierenden Substanzen bzw. Medien, die bei den phänotypischen Untersuchungen Verwendung fanden, sind im jeweiligen Versuchsteil unter Material und Methoden angegeben. Dies gilt auch für alle Abweichungen zu den hier genannten Angaben.

2.3.2 Phänotypische Untersuchungen

2.3.2.1 Überlebenstest bei hohen Salzkonzentrationen

Um die Resistenz der *E. coli*-Stämme gegenüber hohen Salzkonzentrationen zu untersuchen, wurden diese in K10-Minimalmedium bzw. LB-Medium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert ($OD_{600}=0,6$ aerob und $OD_{600}=0,3$ anaerob). Dann wurden 2 M (Minimalmedium) bzw. 3 M (LB-Medium) NaCl zugegeben. Wenn angegeben, wurde Natriumascorbat 15 min vor Setzen des Stresses in einer Endkonzentration von 10 mM zugefügt. Proben wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Erhöhung der Osmolalität entnommen, und mit isoosmolalem Minimalmedium ohne Glukose Verdünnungs-

reihen erstellt. Zur Abschätzung der Zellzahl wurden je 2 µl der Verdünnungen auf LB-Agarplatten aufgetropft und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Zahl der überlebenden Zellen genau zu bestimmen, wurden je 100 µl ausgewählter Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert, und dann die Kolonien gezählt.

2.3.2.2 Untersuchung der Beweglichkeit

Für die Beweglichkeitsuntersuchungen wurden Übernachtskulturen in LB-Medium auf eine $OD_{600}=1$ eingestellt, und davon anschließend je 1 µl auf einen LB-Nährboden mit 0,3 % (w/v) Agar (Weichagar) aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei RT. Wie gut die Zellen in der Lage waren, sich auf den Weichagarplatten fortzubewegen, wurde aus dem Durchmesser der Schwimmzone ermittelt.

2.3.2.3 Quantifizierung der Biofilmbildung

Biofilmbildung wurde mittels Kristallviolett-Färbung der, in den PVC-Mikrotiterplatten haftenden Zellen quantifiziert. Übernachtskulturen in LB-Medium wurden 1:100 in frischem Medium verdünnt und je 100 µl dieser Verdünnung in PVC-Mikrotiterplatten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das flüssige Medium mit den planktonischen Zellen entfernt, die Platte dreimal mit Wasser gewaschen und für 20 min mit 150 µl einer 0,1 % (w/v) Kristallviolett-Lösung inkubiert. Das durch die an der PVC-Mikrotiterplatte haftenden Zellen zurückgehaltene Kristallviolett wurde in 200 µl Ethanol gelöst und die Absorption bei 620 nm im TECAN- Sunrise Reader gemessen.

2.3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 0,4 % (w/v) Glukose wurden in einer 50 ml-Kunststoffröhre mit einer Übernachtskultur auf eine $OD_{600}=0,05$ angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zur einer $OD_{600}=0,6$ inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit 5 ml LB-Medium gewaschen und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) resuspendiert. Die Synthese der GFP-Fusionsproteine wurde durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) Arabinose induziert. Danach erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 30 °C im Dunkeln. Anschließend wurde die Produktion der Hybridproteine durch Zugabe von Chloramphenicol (300 µg/ml) gestoppt. Die Ansätze wurden unter langsamem Schütteln bei 30 °C für 45 min weiter inkubiert, um den Transport der bereits produzierten GFP-Hybridproteine ins Periplasma zu gewährleisten.

Die Kulturen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop DM16000 B von Leica untersucht. 30 µl Kultur wurden auf ein Deckgläschen aufgebracht, der Objektträger aufgelegt und durch

leichtes Drücken auf den Objektträger ein zuviel an Flüssigkeit entfernt. Zunächst wurden die Zellen im Phasenkontrast bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion betrachtet und aufgenommen (Leica Application Suite). Unter den gleichen Bedingungen, jedoch im GFP-Kanal, der sich aus einem Anregungsfilter (470 nm) und einem Suppressionsfilter (525 nm) zusammensetzt, wurden die fluoreszierenden Zellen untersucht. Durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 0,3 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M sowie 0,9 M direkt vor dem Mikroskopieren wurden die Zellen osmotischen Stress ausgesetzt. Die nachträgliche Kolorierung der Bilder erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop Elements 4.0.

2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.4.1 Konstruktion der Mutanten

Die Konstruktion der Mutanten erfolgte mit Hilfe des „Quick and Easy Gene Deletion Kits“ von Gene Bridges. Mittels homologer Rekombination kann spezifisch ein gewünschtes Gen gegen eine Resistenzkassette (FRT-PGK-gb2-*neo*-FRT) ausgetauscht werden. Diese funktionelle Kassette verleiht der Zelle Kanamycinresistenz und dient zur Selektion erfolgreich konstruierter Mutanten. Zuerst wurde das entsprechende DNA-Fragment für die homologe Rekombination amplifiziert. Dazu wurden Primer verwendet (Tab. 2.3; del-Primer), die jeweils zu den Sequenzen stromauf- und stromabwärts der zu deletierenden Gene (*dppA* und *oppA*) und gleichzeitig zu den Enden der Resistenzkassette homolog waren. Die Amplifikation wurde mit Hilfe der Phusion-DNA Polymerase durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und dann daraus eluiert. Für eine zusätzliche Anreicherung wurde die Konzentration der aus den Agarosegelen gereinigten PCR-Produkte durch Butanolfällung erhöht (s. 2.4.7).

Parallel dazu wurde der zu modifizierende *E. coli* HS996-Stamm nach Herstellerangaben mit dem Plasmid pRedET transformiert. Dieses Plasmid kodiert die Gene *red γ βarecA*, deren Produkte die homologe Rekombination katalysieren. Die Induktion der Expression dieser Gene erfolgte durch Zugabe von L-Arabinose. Auch die Transformation der Zellen mit dem linearen PCR-Produkt wurde nach Anleitung durchgeführt. Die Verifizierung der Gendeletionen der kanamycinresistenten Klone erfolgte durch Kolonie-PCR nach Herstellerangaben. Die in der Kontroll-PCR verwendeten Primer sind in Tab. 2.3 (check-Primer und Primer 2 und 3) aufgelistet. Die Umsetzung in den Wildtyp Stamm MG1655 erfolgte durch P1-Transduktion (s. 2.4.8). Die Entfernung der funktionellen Resistenzkassette aus den Stämmen SK2 und SK4 erfolgte durch FLP-Rekombination nach Herstellerangaben. Abweichend dazu wurde statt des 706-FLP-Plasmids das Plasmid pCP20 verwendet, welches ebenfalls für das Gen der FLP-

Rekombinase kodiert. Die erfolgreiche Entfernung der Resistenzkassette wurde durch PCR mit entsprechenden Primern überprüft (Tab. 2.3; check-Primer).

2.4.2 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskulturen mittels des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert und bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Maniatis *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1987) und die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) nach Mullis *et al.* (1986) durchgeführt. Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

2.4.4 Isolierung genomischer DNA

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

2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 0,8-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 10 x DNA-Probenpuffer [50 % (v/v) Glycerol, 0,1 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente der 2Log-Leiter-Standard der Firma New England Biolabs (Frankfurt). Der Gellauf wurde in einer “Mini Sub DNA Cell“-Agarosegel-Laufkammer (BioRad, München) bei konstant 100 V für 30-60 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit einer “Cybertech“-Fotodokumentationsanlage (Peqlab, Erlangen).

2.4.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

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

2.4.7 Anreicherung von DNA mittels Butanolfällung

DNA aus verdünnten Lösungen wurde mittels Butanolfällung angereichert. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 10 Volumen Butanol versetzt. Der Ansatz wurde gemischt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war und 10 min bei 16100 x g (RT) zentrifugiert. Die Butanolphase wurde restlos abgenommen. Die gefällte DNA wurde anschließend mit 300 µl Ethanol [70 % (v/v)] gewaschen, getrocknet (Eppendorf concentrator 5301) und in 2 µl ddH₂O aufgenommen.

2.4.8 P1-Phagenlysatpräparation und P1-Transduktion

Die Präparation von P1-Lysaten der *E. coli*-Donorstämme und die anschließende Transduktion der Phagen in *E. coli* MG1655-Stämme wurden gemäß dem Protokoll nach Leder *et al.* (1977) durchgeführt. Zur Präparation des P1-Lysates wurde 1 ml Zellkultur mit einer OD₆₀₀ = 0,3 in LB-Medium mit 10 mM CaCl₂ und 50 µl P1-Phagensuspension für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 8 ml LB-Medium mit 10 mM CaCl₂ hinzugefügt und die Kultur für 1,5 – 4 h bei 37 °C aerob inkubiert bis eine totale Lyse der Zellen erfolgt war. Das Lysat wurde mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und 5 min bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der, das Phagenlysat enthaltende Überstand, wurde mit einem Tropfen Chloroform versetzt und dann bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Transduktion der Lysate wurden *E. coli* MG1655-Zellen in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 aerob bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 x g geerntet, zweimal in Transduktionslösung (100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) gewaschen und anschließend so in Transduktionslösung resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ = 1 erhalten wurde. Danach wurden je 300 µl der Zellsuspension mit 5-50 µl P1-Phagenlysat für 50 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 5 ml LB-Medium und 10 mM Natriumcitrat versetzt und dann für 60 min aerob bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 x g zentrifugiert, einmal in LB-Medium gewaschen, auf entsprechenden Selektionsnährböden ausplattiert und 1 - 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Kolonien der Transduktanten wurden erneut in Flüssigmedium kultiviert und mittels PCR (Stamm SK2, SK4

und SKRHo60) oder durch Überprüfung des Phänotyps (SK6, Wachstumsarrest bei Zugabe von 4 mM H₂O₂ bei 30 °C) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

2.4.9 Präparation kompetenter Zellen und Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega Technical Manual, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3-0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 4500 x g und 4 °C abzentrifugiert und im halben Ausgangsvolumen kalter Lösung A [10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl] resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4500 x g und 4 °C wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B [100 mM MOPS (pH 6,5), 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl] resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in kalter Lösung B (10 % des Ausgangsvolumens) aufgenommen und direkt für die Transformation verwendet. Dazu wurden 200 µl kompetente Zellen zusammen mit 100 - 200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s bei 42 °C) wurde zu jedem Ansatz 1 ml LB-Medium gegeben und für mindestens eine Stunde aerob bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert; bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurden die Zellen zunächst bei 4500 x g zentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und dann ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.10 Plasmidkonstruktion

Zur Herstellung des Plasmids pRS*hdhA*reg3 wurde im ersten Schritt mit den Primern *hdhA*regNcoI_{sense} und *hdhA*regBamH_{las} (Tab. 2.3) das *hdhA*-Gen mit flankierenden DNA-Bereichen (jeweils ca. 280 bp) von genomischer DNA aus *E. coli* MG1655 amplifiziert. Stromabwärts des *hdhA*-Gens wurde eine natürlich vorkommende *Bam*HI-Schnittstelle für die Klonierung verwendet. Es entstand ein PCR-Produkt mit einer *Nco*I-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Bam*HI-Schnittstelle am 3'-Ende. Die aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente wurden dann mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bam*HI verdaut und in den entsprechend linearisierten pRS415-Vektor ligiert. Aus diesem wurde durch die Restriktion die Gene des *lac*-Operons entfernt. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in *E. coli* JM109. Zur Verifizierung des konstruierten Plasmids wurden ein Kontrollverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen und eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt.

2.4.11 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des „Cycle Sequencing“, welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren durch Didesoxynukleotide basiert. Die Sequenzanalyse und -auswertung erfolgte durch den Sequenzierservice der Genetikabteilung des Departments Biologie I der LMU München.

2.4.12 Markierung von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels PCR-Reaktion mit spezifischen Primern unter Benutzung von chromosomaler DNA von *E. coli* MG1655 als Template amplifiziert (siehe Tab. 2.3). DNA-Fragmente, die als Sonden für Northern-Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden standardmäßig mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP mit Hilfe des „Rediprime™ II“-Kit nach Angaben des Herstellers markiert. Dabei wurde pro Reaktion jeweils 50-100 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Die Reaktion wurde für 10 min bei 37 °C durchgeführt und durch Zugabe von 5 μl EDTA [200 μM , pH 8,0] gestoppt. Die markierte Sonde wurde anschließend mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal“-Kits nach Angaben des Herstellers von überschüssiger Radioaktivität befreit. Die Elution erfolgte in 100 μl EB-Puffer. Die markierte DNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.4.13 Isolierung von RNA

E. coli MG1655 wurde bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase in K10-Minimalmedium bei 37 °C kultiviert. Dann wurden die Kulturen aufgeteilt und eine Hälfte mit Natriumascorbat (10 mM aus einer frisch hergestellten 500 mM Stammlösung) behandelt. Nach 15 min wurden 100 μM Paraquat oder 0,4 M NaCl zugegeben. Ein Teil der Kulturen blieb unbehandelt (Kontrolle). Nach weiteren 10 min wurde RNA mittels der sauren Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Methode nach Aiba *et al.* (1981) aus jeweils 10 ml Zellkultur isoliert. Sämtliche für die RNA-Isolation benötigten Lösungen wurden mit 0,1 % (v/v) DEPC behandeltem ddH₂O in sterilen Gefäßen angesetzt. Alle Reinigungsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Kontrolle der Reinheit der RNA-Proben erfolgte visuell anhand der 16S- und 23S-rRNA Banden nach der Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.4.5) sowie spektrophotometrisch durch das Verhältnis E_{260}/E_{280} in einer 50 μl Quarzküvette mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec2100*pro*, GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Die RNA-Konzentrationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht $E_{260} = 1$ einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.4.14 Northern-Blotting und Hybridisierung

Alle im Weiteren verwendeten Lösungen wurden mit 0,1 % (v/v) DEPC behandeltem ddH₂O angesetzt. RNA-Proben (2 µg/Bestimmung) wurden für 10 min bei 68 °C in RNA-Denaturierungslösung [50 % (v/v) Formamid, 6,5 % (v/v) Formaldehyd, 1 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0)] denaturiert. Nach einem 10-minütigen Inkubationsschritt auf Eis und einer weiteren Verdünnung der Proben mit 4 Volumen 20 x SSC wurde die RNA mittels einer Vakuum Transferapparatur der Firma GE Healthcare (Uppsala, Schweden) auf eine Hybond-N-Nylonmembran transferiert. Danach wurde dreimal mit 200 µl 20 x SSC gewaschen. Die RNA-Proben wurden anschließend durch 3-minütige UV-Bestrahlung pro Seite mit der Nylonmembran quervernetzt. Danach wurde die Membran mit 7,5 ml Hybridisierungslösung {5 x SSC, 5 x Denhardt's Reagenz [0,1 % (w/v) Ficoll Type 400, 0,1 % (w/v) Polyvenylpyrrolidon, 0,1 % (w/v) BSA], 0,1 % (w/v) SDS, 1 µg Lachssperma-DNA (Fluka)} für eine Stunde bei 60 °C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP-markierte DNA-Sonde (2.4.12) wurde kurz vor der Verwendung für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte dann nach Zugabe der jeweiligen DNA-Sonde (50 µl) zur Membran in 7,5 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 60 °C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit 40 ml Waschlösung [2 x SSC; 0,1% (w/v) SDS] bei 42 °C gewaschen. Die inkubierten Membranen wurden anschließend kurz auf Filterpapier getrocknet und für mindestens 24 h unter einem „Storage Phosphor Screen“ (Molecular Dynamics, Freiburg) exponiert. Eine entsprechende Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mittels der Software ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Freiburg). Es wurden jeweils RNA-Proben aus zwei unabhängigen Probennahmen einer Doppelbestimmung unterzogen.

2.5 Biochemische und analytische Methoden

2.5.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale, elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4 % (w/v) und im Trenngel 10 -12,5 % (w/v). Die SDS-Gele wurden mit Hilfe einer Protogel-Fertiglösung [30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid] (Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf) hergestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS,

5 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 0,005 % (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Der Gellauf wurde in einer Gellaufanlage (Modell 45-1010-I, Peqlab, Erlangen) bei konstant 200 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva-Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber und Osborn (1969) detektiert, wobei die Färbelösung zur Fixierung der Proteine zusätzlich 10 % (w/v) TCA enthielt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure. Für die Auftrennung ganzer Zellen wurden abzentrifugierte Zellen aus einer Kultur mit bekannter OD_{600} in einer entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen, so dass eine Proteinkonzentration von ca. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erzielt wurde ($OD_{600} = 1$ entspricht ca. 150 μg Gesamtprotein). Davon wurden 20–30 μg pro Spur aufgetrennt. Um größere Proteinmengen auftragen zu können und um Stressreaktionen der Zellen sofort zu unterbinden, wurde das zelluläre Protein aus 1 ml Kultur durch Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 10 % (w/v) präzipitiert (10 min, 4 °C, 16100 x g) und in 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch eine eindimensionale SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (25 bzw. 30 $\mu\text{g}/\text{Probe}$) wurden mittels einer Nassblot-Apparatur Mini Trans-Blot Cell (BioRad, München) durch horizontale Elektrophorese für 2 h bei 300 mA und 4 °C auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman - Schleicher und Schuell, Dassel; Porendurchmesser 0,45 μm) transferiert (Western-Blot). Dafür wurde nach Angaben des Herstellers ein Puffer mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20 % (v/v) Methanol verwendet. Nach dem Blot wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens eine Stunde in TBS-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl] und 3 % (w/v) BSA zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Zur Detektion von TreF wurde ein polyklonales TreF-Antiserum (Dr. M. Ehrmann, Universität Duisburg) in einer Verdünnung von 1:4000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3 % (w/v) BSA inkubiert. Zur Detektion von RpoS mit einem monoklonalen Antikörper (NeoClone, Madison, USA) wurde dieser in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde gemäß dem Protokoll nach Towbin *et al.* (1979) ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-IgG Antikörper (TreF-Nachweis) oder Ziege-Anti-Maus-IgG Antikörper (RpoS-Nachweis) in einer Endkonzentration von 1:5000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3 % (w/v) BSA inkubiert. Für den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper wurde der Immunoblot durch Zugabe einer Färbe-Substratlösung [50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5), 0,01 % (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium, 0,045 % (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat] entwickelt.

Erfolgte die Detektion von RpoS mit polyklonalem RpoS-Antiserum geschah dies entsprechend Lange und Hengge-Aronis (1994). Dabei wurden 40 μg TCA-gefälltes Protein/Spur eingesetzt.

Um eine Quantifizierung der Ergebnisse zu ermöglichen wurde auf jedem Gel eine Standardprobe aufgetrennt und dem immunologischen Nachweis unterzogen. Dabei handelte es sich entweder um eine Minimalmedium-Kultur, die für 210 min mit 0,6 M NaCl behandelt wurde oder im Fall des RpoS-Nachweises um eine Probe einer stationären Kultur. Die Blots wurden mit einer Auflösung von 600 dpi gescannt und dann mithilfe des Programms ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Freiburg) ausgewertet.

2.5.3 Analyse des cytoplasmatischen Proteoms durch 2D-Gelelektrophorese

2.5.3.1 Herstellung der Zellextrakte für die Proteomanalyse

Die entsprechenden *E. coli* Stämme wurden in K10-Minimalmedium oder KML-Medium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob oder anaerob bei 37 °C kultiviert. Dann wurden die Bedingungen je nach Fragestellung verändert. Es wurden entweder 0,4 M, 0,6 M NaCl oder 0,7 M Sorbitol zugesetzt. Teilweise wurde auch Glycinbetain in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Wenn die Kulturen mit Natriumascorbat behandelt wurden, geschah dies 15 min vor Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 10 mM (500 mM Stammlösung, frisch hergestellt). 50–200 ml Probe wurden entnommen. Zur Unterbindung der weiteren Proteinsynthese wurde Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend 10 min bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert und in 50 ml Waschpuffer [100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 mg/ml Chloramphenicol] homogenisiert, erneut zentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen in Aufschlusspuffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 50 µg/ml RNase, 50 µg/ml DNase, 100 µg/ml Lysozym, 1,39 mM PMSF] aufgenommen und mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen (3 x 30 s; 30 s Pause). Verbliebene Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (10 min, 16100 x g, 4 °C) entfernt. 350 µg Gesamtprotein wurden über Nacht lyophilisiert. Es wurden jeweils Proben aus zwei unabhängigen Kulturen für die Proteomanalyse eingesetzt.

2.5.3.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

350 µg lyophilisiertes Protein wurden in 250 µl Rehydratisierungspuffer gelöst [8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 1,25 % (v/v) IPG-Puffer (pH 4 - 7 L), 28,4 mM DTT] und auf IPG-Streifen (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) (pH 4 - 7 linear, 13 cm) in der 1. Dimension aufgetrennt. Die Fokussierung erfolgte für 19650 Vh bei 20 °C (IPGphor, Amersham Biosciences). Das Programm setzte sich wie folgt zusammen: Rehydratisierung 16 h 50 V, Gradient 2 h 500 V, „Step-n-hold“ 1 h 500 V, „Step-n-hold“ 1 h 1000 V, „Step-n-hold“ 2 h 8000 V).

Für die Auftrennung im basischen pH-Bereich von pH 6-11 (entsprechende IPG-Streifen) wurde dieses Vorgehen folgendermaßen verändert. Dem Rehydratisierungspuffer wurde statt DTT 100 mM Hydroxyethyl-disulfid (HED) zugesetzt und die Konzentration des IPG-Puffers wurde auf 0,5 % (v/v) (pH 6-11) erniedrigt. Die Rehydratisierung des IPG-Streifens erfolgte ohne Protein. Das lyophilisierte Protein wurde in 15 µl Rehydratisierungspuffer gelöst und an der Anodenseite seitlich des IPG-Strips aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte für 15000 Vh.

2.5.3.3 Zweite Dimension: SDS-Page

Nach Äquilibrierung der fokussierten IPG-Streifen für 2 x 15 min bei RT in 50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerol, 4 % (w/v) SDS und 18,2 mM DTT erfolgte die Auftrennung in der 2. Dimension durch SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Dafür wurden 1 mm dicke Flachgele der Größe 16 x 20 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 7 % (w/v) und im Trenngel 13 % (w/v). Der Gellauf erfolgte in einer Hoefer SE 600 Ruby Standard Elektrophorese Einheit (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit Kühlsystem (Multi Temp III, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) über Nacht bei konstant 5 mA/Gel und 15 °C.

2.5.3.4 Coomassiefärbung nach Weber und Osborn (1969)

Die Gele wurden anschließend in Coomassielösung [40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250] für 1 h gefärbt und dann in Entfärbelösung [40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure] für 45 min entfärbt. Eine vollständige Entfärbung erfolgte in 10 % (v/v) Essigsäure.

2.5.3.5 Auswertung mit Hilfe des Programms PDQuest

Die gefärbten Gele wurden mit einem Epson Expression 1689 Pro Scanner im Transmissions-Modus mit einer Auflösung von 300 dpi gescannt. Die Auswertung der zweidimensionalen Proteinmuster erfolgte mit der Analyse-Software PDQuest V 7.3.1 (BioRad, München). Protein-Signale wurden automatisch detektiert und anschließend manuell bearbeitet. Die Gelbilder wurden durch die Verwendung der „total-density“-Methode normalisiert, um Unterschiede, die durch kleine experimentelle Variationen der aufgetrennten Proteinmenge oder der Färbungsintensität hervorgerufen wurden, zu korrigieren. Für die Berechnung der Veränderung der Signalintensitäten der Proteinspots wurden die Mittelwerte verwendet. Proteine, die bei einer der zu vergleichenden Bedingungen in mindestens 2 x größeren bzw. kleineren Mengen vorlagen, wurden aus den 2D-Gelen ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-

Massenspektroskopie (s. 2.6.2) identifiziert. Generell wurden jeweils Proben aus zwei unabhängigen Kulturen analysiert.

2.5.4 BAC/SDS-Gelelektrophorese

2.5.4.1 Zellaufschluss und Präparation von Membranen mit dem Zellaufschlussgerät

E. coli-Zellen wurden wie unter 2.5.1.1 beschrieben kultiviert, geerntet und gewaschen. Zur Herstellung der Membranen wurden die Zellen in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerol; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 50 µg/ml Dnase; 50 µg/ml Lysozym) aufgenommen und in einem Hochdruck-Zellaufschlussgerät (Constant Cell Disruption Systems, Northants, UK) bei 1,35 kbar aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch eine niedertourige Zentrifugation für 20 min bei 4500 x g und 4 °C entfernt. Anschließend wurde der Überstand bei 45000 rpm für eine Stunde zentrifugiert (Beckman Coulter Optima L90-K Ultrazentrifuge). Die Membranen wurden mit niederionigem Puffer (1mM Tris/HCl, pH 7,5; 3 mM EDTA; 0,5 mM PMSF) gewaschen und erneut für eine Stunde bei 45000 rpm zentrifugiert. Die Membranvesikel wurden in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerol] resuspendiert, so dass eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml erreicht wurde. Die Membranen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.4.2 16-BAC/SDS-PAGE

Die Auftrennung von *E. coli*-Membranproteinen erfolgte durch zweidimensionale 16-BAC/SDS-PAGE. Die erste Dimension beinhaltete eine elektrophoretische Auftrennung der Proben hinsichtlich ihres Molekulargewichtes über 16-BAC-PAGE nach der von Macfarlane (1989) beschriebenen und von Hartinger (1996) modifizierten Methode. Für die Auftrennung der Membranproteine über 16-BAC-PAGE wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 16 x 20 cm verwendet. In Tab. 2.4 ist die Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels aufgeführt.

Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von H₂O₂ gestartet. Die Polymerisationszeit des Trenngels wurde auf acht Stunden festgesetzt, die des Sammelgels war nach 20 min abgeschlossen. Um eine Austrocknung des Trenngels zu verhindern, und um eine gerade Gelfront zu erhalten, wurde es mit 75 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 2,1) überschichtet. 16-BAC wurde vor dem Gebrauch bei 60 °C gelöst.

Tab. 2.4: Zusammensetzung der 16-BAC/SDS-PAGE

	7,5% Trenngel	4% Sammelgel
Harnstoff	5,4 g	1 g
Acrylamid/ <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamidlösung	7,5 ml	1,33 ml
300 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1	7,5 ml	-
0,5 M Kaliumphosphatpuffer pH 4,1	-	2,5 ml
ddH ₂ O	7,5 ml	3 ml
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid [1,7% (w/v)]	1,05 ml	1,39 ml
80 mM Ascorbinsäure (frisch)	1,5 ml	0,5 ml
5 mM Eisensulfat (frisch)	48 µl	8,5 µl
250 mM 16-BAC	300 µl	70 µl
H ₂ O ₂ 1:1200 Verdünnung einer 30%igen Stammlösung (frisch)	960 µl	-
H ₂ O ₂ 1:750 Verdünnung einer 30%igen Stammlösung (frisch)	-	500 µl

Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit frisch hergestelltem, zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt (Tab. 2.5). Hierfür wurden Harnstoff, 16-BAC, Glycerol und ddH₂O vorsichtig bis zur Lösung aller Komponenten in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von Dithiothreitol und Pyronin-Y-Lösung wurde ein Endvolumen von 2 ml mit ddH₂O eingestellt. Der Puffer wurde bis zum Gebrauch bei 60 °C gelagert.

Tab. 2.5 : Zusammensetzung des 2 x Auftragspuffers für 16-BAC-PAGE

Harnstoff	0,9 g
16-BAC	0,2 g
ddH ₂ O	0,8 ml
Glycerol	0,2 ml
1,5 M DTT	100 µl
5% (w/v) Pyronin-Y-Lösung	20 µl
ad 2 ml ddH ₂ O	

Nachdem die Proteinproben mit dem Puffer versetzt waren, wurden sie 5 min bei 60 °C inkubiert. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer (2,5 mM 16-BAC; 150 mM Glycerol; 50 mM Phosphorsäure) gespült und im Anschluss mit den Proteinproben beladen, wobei jeweils eine Spur zwischen den einzelnen Proben freigelassen wurde. Der Gellauf wurde in einer SE-400 Gelkammer (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) im Kühlraum bei konstant 12 mA in Richtung Kathode für 16 Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel 3 x 20 min in Fixierungslösung (35 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert und für 30 min in 0,15 % (w/v) Coomassie blue R-250 (in Fixierungslösung) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für 30 min in der Fixierungslösung. Im Anschluss wurde das Gel für die SDS-PAGE 3 x 10 min in 100 mM Tris/HCl pH 6,8 reäquilibriert und sofort weiterverwertet.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Es wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 16 x 20 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Trenngel 10 % (w/v), im Sammelgel 4 % (w/v). Das 16-BAC-Gel der ersten Dimension wurde in Streifen geschnitten. Ein BAC-Gelstreifen wurde luftblasenfrei auf eine 16 x 20 cm Glasplatte gelegt (ca. 2,0 cm vom oberen Rand und je 4,0 cm vom rechten und linken Rand entfernt) und vorsichtig mit der zweiten Glasplatte bedeckt. Das Trenngel wurde dann am Gelstreifen vorbei gegossen und zur Polymerisierung mit Isopropanol bedeckt. Nachdem das Isopropanol durch Waschen mit Ethanol und ddH₂O entfernt worden war, wurde das Sammelgel luftblasenfrei unter die 16-BAC-Gelstreifen gegossen. Die BAC-Gelstreifen wurden mit 3 x Laemmli-Puffer (150 mM Tris/HCl pH 6,8, 30 % (v/v) Glycerol, 6 % (w/v) SDS, 300 mM DTT und 0,3 % (w/v) Bromphenolblau) überschichtet und für 10 min inkubiert. Der Gellauf erfolgte in einer Hoefer SE 600 Ruby Standard Elektrophorese Einheit (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit Kühlsystem (Multi Temp III, Pharmacia Biotech) bei 15 °C und 4 mA/Gel über Nacht. Im Anschluss wurde die Stromstärke auf 20 mA/Gel erhöht bis die zweite Farbfront das Trenngelende erreicht hatte. Die Färbung und Auswertung der Gele erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.5.5 Proteinbestimmungen

2.5.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Wenn angegeben, wurden Proteinbestimmungen mittels der Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (AppliChem, Darmstadt) verwendet.

2.5.5.2 Proteinbestimmung nach Peterson

Standardmäßig wurden Proteinbestimmungen in Abwandlung des Protokolls von Lowry *et al.* (1951) nach Peterson *et al.* (1977) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (AppliChem, Darmstadt) verwendet.

2.5.6 Bestimmung der Osmolalität von LB- und K10-Medium

Die Osmolalität von LB- und K10-Medium nach Zugabe verschiedener NaCl-Konzentrationen wurde im Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.5.7 Analyse von Proteininteraktionen in vivo

2.5.7.1 Quervernetzung mit Formaldehyd

E. coli MG1655 wurde in 1 l K10-Medium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden entweder 0,8 M NaCl zugegeben oder die Kultur blieb unbehandelt (Kontrolle). Nach weiterer Inkubation für 3 min wurde zur Fixierung 1 % (w/v) Formaldehyd aus einer konzentrierten Stammlösung [37 % (w/v)] zugegeben. Nach einstündiger Fixierung wurden die Zellen für 10 min bei 6500 x g und 4 °C vom Medium getrennt und einmal in K10-Minimalmedium gewaschen.

2.5.7.2 Zellaufschluss

Die Zellen aus 2.5.7.1 wurden in 1,2 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 50 µg/ml DNase, 100 µg/ml Lysozym, 1,39 mM PMSF) resuspendiert und durch Ultraschall auf Eis aufgeschlossen (3 x 30 s, 30 s Pause). Verbliebene Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (10 min, 16100 x g, 4 °C) entfernt. Dann erfolgte eine Abtrennung der Membranen und großen Komplexe durch Ultrazentrifugation (30 min, 70000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde nach einer Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.5.1) in der Gelfiltration eingesetzt.

2.5.7.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer AKTA-Prime-Apparatur (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Es wurde eine XK16/100-Säule verwendet, die mit Sephacryl S-400 Material (Trennbereich 10-5000 kDa) gepackt war. Als Laufmittel diente folgender Puffer (entgast und filtriert): 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl. Die Laufgeschwindigkeit wurde auf 1 ml/min festgelegt und 10 ml Fraktionen gesammelt. Die Äquilibration erfolgte mit 3 Säulenvolumen Laufpuffer. Es wurden 30 mg Protein mit Laufpuffer auf 2 ml Volumen verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Der Lauf wurde durch Messung der Extinktion des Eluats bei 280 nm verfolgt.

2.5.7.4 Analyse der Fraktionen

Zuerst wurde der Proteingehalt der gesammelten Fraktionen bestimmt (2.5.5.1). Je Fraktion wurden einmal 50 µg lyophilisiertes Protein mit SDS-Probenpuffer versetzt (s. 2.5.1) und ohne weitere Behandlung auf einem 7,5 %igen SDS-Gel (2.5.1) in einer Hoefer SE 600 Ruby

Standard Elektrophorese Einheit (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) im Kühlraum aufgetrennt, und einmal 50 µg lyophilisiertes Protein mit Probenpuffer versetzt, 5 min auf 98 °C erhitzt und dann auf einem 12,5 %igen SDS-Gel analysiert. Die Färbung der Proteine erfolgte wie unter 2.5.3.4 beschrieben. Die Proteinzusammensetzung der entsprechenden Fraktionen gestresster und nicht gestresster Zellen wurde verglichen, in unterschiedlichen Mengen vorhandene Proteine ausgeschnitten und durch MALDI-TOF-MS (s. 2.6.2) identifiziert. Das komplette Experiment wurde, ausgehend von der Zellkultivierung, zweimal durchgeführt und nur reproduzierbare Veränderungen in den Proteinmustern weiter verfolgt.

2.5.8 In vivo-Radikalmessung

Die Radikalbildung in lebenden Zellen wurde unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes CM-H₂DCFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester, Molecular Probes) bestimmt. Zellen der exponentiellen Wachstumsphase wurden dazu in vorgewärmtem K10-Minimalmedium auf eine OD₆₀₀=0,025 verdünnt und mit CM-H₂DCFDA (10 µM einer frisch hergestellten 1 mM Stammlösung in Ethanol) für 1 h im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Wenn angegeben wurde Natriumascorbat in einer Konzentration von 10 mM aus einer frisch hergestellten Stammlösung (500 mM) 15 min vor der Messung zugegeben. Die Veränderungen der Fluoreszenz wurden in 1 ml Küvetten unter Rühren oder in 400 µl Küvetten jeweils bei 37 °C in einem Spektrofluorimeter (Fluoro-Max-3, Horibe Jobin Yvon) gemessen. Die Excitation fand bei 502 nm statt. Die Emission wurde bei 525 nm gemessen. Nach der Messung wurde eine Probe aus der Küvette entnommen, Verdünnungsreihen in isoosmotischem Minimalmedium ohne Glukose erstellt und die Zahl der lebenden Zellen nach Ausplattieren auf LB-Agarplatten bestimmt.

Um die Unterschiede in aerob und anaerob kultivierten Zellen zu ermitteln, wurden die Kulturen während des Markierungsschrittes in Schikanekolben geschüttelt oder ohne Schütteln in komplett gefüllten 2 ml-Reaktionsgefäßen inkubiert.

Alle Messungen wurden mit mindestens 3 unabhängigen Kulturen durchgeführt.

2.5.9 Bestimmung des intrazellulären Trehalosegehaltes

2.5.9.1 Trehalase-Präparation

Die Trehalase, die in der Nachweisreaktion (2.5.9.2) verwendet wurde, war eine teilweise gereinigte Präparation von TreA aus *E. coli*. Dazu wurde ein periplasmatischer Extrakt des *E.*

coli Stammes CS12, dem mehrere aktive Formen von Dextrin-spaltenden Enzymen fehlen (Prinz *et al.*, 1996) und der ein Plasmid enthielt, das das Gen *treA* beinhaltet (ptre11), durch kalten osmotischen Schock (Nossal und Heppel, 1966) hergestellt. Die Proteinzusammensetzung dieser Präparation wurde mittels SDS-PAGE untersucht, wobei eine deutliche Anreicherung eines Proteins der entsprechenden Größe von TreA in der Periplasmafraktion erkennbar war. Die Periplasmafraktion wurde aliquotiert, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde das lyophilisierte Protein in 100 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

2.5.9.2 Trehalosenachweis

Der Trehalosegehalt von Zellen wurde wie beschrieben bestimmt (Kandror *et al.*, 2002). Die entnommenen Proben (1 ml Kultur) wurden zentrifugiert (5 min, 16100 x g, 4 °C), in isoosmotischem Medium ohne Glukose gewaschen, und dann in 250 µl eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Hydrolyse der Trehalose durch die endogene Trehalase zu verhindern. Trehalose wurde durch Kochen der Zellsuspension (20 min, 95 °C) extrahiert. Dann wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 16100 x g, 4 °C) entfernt. Die weitere Trehalosebestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: 10-40 µl Überstand, 5 µl 1 M Natriumphosphat-Puffer pH 6 ad 50 µl ddH₂O. Es wurden jeweils 4 Bestimmungen pro Probe durchgeführt, wobei der Hälfte der Ansätze 1 µl der TreA-Präparation zugesetzt wurde. Die anderen Ansätze dienten zur Bestimmung des Glukose-Hintergrundes. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurde die entstandene Glukose unter Verwendung des Glukose-Assay-Kits (Sigma) nach Herstellerangaben bestimmt (Endvolumen 250 µl). Die Messung erfolgte in einem TECAN Sunrise-Reader bei 450 nm. Der ermittelte Hintergrundwert, der der freien Glukose entspricht, wurde von den Extinktionswerten subtrahiert und die Trehalosemenge durch eine auf gleiche Weise erhaltene Eichgerade ermittelt. Die Ergebnisse wurden auf die parallel bestimmte Proteinkonzentration (2.5.5.2) bezogen.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehalts

Proben (1 ml) wurden aus wachsenden Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, und die Zellen wurden durch Zentrifugation durch Silikonöl (DC550, Serva, Heidelberg) für 30 s

vom Medium getrennt. Der Aufbereitung der Zellen erfolgte wie beschrieben (Bossemeyer *et al.*, 1989). K wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie (Varia AA240, Varian, Inc. Spectroscopy Instruments) analysiert.

2.6.2 MALDI-TOF

Proteine wurden durch MALDI-TOF-Analyse („Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight“) identifiziert. Hierfür wurden die Proteine manuell mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus den Gelen ausgestochen oder mit einem Skalpell ausgeschnitten und 4 x 30 min bei 37 °C unter Schütteln mit ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Gelstücke 2 x 15 min in 50 % (v/v) Acetonitril bei 37 °C inkubiert und über Nacht bei 37 °C in 40 mM Ammonium-Bicarbonat mit Trypsin (Promega, Mannheim) verdaut. Nach dem Entsalzen der Proben über eine ZipTip μ -C18-Säule (Millipore, Eschborn) wurden die Peptide mit 1 μ l Matrix [gesättigte Lösung von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,6 % (v/v) Trifluoressigsäure] direkt auf die Probenplatte eluiert. Die Messung erfolgte im MALDI-TOF-System (Voyager DE STR, Applied Biosystems, Foster City, USA) im reversen Modus im Bereich von 700-3500 Da. Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf bekannte Massen der Autolysepeptide von Trypsin. Die Identifikation der Proteine erfolgte mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Eine Übersicht der Suchergebnisdaten aller in dieser Arbeit identifizierten Proteine findet sich im Anhang.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen im Proteom von *E. coli* bei Kultivierung in Minimalmedium

Es existieren globale Analysen zum Verlauf der Osmoadaptation von *E. coli* auf Transkriptions- und Translationsebene. Allerdings wurden die Proteomstudien nur zu sehr späten Zeitpunkten nach Setzen des osmotischen Stresses durchgeführt und die meisten Proteine blieben unidentifiziert (Botsford 1990; Clark and Parker 1984; Gutierrez *et al.*, 1987; Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Weber und Jung, 2002). Um diese Daten zu vervollständigen und neue Komponenten der Osmoadaptation zu finden, sowie auch bis jetzt unbekannte regulatorische Muster zu erkennen, wurden zeitabhängige Proteomanalysen nach einem osmotischen Stress unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Auch die Art des Stresses wurde variiert. Begonnen wurde mit einer Analyse der Veränderungen unter aeroben Bedingungen bei Wachstum in Minimalmedium. Um den zeitlichen Verlauf zu verdeutlichen, wurden Proben in einem Zeitraum von 1 h genommen. Die Experimente wurden in einem Fermenter durchgeführt, da auf diese Weise alle anderen äußeren Bedingungen, wie Sauerstoffversorgung, pH-Wert und Temperatur konstant gehalten werden konnten. Die Ergebnisse sind in Weber *et al.*, 2007 veröffentlicht.

3.1.1 Proteomveränderungen während der osmotischen Stressadaptation unter aeroben Bedingungen

Osmotischer Stress kann sowohl durch ungeladene Substanzen als auch durch Salze verursacht werden. Wird die extrazelluläre Osmolalität durch Zugabe von Salz erhöht, spricht man zur Unterscheidung von Salzstress. Um zu untersuchen, ob Salzstress andere Reaktionen in der Zelle hervorruft, als reiner osmotischer Stress, wurden isoosmolale Mengen Sorbitol (0,7 M) und NaCl (0,4 M) zu einer exponentiell wachsenden Kultur gegeben, Proben vor Zugabe, 10, 30 und 60 min danach entnommen, aufbereitet und zweidimensional aufgetrennt. Wie in der aufgenommenen Wachstumskurve deutlich wird, wurde die Wachstumsrate durch die Erhöhung der Osmolalität kaum vermindert (exemplarisch gezeigt für NaCl-Zugabe, Abb. 3.1). Man kann davon ausgehen, dass die beobachteten Veränderungen auf Proteomebene hauptsächlich auf den osmotischen Stress und nur in sehr geringem Umfang auf die Reduktion der Wachstumsrate zurückzuführen sind.

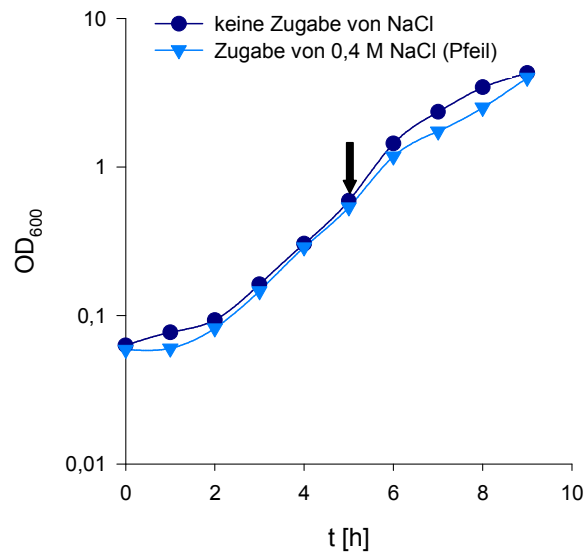


Abb. 3.1: Aerobes Wachstum von *E. coli* MG1655 in Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose]. *E. coli* MG1655 wurde aerob in K10-Minimalmedium im 5 l-Fermenter kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (Pfeil). Die Kontrollkultur blieb unbehandelt. Die Probenahme zur Proteomanalyse erfolgte in den ersten 60 min nach Setzen des Stresses. Das Wachstum wurde durch Messen der OD₆₀₀ verfolgt.

Der überwiegende Teil der aufgetrennten Proteine zeigte keine gravierenden Mengenveränderungen im Verlauf der Untersuchungen (Abb. 3.2). Die Menge des größten Teils der Proteine blieb nach Zugabe von NaCl oder Sorbitol konstant. Mit dem verwendeten Gelsystem wurden etwa 600 Proteine in einem pH Bereich von 4 bis 6,5 und mit einem Molekulargewicht von 5 bis 100 kDa aufgetrennt. Man kann annehmen, dass durch die Limitationen der Methode die Anzahl der aufgetrennten membranintegrierten oder membrangebunden Proteine sehr klein ist. Es wurde festgelegt, dass Proteine osmoreguliert sind, wenn die quantifizierte Menge mindestens zweifach höher war, als die in der unbehandelten Kontrollkultur und wenn ein kontinuierlicher Regulationstrend im gesamten Zeitverlauf zu erkennen war.

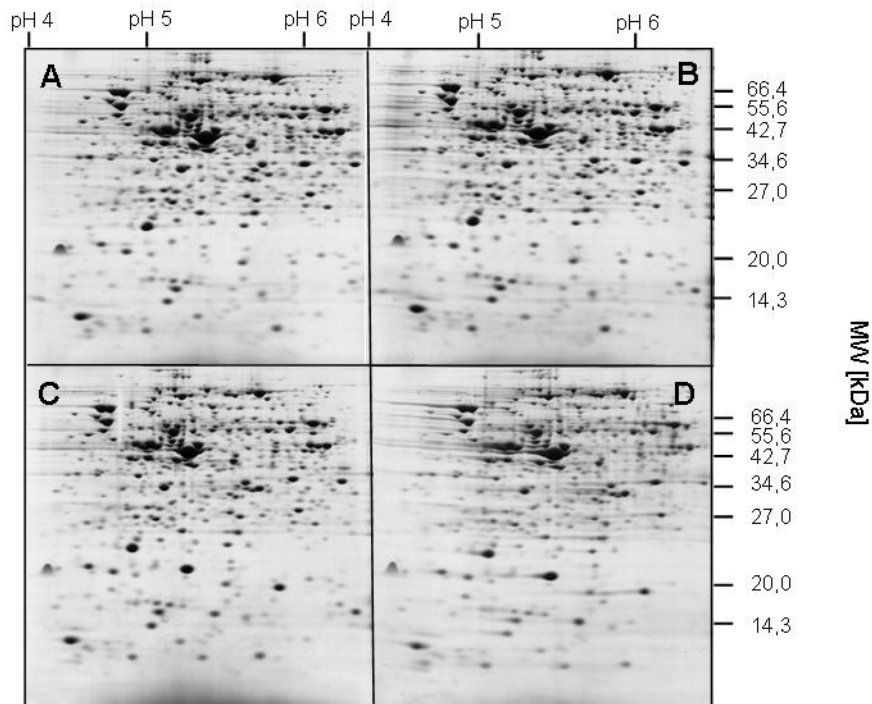


Abb. 3.2: Veränderungen im Proteom von *E. coli* MG1655 nach Zugabe von 0,4 M NaCl (Minimalmedium/aerob). *E. coli* MG1655 wurde aerob in K10-Minimalmedium im 5 l-Fermenter kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben. Direkt vor Zugabe des Salzes (A), 10 min (B), 30 min (C) und 60 min (D) nach Zugabe wurden Proben entnommen, Zellextrakt präpariert und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht.

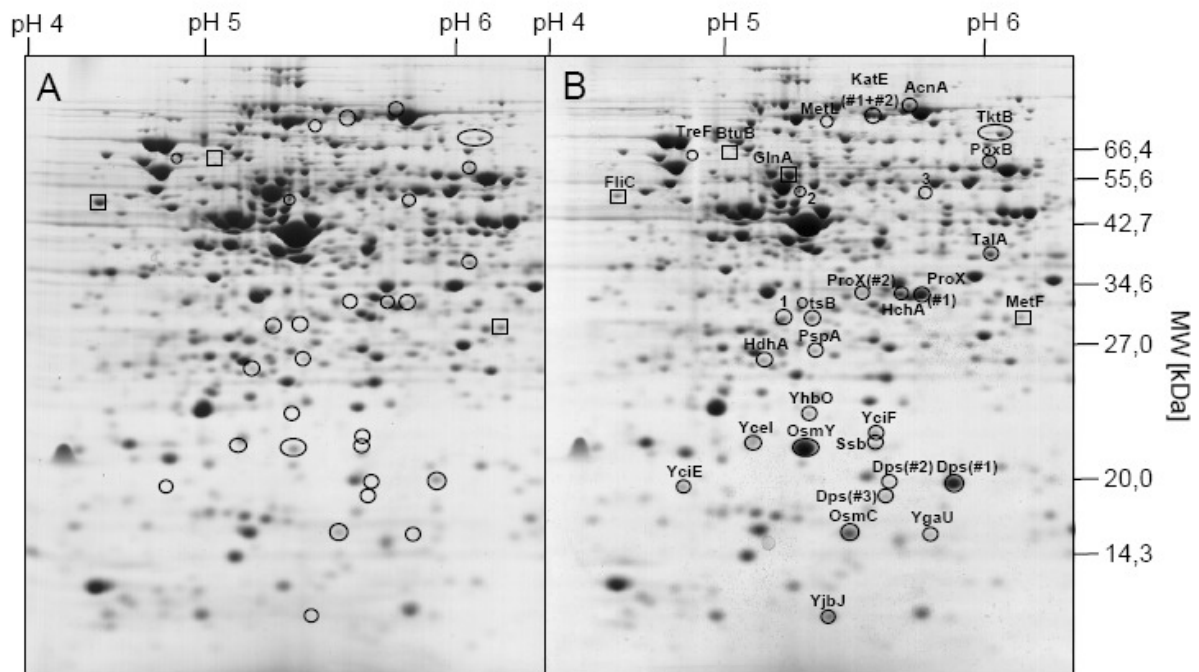


Abb. 3.3: Proteom von *E. coli* MG1655 vor (A) und 30 min (B) nach Zugabe von 0,4 M NaCl unter aeroben Bedingungen bei Kultivierung in Minimalmedium. Zellextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine, deren Menge sich mindestens zweifach veränderte, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Proteine mit erhöhten Mengen nach Salzstress sind durch Kreise gekennzeichnet, Proteine mit erniedrigter Menge durch Quadrate. Proteingemische sind nummeriert. Isoformen werden durch Nummerierung (#) unterschieden.

Es wurden zwölf Proteine nachgewiesen, die unter beiden Bedingungen, osmotischer Stress (0,7 M Sorbitol) und Salzstress (0,4 M NaCl), in erhöhten Mengen vorlagen (Tab. 3.1, Abb. 3.3). Die Identifikation dieser Proteine durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte, dass es sich um die bekannten, osmotisch regulierten Proteine OsmY und OsmC, die Stressproteine Dps und PspA, das Chaperon (Hsp31) HchA und ProX, das periplasmatische Bindeprotein des ABC-Transporters ProU für Glycinbetain handelte. Weiterhin wurden die α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase HdhA, der Initiationsfaktor InfB, die Hydroxyperoxidase KatE, die cytoplasmatische Trehalase TreF, die Transaldolase A (TalA) und Transketolase B (TktB) identifiziert. Vom Großteil dieser Proteine ist bekannt, dass sie auf transkriptioneller Ebene direkt oder indirekt durch den Stress- δ -Faktor RpoS reguliert werden. Die Menge der oben genannten Proteine vervielfachte sich in einem Bereich von 2-20-fach im Vergleich zu den Proben der nicht gestressten Kontrollkulturen. Die Veränderungen der Proteinmengen waren bei osmotischem Stress und Salzstress vergleichbar (Tab. 3.1).

Tab. 3.1. Akkumulierte Proteine bei osmotischem und Salzstress unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Protein	Beschreibung	Ratio mittlerer Signalintensitäten (gestresste Zellen/nicht gestresste Zellen)			Regulation auf Transkriptionsebene ^{1,2}
		Aerobes Wachstum		Anaerobes Wachstum	
		+ 0,4 M NaCl	+ 0,7 M Sorbitol	+ 0,4 M NaCl	
OsmY	Periplasmatisches Protein	16,6 \pm 2,9	4,6 \pm 0,6	5,6 \pm 2,0	RpoS(+), Lrp(-), Crp(-), IHF(-)
OsmC	Osmotisch induzierbare Peroxidase	13,0 \pm 0,7	15,9 \pm 2,0	3,1 \pm 0,3	RpoS(+), Lrp(+/-), RcsB(+), NhaR(+)
Dps(#3) ³	DNA-bindendes Protein mit einer Ferritin-ähnlichen Domäne	6,6 \pm 1,6	2,7 \pm 0,4	2,9 \pm 0,1	RpoS(+), OxyR(+), IHF(+)
PspA	„Phage shock“ Protein A	3,3 \pm 0,5	2,4 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	PspF(+), IHF(+)
HchA	Hsp31	10,9 \pm 1,1	6,4 \pm 3,5	3,1 \pm 0,1	<i>RpoS</i> (+)
ProX(#1) ³	Periplasmatisches Glycinbetain-Bindeprotein	9,3 \pm 0,1	10,0 \pm 0,4	15,6 \pm 1,4	H-NS(-)
HdhA	α -Hydroxysteroid- Dehydrogenase, NAD-abhängig	5,3 \pm 1,4	3,3 \pm 1,3	3,2 \pm 1,0	<i>RpoS</i> (+)
InfB	Initiationsfaktor IF-2	2,8 \pm 0,1	2,9 \pm 0,5	3,7 \pm 0,1	Fis(+), CRP(-), ArgR(-)
KatE	Hydroxyperoxidase II	4,0 \pm 1,7	3,8 \pm 2,0	0,6 \pm 0,1	RpoS(+), Lrp(+)
TreF	Cytoplasmatische Trehalase	20,3 \pm 2,1	25,3 \pm 0,9	1,0 \pm 0,1	<i>RpoS</i> (+)
TalA	Transaldolase A	3,5 \pm 0,5	2,1 \pm 0,4	1,5 \pm 0,3	RpoS(+), CreBC(+), <i>FNR</i> (-), <i>ArcA</i> (-)
TktB	Transketolase II	4,1 \pm 0,6	6,8 \pm 1,9	1,1 \pm 0,1	<i>RpoS</i> (+)

¹(Keseler *et al.*, 2005; Somalinga *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005)

² kursiv: indirekte Regulation

³ Isoformen wurden durch Nummerierung unterschieden

Bei Salzstress war zu beobachten, dass zusätzlich zu diesen 12 Proteinen, weitere 17 Proteine in den Zellen akkumulierten (Abb. 3.3, Tab. 3.2). Dies war bei osmotischem Stress, ausgelöst durch die ungeladene Substanz Sorbitol, nicht der Fall. Es handelte sich hierbei um die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase OtsB, das DNA-Einzelstrang-bindende Protein Ssb, die Aspartatkinase MetL, die Aconitat-Hydratase I AcnA und die Pyruvat-Dehydrogenase/Oxidase PoxB. Bei den weiteren identifizierten Proteinen handelte es sich um Gemische (s. Tab. 3.2) und um die Proteine unbekannter Funktion YciE, YciF, YjbJ, YgaU, Ycel und YhbO. Während YciE, YciF, YjbJ, Ycel und YjbJ in ungestressten Zellen kaum nachzuweisen waren und sich deshalb um bis zum 380-fachen der Menge unterschieden, zeigten die anderen Proteine eine um das 3-36-fache erhöhte Menge nach 60-minütigem Salzstress.

Tab. 3.2: Zusätzlich akkumulierte Proteine bei Salzstress (0,4 M NaCl) (0,95 osmol/kg) unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Protein	Beschreibung	Ratio mittlerer Signalintensitäten (gestresste Zellen/nicht gestresste Zellen)		Regulation auf Transkriptionsebene ^{1,2}
		Aerobes Wachstum	Anaerobes Wachstum	
		+ 0.4 M NaCl	+ 0.4 M NaCl	
OtsB	Trehalose-6-phosphat-Phosphatase	4,5±0,8	2,3±0,4	RpoS(+), Lrp(+)
Ssb	Einzelstrang-bindendes Protein	36,0±7,0	1,0±0,3	LexA(-)
MetL	Aspartokinase und Homoserin-Dehydrogenase II	14,7±2,1	1,0±0,2	MetJ(-)
AcnA	Aconitat-Hydratase I	4,0±0,4	1,4±0,4	FNR(-), ArcA(-), CRP(+)
PoxB	Pyruvat-Dehydrogenase/oxidase	2,8±0,3	1,1±0,4	RpoS(+), SoxS(+), MarA(+)
YciE	Konserviertes Protein	220,4±58,2	100,2±28,7	n. b. ³
YciF	Konserviertes Protein	166,4±21,4	71,7±30,7	RpoS(+)
YjbJ	Protein unbekannter Funktion	380,5±28,2	270,6±25,9	RpoS(+)
YgaU	Konserviertes hypothetisches Protein	3,4±0,3	2,8±0,2	RpoS(+), Lrp(+)
Ycel	Periplasmatisches Protein, wahrscheinlich sekretiert	184,7±73,1	110,7±32,2	n. b.
YhbO	Putative intrazelluläre Proteinase	101,7±10,5	1,8±0,0	RpoS(+)
1:⁴ MinD/OtsB	“Septum side-determining“-Protein/ Trehalose-6-phosphat-Phosphatase	2,7±0,5	1,0±0,1	n. b./ RpoS(+), Lrp(+)
2:⁴ RfaE/GadA/ GadB	Putative Kinase/Glutamat Decarboxylase A und B	3,3±0,9	1,0±0,2	n. b. /GadW(-), HNS(-), CRP(-), GadX(+), GadE(+)/(GadW(-), GadX(+))
3:⁴ HflX/GorA	Putative Kinase, möglicher Regulator der HflKC/Glutathion-Reduktase	17,3±2,5	1,0±0,1	n. b. / n. b.
AhpC	Alkylhydroperoxid- Reduktase	1,4±0,8	3,7±0,6	MetJ(-), OxyR(+)
OmpC	Porin C der äußeren Membran	n. n. ⁵	2,8±0,8	Lrp(-), EnvZ(+), OmpR(+)
4:⁴ HemL/FruB	Glutamat-1-semialdehyd- Aminotransferase/PTS System, Fructose-spezifische IIA/FP Komponente	1,9±0,5	2,2±0,3	n. b. /FruR(-)

¹(Keseler *et al.*, 2005; Somalinga *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005)

² kursiv: indirekte Regulation

³nicht bekannt

⁴Proteingemisch

⁵ nicht nachgewiesen

Eine Verminderung der Proteinmenge im untersuchten Zeitverlauf war nur für wenige Proteine zu beobachten. Dazu zählten GlnA, eine Glutaminsynthetase, MetF, eine 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase, die Flagellin-Untereinheit FlhC und BtuB, ein Rezeptor für den Transport von Vitamin B₁₂, der in der äußeren Membran lokalisiert ist.

3.1.2 Proteomveränderungen während der Salzstressadaptation unter anaeroben Bedingungen

Analoge Untersuchungen wie oben beschrieben wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Anaerobe Bedingungen sind eine typische Eigenschaft des Gastrointestinaltrakts, in dem *E. coli* auf hyperosmotischen Stress trifft. Auch in Abwesenheit von Sauerstoff zeigten sich kaum Unterschiede im Wachstumsverlauf einer gestressten im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur (Abb. 3.4).

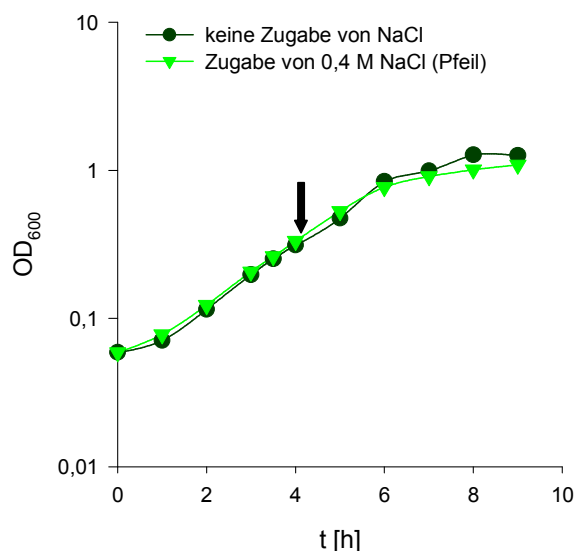


Abb. 3.4: Anaerobes Wachstum von *E. coli* MG1655 in Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose]. *E. coli* MG1655 wurde anaerob in K10-Minimalmedium im 5 l-Fermenter kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (Pfeil). Die Kontrollkultur blieb unbehandelt. Die Probenahme zur Proteomanalyse erfolgte in den ersten 60 min nach Setzen des Stresses. Das Wachstum wurde durch Messen der OD₆₀₀ verfolgt.

Unter anaeroben Bedingungen wurden nur die Proteomveränderungen bei Zugabe von Salz als osmotischem Agens untersucht, da unter aeroben Bedingungen NaCl-Stress eine ausgeprägtere Wirkung zeigte als Zugabe von isoosmolaren Mengen an Sorbitol.

Für folgende Proteine wurde sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Sauerstoff eine Akkumulation nach Zugabe von 0,4 M NaCl beobachtet: OsmY, OsmC, Dps (Isoform 3), HchA, ProX (Isoform 1 und 2), HdhA, InfB, YciE, YciF, YjbJ, YgaU, Ycel und OtsB (Tab. 3.1 und Tab. 3.2, Abb. 3.5). Bei 11 Proteinen und den 3 Proteingemischen, die unter aeroben Bedingungen

bei Salzstress akkumulierten, war dies unter anaeroben Bedingungen nicht der Fall: PspA, KatE, TreF, TalA, TktB, AcnA, PoxB, MetL, YhbO, Ssb und Dps (Isoform 2). Gleichzeitig wurden zwei Proteine und ein Proteingemisch identifiziert, die nur unter anaeroben Bedingungen hochreguliert waren. Dabei handelte es sich um die Alkylhydroperoxidase AhpC und ein Porin der äußeren Membran, OmpC, sowie um ein Gemisch aus den metabolischen Enzymen HemL (Glutamat-1-semialdehyd Aminotransferase) und FruB, eine Komponente des Fruktose-Phosphotransferase-Systems.

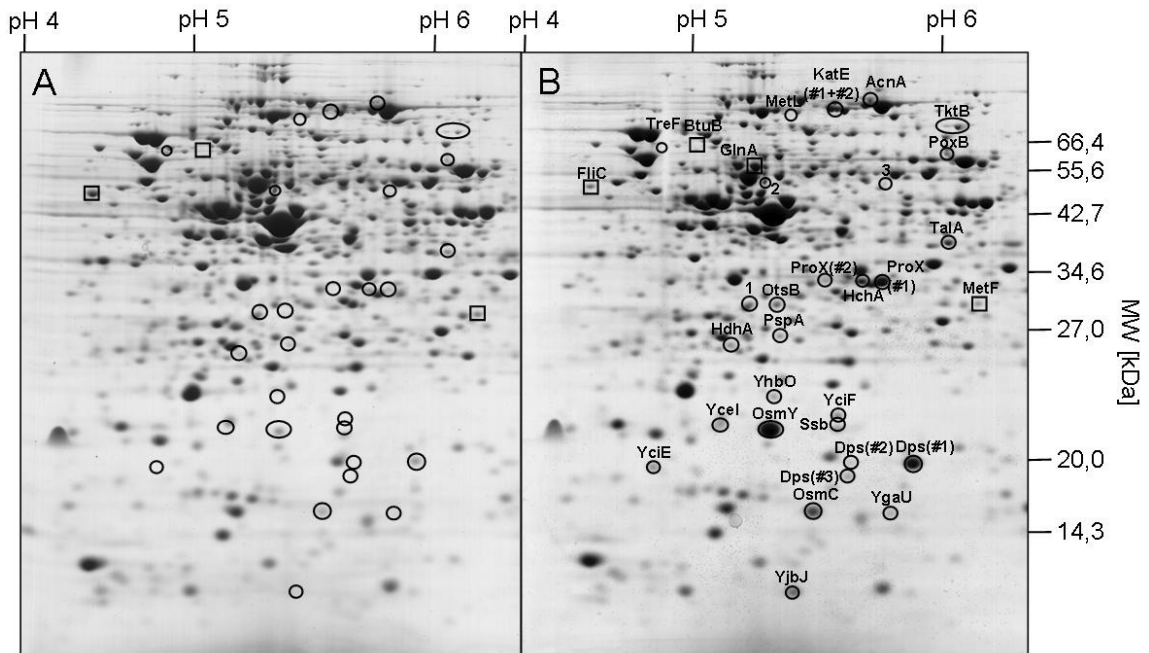


Abb. 3.5: Proteom von *E. coli* MG1655 vor (A) und 60 min (B) nach Zugabe von 0,4 M NaCl unter anaeroben Bedingungen bei Kultivierung in Minimalmedium. Zellextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine deren Menge sich mindestens zweifach verändert hat, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Proteine mit erhöhten Mengen nach Salzstress sind durch Kreise gekennzeichnet, Proteine mit erniedrigter Menge durch Quadrate. Proteingemische sind nummeriert. Isoformen werden durch Nummerierung (#) unterschieden.

Nur bei wenigen Proteinen verringerte sich die Menge nach Salzstress unter anaeroben Bedingungen. Dazu zählten wie auch unter aeroben Bedingungen GlnA, eine Glutaminsynthetase und die nur unter anaeroben Bedingungen identifizierten Proteine GlnS, eine Glutaminyl-tRNA-Synthetase, OppA, das Bindepotein eines Transporters für Oligopeptide, FbaA, eine Fruktose-bisphosphat-aldolase (Klasse II) und RpsA, das Protein S1 der ribosomalen 30S-Untereinheit.

3.1.3 Zeitlicher Verlauf der Stressantwort

Neben der Identifizierung der verändert vorhandenen Proteine, konnte für jedes Protein die zeitabhängige Mengenveränderung verfolgt werden. Exemplarisch sind die Ergebnisse mit den entsprechenden Gelausschnitten für das periplasmatische Protein OsmY in Abb. 3.6 dargestellt. Unter aeroben Bedingungen stieg die Menge an OsmY zwischen 10 und 30 min nach Zugabe von NaCl oder Sorbitol an. Nach 60 min war in den Zellen, die Salzstress ausgesetzt waren, die Menge im Vergleich zu nicht gestressten Zellen um etwa das 16-fache erhöht. Wenn Sorbitol zur Erhöhung der Osmolalität eingesetzt wurde, war die Zunahme weniger stark ausgeprägt (5-fach). Wenn kein osmotischer Stress vorhanden war, konnten keine Veränderungen der OsmY-Menge beobachtet werden. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen stieg die OsmY-Menge nach Zugabe von NaCl ebenfalls an, aber weniger stark als in aerob kultivierten Zellen. Unter allen untersuchten Bedingungen erreichte die OsmY-Menge nach 30 min ein Plateau, das im weiteren Zeitverlauf aufrechterhalten wurde.

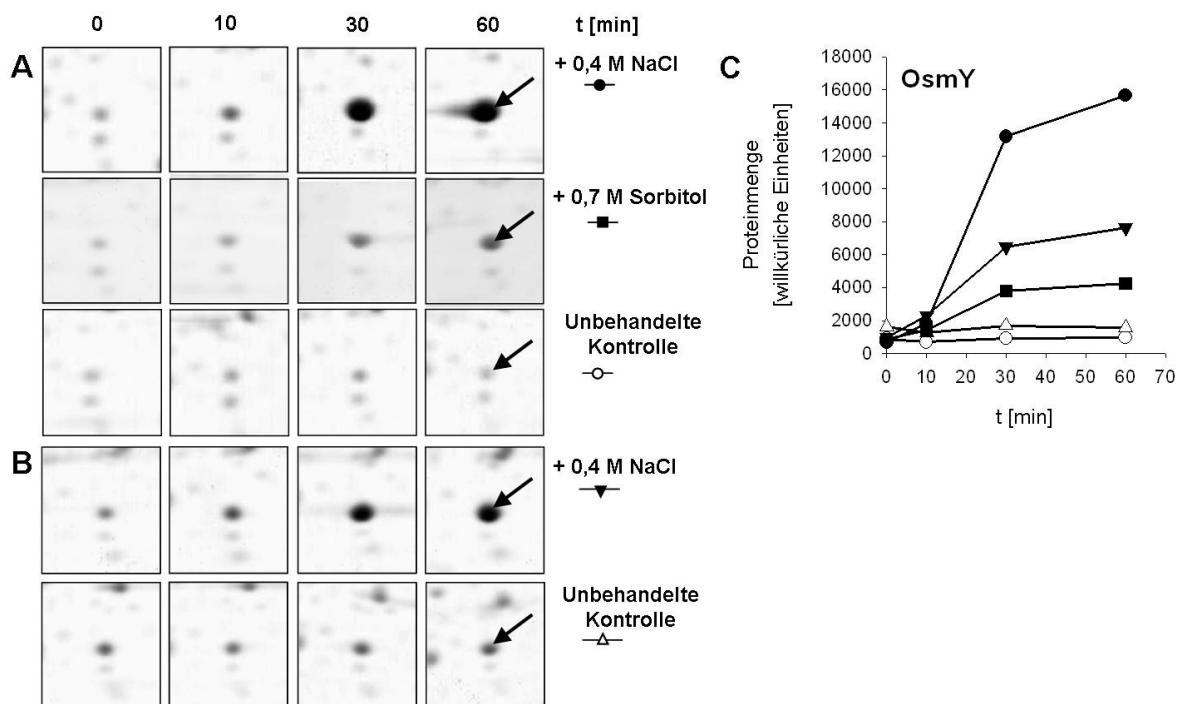


Abb. 3.6: Die zeitabhängige Akkumulation des periplasmatischen Proteins OsmY nach osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 wurde in einem Fermenter in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Vor Zugabe (0), 10, 30 und 60 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl bzw. 0,7 M Sorbitol wurden Proben entnommen und durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. Entsprechende Ausschnitte der Gele zeigen die Akkumulation von OsmY (Pfeil) im Zeitverlauf unter aeroben (A) und anaeroben (B) Bedingungen. Die Intensitäten der Signale wurden quantifiziert, und Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten wurden gegen die Zeit aufgetragen (C).

Auf diese Weise war es möglich, die identifizierten Proteine in Gruppen, entsprechend dem zeitlichen Verlauf der Proteinakkumulation, einzuteilen. Unter aeroben Bedingungen waren die meisten der oben beschriebenen Proteine in der mittleren Phase der Osmostressantwort

involviert (Abb. 3.7). Bereits 30 min nach NaCl-Zugabe hatten die Proteinmengen den maximalen Wert erreicht und blieben dann stabil. Für einige Proteine konnte bereits nach 10 min eine signifikante Erhöhung der Menge im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Dabei handelte es sich um ProX, InfB und OsmC. Diese Proteine scheinen schon in die frühe Adaptationsphase involviert zu sein. Eine dritte Gruppe von Proteinen zeigte über den gesamten Untersuchungszeitraum (10-60 min) einen gleichmäßigen Anstieg. Diese Proteine können der mittleren und späten Phase zugerechnet werden. Nur ein Protein, YgaU, zeigte erst nach 60 min NaCl-Stress einen Anstieg und wurde somit der späten Phase der Osmostressantwort zugerechnet.

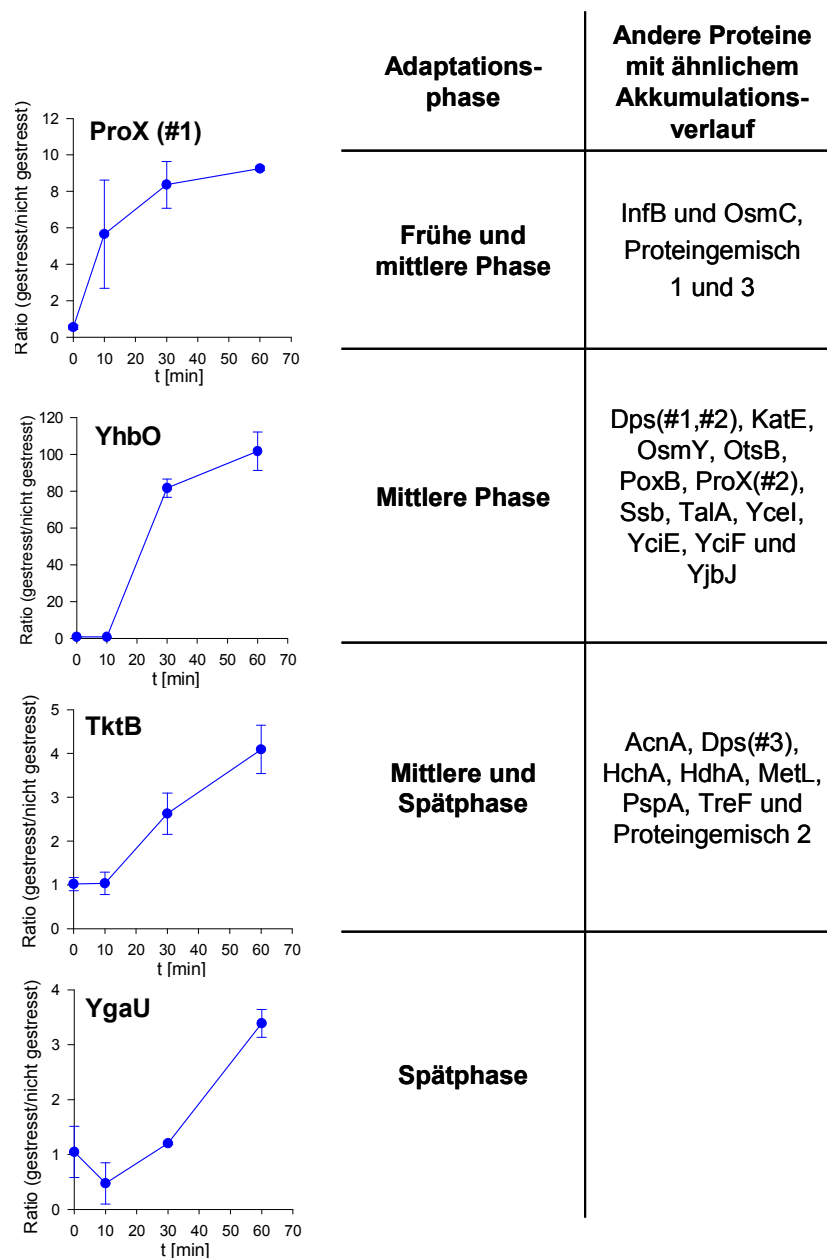


Abb. 3.7: Einordnung von Proteinen, die bei Salzstress unter aeroben Bedingungen akkumulieren, in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf. Exemplarisch ist die Regulation von ProX (Isoform 1), YhbO, TktB und YgaU zeitabhängig nach Setzen des osmotischen Stresses ($t=0$ min) dargestellt. Es sind Mittelwerte der Intensitätsratio (gestresste Zellen/ nicht gestresste Zellen) mit den absoluten Abweichungen gegen die Zeit aufgetragen. Proteine mit vergleichbaren Akkumulationsmustern wurden in Gruppen zusammengefasst und sind in der rechten Spalte aufgeführt.

Unter anaeroben Bedingungen wurden die meisten Proteine der mittleren Phase der Stressantwort zugerechnet (Abb. 3.8). Bei wenigen Proteinen (AhpC, OmpC, InfB und YgaU) konnte eine erhöhte Konzentration bereits nach 10 min nachgewiesen werden, die dann während des restlichen untersuchten Zeitraums relativ konstant blieb. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter aeroben Bedingungen stieg die Menge einiger Proteine, wie Dps (Isoform 1), ProX (Isoform 1) und OsmY gleichmäßig an. Das Verlaufsmuster von YgaU unterschied sich unter aeroben und anaeroben Bedingungen deutlich. In Abwesenheit von Sauerstoff stieg die Menge von YgaU in den ersten 10 min nach NaCl Zugabe transient an. Nach 60 min war die Menge erneut, allerdings stärker erhöht. Unter aeroben Bedingungen war der Anstieg deutlich verzögert (Abb. 3.7 und 3.8).

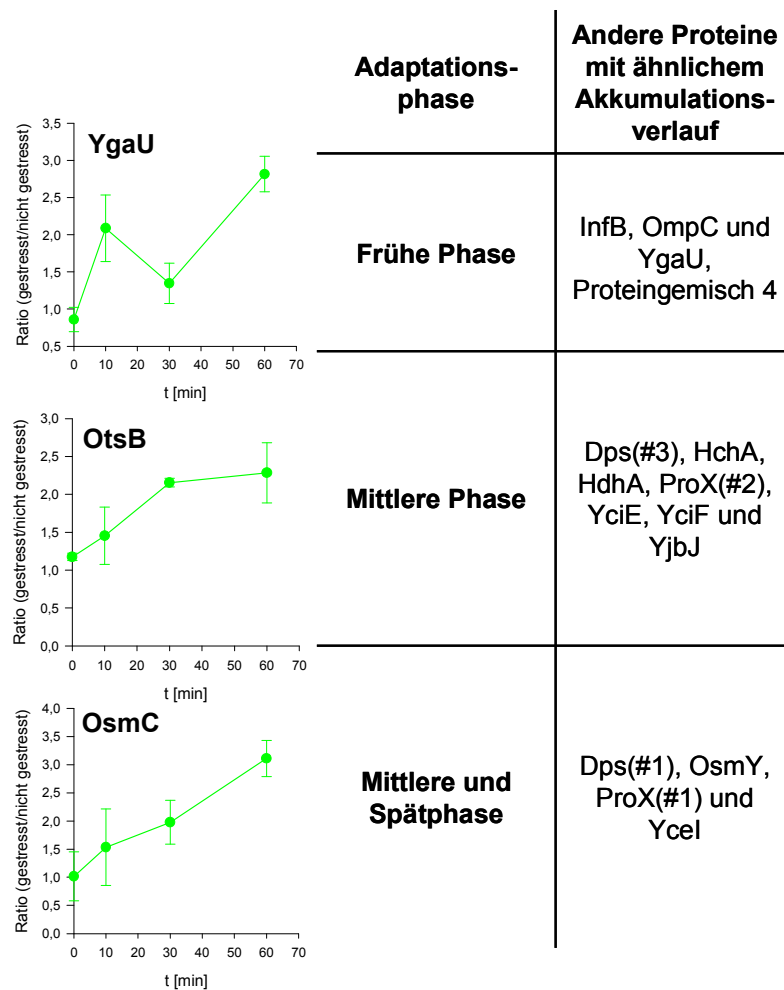


Abb. 3.8: Einordnung von Proteinen, die bei Salzstress unter anaeroben Bedingungen akkumulieren, in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf. Exemplarisch ist die Regulation von AhpC, OtsB und OsmC zeitabhängig nach Setzen des osmotischen Stresses ($t=0$ min) dargestellt. Es sind Mittelwerte der Intensitätsratio (gestresste Zellen/ nicht gestresste Zellen) mit den absoluten Abweichungen gegen die Zeit aufgetragen. Proteine mit vergleichbaren Akkumulationsmustern wurden in Gruppen zusammengefasst und sind in der rechten Spalte aufgeführt.

Es konnte festgestellt werden, dass die Osmostressantwort auf Proteinebene unter den gewählten Bedingungen einen Zeitraum von etwa einer Stunde umfasst. Die meisten Veränderungen konnten erst nach etwa 30 min nachgewiesen werden und scheinen in der

Langzeitanpassung eine Rolle zu spielen. Unter anaeroben Bedingungen ist die Reaktion im Vergleich zu aeroben Bedingungen verlangsamt.

3.1.4 Proteomanalysen im alkalischen pI-Bereich

Um die erhaltenen Ergebnisse (3.1.1 und 3.1.2) zu vervollständigen, wurden die Proben in einem pH-Bereich von 6-11 aufgetrennt. In diesem Bereich sind theoretisch wesentlich weniger Proteine zu erwarten als im pH-Bereich 4-7, da nur etwa 38 % der Proteine von *E. coli* einen theoretischen pI-Wert >6 vorweisen (Weber, 2003). Um eine überzeugende Auftrennung in diesem pH-Bereich zu gewährleisten, wurde das Reduktionsmittel im System geändert. DTT ist eine schwache Säure, deren pK_a Wert im Bereich von pH 8-9 liegt und ist für eine Auftrennung unter alkalischen Bedingungen nicht geeignet. Da es im alkalischen pH-Bereich geladen ist, wandert es im elektrischen Feld. Dadurch fehlt in bestimmten Gelbereichen das Reduktionsmittel und es kommt zu einer ineffizienten Auftrennung. Um dieses Problem zu umgehen, wurde für die Proteomanalysen im pH-Bereich 6-11 anstelle von DTT Hydroxyethylidisulfid verwendet (Olsson *et al.*, 2002; Cortón *et al.*, 2004).

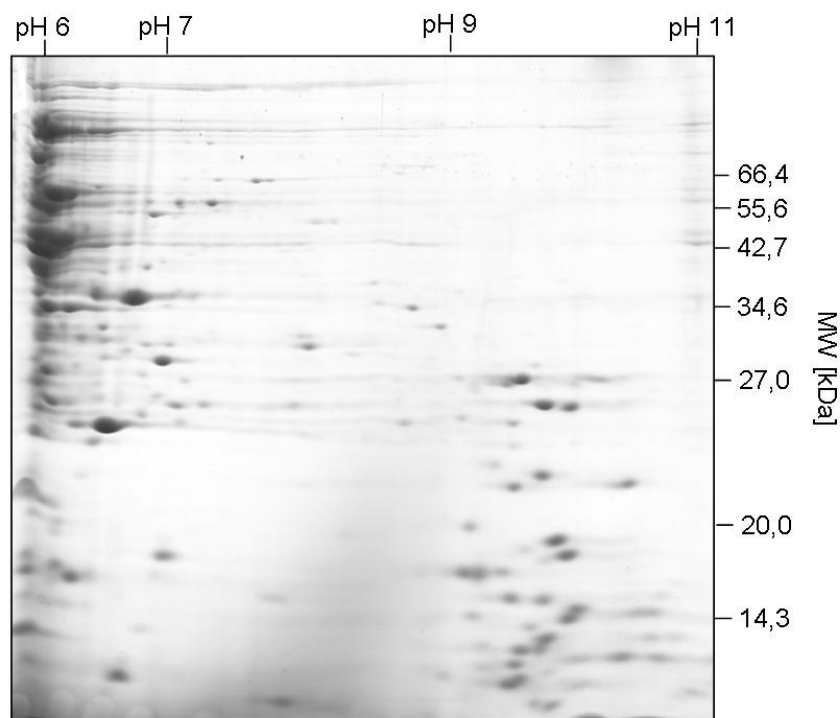


Abb. 3.9: Proteom von *Escherichia coli* im pH-Bereich 6-11. *E. coli* MG1655 wurde in K10-Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob kultiviert. Zellextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 6-11, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht.

Abb. 3.9 zeigt ein typisches 2D-Gel des pH-Bereichs 6-11. In diesem Bereich wurden erwartungsgemäß deutlich weniger Proteine aufgetrennt als im pH-Bereich ≤ 7 . Im sauren pH-

Bereich zeigte sich eine starke Anhäufung der Proteine, die einen niedrigeren pI (<6) besitzen. Dadurch wurde die Analyse dieses Gelbereichs erschwert. Im pH-Bereich von 7,5-9 waren nur sehr wenige Proteine sichtbar. Im pH-Bereich >9 wurden viele Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 30 kDa aufgetrennt. Für die Untersuchung der osmotischen Stressreaktion wurden die Membranfraktionen von Zellen ohne und mit Zugabe von 0,4 M NaCl analysiert. Anaerob kultivierte Zellen wurden nicht analysiert, da unter diesen Bedingungen nur geringe Änderungen zu erwarten waren (vgl. 3.1.2). Im Allgemeinen waren die Proteinmuster nach Auftrennung im alkalischen Bereich nicht vollständig reproduzierbar. Vor allem im pH-Bereich über 9 variierten die Muster stark.

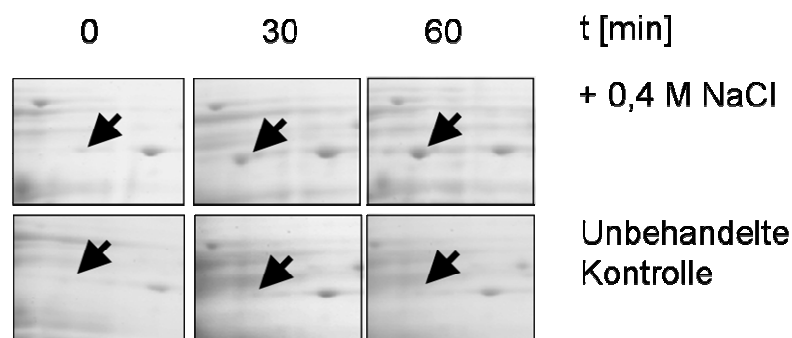


Abb. 3.10: Die zeitabhängige Akkumulation von OtsA nach Salzstress. *E. coli* MG1655 wurde in einem Fermenter in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Vor Zugabe (0), 30 und 60 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl wurden Proben entnommen und durch zweidimensionale Gelelektrophorese (pH 6-11) analysiert. Entsprechende Ausschnitte der Gele zeigen die Akkumulation von OtsA (Pfeil) im Zeitverlauf.

Dennoch konnte ein Protein identifiziert werden, das reproduzierbar verstärkt bei osmotischem Stress akkumulierte. Dabei handelte es sich um OtsA, die Trehalose-6-phosphat-Synthase (Abb. 3.10). OtsA ist wie das identifizierte OtsB (3.1.2) an der Synthese des kompatiblen Solutes Trehalose beteiligt.

3.1.5 Einfluss von Glycinbetain auf die Proteomveränderungen bei osmotischem Stress

Glycinbetain ist ein kompatibles Solut, das von *E. coli* unter osmotischen Stressbedingungen aufgenommen werden kann, und zahlreichen anderen kompatiblen Soluten vorgezogen wird (Larsen *et al.*, 1987). Es wurde untersucht, inwieweit die Zugabe von Glycinbetain die Veränderungen des Proteoms im Verlauf der Osmoadaptation beeinflusst. Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt: Zugabe von 0,6 M NaCl für 60 min und Analyse der Proben in einem pH-Bereich von 4-7. Die Untersuchungen wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt, wobei zur Hälfte der Ansätze Glycinbetain in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben wurde. Während unter anaeroben Bedingungen nur ein geringer

Einfluss von Glycinbetain auf die Proteomveränderungen nachgewiesen werden konnte, zeigten sich in Anwesenheit von Sauerstoff deutliche Unterschiede (Abb. 3.11).

Glycinbetain führte unter aeroben Bedingungen zu einer verminderten Akkumulation der Proteine unbekannter Funktion YciE, YciF und YceI, sowie der DNA-bindenden Proteine Ssb und der beiden Dps-Isoformen (#1 und #2), des Chaperons HchA, des Trehaloseproduzierenden Enzyms OtsB, der Transporteruntereinheit ProX und des Stressproteins OsmY. In allen Fällen war die beobachtete Proteinmenge um mindestens die Hälfte reduziert. Eine gegenläufige Regulation war bei den Proteinen YhbO, TreF und FliC zu beobachten. Während die Menge an FliC, der Flagellinuntereinheit des Flagellums, bei osmotischem Stress sank, war diese Verminderung bei Zugabe von Glycinbetain aufgehoben. Anders verhielt es sich bei TreF und YhbO. Sowohl die im Cytoplasma lokalisierte Trehalase TreF, wie auch die potentielle Protease YhbO wurden in Gegenwart von Glycinbetain und Sauerstoff in größeren Mengen nachgewiesen als ohne das kompatible Solut (Abb. 3.11). Glycinbetain hatte keinen Einfluss auf die Regulation der Proteine HdhA, TktB, TalA, OsmC und PspA (Daten nicht gezeigt). Unter anaeroben Bedingungen war der Effekt von Glycinbetain wesentlich geringer. Eine verminderte Akkumulation konnte nur für das Prolin/Glycinbetain-Bindeprotein ProX eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Für einige Proteine (OsmY, HchA, YhbO und OsmC) wurde durch die Zugabe des kompatiblen Solutes allerdings eine verstärkte Akkumulation (bis zu 2-fach) unter anaeroben Bedingungen detektiert (OsmC nicht gezeigt).

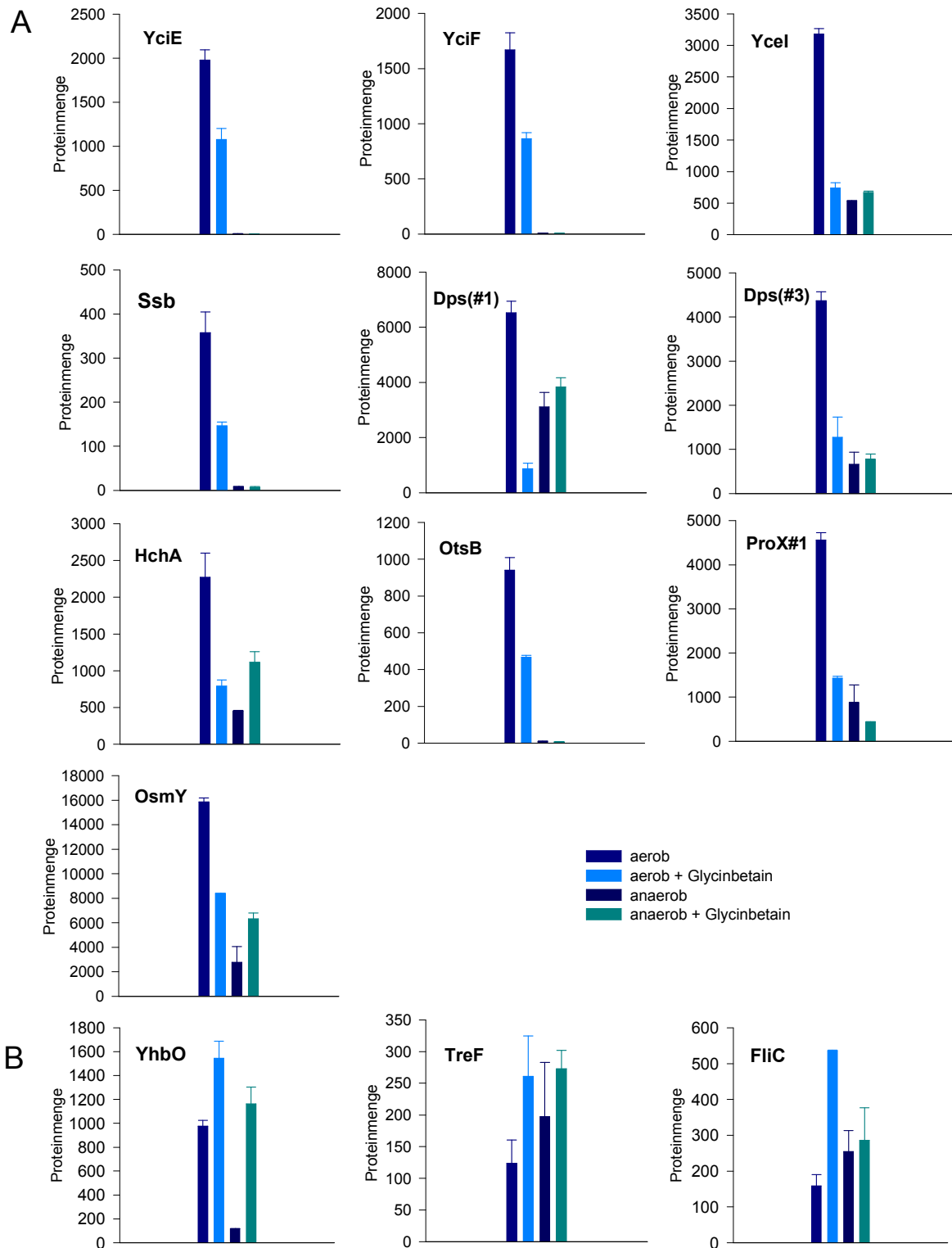


Abb. 3.11: Einfluss von Glycinbetain auf die Akkumulation verschiedener osmotischer Stressproteine in *E. coli* 60 min nach Zugabe von 0,6 M NaCl. *E. coli* MG1655 wurde in K10-Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob und anaerob bei 37 °C inkubiert. Dann wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,6 M zugegeben. Der Hälfte der Kulturen wurde zum gleichen Zeitpunkt 10 mM Glycinbetain zugesetzt. 60 min nach Zugabe des Salzes wurden Proben entnommen und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Es wurden pro Bedingung zwei unabhängige Kulturen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proteinmengen in willkürlichen Einheiten mit absoluten Abweichungen. In **(A)** sind Proteine mit verminderter Menge bei Kultivierung von *E. coli* in Gegenwart von Glycinbetain unter aeroben Bedingungen gruppiert. In **(B)** entsprechend Proteine mit erhöhter Menge.

Da die meisten der erwähnten Proteine direkt oder indirekt vom globalen Stressregulator RpoS reguliert werden (Tab. 3.1 und 3.2), wurden Untersuchungen zu Veränderungen der RpoS-Menge in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycinbetain durchgeführt (Abb. 3.12). Unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit zeigte sich, dass die transiente Akkumulation von RpoS nach Zugabe von NaCl ($t=0$) durch die Zugabe von Glycinbetain deutlich abgeschwächt wurde. Während unter aeroben Bedingungen die RpoS-Menge 60 min nach NaCl-Zugabe deutlich erhöht war, war dies in Gegenwart des kompatiblen Solutes nicht zu beobachten. Weiterhin konnte durch den immunologischen Nachweis gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Sauerstoff deutlich weniger RpoS in den Zellen vorhanden war. In den Kulturen, denen Glycinbetain zugesetzt wurde, war die RpoS-Menge zwei Stunden nach Erhöhung der Osmolalität sogar stark erniedrigt.

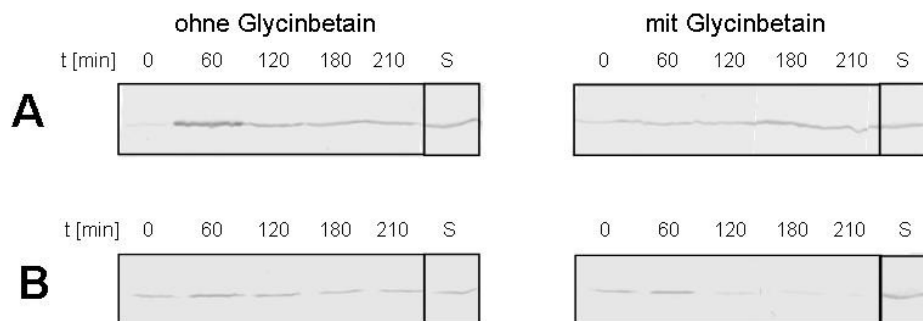


Abb. 3.12: Einfluss von Glycinbetain auf die Veränderung der RpoS-Menge in *E. coli* nach Salzstress (0,6 M NaCl). *E. coli* MG1655 wurde in K10-Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob (A) und anaerob (B) bei 37 °C inkubiert. Dann wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,6 M zugegeben. Der Hälfte der Kulturen wurde zum gleichen Zeitpunkt 10 mM Glycinbetain zugesetzt. Es wurden zeitabhängig Proben entnommen und je 25 µg Protein auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen RpoS-Antikörper. S=interner Standard.

3.1.6 Veränderungen im Membranproteom

Wie bereits erwähnt, ist die Auflösung der konventionellen 2D-Gelelektrophorese auf lösliche oder nur schwach hydrophobe Proteine beschränkt. Dies wurde auch in den erhaltenen Ergebnissen (s. 3.1.1 und 3.1.2) deutlich. Es konnten keine integralen Membranproteine und nur ein Porin der äußeren Membran identifiziert werden. Zur Erweiterung der Ergebnisse wurde eine weitere gelbasierte Methode angewandt, die in der ersten Dimension der Auftrennung auf isoelektrische Fokussierung verzichtet. Dies hat den Vorteil, dass das Aggregieren und Präzipitieren von stark hydrophoben Proteinen an ihrem isoelektrischen Punkt vermieden wird. Verwendet wurde eine Methode von Macfarlane (1989). In beiden Dimensionen wird dabei nach der molekularen Masse aufgetrennt, wobei die erste Dimension auf einem saurem Gelsystem mit dem positiv geladenen Detergenz Benzyldimethyl-*n*-hexadecylammonium-chlorid (16-BAC) beruht. In der zweiten Dimension wird analog zur konventionellen zweidimensionalen

Gelelektrophorese vorgegangen. Diese im Folgenden präsentierten Ergebnisse wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Niefnecker erarbeitet, deren Fortgang ich betreut habe.

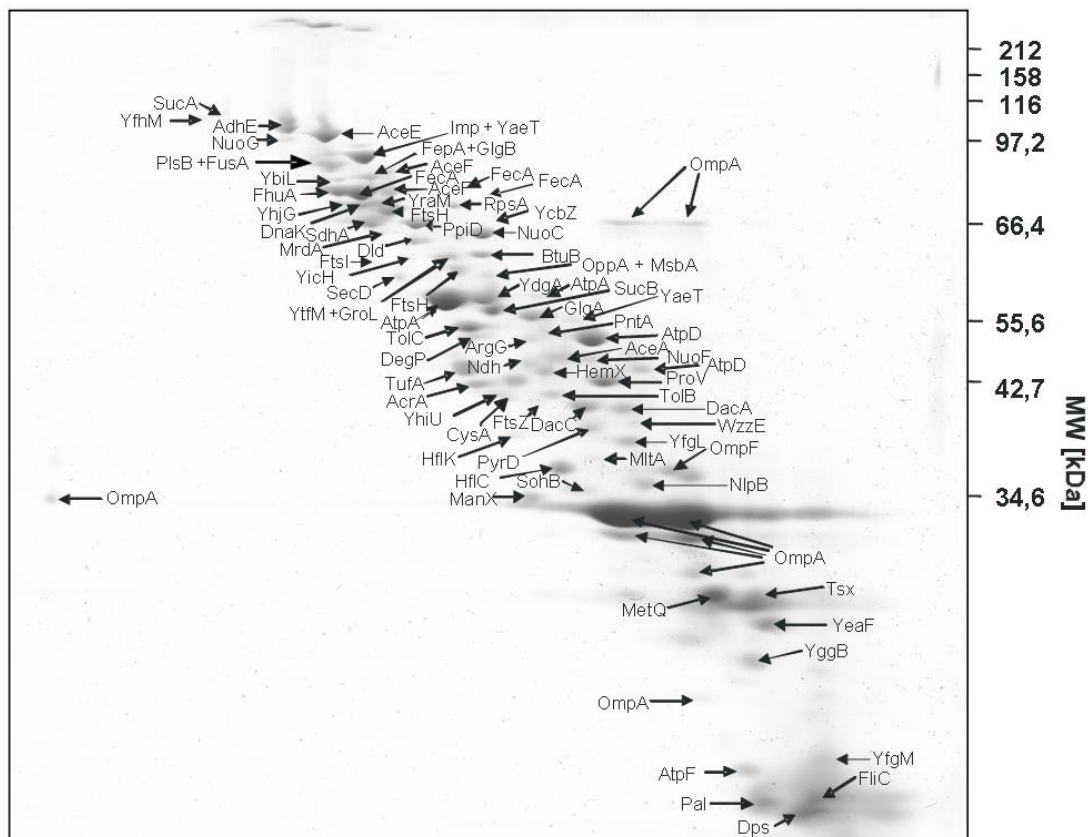


Abb.3.13: 16-BAC/SDS-Referenzgel der *E. coli* Membranfraktion. *E. coli* MG1655 wurde in K10-Minimalmedium kultiviert, Membranen wurden präpariert und 150 µg Protein durch kombinierte 16-BAC/SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Proteine wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und durch MALDI-TOF-MS identifiziert (Niefnecker, 2005).

Mit dieser Methode konnten 76 verschiedene Proteine der Membranfraktion von *E. coli* aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden (Niefnecker, 2005; Abb. 3.13, Anhang). Dies entspricht etwa 10 % der vorhergesagten 757 Proteine der äußeren und inneren Membran. Die theoretischen Molekulargewichte dieser Proteine lagen zwischen 18,5 und 180 kDa. Sechs Proteine konnten an mehreren Stellen im Gel identifiziert werden. Dies war am deutlichsten bei OmpA sichtbar, einem Porin der äußeren Membran, das auf 9 verschiedene Stellen im Gel verteilt war. Bei den meisten der identifizierten Proteine handelte es sich um periphere Membranproteine. 50 % davon sind an der inneren, 21 % an der äußeren Membran lokalisiert. Nur wenige Proteine für die eine cytosolische Lokalisation vorhergesagt oder bekannt ist, wurden nachgewiesen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Proteine, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorliegen, wie das Ferritin-Homolog und DNA-bindende Protein Dps, den Elongationsfaktor EF-G und SucA und SucB, zwei Untereinheiten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes. Ebenso wurden die vorhergesagten Cytoplasmaproteine AceE, AceF (beide Bestandteil des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes) und ManX (Mannose

spezifisches PTS Enzym IIAB) nachgewiesen. Diese wurden bereits in anderen Untersuchungen der Membranfraktion zugeordnet (Lopez-Campistrous *et al.*, 2005). Nur 3 Proteine wurden auf den BAC/SDS-Gelen aufgetrennt, die im Periplasma lokalisiert sind. Dabei handelte es sich um das Bindeprotein für Oligopeptide OppA, TolB und die Protease DegP.

Das Gelsystem zeigte eine gute Auflösung der Proteine der äußeren Membran mit einer β -Fass-Struktur. Es konnten, die in die Eisenaufnahme involvierten Proteine FepA, FecA und FhuA sowie des Weiteren 8 andere Proteine mit dieser Struktur identifiziert werden.

Die meisten der Proteine der inneren Membran waren periphere Membranproteine oder beinhalteten einen Lipidanker. 19 membranintegrierte Proteine wurden aufgetrennt und identifiziert. Davon hatten 11 Proteine eine Transmembranhelix (TMH), 4 Proteine zwei vorhergesagte TMHs (FtsH, SohB, WzzE und YhjG), ein Protein 3 TMHs (YggB), ein Protein 5 TMHs (PntA) und zwei Proteine 6 TMHs (MsbA und SecD). Einige dieser Proteine (ca. 25 %) wurden bis jetzt auf keinem konventionell angefertigten 2D-Gel identifiziert (Han und Lee, 2006). Diese Gruppe schließt die ATP-bindende Untereinheiten der entsprechenden ABC-Transporter CysA und ProV, einige Proteine der Mureinsynthese (DacC, FtsI, MltA und MrdA), das Proteinexport-Protein SecD und einige Lipoproteine unbekannter Funktion (YfhM, YicH und YffM) ein. Eine zweidimensionale Auftrennung von NuoC (NADH-Quinon-Oxidoreduktase C/D), SecD und ProV wurde zum jetzigen Zeitpunkt nur durch „Blue native PAGE“ beschrieben (Stenberg *et al.*, 2005).

Mit Hilfe dieses Gelsystems wurden im Folgenden Proben aus aerob und anaerob in Minimalmedium kultivierten *E. coli* Zellen zeitabhängig vor und 10, 30 und 60 min nach Salzstress (0,4 M NaCl) analysiert. Dabei konnte eine Akkumulation von ProV, der ATP-hydrolysierenden Membran-ständigen Untereinheit des Transporters für Prolin/Glycinbetain ProU nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Die Menge an ProV nahm um etwa den Faktor 10 zu. Dies entspricht den Werten, der unter 3.1.1 identifizierten, weiteren Untereinheit des ProU-Transporters, des Bindeproteins ProX.

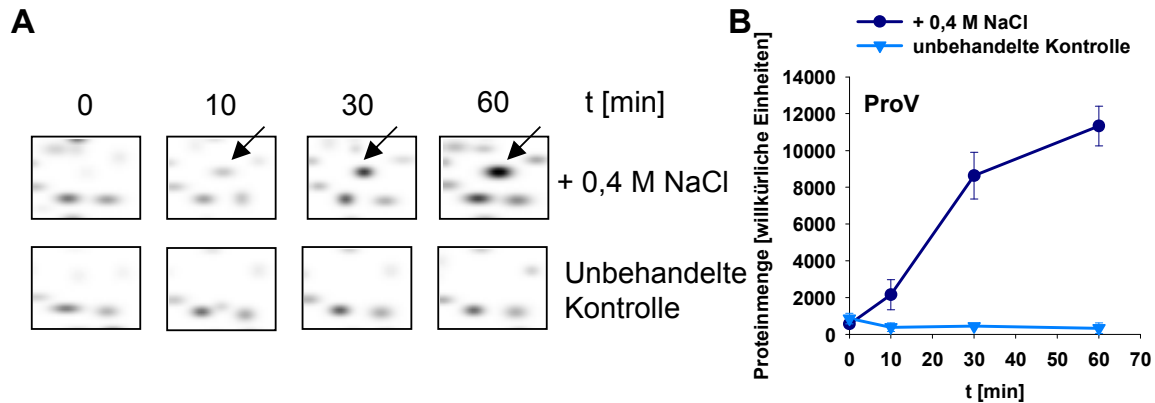


Abb. 3.14: Die zeitabhängige Akkumulation der Transporteruntereinheit ProV in *E. coli* nach osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 wurde in einem Fermenter aerob in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Vor Zugabe (0), 10, 30 und 60 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl wurden Proben entnommen, die Membranfraktion präpariert und durch BAC/SDS-Gelelektrophorese analysiert. Entsprechende Ausschnitte der Gele zeigen die Akkumulation von ProV (Pfeil) im Zeitverlauf (A). Die Intensitäten der Signale wurden quantifiziert, und Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten wurden gegen die Zeit aufgetragen (B).

3.2 Einfluss der Kaliumaufnahme auf die Osmoadaptation

Die erste aktive Reaktion der Zelle auf einen osmotischen Stress ist die Aufnahme von K^+ über die konstitutiven, sekundären Transporter TrkH und TrkG (Schlösser *et al.*, 1992). Um die Bedeutung von erhöhten K^+ -Konzentrationen als eine Art „second messenger“ auf die nachfolgende Osmoadaptation zu untersuchen, wurden die globalen Proteomveränderungen in einer Kaliumaufnahmemutante (LB650 $\Delta trkH::Cam^R$ $\Delta trkG::Kan^R$ $\Delta kdpFABC5$ $trkD1$) im Vergleich zum isogenen Wildtyp (FRAG-1) nach Erhöhung der extrazellulären Osmolarität durch Zugabe von NaCl untersucht.

3.2.1 Bedeutung der Kaliumaufnahme bei der osmotischen Stressreaktion in Minimalmedium

Die Untersuchungen wurden mit in Minimalmedium kultivierten Zellen begonnen. Die *E. coli* Mutante LB650 besitzt keines, der für *E. coli* bekannten Aufnahmesysteme für K^+ , weder die niedrig-affinen Transportsysteme Trk und Kup, noch das hoch-affine Kdp-System (Stumpe und Bakker, 1997). Daher wächst diese Mutante nur in Gegenwart von hohen K^+ -Konzentrationen. Wenn die Mutante in Minimalmedium kultiviert und einem Salzstress ausgesetzt wurde, stoppte das Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp (FRAG1) sofort (Abb. 3.15). Dies zeigte, dass die Mutante nicht in der Lage war, sich an die erhöhte Osmolarität zu adaptieren.

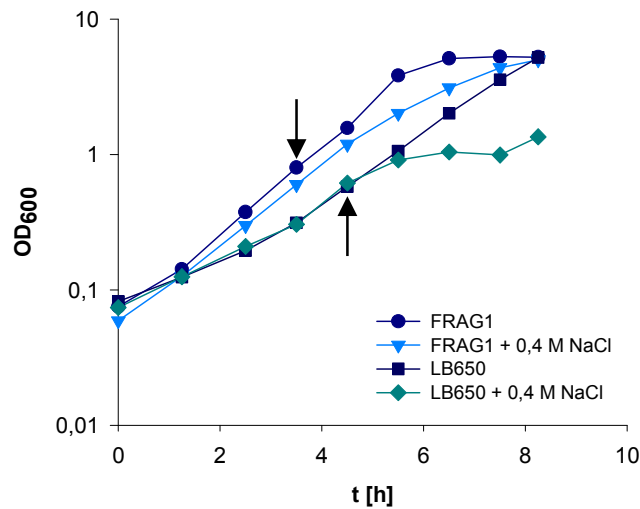


Abb. 3.15: Wachstum von *E. coli* FRAG1 und LB650 in Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose]. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in K115-Minimalmedium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (Pfeil). Die Kontrollkulturen blieben unbehandelt. Die Probenahme zur Proteomanalyse erfolgte in den ersten 60 min nach Setzen des Stresses. Das Wachstum wurde durch Messen der OD_{600} verfolgt.

Messungen der intrazellulären Kaliummenge ergaben für den Wildtyp eine temporäre starke Erhöhung der Kaliummenge, während dies in der Mutante nicht zu beobachten war (Abb. 3.16).

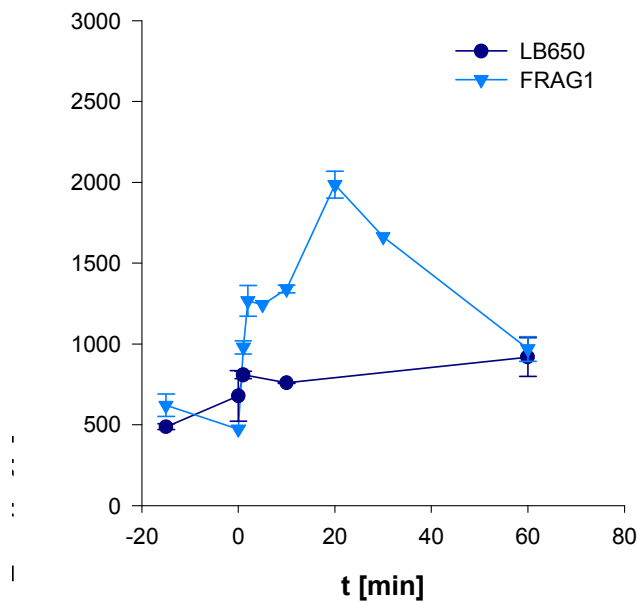


Abb.3.16: Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehalts von *E. coli* FRAG1 und LB650 nach Salzstress in Minimalmedium. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in K10-Minimalmedium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben ($t=0$). Die intrazelluläre Kaliummenge wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Die Messung wurde zweimal mit Proben aus unabhängigen Kulturen durchgeführt. Es sind absolute Abweichungen dargestellt.

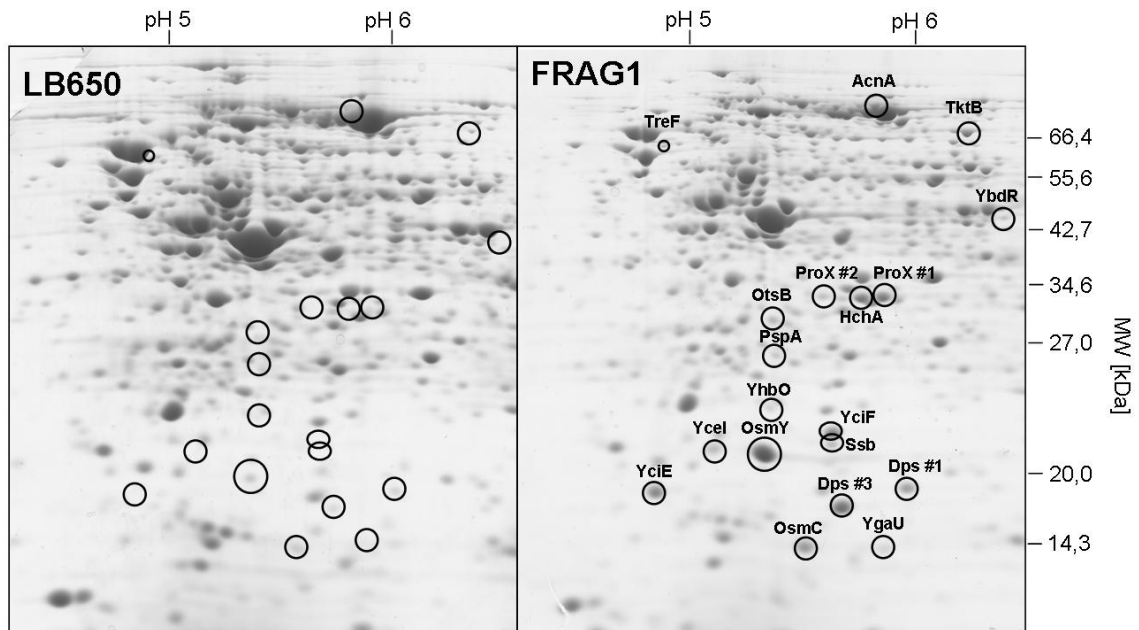


Abb. 3.17: Proteom von *E. coli* LB650 und FRAG1 60 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl bei Kultivierung in Minimalmedium. Zellextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine, deren Menge sich mindestens zweifach veränderte, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Die identifizierten Proteine sind durch Kreise gekennzeichnet.

Die nur geringen Veränderungen des Proteinmusters, die in der zeitabhängigen Proteomanalyse sichtbar wurden, verdeutlichen, dass die K^+ -Aufnahmemutante LB650 kaum Reaktionen auf den Stress zeigte (Abb. 3.17). OsmC, Dps und PspA waren die einzigen Proteine, für die eine erhöhte Menge nach Salzstress nachgewiesen wurde (Tab. 3.3). Die Erhöhung war allerdings kleiner als im isogenen Wildtyp FRAG1. Es sollte erwähnt werden, dass, obwohl die Mutante einen Wachstumsarrest zeigte, die Proteomanalysen keine offensichtlichen Verminderungen des größten Teils der Proteinmengen nachwiesen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Stammes MG1655 (3.1.1 und 3.1.2) war eine Akkumulation von Osmostress-Proteinen im Stamm FRAG1 zu beobachten (Abb. 3.17). Zusätzlich wurde für diesen Stamm eine Zunahme von YbdR, einer potentiellen Zink-abhängigen Oxidoreduktase, nachgewiesen.

Tab. 3.3: Proteine mit veränderter Regulation in *E. coli* LB650 und FRAG1 nach Salzstress in Minimalmedium.

Protein	Beschreibung	Ratio	Ratio
		Mutante (LB650) 60min/0min Salzstress (0,4 M NaCl)	Wildtyp (FRAG1) 60min/0min Salzstress (0,4 M NaCl)
Proteine mit Hochregulation in der K⁺-Aufnahmemutante LB650			
Dps (#1) ¹	DNA-bindendes Protein mit einer Ferritin-ähnlichen Domäne	5,0 ± 0,5	9,4 ± 0,8
OsmC	Osmotisch induzierbare Peroxidase	1,6 ± 0,3	9,5 ± 2,3
PspA	„Phage shock“ Protein A	2,1 ± 0,0	4,0 ± 0,5
Proteine mit Hochregulation im Wildtyp FRAG1			
AcnA	Aconitat- Hydratase 1	0,1 ± 0,0	2,8 ± 2,1
Dps (#3)	DNA-bindendes Protein mit einer Ferritin-ähnlichen Domäne	1,1 ± 0,0	11,5 ± 2,9
HchA	Hsp31	0,6 ± 0,2	7,8 ± 3,8
OsmY	Hyperosmotisch induzierbares, periplasmatisches Protein	0,3 ± 0,0	8,3 ± 1,5
OtsB	Trehalose-6-phosphat -Phosphatase	1,1 ± 0,7	2,7 ± 1,0
ProX (#1)	Glycinbetain-bindendes, periplasmatisches Protein	0,8 ± 0,4	17,0 ± 2,7
ProX (#2)	Glycinbetain-bindendes, periplasmatisches Protein	-	17,1 ± 0,7
Ssb	Einzelstrang-bindendes Protein	-	708,4 ± 18,3
TreF	Cytoplasmatische Trehalase	-	79,9 ± 78,3
TktB	Transketolase II	1,1 ± 0,2	1,9 ± 1,4
YbdR	Hypothetische Zink-Alkoholdehydrogenase	-	894,8 ± 614,9
Ycel	Protein unbekannter Funktion	-	19,9 ± 0,7
YciE	Konserviertes Protein	-	95,1 ± 33,5
YciF	vorhergesagtes Strukturprotein	-	3321,7 ± 442,8
YhbO	Konserviertes Protein	-	393,7 ± 42,5
YgaU	Vorhergesagtes Protein	-	657,4 ± 60,6

¹Isoformen wurden durch Nummerierung unterschieden

Da RpoS ein globaler Regulator der Stressantwort in *E. coli* ist, wurde die RpoS-Menge für beide Stämme im Zeitverlauf der Salzstressantwort durch Immunoblot untersucht (Abb. 3.18). In der K⁺-Aufnahmemutante wurde schon vor Zugabe von NaCl eine erhöhte RpoS-Menge detektiert. Die Zunahme von RpoS nach Setzen des Stresses war langsamer und weniger ausgeprägt als im Wildtyp. Trotz der erhöhten Menge des positiven Regulators konnte keine Induktion des entsprechenden Regulons (Tab. 3.3) nachgewiesen werden.

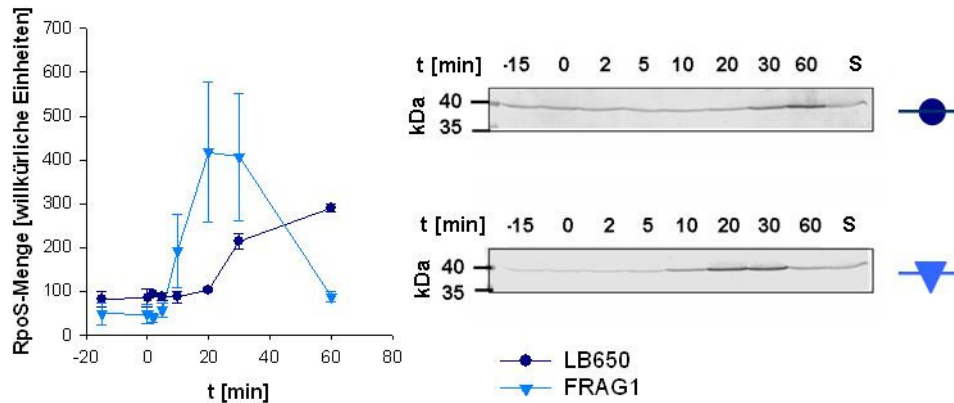


Abb. 3.18: RpoS-Menge in *E. coli* LB650 und FRAG1 nach Salzstress bei Kultivierung in Minimalmedium. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in K115-Minimalmedium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben ($t=0$). Proben wurden einer Immunblot-Analyse mit polyklonalem Anti-RpoS-Serum unterzogen. Die Quantifizierung erfolgte in Bezug auf den internen Standard (S), der auf 100 % gesetzt wurde, mittels der Software ImageQuant.

3.2.2 Bedeutung der Kaliumaufnahme bei der osmotischen Stressreaktion in Komplexmedium

Um die massiven Wachstumsunterschiede bei der Kultivierung der beiden Stämme in Minimalmedium zu umgehen, wurden die analogen Experimente zu 3.2.1 mit Zellen durchgeführt, die in Komplexmedium mit hoher K^+ -Konzentration (KML) inkubiert wurden.

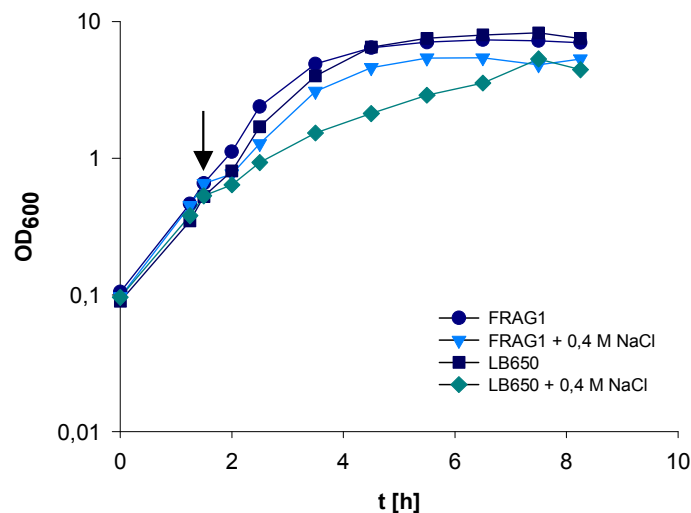


Abb. 3.19: Wachstum von *E. coli* FRAG1 und LB650 in Komplexmedium. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in KML-Medium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (Pfeil). Die Kontrollkulturen blieben unbehandelt. Die Probenahme zur Proteomanalyse erfolgte in den ersten 60 min nach Setzen des Stresses. Das Wachstum wurde durch Messen der OD_{600} verfolgt.

Nach Zugabe von NaCl (0,4 M) zu einer exponentiell wachsenden Kultur der K⁺-Aufnahmemutante LB650 in Komplexmedium zeigte sich eine Verringerung der Wachstumsrate um etwa 50 % im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 3.19). Eine Erhöhung der extrazellulären Osmolalität beim Wildtyp (FRAG1) hatte nur einen geringfügigen Einfluss auf die Wachstumsrate. Die Bestimmung des intrazellulären K⁺-Gehalts der beiden Stämme unter diesen Versuchsbedingungen ergab eine Akkumulation von K⁺ innerhalb von Minuten nach Zugabe von NaCl im Wildtyp und keine nachweisbare Erhöhung des K⁺-Gehaltes im Stamm LB650 (Abb. 3.20).

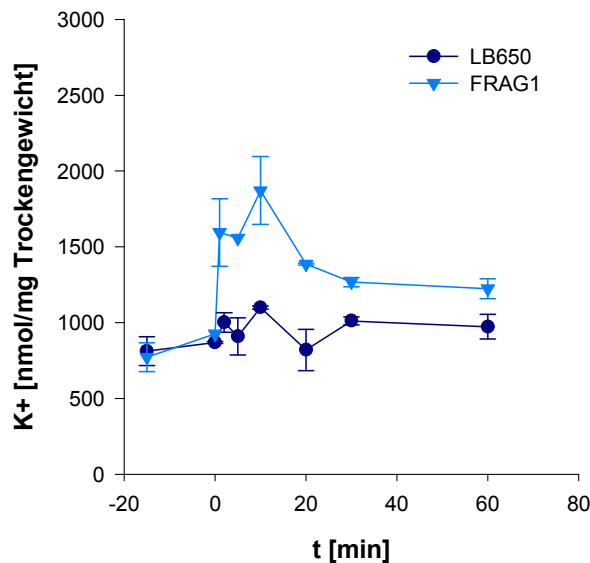


Abb. 3.20: Bestimmung des intrazellulären Kaliumgehalts von *E. coli* FRAG1 und LB650 nach Salzstress in Komplexmedium. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in KML-Medium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (t=0). Die intrazelluläre Kaliummenge wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Die Messung wurde zweimal mit Proben aus unabhängigen Kulturen durchgeführt. Es sind absolute Abweichungen dargestellt.

Um die Veränderungen auf Proteomebene zu untersuchen, wurden Zellen zu mehreren Zeitpunkten vor und nach Setzen des osmotischen Stresses geerntet, Zellextrakte präpariert und dann durch 2D-PAGE in einem pH-Bereich von 4-7 analysiert (Abb. 3.21). Es wurden jeweils Proben von zwei unabhängigen Kulturen untersucht. Bei FRAG1 konnte eine Induktion der RpoS-regulierten Proteine OsmC, ProX, YciF und YjbJ beobachtet werden (Tab. 3.4). Dies entspricht den Ergebnissen von osmotisch gestressten Zellen in Minimalmedium (3.1.1 und 3.1.2). Außerdem wurde eine leichte Zunahme der Mengen von OsmY, TktB, YeaG, YhbO und des Proteingemisches PepQ und YdcW detektiert (1,3 bis 1,8-fach). Diese Proteine waren auch in Minimalmedium osmoreguliert, aber wesentlich ausgeprägter (3.1.1 und 3.1.2). Zusätzlich zu diesen Proteinen akkumulierten die Proteine AspA, CadA, GalM, GatY, TnaA und ein unidentifiziertes Protein (8008) um mindestens den Faktor 2 innerhalb von 60 min nach Zugabe von NaCl im Wildtyp in Komplexmedium. Diese Proteine zeigten in Zellen, die in Minimalmedium kultiviert wurden, nach Salzstress keine Akkumulation. Zwei dieser Enzyme

greifen in den Zucker-Metabolismus von *E. coli* ein: GalM, eine Aldose-1-Epimerase und GatY, eine Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase. Drei Proteine sind am Aminosäure-Metabolismus beteiligt: TnaA, eine Tryptophanase, AspA, eine Aspartat-Ammonium-Lyase und CadA, eine Lysin-Decarboxylase. Zusätzlich wurde eine Akkumulation der Enzyme des Citrat-Zyklus, SdhA, SucA und SucB nachgewiesen, die allerdings nur den Faktor 1,5 nach 60 min erreichte. Bei SdhA handelt es sich um das Succinat-Dehydrogenase-Flavoprotein, bei SucA um die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Komponente E1) und bei SucB um die Dihydrolipoyllysin-Succinyltransferase des gleichen Proteinkomplexes.

Auf Komplexmedium zeigte sich also im Wildtyp (FRAG1) eine Akkumulation zahlreicher metabolischer Enzyme nach Zugabe von NaCl. Dies spricht für globale Modifikationen im Zellmetabolismus bei Salzstress unter diesen Bedingungen.

Tab. 3. 4: : Proteine mit veränderter Regulation in *E. coli* LB650 und FRAG1 nach Salzstress in Komplexmedium.

Protein	Beschreibung	Ratio	Ratio
		Mutante (LB650) 60min/0min Salzstress (0,4 M NaCl)	Wildtyp (FRAG1) 60min/0min Salzstress (0,4 M NaCl)
Proteine mit Hochregulation in der K⁺-Aufnahmemutante LB650			
Bfr	Bacterioferritin	5,6 ± 3,6	0,9 ± 0,0
KatE	Hydroperoxidase II	1,6 ± 0,5	0,9 ± 0,1
OsmC	Osmotisch induzierbare Peroxidase	12,2 ± 10,5	2,5 ± 0,5
OsmY	Hyperosmotisch induzierbares, periplasmatisches Protein	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,8
PepQ/YdcW	Prolin-Dipeptidase/ γ -Aminobutyraldehyd-Dehydrogenase	500,3 ± 81,0	1,9 ± 0,9
PflB	Formiat-Acetyltransferase 1	2,3 ± 0,3	1,2 ± 0,2
TktB	Transketolase II	3,3 ± 0,4	1,7 ± 0,1
YciF	Putatives Strukturprotein	341,7 ± 86,7	7,5 ± 6,4
YeaG	Konserviertes Protein	3,0 ± 1,3	1,8 ± 0,6
YhbO	Konserviertes Protein	13,0 ± 1,6	1,6 ± 0,3
YjbJ	Vorhergesagtes Stressantwort-Protein	13,5 ± 7,3	2,4 ± 2,1
8008	Nicht identifiziert	5,4 ± 1,5	3,1 ± 0,5
Proteine mit Hochregulation im Wildtyp FRAG1			
AspA	Aspartat- ammonia Lyase	2,1 ± 0,1	3,0 ± 1,0
CadA	Lysindecaboxylase	1,8 ± 0,9	2,4 ± 0,5
GalM	Aldose 1-epimerase	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,2
GatY	Tagatose-1,6- bisphosphat-Aldolase	1,8 ± 0,4	2,2 ± 0,0
ProX	Glycinbetain-bindendes, periplasmatisches Protein	0,9 ± 0,1	2,4 ± 0,8
TnaA	Tryptophanase	1,4 ± 0,4	2,3 ± 0,2

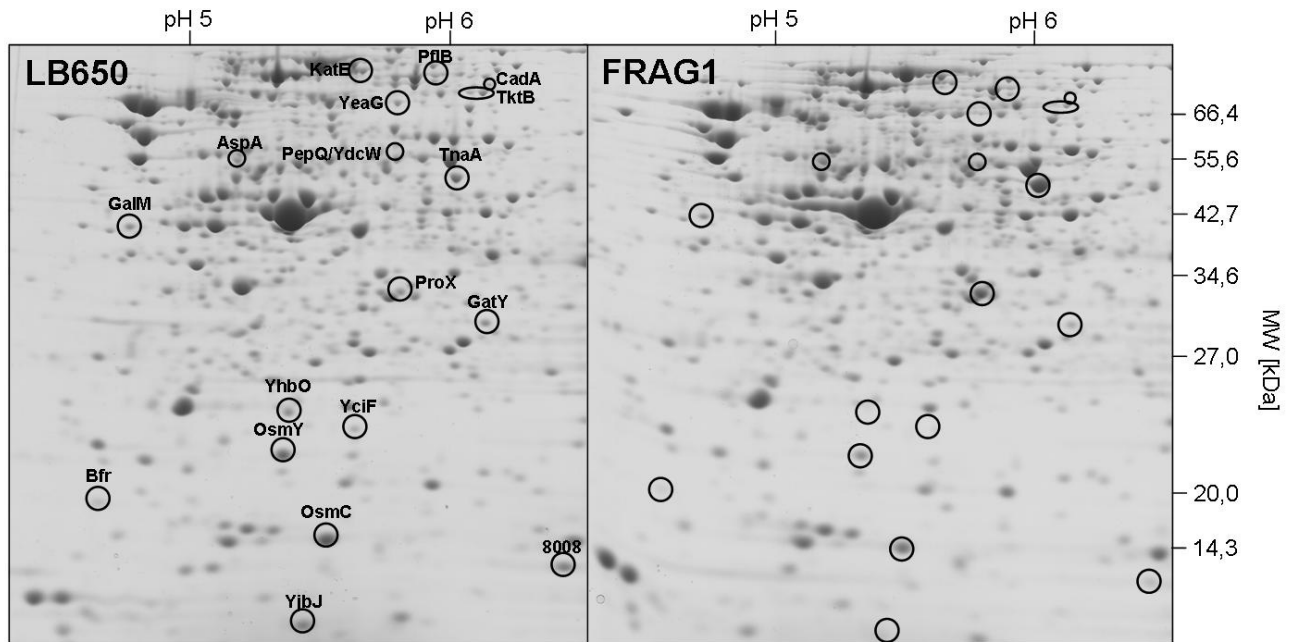


Abb. 3.21: Proteom von *E. coli* LB650 und FRAG1 30 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl bei Kultivierung in Komplexmedium. Zellextrakt wurde zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine, deren Menge sich mindestens zweifach verändert hat, wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Die identifizierten Proteine sind durch Kreise gekennzeichnet.

Die Dynamik der Salzstressadaptation zeigte sich in den zeitabhängigen Analysen. Bei einigen Proteinen (ProX und OsmY) wurde die maximale Menge transient bereits nach 30 min erreicht. Bei anderen Proteinen (GalM und TnaA) wurde im Gegensatz dazu nach 30 min ein konstantes „Level“ erreicht. Im weiteren untersuchten Zeitraum (bis 60 min) blieb die Menge gleich. Die Menge anderer Proteine begann sich nachweislich erst nach 30 min zu erhöhen (AspA und GatY) (Abb. 3.22).

Der Vergleich der Ergebnisse der beiden untersuchten Stämme LB650 und FRAG1 ergab deutliche Unterschiede (Abb. 3.22, Tab. 3.4). Dadurch konnten Proteine ermittelt werden, deren Regulation eine Abhängigkeit von einer Erhöhung der intrazellulären K^+ -Konzentration zeigte. Die Akkumulation des, durch osmotischen Stress regulierten, periplasmatischen Bindeproteins für Glycinbetain, ProX, war in der Mutante komplett inhibiert. Außerdem war die im Wildtyp beobachtete Hochregulation der Proteine TnaA, GalM, AspA, GatY, SdhA, SucA und CadA in der Mutante in unterschiedlichem Ausmaß negativ beeinflusst. Wie in Abb. 3.22 für CadA, GatY und GalM gezeigt, unterschieden sich dabei die Verhältnisse vor und nach Salzstress und/oder die absoluten Proteinmengen. Die Menge dieser Proteine, eingeschlossen Bfr, KatE und YeaG (nicht gezeigt) war schon vor der Zugabe von NaCl im Stamm LB650 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Während CadA und KatE in den Wildtyp-Proben vor Zugabe von NaCl unter dem Detektionslimit lagen, aber in der Mutante detektierbar waren, war die Menge von Bfr, YeaG, GatY und GalM etwa 1,3-1,9-fach im Vergleich zum Wildtyp erhöht ($t=0$).

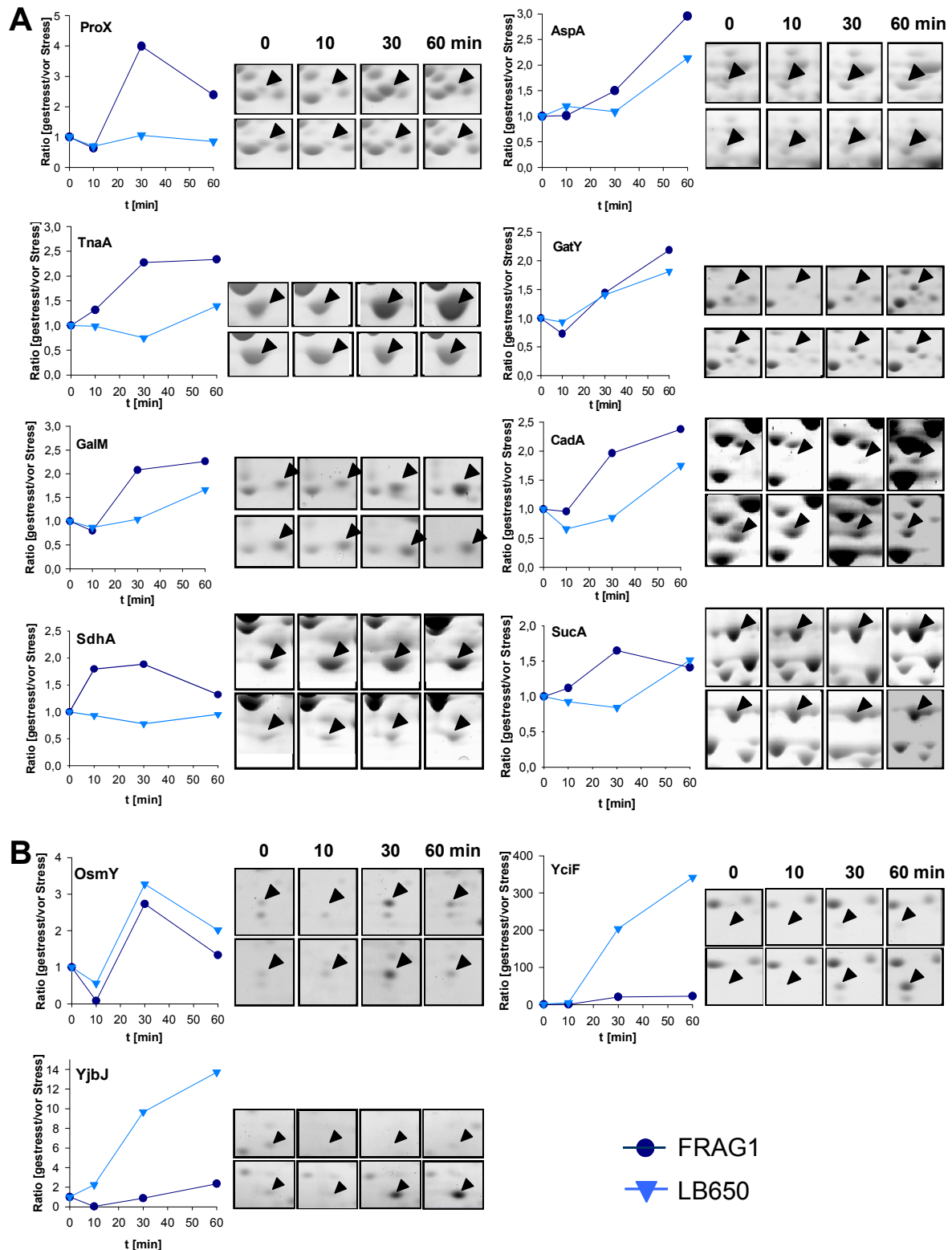


Abb. 3.22: Zeitabhängige Veränderungen der Proteine, die in *E. coli* LB650 und FRAG1 bei Salzstress auf Komplexmedium gegenläufig reguliert sind. *E. coli* LB650 und FRAG1 wurden unter Schütteln in KML-Medium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Vor Zugabe (0) und 10, 30 und 60 min nach Zugabe von 0,4 M NaCl wurden Proben entnommen und zweidimensional in einem pH-Bereich von 4-7 aufgetrennt. Die Proteinmengen wurden quantifiziert, Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten gebildet und gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausschnitte der 2D-Gele illustrieren die Veränderungen der entsprechenden Proteinmengen. Die obere Reihe zeigt jeweils die Proben des Stammes FRAG1, die untere Reihe zeigt die der Mutante LB650. In Abhängigkeit der Akkumulationsmuster wurden die Proteine in K^+ -regulierte Proteine (**A**) und exemplarisch in osmoregulierte Proteine (**B**) gruppiert.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich in den Proben der K^+ -Aufnahmemutante eine Akkumulation von Proteinen die zum RpoS-Regulon gezählt werden: Bfr, KatE, OsmC, TktB, YciF, YeaG, YhbO und YjbJ. Das ebenfalls RpoS-regulierte OsmY stellt eine Ausnahme dar, da in beiden Stämmen vergleichbare Akkumulationsmuster gefunden wurden. Zusätzlich wurde eine stärkere Akkumulation des Proteingemisches PepQ und YdcW, sowie eines nicht identifizierten Proteins (8008) in der Mutante nachgewiesen (Abb. 3.21, Tab. 3.4).

Da die beiden untersuchten Stämme große Unterschiede in der Akkumulation von Proteinen zeigten, die dem RpoS-Regulon zugerechnet werden, wurde die RpoS-Menge im Zeitverlauf nach Salzstress durch Immunoblot quantifiziert (Abb. 3.23). Die Menge von RpoS stieg in beiden Stämmen als Antwort auf den Stress an, erreichte nach etwa 30 min einen maximalen Wert und fiel dann wieder ab. Die absolute Menge von RpoS war in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht.

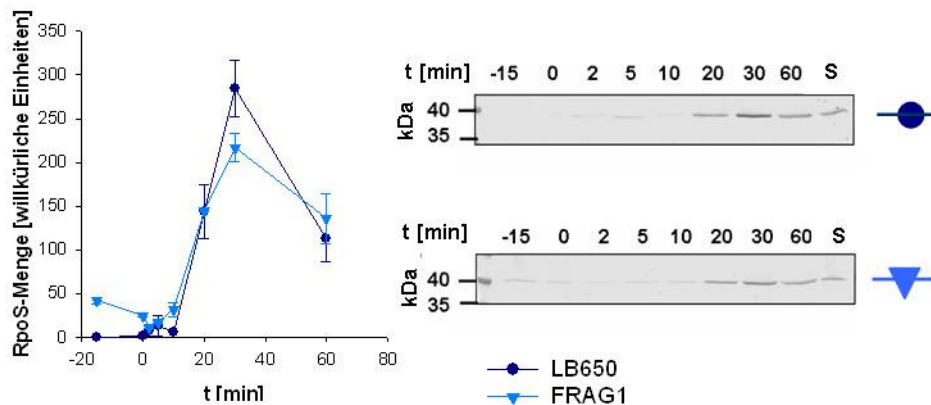


Abb. 3.23: RpoS-Menge in *E. coli* LB650 und FRAG1 nach Salzstress bei Kultivierung in Komplexmedium. *E. coli* FRAG1 und LB650 wurden unter Schütteln in KML-Medium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben (t=0). Proben wurden einer Immunoblot-Analyse mit polyklonalem Anti-RpoS-Serum unterzogen. Die Quantifizierung erfolgte in Bezug auf den internen Standard (S), der auf 100 % gesetzt wurde, mittels der Software ImageQuant.

3.3 Veränderungen der Proteininteraktionen bei osmotischem Stress

Ein weiterer Signalweg zur Sensierung und Reaktion auf Stressbedingungen stellen, neben der Konzentrationsveränderung von kleinen Molekülen wie z.B. Kaliumionen oder Radikalen, Veränderungen in Proteininteraktionen dar. Um mögliche Veränderungen nach osmotischem Stress in *E. coli* zu untersuchen, wurde die Methode der Quervernetzung gewählt. Interaktionen aller Proteine wurden damit unspezifisch fixiert und einer Analyse zugänglich gemacht. Abb. 3.24 zeigt eine Übersicht über das experimentelle Vorgehen. Eine exponentiell wachsende Kultur wurde aufgeteilt, zu einer Hälfte wurde NaCl zugegeben, die andere blieb unbehandelt,

Nach weiterer Inkubation wurde Formaldehyd zur unspezifischen Fixierung der Zellen zugegeben. Formaldehyd ist membrangängig und dient als unspezifisches Quervernetzungs-Agenz. Durch die Zugabe von Formaldehyd werden alle zellulären Prozesse gestoppt. Nach der Fixierung wurden die Zellen aufgeschlossen, sehr große Komplexe und Membranen durch einen Ultrazentrifugationsschritt abgetrennt und der lösliche Zellextrakt weiter verwendet. Die Komplexität des Zellextraktes wurde durch Gelfiltration und Auftrennung in einzelne Fraktionen reduziert. Die erhaltenen Fraktionen wurden sowohl unbehandelt als auch nach Aufheben der Quervernetzung durch Erhitzen analysiert und die Fraktionen der nicht gestressten und osmotisch gestressten Zellen verglichen.

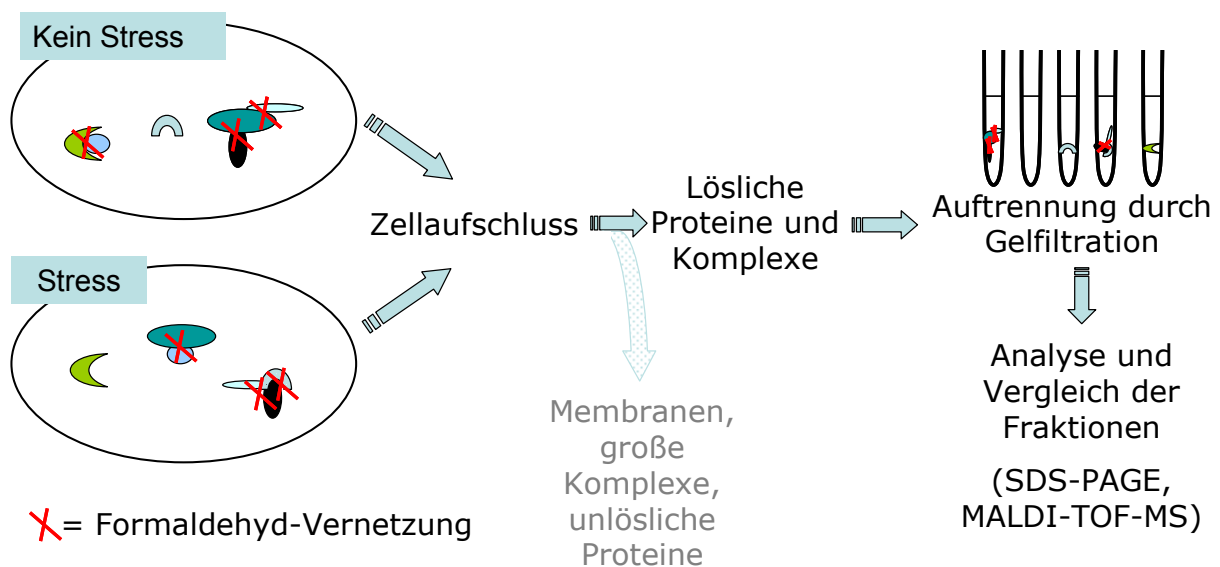


Abb.3.24: Experimentelles Vorgehen zur Untersuchung der Veränderungen der Proteininteraktionen bei osmotischem Stress. Zellen wurden Stress ausgesetzt oder blieben unbehandelt. Dann wurden die Proteininteraktionen durch Zugabe von Formaldehyd fixiert. Nach Präparation des Zellextrakts wurden große Komplexe, Membranen und unlösliche Proteine durch Ultrazentrifugation abgetrennt und der Überstand durch Gelfiltration weiter aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE untersucht und verglichen.

Die Stress- und Fixierungsbedingungen wurden im kleinen Maßstab in Vorversuchen optimiert. Für die Hauptversuche wurden folgende Bedingungen gewählt. Der Stress wurde durch Zugabe von 0,8 M NaCl ausgelöst, und nach einer Inkubation von 3 min wurden die Zellen und damit die Proteininteraktionen mit 1 % (w/v) Formaldehyd für 1 h fixiert. Nach dem Zellaufschluss wurden nur der Überstand mit den löslichen Komplexen und nicht vernetzten Proteinen weiter aufgetrennt und analysiert. Membranständige Komplexe oder sehr große Komplexe bzw. unlösliche Proteine wurden im Weiteren nicht berücksichtigt. Ein typischer Verlauf der Gelfiltration ist in Abb. 3.25 A gezeigt. Die gesammelten Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Es wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt, und mit gleichen Proteinmengen weitergearbeitet. Einen ersten Überblick über die Zusammensetzung der einzelnen löslichen Fraktionen gibt Abb. 3.25 (B und C). Die Auftrennung der quervernetzten

Proben (ohne Auflösung durch Erhitzen) war problematisch und konnte auch mit alternativen Gelsystemen, z.B. einer Agarose-Gelelektrophorese (Warren *et al.*, 2003) nicht überzeugend erreicht werden. Deswegen wurde auf ein niederprozentiges Laemmli-Gelsystem (7,5 %) zurückgegriffen (Abb. 3.25 B und C). Es konnten keine hochmolekularen Komplexe in den ersten proteinhaltigen Fraktionen (8-11) nachgewiesen werden. Diese sind vermutlich nicht in das Gel eingewandert. Die Proteinzusammensetzung der analogen Fraktionen der gestressten (Abb. 3.25 C) und nicht mit NaCl behandelten Zellen (Abb. 3.25 B) war vergleichbar. In einzelnen Fraktionen zeigten sich allerdings Unterschiede in der Menge oder im Vorkommen einzelner Proteine bzw. Komplexe. Durch Aufkochen der Proben in SDS-Probenpuffer wurde die Quervernetzung durch das Formaldehyd aufgehoben. Die Auftrennung dieser Proben erfolgte auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel (Abb. 3.25 D und E). Es zeigte sich im Allgemeinen eine bessere Auftrennung im Vergleich zu den quervernetzten Proben und dadurch weniger Hintergrund. Proteine wurden in den Fraktionen 9-19 nachgewiesen.

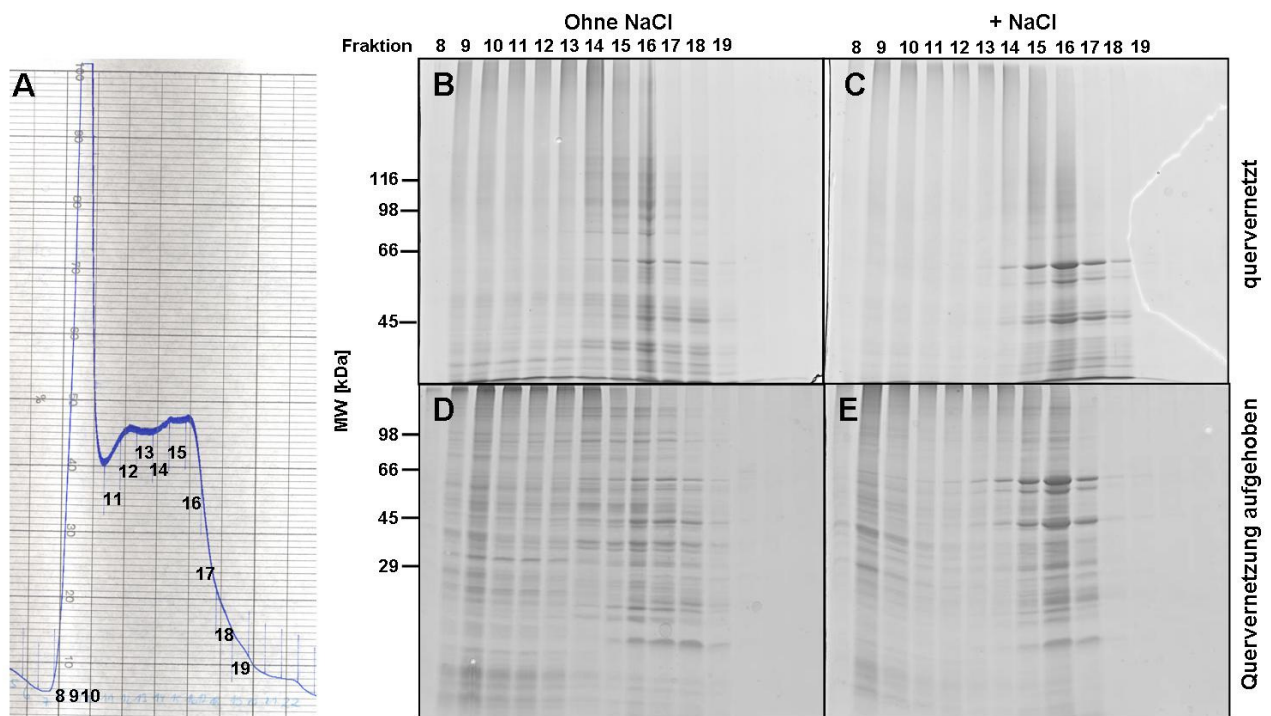


Abb. 3.25: Analyse der Fraktionen der Gelfiltration nach Quervernetzung mit Formaldehyd *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur Mitte der exponentiellen Phase in K10-Minimalmedium kultiviert. Zu einer Kultur wurde 0,8 M NaCl zugegeben, die andere blieb unbehandelt. Nach 3 min Inkubation wurden die Zellen mit 1 % (w/v) Formaldehyd für eine Stunde fixiert, gewaschen, aufgeschlossen und der Zellextrakt durch Gelfiltration (Sephacryl S-400) weiter aufgetrennt. Einen typischer Verlauf der Gelfiltration, verfolgt durch Messung der E_{280} , ist in (A) dargestellt. Aus den gesammelten 10 ml-Fraktionen wurden 50 μ g Protein durch SDS-PAGE [7,5 % (B und C) bzw. 12,5 % (D und E) Laemmli-Gel] analysiert und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Eine Reihe der Fraktionen wurde unbehandelt analysiert (B und C), die andere wurde vor der Gelelektrophorese in Probenpuffer erhitzt und damit die Quervernetzung aufgehoben (D und E). B und D zeigen die Proben der Kontrollzellen, C und E zeigen die Proben aus Zellen, die Salzstress ausgesetzt waren.

Analoge Fraktionen der unterschiedlich behandelten Zellen wurden genauer verglichen und die Proteine von Interesse durch MALDI-TOF-MS identifiziert. Abb. 3. 26 zeigt den direkten

Vergleich der Fraktionen 11, 14, 15 und 17 mit den entsprechenden Identifizierungsdaten. Es wurden Fraktionen mit deutlichen, reproduzierbaren Unterschieden ausgewählt. Es war nicht möglich Proteine im Komplex mit den dazugehörigen Interaktionspartnern zu identifizieren, Möglicherweise wurden diese unzureichend aufgetrennt bzw. schon beim Ultrazentrifugations-schritt abgetrennt. Im direkten Vergleich der ausgewählten Fraktionen war in den Fraktionen, der mit Salzstress behandelten Zellen, die Menge der folgenden Proteine reduziert: ribosomale Proteine L12, S4 und L3 (Fraktion 11), und die Enzyme AceA, TalB, GpmA, Mdh, TktB, Mdh und GapA (Fraktion 14, 15 bzw. 17). In allen Fällen handelt es sich um Bestandteile des zentralen Metabolismus der Zelle oder der Translationsmaschinerie (Tab. 3.5). Die unterschiedlichen Mengen dieser Proteine in den analogen Fraktionen nach wenigen Minuten Salzstress kann zum einen durch Denaturierung und Ausfallen dieser Proteine unter Stressbedingungen oder durch Bildung anderer Interaktionen erklärt werden.

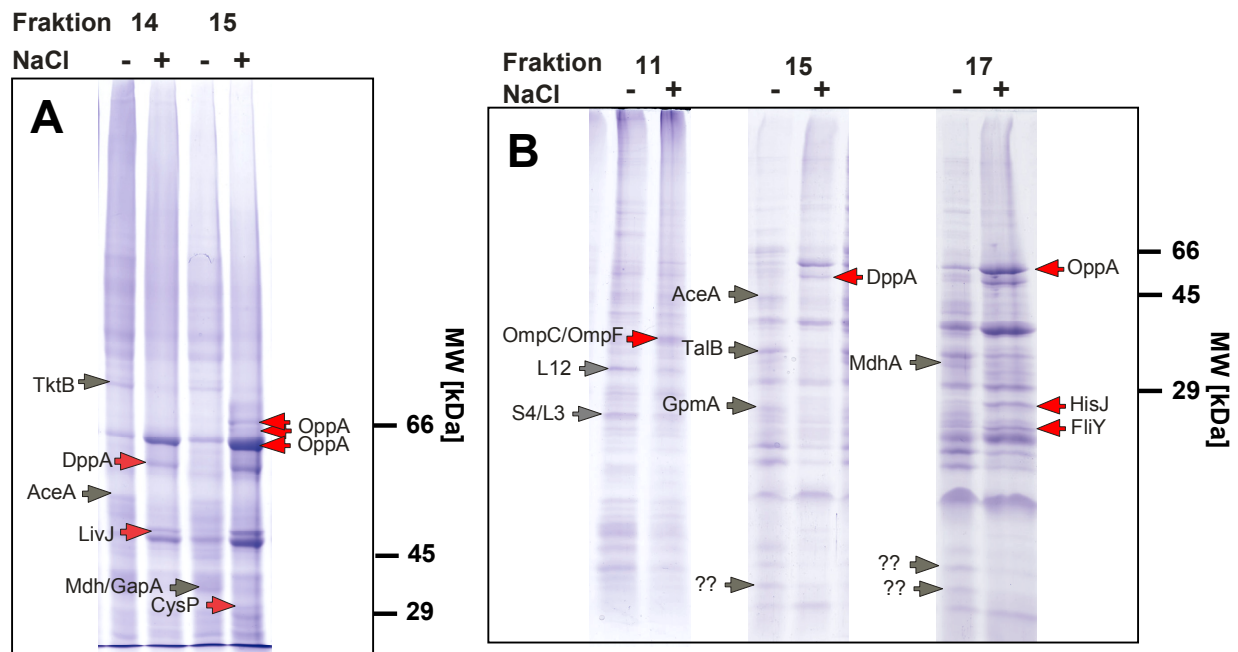


Abb. 3.26: Übersicht der identifizierten Proteine der Fraktionen der Gelfiltration nach Quervernetzung mit Formaldehyd *in vivo*. *E. coli* MG1655 wurde bis zur Mitte der exponentiellen Phase in K10-Minimalmedium kultiviert. Zu einer Kultur wurde 0,8 M NaCl zugegeben, die andere blieb unbehandelt. Nach 3 min Inkubation wurden die Zellen mit 1 % (w/v) Formaldehyd für eine Stunde fixiert, gewaschen, aufgeschlossen und der Zelleextrakt durch Gelfiltration aufgetrennt. Die Fraktionen (je 50 µg Protein) wurden durch SDS-PAGE [7%iges (**A**) bzw. 12,5%iges Gel (**B**)] analysiert. Eine Reihe der Fraktionen wurde unbehandelt analysiert (**A**), die andere wurde vor der Gelelektrophorese in Probenpuffer erhitzt, wodurch die Quervernetzung aufgehoben wurde (**B**). Zum direkten Vergleich wurden jeweils die entsprechenden Fraktionen unbehandelter und behandelter Zellen nebeneinander aufgetragen. Rote Pfeile markieren Proteine, die in den entsprechenden Fraktionen aus mit Salzstress behandelten Zellen verstärkt vorhanden waren. Graue Pfeile, die die in diesen Fraktionen fehlten oder vermindert vorhanden waren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige Proteine verstärkt in den entsprechenden Zellextrakt-Fraktionen von mit Salzstress behandelten Zellen vorhanden waren (Fraktionen 11, 14, 15 und 17). Dabei handelte es sich ausschließlich um Proteine, die im Periplasma oder in der äußeren Membran lokalisiert sind. Identifiziert wurde eine Reihe an Bindeproteinen für

Aminosäuren oder Peptide, HisY, FLiY, LivJ, DppA und OppA, das Bindeprotein für Thiosulfat CysP und die Porine der äußeren Membran OmpC und OmpF. Dies spricht für starke Veränderungen im Periplasma nach osmotischem Stress. Die veränderten Mengen dieser Proteine in den analogen Fraktionen kann durch eine Freisetzung dieser Proteine aus Komplexen oder Assoziationen z.B. mit der Membran oder dem entsprechenden Transporter-Komplex erklärt werden. Veränderte Mengen sind durch die Kürze der Inkubationszeit (3 min) nicht auf Proteinneusynthese zurückzuführen.

Tab. 3.5: Identifizierte Proteine der Interaktionsanalysen.

	Protein	Beschreibung
Proteine, die in den entsprechenden Fraktionen der mit Salzstress behandelten Zellen fehlten bzw. deren Menge reduziert war	L12	Ribosomales Protein
	S4/L3	Ribosomale Proteine
	AceA	Isocitrat-Lyase
	TalB	Transaldolase B
	GpmA	Phosphoglycerat-Mutase 1
	Mdh	Malat-Dehydrogenase
	TktB	Transketolase B
	Mdh/GapA	Malat-Dehydrogenase/Glycerolaldehyd-1-phosphat-Dehydrogenase
Proteine, die in den entsprechenden Fraktionen der mit Salzstress behandelten Zellen in erhöhter Menge vorlagen	HisJ	Periplasmatisches Histidin-bindendes Protein
	FLiY	Periplasmatisches Cystin-bindendes Protein
	LivJ	Periplasmatisches Bindeprotein für Leucin, Isoleucin und Valin
	CysP	Periplasmatisches Thiosulfat-bindendes Protein
	DppA	Periplasmatisches Dipeptid-bindendes Protein
	OppA	Periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein
	OmpC/OmpF	Porine der äußeren Membran

3.4 Veränderungen im Periplasma bei osmotischem Stress

Die durchgeführten Analysen der Interaktionsmuster bei osmotischem Stress zeigten, dass es bei einer großen Anzahl von periplasmatischen Proteinen zu einem veränderten Interaktionsmuster kam. Es ist wenig dazu bekannt, welche Veränderungen im Periplasma vor sich gehen, wenn die extrazelluläre Osmolalität erhöht wird. Um die Veränderungen im Periplasma genauer zu untersuchen und auch mögliche Unterschiede in der Lokalisation der identifizierten Peptid-Bindeproteine OppA und DppA nachzuvollziehen, wurde das „grün

fluoreszierendes Protein“ (GFP) allein oder als Hybridpartner verwendet. Durch N-terminale Fusion mit der Signalsequenz des TAT-Transportsystems kann eine Produktion des Proteins und der Transport in das Periplasma in einer fluoreszierenden Form gewährleistet werden (Santini *et al.*, 2001). Die nachfolgenden Ergebnisse (3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3) wurden von Tobias Bauer im Rahmen seiner Diplomarbeit (Bauer, 2007) erarbeitet, deren experimentelle Arbeiten ich betreut habe.

3.4.1 Nachweis der Plasmolyse durch periplasmatisches GFP (grün fluoreszierendes Protein)

Zuerst wurden die Veränderungen der Lokalisation von freiem GFP im Periplasma untersucht. Dazu wurden die Zellen in LB-Medium kultiviert und die Produktion von RR-GFP ausgelöst. Unter diesen Bedingungen war das Periplasma als intensiv fluoreszierender Ring, der sich deutlich vom Cytoplasma der Zelle abgrenzte, im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen (Abb. 3.27 A). Die Zellen wiesen im Periplasma eine gleichmäßige Fluoreszenz auf. Dies spricht für eine einheitliche Verteilung von GFP unter isoosmotischen Bedingungen. Durch die Zugabe von NaCl (0,3 M) verlagerte sich die Fluoreszenz zu den Polen (Abb 3.27 B). Im Vergleich zu 0,3 M NaCl nahm der fluoreszierende, polare Bereich bei 0,4 M (3.27 C) noch weiter an Größe zu und an der lateralen Seite der Zelle waren anfangende Invaginationen zu beobachten. Dabei war immer ein polarer Bereich vergrößert. Bei einer Endkonzentration von 0,6 M konnten einzelne Einstülpungen an der lateralen Seite der Zellen nachgewiesen werden (3.27 D). Die Anzahl dieser Invaginationen pro Zelle erhöhte sich drastisch und erreichte bei 0,8 M NaCl ein Maximum (3.27 E).

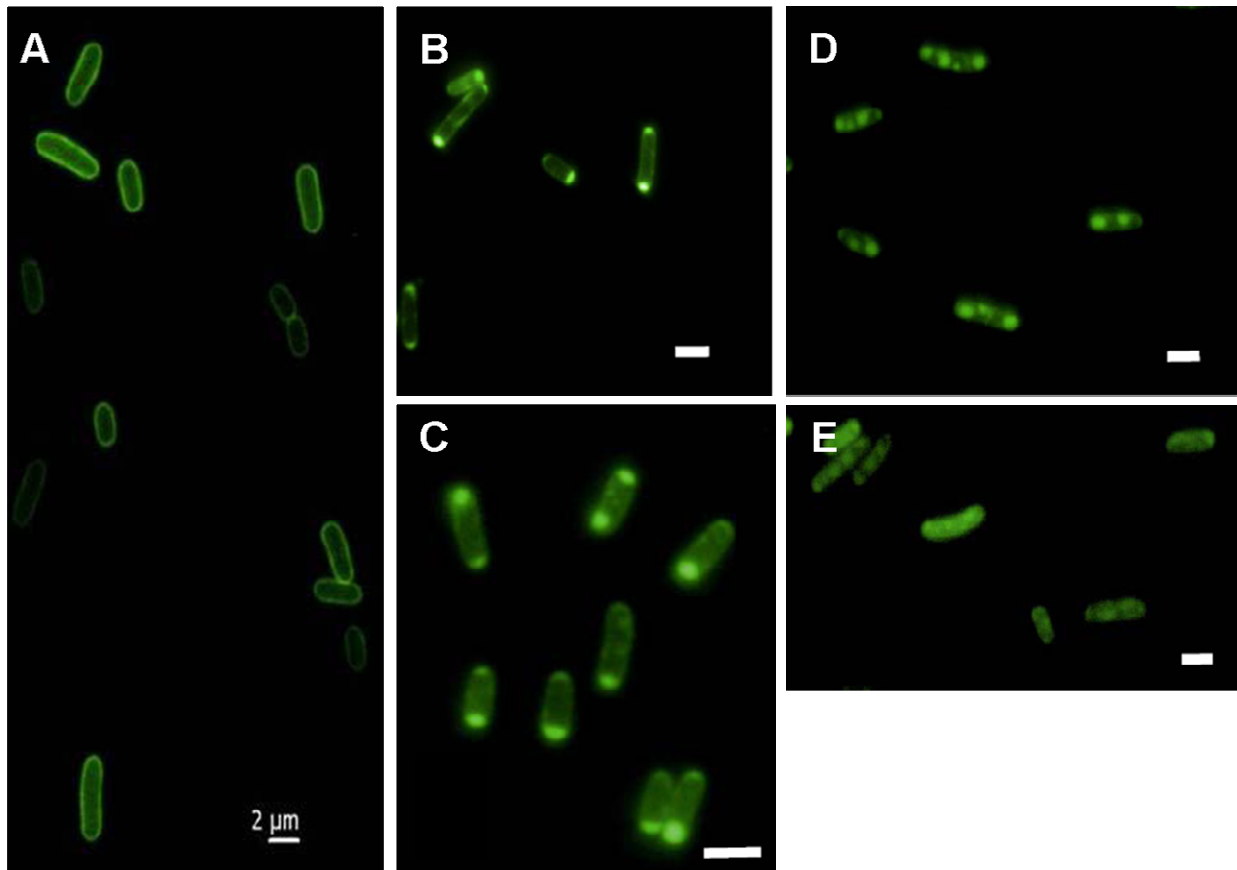


Abb. 3.27: Verlauf der Plasmolyse bei *E. coli* MG1655 sichtbar gemacht durch die Veränderungen der GFP-Verteilung im Periplasma. *E. coli* MG1655 pBAD-RR-*gfp* wurde in LB-Medium kultiviert. Die Produktion von GFP wurde durch Zugabe von Arabinose induziert. 45 min nach Inhibierung der Proteinneusynthese mit Chloramphenicol wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden unbehandelt analysiert (A) oder unmittelbar vor der mikroskopischen Aufnahme NaCl in unterschiedlichen Konzentrationen [0,3 M (B), 0,4 M (C), 0,6 M (D) und 0,8 M (E)] ausgesetzt. Der Balken entspricht 2 μ m. (Bauer, 2007).

3.4.2 Untersuchung der Veränderung der Lokalisation der Peptidbindeproteine OppA und DppA bei osmotischem Stress

Die Lokalisation der Peptidbindeproteine OppA und DppA, die in den Interaktionsanalysen identifiziert worden waren, wurde verglichen. Dazu wurden Plasmide hergestellt, die für entsprechende Hybridproteine mit GFP kodieren (Bauer, 2007).

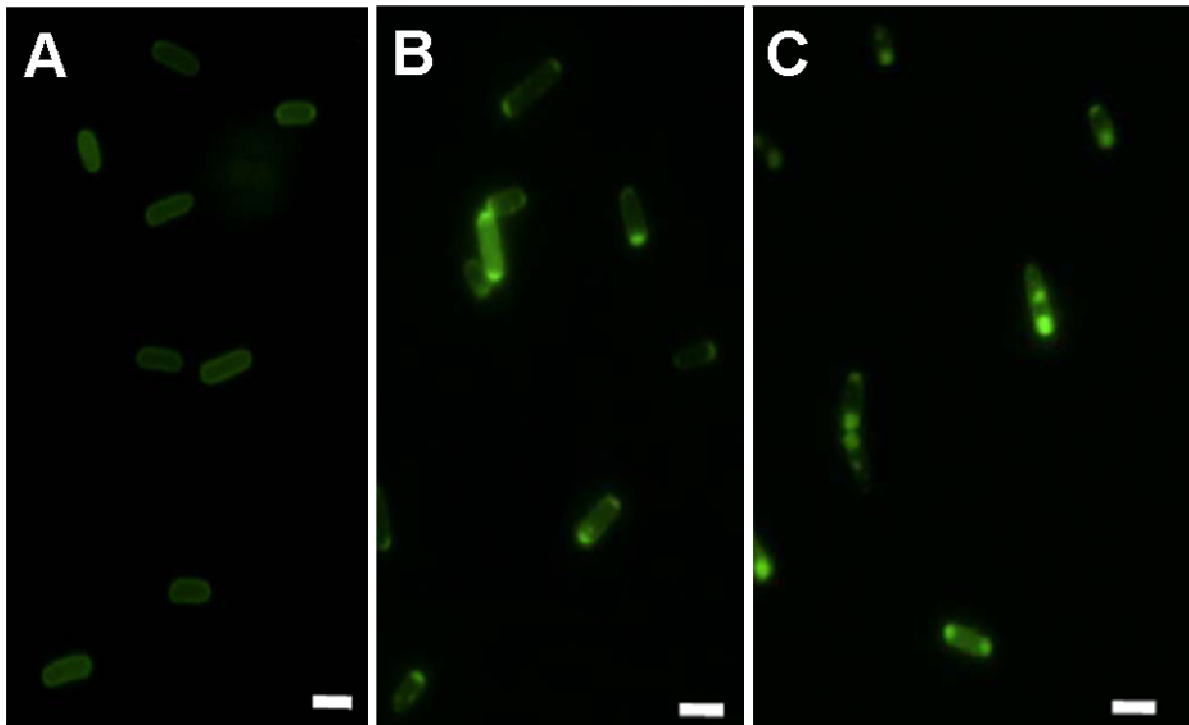


Abb. 3.28: Lokalisation von GFP-OppA in *E. coli* MG1655 pBAD-RR-*gfp-oppA* bei osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 pBAD-RR-*gfp-oppA* wurde in LB-Medium kultiviert. Die Produktion von GFP-OppA wurde durch Zugabe von Arabinose induziert. 45 min nach Inhibierung der Proteinneusynthese mit Chloramphenicol wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden unbehandelt analysiert (A) oder unmittelbar vor der mikroskopischen Aufnahme NaCl in unterschiedlichen Konzentrationen [0,3 M (B) und 0,6 M (C)] ausgesetzt. Der Balken entspricht 2 μ m. (Bauer, 2007).

Zellen von *E. coli* MG1655, die das Hybridprotein GFP-OppA produzieren, wurden analog zu oben beschrieben behandelt. In einem Teil der Zellen mit dem Plasmid pBAD-RR-*gfp-oppA* war das Hybridprotein GFP-OppA polar lokalisiert (Abb. 3.28). Die anderen Zellen zeigten eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz im Periplasma, vergleichbar mit der Verteilung des periplasmatischen GFP ohne NaCl. Bei Salzzugabe (0,3 M) traten, wie auch zuvor beobachtet, Einstülpungen an den beiden Polen auf (Abb. 3.28). Der Großteil der Zellen zeigte das gleiche Erscheinungsbild. Eine Differenzierung zwischen den beiden oben beschriebenen Zelltypen - polare Lokalisierung und gleichmäßige Verteilung des GFP-OppA - war bei dieser erhöhten Osmolalität nicht mehr möglich. Bei 0,6 M NaCl konnte eine Vergrößerung der polaren Einstülpungen sowie kleinere, meist singuläre Einstülpungen der Cytoplasmamembran an der lateralen Seite der Zelle beobachtet werden.

Bei den *E. coli*-Zellen mit dem Hybridprotein GFP-DppA konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop ebenfalls ein gleichmäßiger Ring, vergleichbar zu periplasmatischem GFP allein, beobachtet werden (Abb. 3.29). Eine begrenzte Lokalisation von DppA im Periplasma konnte nicht festgestellt werden. Bei der Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 0,3 M, trat wie bereits beschrieben eine Polarisierung auf. Jedoch ließen sich schon bei dieser Osmolalität an den lateralen Seiten der Zelle punktuelle Stellen mit einer

intensiveren Fluoreszenz erkennen. Bei einer NaCl-Zugabe von 0,6 M zeigten sich im Vergleich zu den Untersuchungen mit periplasmatischem GFP allein, eine größere Anzahl von Invaginationen an der lateralen Seite der Zelle.

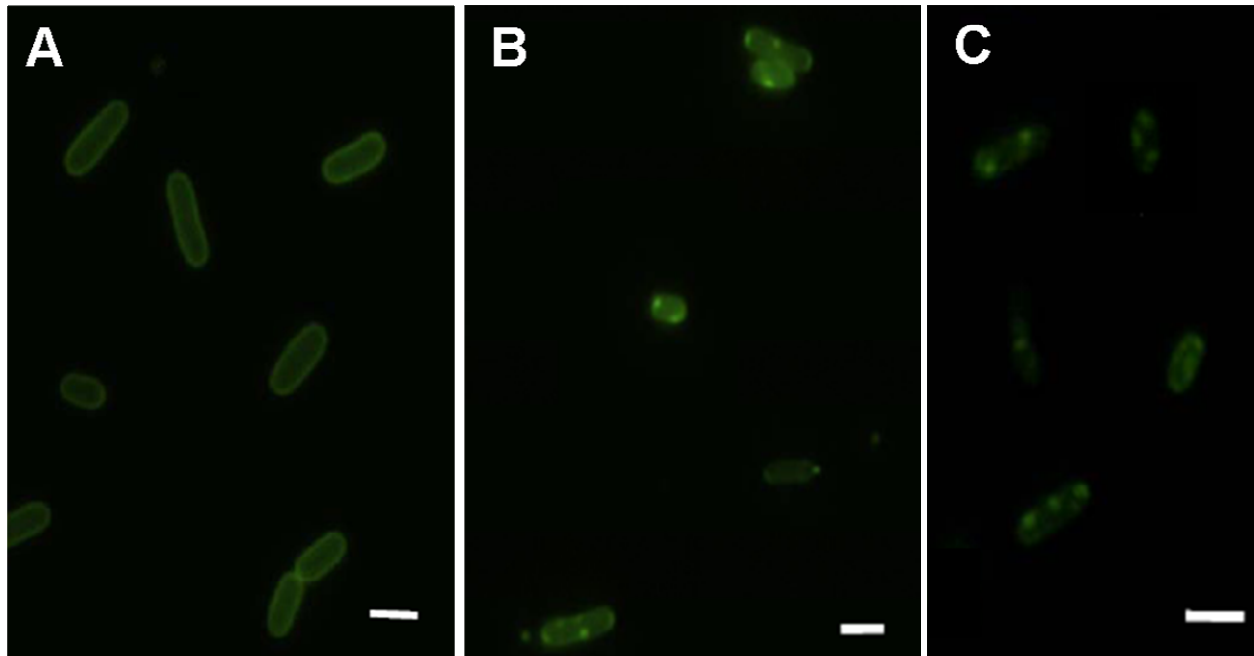


Abb. 3.29: Lokalisation von GFP-DppA in *E. coli* MG1655 pBAD-RR-*gfp-dppA* bei osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 pBAD-RR-*gfp-dppA* wurde in LB-Medium kultiviert. Die Produktion von GFP-DppA wurde durch Zugabe von Arabinose induziert. 45 min nach Inhibierung der Proteinneusynthese mit Chloramphenicol wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden unbehandelt analysiert (A) oder unmittelbar vor der mikroskopischen Aufnahme NaCl in unterschiedlichen Konzentrationen [0,3 M (B) und 0,6 M (C)] ausgesetzt. Der Balken entspricht 2 μ m. (Bauer, 2007).

Insgesamt konnten also nur kleine Unterschiede der Lokalisation der beiden Bindeproteine im Vergleich zur Kontrolle, GFP alleine, festgestellt werden. Trotz allem zeigten beide Proteine tendenziell eine weniger ausgeprägte gleichmäßige Verteilung als GFP.

3.5 Zusammenhang zwischen Radikalbildung und osmotischer Stressantwort

Wie durch die vorher beschriebenen Studien (3.1.1 und 3.1.2) gezeigt werden konnte, beinhaltet die osmotische Stressantwort von *E. coli* eine erhöhte Produktion von Proteinen, die an der Detoxifikation von Sauerstoffradikalen beteiligt sind, oder eine Schutzfunktion gegen diese bieten. Dazu gehören beispielsweise das DNA-bindende Protein Dps, die Hydroxyperoxidase II KatE, OsmC und AhpC. Eine Akkumulation von radikalentgiftenden Enzymen bei osmotischem Stress ist beispielsweise auch in *B. subtilis* zu beobachten (Höper *et al.*, 2006). Es ist ebenfalls bekannt, dass in eukaryotischen Zellen bei osmotischem Stress

verstärkt Radikale gebildet werden, die auch eine regulatorische Funktion ausüben (Zhou *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob ähnliche Mechanismen in *E. coli* greifen, wurde die Radikalbildung bei osmotischem Stress untersucht und die mögliche regulatorische Auswirkung dieser Radikale auf die Stressantwort untersucht.

3.5.1 Nachweis der Radikalbildung

Die Radikalbildung nach einer Erhöhung der externen Osmolarität wurde in lebenden Zellen verfolgt. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff CM-H₂DCFDA verwendet. Dieser reagiert in der Zelle mit Radikalen und wird dadurch fluoreszent. Kontrollexperimente zeigten, dass die Zugabe von NaCl (0,8 M) zu CM-H₂DCFDA in Medium in Abwesenheit von Zellen zu keiner Erhöhung der unspezifischen Oxidation führt (Abb. 3.30 A). Wurden mit dem Farbstoff markierte Zellen osmotisch gestresst, stieg die Fluoreszenz deutlich stärker an. Die Zugabe von Medium ohne NaCl führte nicht zu einer verstärkten Fluoreszenz.

Zehn Minuten nach der Zugabe von NaCl war die Fluoreszenz pro Zelle im Vergleich zu nicht gestressten Kontrollzellen um das 2 bis 3-fache erhöht (Abb. 3.30 B). Eine weitere Erhöhung der Osmolalität (Zugabe von bis zu 0,8 M NaCl) erhöhte die Zahl der produzierten Radikale nur marginal oder gar nicht. Dies spricht für eine Radikalbildung aufgrund des Salzstresses.

Die Zunahme der Fluoreszenz auf einen längeren Zeitraum gesehen (30 min) war nur in aerob kultivierten Zellen bei erhöhten Salzkonzentrationen nachzuweisen (Abb. 3.30 C). Unter anaeroben Bedingungen konnte keine Zunahme beobachtet werden. Allgemein war die Fluoreszenz bei anaeroben Kulturen auch ohne Stress deutlich erniedrigt. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die erhöhte Fluoreszenz bei Salzstress eine Akkumulation von Sauerstoffradikalen nachgewiesen wurde.

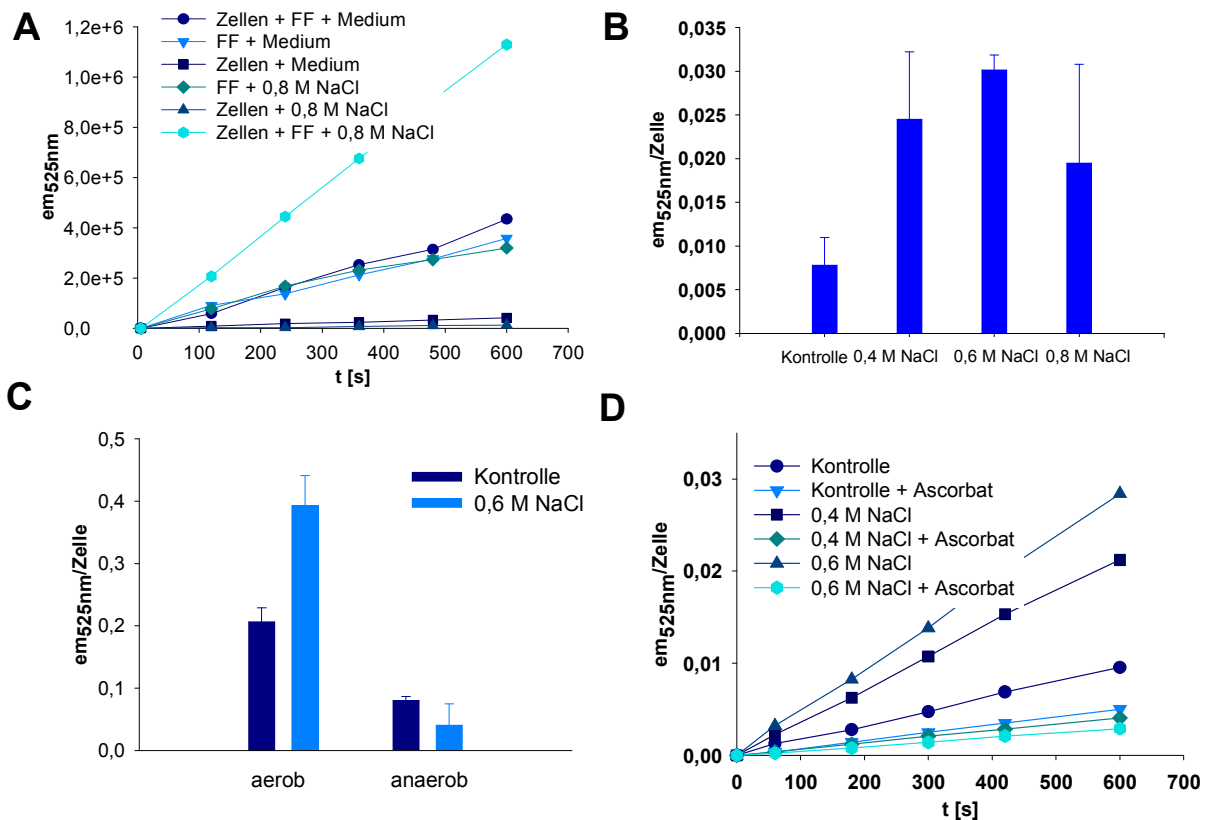


Abb. 3.30: Radikalbildung in *E. coli* MG1655 nach Salzstress. *E. coli* MG1655 wurde in Minimalmedium (K10) bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob kultiviert, auf eine $OD_{600}=0,025$ in vorgewärmtem Medium verdünnt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-H₂DCFDA (10 μ M) für eine Stunde markiert. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe einer NaCl-Lösung oder K10-Minimalmedium wurde in einem Spektrofluorimeter gemessen (A) und auf die Zahl der lebenden Zellen bezogen (B-D). Als Kontrolle wurden Messungen ohne Zellen oder in Abwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes (FF) durchgeführt (A). Messungen wurden 10 min (B) oder nach 30 min (C) nach Zugabe von NaCl oder Medium durchgeführt. Analoge Messungen wurden mit Zellen durchgeführt, die mit Natriumascorbat (10 mM) für 15 min vorbehandelt waren (D). Für die in (C) dargestellten Messungen wurden Zellen, wenn angegeben anaerob kultiviert und analog behandelt.

Um die Radikalbildung zu hemmen, wurde das Antioxidant Ascorbat verwendet. Es ist bekannt, dass dem Medium zugesetztes Ascorbat die Radikalbildung durch die Antibiotika-Substanzklasse der Quinolone in *E. coli* inhibiert (Goswami *et al.*, 2006). Deshalb wurde in den durchgeführten Salzstress-Experimenten Natriumascorbat als Radikalfänger zugesetzt. Wurden die Zellen mit Natriumascorbat vorbehandelt, war die Fluoreszenz, und damit die Radikalzahl, deutlich reduziert. Außerdem verhinderte eine Vorbehandlung mit Natriumascorbat, die verstärkte Radikalbildung nach Zugabe von NaCl (Abb. 3.30 D). Natriumascorbat war auch in der Lage, die transiente Radikalerhöhung in Zellen nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid (5 mM) oder Paraquat (100 μ M) zu verhindern (Daten nicht gezeigt).

3.5.2 Rolle der Radikalbildung während der Salzstressadaptation

Um die Bedeutung der Radikalbildung während des Adaptationsprozesses zu untersuchen, wurden die Wachstumsraten des *E. coli*-Wildtyps MG1655 in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen (bis zu 0,8 M) und mit oder ohne Vorbehandlung mit Natriumascorbat untersucht. Unter diesen Bedingungen konnten keine Unterschiede der Wachstumsraten in Abhängigkeit von Natriumascorbat festgestellt werden. Exemplarisch ist das Wachstum von *E. coli* bei einer Zugabe von 0,4 M NaCl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Abb. 3.31A dargestellt. Allerdings ergab die Untersuchung der Überlebensraten bei extremem NaCl Stress (2 M) einen Unterschied zwischen Zellen, die mit Ascorbat vorbehandelt wurden und Zellen, die unbehandelt blieben. Kontrollzellen überlebten unter diesen Bedingungen deutlich besser, als Zellen die mit dem Radikalfänger Ascorbat vorbehandelt waren (Abb. 3.31B). Dieser Effekt kann nicht auf die Anwesenheit von Ascorbat allein zurückzuführen sein, da ein Kontrollexperiment mit anaerob kultivierten Zellen keine Unterschiede nachwies (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen für eine Bedeutung der Radikalbildung bei der vollständigen Auslösung der osmotischen Stressantwort.

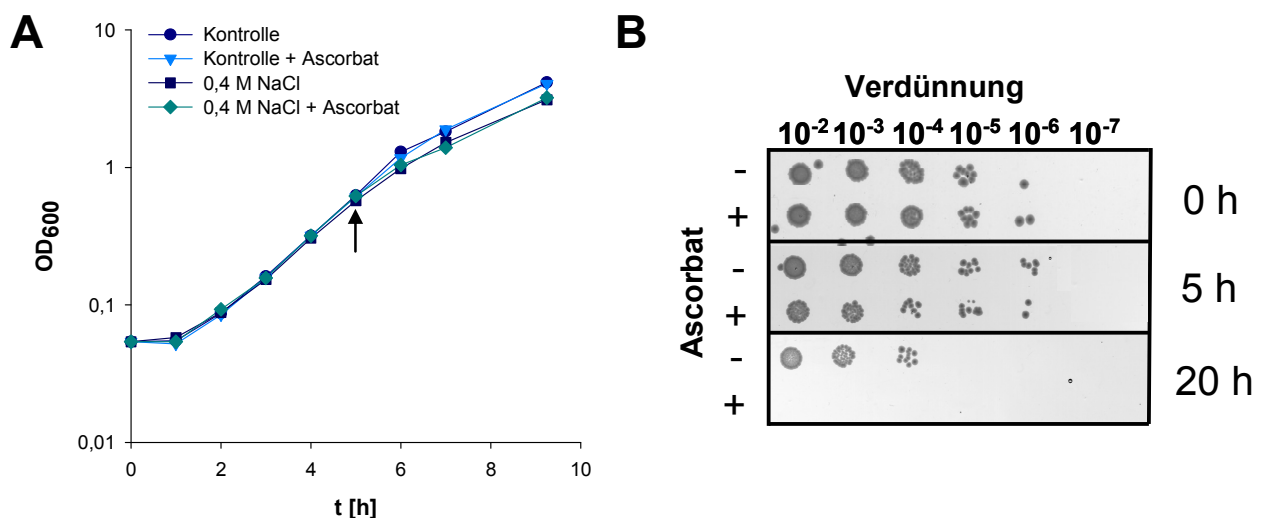


Abb. 3.31: Einfluss von Ascorbat auf das Wachstum und Überleben von *E. coli* in Minimalmedium bei Salzstress unter aeroben Bedingungen. *E. coli* MG1655 wurde aerob in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Dann wurde die Kultur aufgeteilt: eine Hälfte wurde mit Natriumascorbat (10 mM) für 15 min vorbehandelt (+), die andere Hälfte blieb unbehandelt (-). Für die Wachstumsexperimente (A) wurde entweder 0,4 M NaCl zugegeben (Pfeil) oder die Zellen blieben unbehandelt (Kontrolle). Das Wachstum wurde durch Messen der OD₆₀₀ verfolgt. Zum Nachweis der überlebenden Zellen bei extremem Salzstress wurde die Osmolalität durch Zugabe von 2 M NaCl erhöht (B). Proben wurden vorher (0), 5 und 20 h nach der NaCl-Zugabe entnommen. Verdünnungen der Kulturen wurden auf LB-Agarplatten aufgetropft und für einen Tag bei 37 °C inkubiert.

Da die Radikalbildung einen Einfluss auf die Salzstressadaptation zeigte, wurde die Induktion verschiedener osmotisch regulierter Gene in Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit des

Radikalfängers Natriumascorbat untersucht. Dabei wurden bekannte, osmotisch regulierte Gene ausgewählt: *osmY*, *osmC*, *otsA*, *dps*, *proX* und *katE* (s. 3.1; Weber und Jung, 2005). Parallel dazu wurde der Effekt von Ascorbat auf die Geninduktion in Zellen, die mit dem Oxidationsmittel Paraquat behandelt wurden, untersucht. Dadurch sollte zum einen untersucht werden, ob erhöhte Radikalbildung die osmotische Genregulation beeinflusst und zum anderen ob eine erhöhte Radikalkonzentration wie bei oxidativem Stress allein ausreicht, um osmotisch regulierte Gene zu induzieren. In Minimalmedium kultivierte Zellen wurden für 10 min entweder mit 100 µM Paraquat oder mit 0,4 M NaCl in An- oder Abwesenheit von Ascorbat inkubiert. Proben wurden vor dem Stress und nach der Behandlung entnommen. Die RNA wurde präpariert und durch Northern-Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.32). Wie erwartet, induzierte die Erhöhung der externen Osmolarität (0,4 M NaCl) die Transkription der Osmostress-regulierten Gene *osmC*, *osmY*, *otsA*, *proX*, *dps* und *katE* (Weber und Jung, 2005). Die Induktionsrate variierte hierbei von Gen zu Gen. Die Behandlung mit Paraquat verursachte eine Induktion von *osmC* und *dps* um das 2 bzw. 4-fache. Es wurde kein Einfluss von oxidativem Stress auf die Transkriptionsrate der anderen untersuchten osmotisch regulierten Gene nachgewiesen.

Die Hemmung der Radikalbildung durch vorherige Inkubation mit Natriumascorbat führte nach Salzstress zu einer erniedrigten Induktionsrate von *proX*. Ohne Ascorbat wurde *proX* 8-fach induziert, verglichen mit nur einer 6-fachen Steigerung der Transkriptmenge, wenn die Radikalbildung durch Ascorbat inhibiert wurde. Wesentlich schwächere Effekte wurden auf die Transkriptmengen von *osmY*, *dps* und *katE* beobachtet. Analoge Studien zeigten, dass typische, durch oxidativen Stress regulierte Gene des *oxyR*-Regulons, wie *ahpC* und *katG*, oder des *soxRS*-Regulons, wie *sodA*, nicht durch Salzstress induziert wurden. Es kann zusammengefasst werden, dass die erhöhte Radikalbildung die Expression einiger osmotisch regulierter Gene innerhalb der ersten Minuten der Stressantwort leicht erhöht. Die erhöhte Radikalzahl allein führt nicht zur Induktion osmotisch regulierter Gene, genauso wenig wie Salzstress Gene der oxidativen Stressantwort induziert. Eine Ausnahme bildet die *dps*-Transkription, die durch beide Stressbedingungen beeinflusst wurde.

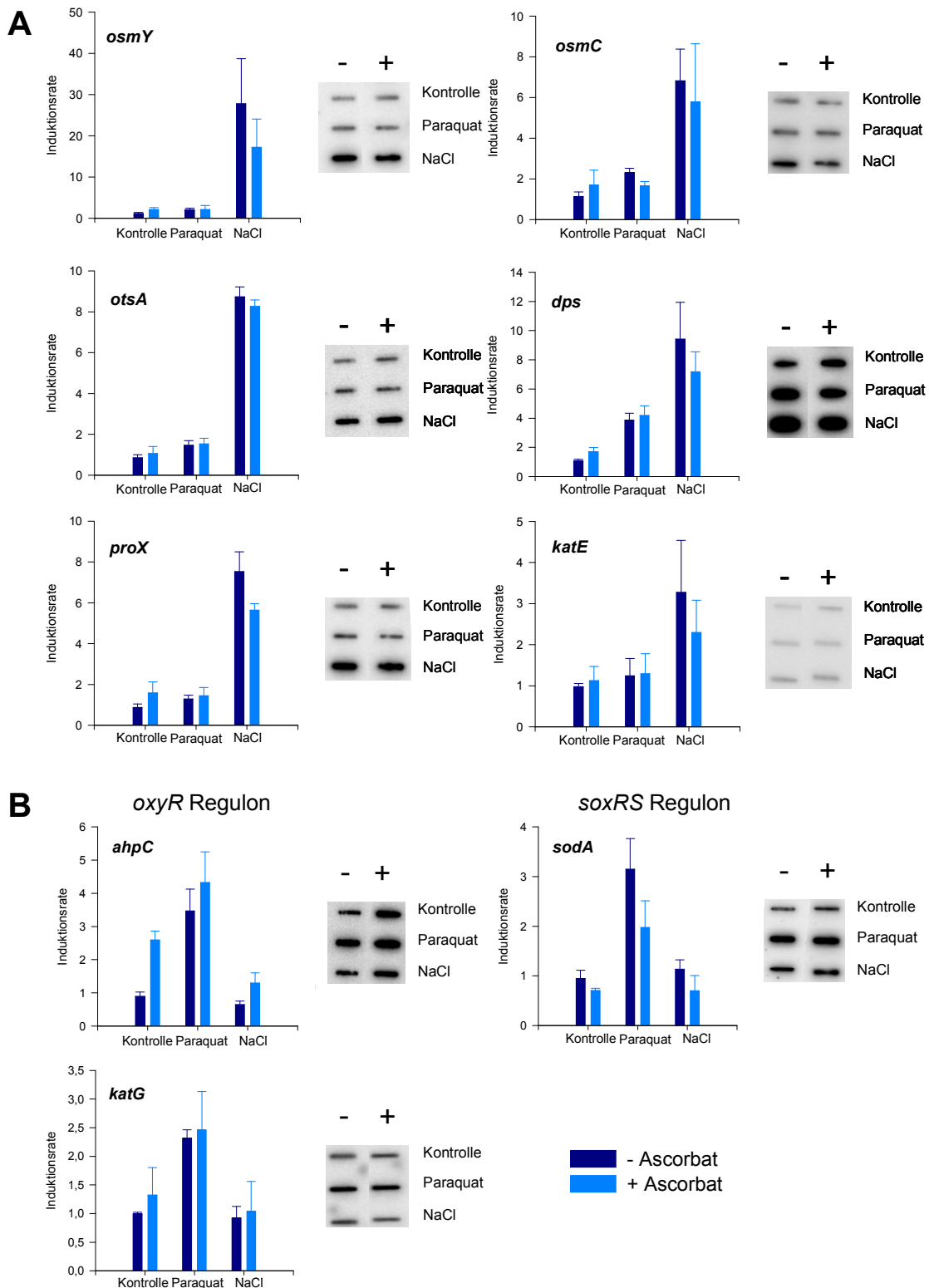


Abb. 3.32: Northern-Blot-Analyse von Genen, die durch osmotischen und oxidativen Stress reguliert werden. *E. coli* MG1655 wurde in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob kultiviert. Dann wurde zur Hälfte der Kulturen Natriumascorbat (10 mM) zugegeben und weitere 15 min inkubiert (entspricht +). Nach der Inkubationszeit wurde entweder 0,4 M NaCl oder 100 μ M Paraquat zugegeben, oder die Kulturen blieben unbehandelt (Kontrolle). Nach weiteren 10 min wurde RNA präpariert und jeweils 2 μ g RNA einer Northern-Slotblot-Analyse unterzogen. Induktionsraten wurden aus der Doppelbestimmung von zwei unabhängigen RNA-Präparationen errechnet. Die transkriptionelle Regulation der osmotisch regulierten (**A**) und der durch oxidativen Stress regulierten Gene (**B**) ist gezeigt.

Der Effekt der Radikalbildung auf die osmotische Stressantwort in der späten Phase der Adaptation wurde durch zweidimensionale Proteomanalyse untersucht. Dazu wurde *E. coli* MG1655 in Minimalmedium kultiviert und für 60 min mit 0,4 M NaCl behandelt. Die erhaltenen Zellextrakte wurden mit denen nicht gestresster Zellen verglichen. Die Untersuchungen wurden in An- und Abwesenheit von Ascorbat durchgeführt. Natriumascorbat zeigte keinen generellen Effekt auf die Akkumulation von Proteinen, von denen schon zuvor eine erhöhte Menge unter osmotischen Stressbedingungen festgestellt wurde (3.1.1 und 3.1.2). Nichtsdestotrotz resultierte die Inhibierung der Radikalakkumulation in einer verringerten Zunahme (1,5 bis 3-fach) von Proteinen des RpoS-Regulons: HchA, HdhA, OsmY und YgaU (Abb. 3.34). Außerdem war auch die Menge des Trehalose-produzierenden Enzyms OtsB, sowie der Proteine unbekannter Funktion Ycel und YciE im Vergleich zu mit Salz inkubierten Zellen ohne Zugabe von Ascorbat reduziert. Andere osmoregulierte Proteine (z.B. AcnA, Dps, PspA, ProX, TktB und OsmC) zeigten keine unterschiedlichen Regulationsmuster unter den getesteten Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Da vor allem Proteine, die Teil des RpoS-Regulons sind, eine unterschiedliche Regulation in Abhängigkeit der Radikalakkumulation zeigten, wurden eine quantitative Immunoblot-Analyse des RpoS-Gehaltes von gestressten Zellen in An- und Abwesenheit von Ascorbat durchgeführt. Dabei wurden verschiedene NaCl-Konzentrationen verwendet (0,4 M, 0,8 M und 2 M). Die Ergebnisse wiesen keine Korrelation zwischen der Radikalbildung und der RpoS-Menge nach. Zugabe von Ascorbat änderte die RpoS-Menge und den Verlauf der RpoS-Akkumulation nicht (Daten nicht gezeigt).

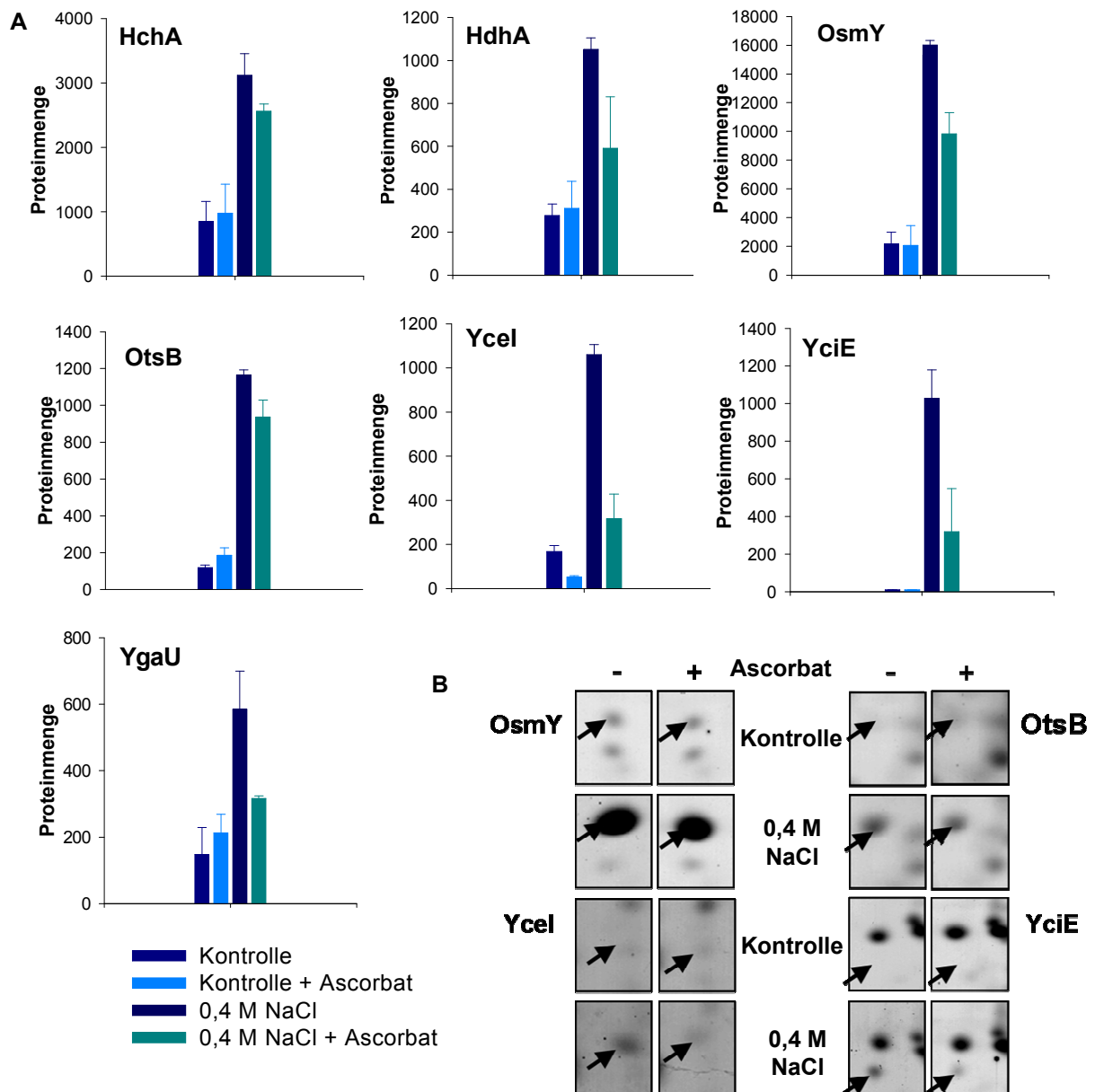


Abb. 3.34: Einfluss der Inhibierung der Radikalbildung durch Ascorbat auf Proteomveränderungen nach osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 wurde in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob kultiviert. Zur Hälfte der Kulturen wurde Natriumascorbat 15 min vor Setzen des Stresses in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben (+/-). Die Osmolalität wurde durch Zugabe von 0,4 M NaCl erhöht. Proben wurden vor der NaCl-Zugabe und 60 min danach entnommen, aufbereitet und durch zweidimensionale Elektrophorese analysiert. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Die Quantifizierungsdaten ausgewählter Proteine sind in (A) aufgetragen. Es wurden pro Bedingung zwei unabhängige Kulturen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit absoluten Abweichungen. Die entsprechenden Gelausschnitte ausgewählter Proteine sind in (B) gezeigt.

3.5.3 Osmoadaptation in Katalase- und Superoxiddismutase-Mutanten

Sauerstoffradikale werden in Zellen durch die Aktivität detoxifizierender Enzyme wie Katalase und Superoxid-Dismutase abgebaut. Um den Zusammenhang zwischen der Bildung von Sauerstoffradikalen und der Resistenz gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen auf eine andere Art und Weise zu untersuchen, wurden mehrere Katalase- und Superoxid-Dismutase-defiziente Stämme hinsichtlich ihrer osmotischen Stressresistenz getestet. Die *katE*-Einzelmutante (SK6) und die *katE-katG*-Doppelmutante (QC2476) zeigten eine 1,5-fach erhöhte Wachstumsrate in Minimalmedium nach Zugabe von 0,6 M NaCl im Vergleich zum isogenen Wildtyp MG1655 (Abb. 3.35A). *E. coli* QC6083 trägt Mutationen in den Katalase-kodierenden Genen *katE* und *katG* und in den Genen *sodA* und *sodB*, die für Superoxid-Dismutasen kodieren. Der Stamm QC6083 konnte in diese Untersuchungen nicht einbezogen werden, da er ausgeprägte Wachstumsdefekte in Minimalmedium aufweist (Imlay und Fridovich, 1992; diese Arbeit). Um die Osmoadaptation in diesem Stamm zu testen, wurde zusätzlich die Salzresistenz aller Stämme in LB-Komplexmedium untersucht.

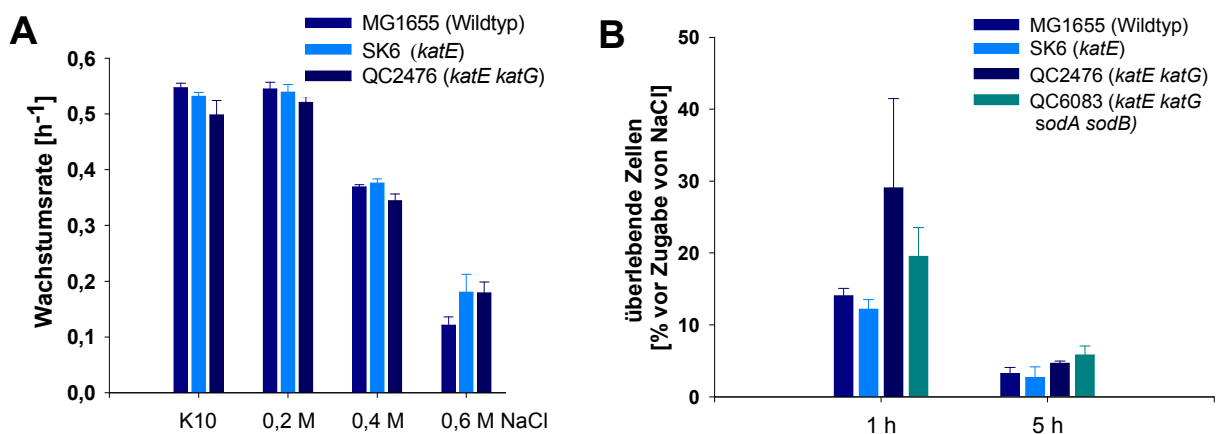


Abb. 3.35: Erhöhte Salzresistenz von Katalase- und Superoxid-Dismutase Mutanten. *E. coli* MG1655, SK6 (*katE::Cm^R*) und QC2476 (*katE::Tn10 katG::Tn10*) wurden in Minimalmedium bis zu einer $OD_{600}=0,6$ kultiviert. Dann wurde NaCl in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Wachstumsraten wurden nach erneutem Einsetzen von exponentiellem Wachstum bestimmt (A). Um die Überlebensfähigkeit der Stämme MG1655, SK6 (*katE::Cm^R*), QC2476 (*katE::Tn10 katG::Tn10*) und QC6083 (*katE::Tn10 katG::Tn10 sodA49 sodB::MudPR3*) bei extremem Salzstress zu quantifizieren, wurden diese Stämme in LB-Medium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Dann wurden 3 M NaCl zugegeben und Proben vor und zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe (1 und 5 h) entnommen. Die Proben wurden verdünnt und ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten zu zählen. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde auf die Zahl der lebenden Zellen vor Zugabe von NaCl bezogen (100 %) (B).

Die Stämme QC2476 und QC6083 zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber 3 M NaCl in LB-Medium im Vergleich zum parental Stamm MG1655 (Abb. 3.35 B). Nach einer Stunde extremem Salzstress waren noch 20-30 % der Zellen dieser Stämme fähig eine Kolonie auf LB ohne zusätzliches NaCl auszubilden. Beim Wildtyp überlebten nur 15 % diese Behandlung. Im Gegensatz zu den Wachstumsexperimenten auf Minimalmedium konnte in Komplexmedium kein Vorteil des Stammes SK6 gegenüber dem Wildtyp bei Salzstress beobachtet werden. Die

Hemmung der Radikalbildung durch die vorherige Inkubation der Mutanten-Stämme mit Ascorbat hatte die gleichen Effekte auf das Überleben wie bereits beschrieben (3.5.2, Daten nicht gezeigt).

3.6 Bedeutung von *TreF* bei der Regulation der intrazellulären Trehalosekonzentration

Die Akkumulation von Trehalose ist entscheidend für eine erfolgreiche Adaptation von *E. coli* an erhöhte Osmolalitäten. Die Synthese der Trehalose wird durch die Enzyme OtsA und OtsB katalysiert (Giaever *et al.*, 1988). *E. coli* besitzt außerdem die osmotisch regulierte, intrazelluläre Trehalase TreF (Horlacher *et al.*, 1996). Wie unter 3.1.1 und 3.1.5 gezeigt wurde, wird die Regulation von TreF nicht nur durch erhöhte Osmolarität beeinflusst, sondern auch durch andere Faktoren, wie aerobe und anaerobe Bedingungen oder die Anwesenheit des kompatiblen Solutes Glycinbetain. In Anwesenheit dieses Solut war TreF eines der wenigen osmotisch induzierbaren Proteine, das, im Vergleich zu Bedingungen ohne kompatible Solute, aerob verstärkt gebildet wurde. Um den Einfluss von TreF auf die Osmoadaptation und vor allem auf die Trehalose-Akkumulation zu untersuchen, wurden Experimente mit dem Stamm SKRHo60, in dem *treF* inaktiviert ist, durchgeführt. Wachstumsstudien zeigten einen Wachstumsvorteil von SKRHo60 gegenüber dem isogenen Wildtyp in Minimalmedium nach Zugabe von 0,6 M NaCl (Abb. 3.36). Während nach Zugabe des kompatiblen Solutes Glycinbetain zu Kulturen des Wildtyps eine Erhöhung der Wachstumsrate zu beobachten war, zeigte der Mutantenstamm keine weitere Wachstumsstimulation. Die beiden Stämme zeigten bei Zugabe von Glycinbetain das gleiche Wachstumsverhalten.

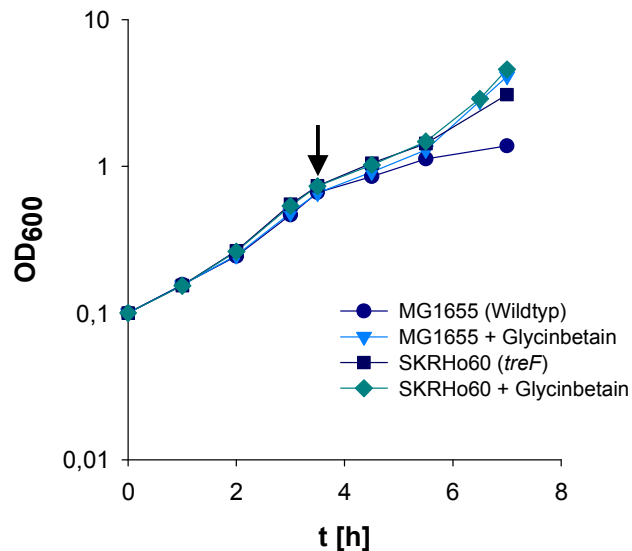


Abb. 3.36: Wachstum von *E. coli* MG1655 und SKRHo60 in Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose]. Die *E. coli* Stämme wurden aerob in K10-Minimalmedium kultiviert. In der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,6 M zugegeben (Pfeil). Wenn Glycinbetain zugegeben wurde, erfolgte dies zum gleichen Zeitpunkt wie die NaCl-Zugabe in einer Konzentration von 10 mM. Das Wachstum wurde durch Messen der OD₆₀₀ verfolgt.

Da TreF als intrazelluläre Trehalase die Trehalose-Akkumulation in der Zelle bei Salzstress beeinflussen könnte, wurden zeitabhängige Trehalosemessungen durchgeführt (Abb. 3.37). In Minimalmedium akkumulierte im *E. coli*-Wildtyp MG1655 nach Zugabe von 0,6 M NaCl Trehalose (3.37 A). Nach 60 min wurde eine Trehalosemenge von etwa 0,15 μmol Trehalose/mg Protein erreicht. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich keine signifikante Veränderung dieses Wertes, wobei die gemessenen Trehalosemengen 180 min nach Zugabe von NaCl stark streuten. Ein immunologischer Nachweis von TreF ergab eine Akkumulation des Enzyms in den ersten 120 min nach Zugabe von NaCl (Abb. 3.37B). Danach änderte sich die Menge nicht mehr. In der *treF*-Mutante konnte ein anderes Muster der Trehaloseakkumulation detektiert werden (Abb. 3.37A). 120 min nach Zugabe von NaCl waren die Trehalosemengen im Vergleich zum Wildtyp um mindestens das Doppelte erhöht. Auch bei diesen Kulturen streuten die gemessenen Trehalosemengen 180 min nach Zugabe von NaCl stark. Der größte Unterschied in den Trehalosemengen in Mutante und Wildtyp wurde also nach 120 min Salzstress nachgewiesen. Dies stimmte genau mit dem Zeitpunkt überein, bei dem die maximale Menge von TreF im Wildtyp erreicht wurde (Abb. 3.37A und B).

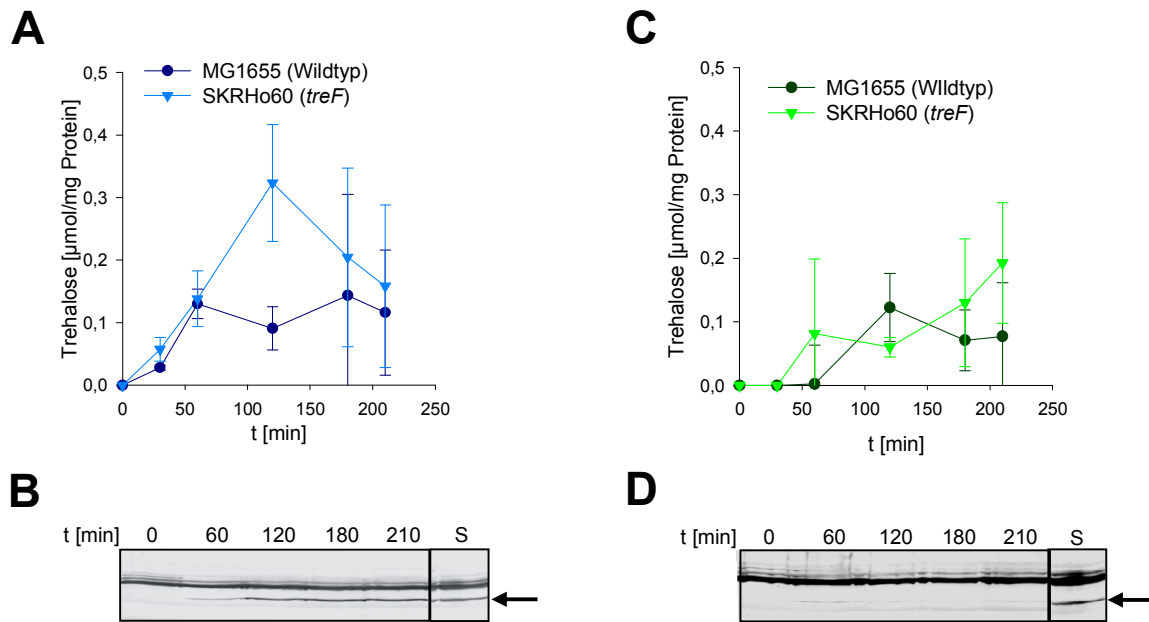


Abb. 3.37: Zeitliche Veränderungen des intrazellulären Trehalosegehaltes und der Menge der cytoplasmatischen Trehalase TreF nach osmotischem Stress. *E. coli* MG1655 (Wildtyp) und SKRHo60 (*treF*) wurden in K10-Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose] bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob (A und B) oder anaerob (C und D) inkubiert. Es wurden 0,6 M NaCl zugegeben, Proben entnommen und der Trehalosegehalt bestimmt (A und C). In analog erhaltenen Proben (25 μg Protein) von *E. coli* MG1655 wurde TreF durch Immunoblot mit TreF-Antiserum nachgewiesen (B und D). Die Pfeile markieren TreF (S: interner Standard).

Wurden analoge Messungen mit Proben aus Kulturen durchgeführt, die in Abwesenheit von Sauerstoff kultiviert wurden (Abb. 3.37C), zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Trehalose-Akkumulation der beiden getesteten Stämme. Beim Wildtyp setzte die Trehaloseakkumulation im Vergleich zu aeroben Bedingungen später ein. Trehalose wurde erst 120 min nach NaCl-Zugabe nachgewiesen. Die absoluten Werte des Wildtyps waren mit den Werten in Gegenwart von Sauerstoff vergleichbar. Die für die *treF*-Mutante bestimmten Werte entsprachen denen des Wildtyps. Durch Immunoblot konnte nur eine sehr schwache Akkumulation von TreF im Wildtyp unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 3.37D).

Weiterhin wurde der Einfluss des kompatiblen Solutes Glycinbetain auf den Trehalosegehalt und die zelluläre Menge von TreF näher untersucht. Dazu wurde Glycinbetain (10 mM) gleichzeitig mit 0,6 M NaCl zu den Kulturen gegeben (Abb. 3.38). Unter aeroben Bedingungen war sowohl im Wildtyp wie auch in der *treF*-Mutante eine sehr schwache Trehaloseakkumulation nachweisbar (Abb. 3.38A). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Stämmen. Durch immunologischen Nachweis von TreF im Wildtyp wurde eine Produktion von TreF bereits nach 60 min Stress detektiert (Abb. 3.38B)

Unter anaeroben Bedingungen waren die Effekte anders. Im Wildtyp konnte eine schwache, transiente Akkumulation von Trehalose nachgewiesen werden (Abb. 3.38 C). Die maximal erreichten Mengen waren mit denen ohne Glycinbetain-Zugabe vergleichbar. In der Mutante waren deutlich höhere Mengen des Disaccharids vorhanden. Nach 180 min wurde ein Wert von

etwa 0,28 μmol Trehalose/mg Protein bestimmt. Im Wildtyp konnte bei Zugabe von Glycinbetain auch unter anaeroben Bedingungen eine Akkumulation der cytoplasmatischen Trehalase TreF nach 120 min nachgewiesen werden (Abb. 3.38 D).

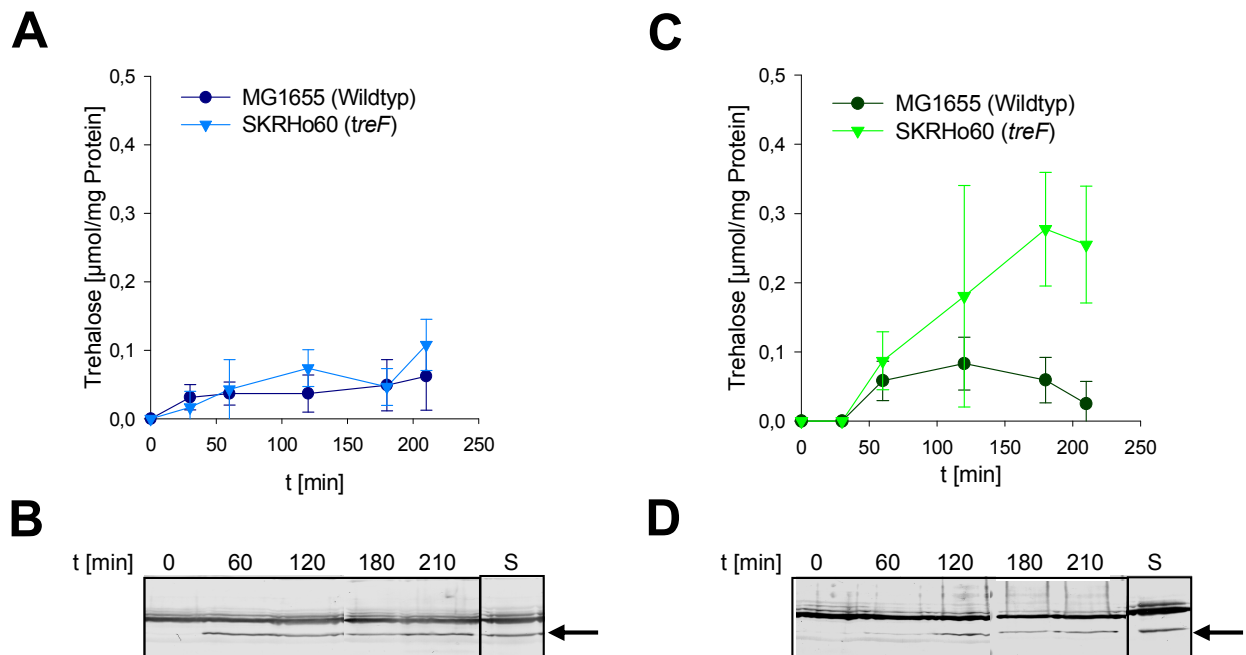


Abb. 3.38: Zeitliche Veränderungen des intrazellulären Trehalosegehaltes und der Menge der cytoplasmatischen Trehalase TreF nach osmotischem Stress in Anwesenheit des kompatiblen Solutes Glycinbetain. *E. coli* MG1655 (Wildtyp) und SKRHo60 (*treF*) wurden in K10-Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose] bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob (A und B) oder anaerob (C und D) inkubiert. Es wurden 0,6 M NaCl und gleichzeitig 10 mM Glycinbetain zugegeben, Proben entnommen und der Trehalosegehalt bestimmt (A und C). In analog erhaltenen Proben (25 μg Protein) von *E. coli* MG1655 wurde TreF durch Immunoblot mit TreF-Antiserum nachgewiesen (B und D). Die Pfeile markieren TreF(S: interner Standard).

Um die Unterschiede in der TreF-Akkumulation genauer vergleichen zu können, wurden die Immunoblots quantifiziert (Abb. 3.39). Dadurch konnte gezeigt werden, dass unter aeroben Bedingungen TreF nach Zugabe von NaCl um den Faktor 10 zunahm (Abb. 3.39A). Es wurde nach etwa zwei Stunden ein Plateau erreicht. Durch Zugabe von Glycinbetain beschleunigte sich die Akkumulation. Der maximale Wert wurde bereits nach 60 min erreicht. Unter anaeroben Bedingungen konnte eine TreF-Produktion nur in Gegenwart von Glycinbetain gezeigt werden (Abb. 3.39B). Diese setzte erst nach 60 min ein. Allerdings waren die TreF-Mengen auch in Gegenwart des kompatiblen Solut nur etwa halb so groß wie unter aeroben Bedingungen.

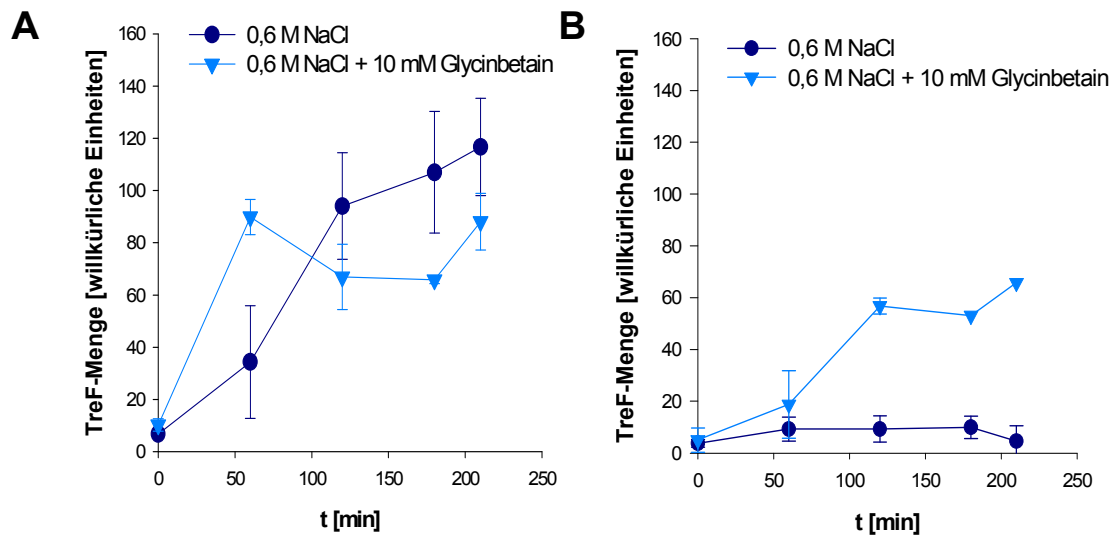


Abb. 3.39: Quantifizierung der zeitlichen Veränderung der TreF-Menge nach osmotischem Stress in An- oder Abwesenheit von Glycinbetain. *E. coli* MG1655 (Wildtyp) wurde in K10-Minimalmedium [0,4 % (w/v) Glukose] bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob (A) oder anaerob (B) inkubiert. Es wurden 0,6 M NaCl und zur Hälfte der Kulturen 10 mM Glycinbetain zugegeben, Proben entnommen und durch Immunoblot mit TreF-Antiserum TreF nachgewiesen. Die Quantifizierung von mindestens drei unabhängigen Experimenten bezogen auf einen internen Standard ist dargestellt.

3.7 Bedeutung identifizierter Proteine bei der Osmoadaptation

Im Verlauf dieser Arbeit ergaben sich zahlreiche neue Erkenntnisse über die an der Osmostressantwort beteiligten Proteine. Um die Funktion dieser Proteine näher zu untersuchen, wurden von einigen dieser Proteine Deletionsmutanten hergestellt und diese näher phänotypisch charakterisiert. Die Herstellung der Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe des „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kits“ von Gene Bridges wie in Material und Methoden beschrieben. Dabei wurden die Deletionsmutanten von *oppA* und *dppA* im Zuge dieser Arbeit erstellt (Stämme SK2-5), während die Deletionsmutanten für die Gene *hdhA*, *ycel*, *ygaU*, *yjbJ*, *yciG*, *osmY*, *yciE*, *yciF* und *yciG* im Rahmen einer Diplomarbeit (Hofer, 2007) hergestellt wurden. Alle diese Mutanten wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unter verschiedensten Stressbedingungen, der Fähigkeit zur Bewegung und Biofilmbildung und anderer Phänotypen untersucht und mit dem isogenen Wildtyp MG1655 verglichen (Hofer, 2007; Bauer, 2007). Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich bei zwei Deletionen ein unterschiedlicher Phänotyp. Dabei handelte es sich um die Deletionen von *hdhA* und *dppA*.

3.7.1 Phänotypische Charakterisierung der *dppA*-Mutante

Durch Untersuchungen der Veränderungen der globalen Proteininteraktionen direkt nach Salzstress wurden Veränderungen im Periplasma nachgewiesen (s. 3.3). Dabei wurde das periplasmatische Dipeptidbindeprotein identifiziert. Sowohl die Deletion des für das

Dipeptidbindeprotein kodierenden Gens *dppA* (Stamm SK3) als auch die Unterbrechung des offenen Leserahmens des gesamten *dpp*-Operons, und damit das Fehlen des gesamten Transporters Dpp durch Einsetzen einer Resistenzkassette (Stamm SK2), resultierte in mehreren Veränderungen des Phänotyps. Die Untersuchungen zum Phänotyp wurden von Tobias Bauer im Rahmen seiner Diplomarbeit (Bauer, 2007) erarbeitet, deren experimentelle Arbeiten ich betreut habe.

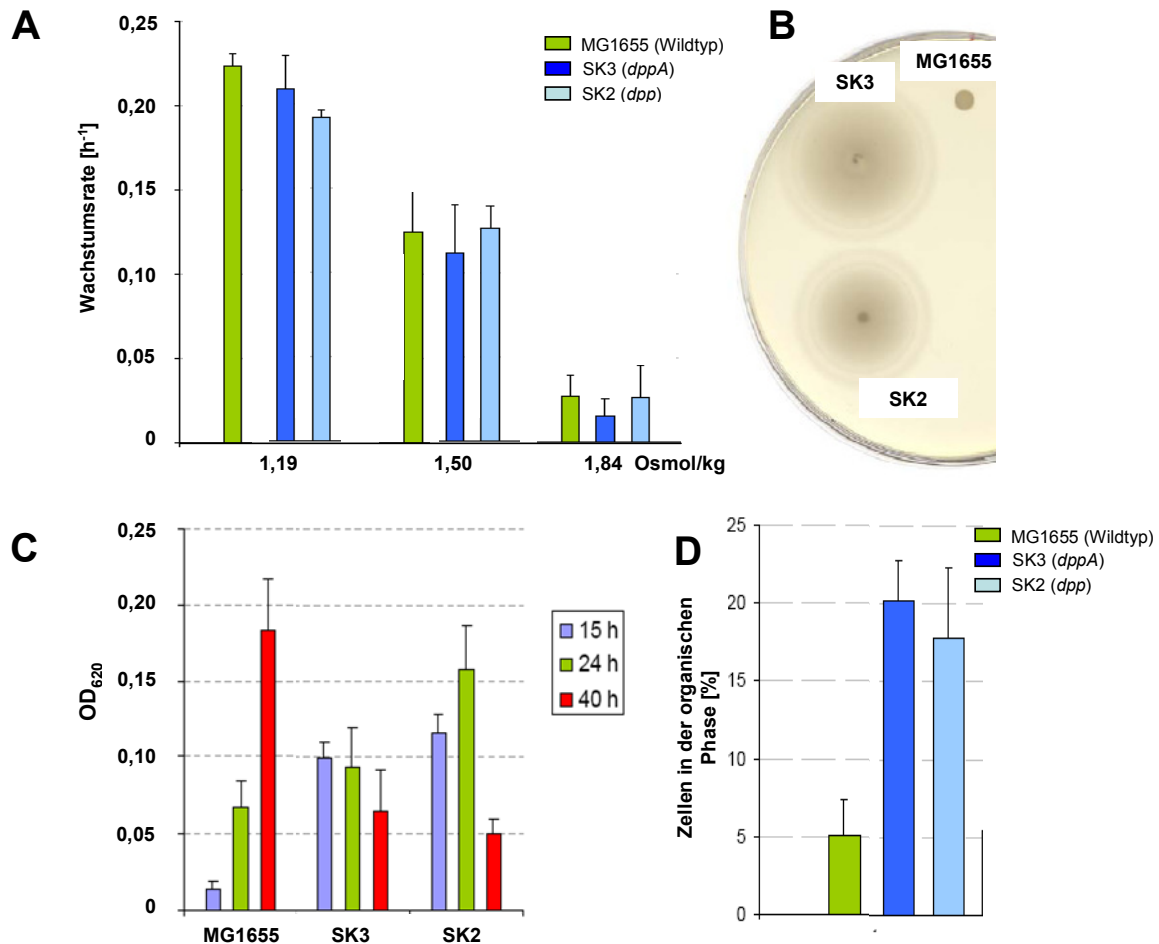


Abb.

3. 40: Phänotypische Untersuchungen der Stämme *E. coli* MG1655 (Wildtyp), SK2 (*dpp*) und SK3 (*dppA*). Wachstumsraten auf K10-Minimalmedium dem verschiedene Mengen NaCl zugesetzt wurden. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Die Osmolalität der Medien wurde im Osmometer bestimmt (A). Beweglichkeit auf LB-Weichagar [0,3 % (w/v) Agar]. Es wurde jeweils 1 µl einer OD₆₀₀=1 auf die Platten aufgetropft und für 8 h bei 37 °C inkubiert (B). Zeitliche Untersuchung der Biofilmbildung. Zur Quantifizierung der Biofilmbildung wurde der an der Plastikoberfläche gebildete Biofilm in LB-Medium mit Kristallviolett gefärbt. Das an den Zellen haftende Kristallviolett wurde durch Lösen in Ethanol und Absorptionsmessung bei 620 nm quantifiziert (C). Untersuchung der Hydrophobizität durch Nachweis der Affinität zu Xylol. Prozentualer Anteil der Zellen, der nach der Inkubation mit Xylol in der organischen Phase vorhanden war. Die Bestimmung erfolgte durch Messung der OD₆₀₀ in der wässrigen Phase vor und nach Xylolbehandlung (D). Alle Werte ergaben sich aus 3 unabhängigen Versuchen (Bauer, 2007).

Das Fehlen des Dipeptidbindeproteins hatte keine Auswirkungen auf die Wachstumsraten in Medium mit verschiedenen Osmolalitäten (Abb. 3.40A). Die Osmoadaptation war also nicht beeinträchtigt. Allerdings verursachte das Fehlen von DppA veränderte Oberflächeneigenschaften der Zellen. Die Stämme SK2 und SK3 begannen auf Weichagar-Platten schon nach wenigen Stunden zu schwimmen, während dies beim Wildtyp erst nach der

Koloniebildung der Fall war (Abb. 3.40B). Auch war das Einsetzen der Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp zeitlich vorverlagert (Abb. 3.40C). Bereits nach 15 h war ein Biofilm durch Kristallviolettfärbung nachzuweisen. Beide Effekte lassen sich durch die nachgewiesene, erhöhte Hydrophobizität der beiden Stämme im Vergleich zum Ausgangsstamm erklären (Abb. 3.40D).

3.7.2 Phänotypische Charakterisierung der *hdhA*-Mutante

HdhA katalysiert *in vitro* die Oxidation von Gallensäuren, die eine α -Hydroxylgruppe an Position C7 des Steroidgerüsts besitzen (Yoshimoto *et al.*, 1991). Die mögliche Funktion dieser enzymatischen Funktion bei der osmotischen Stressreaktion in *E. coli* ist bis jetzt unklar. Wie unter 3.1 gezeigt wurde, wird HdhA unter osmotischen Stressbedingungen hochreguliert.

Nach Austausch des *hdhA*-Gens durch eine Resistenzkassette (Stamm VH1), konnte eine Veränderung des Phänotyps beobachtet werden (Hofer, 2007). Diese Veränderungen betrafen die Beweglichkeit und die Fähigkeit zur Biofilmbildung. Es war sowohl die Beweglichkeit als auch die Biofilmbildung um den Faktor 2-3 im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Abb. 3.41).

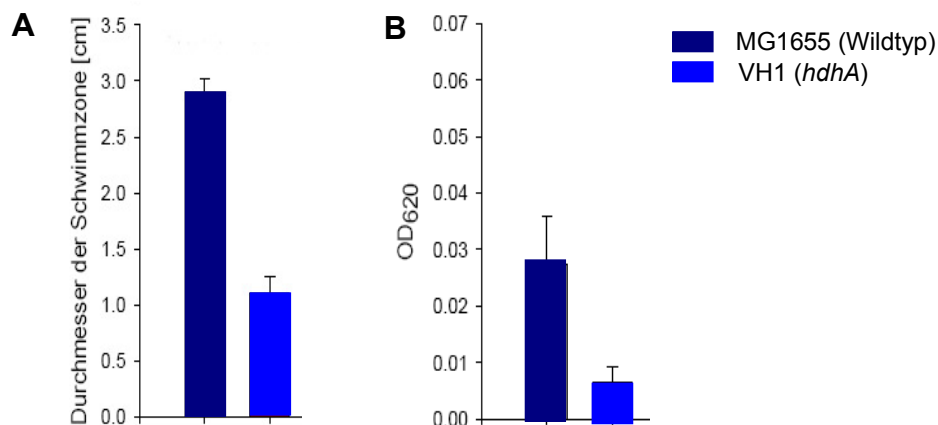


Abb. 3.41: Vergleich der Biofilmbildung und Beweglichkeit von *E. coli* VH1 (*hdhA*) im Vergleich zum Wildtyp. Die Beweglichkeit wurde durch die Größe der Schwimmzonen nach 20 h Inkubation bei RT auf Weichagarplatten festgestellt (A). Die Biofilmbildung wurde nach 24 h durch Quantifizierung des an den Zellen haftenden Kristallvioletts durch Lösen in Ethanol und Absorptionsmessung bei 620 nm bestimmt (B). Werte ergaben sich aus drei unabhängigen Versuchen (Hofer, 2007).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsrate des Stammes im Vergleich zum Wildtyp bei Salzstress verringert war. Die verminderte osmotische Stressresistenz wurde detailliert in Minimal- und Komplexmedium untersucht (Abb. 3.42). Bei Kultivierung in NaCl-freiem LB-Medium zeigte sich, dass die Deletion des *hdhA*-Gens keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte. Sobald dem Medium NaCl zugesetzt wurde, wuchs VH1 langsamer als der Wildtyp. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Wachstumsexperimenten in Minimalmedium erhalten. Die beiden Stämme hatten ohne NaCl-Zugabe eine identische Verdopplungszeit. Wurde die Osmolalität des Mediums durch Zugabe von NaCl während des Wachstums erhöht, hatte dies einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Wachstum des Stammes VH1. Bei

Kultivierung in Komplexmedium war zu beobachten, dass beide Stämme ihr Wachstumsoptimum bei einer Osmolalität von 0,5 osmol/kg hatten. Während beim Wildtyp die höchste Wachstumsrate in Minimalmedium bei 0,6 osmol/kg gemessen wurde, lag das Wachstumsoptimum des Stammes VH1 darunter (0,3 osmol/kg).

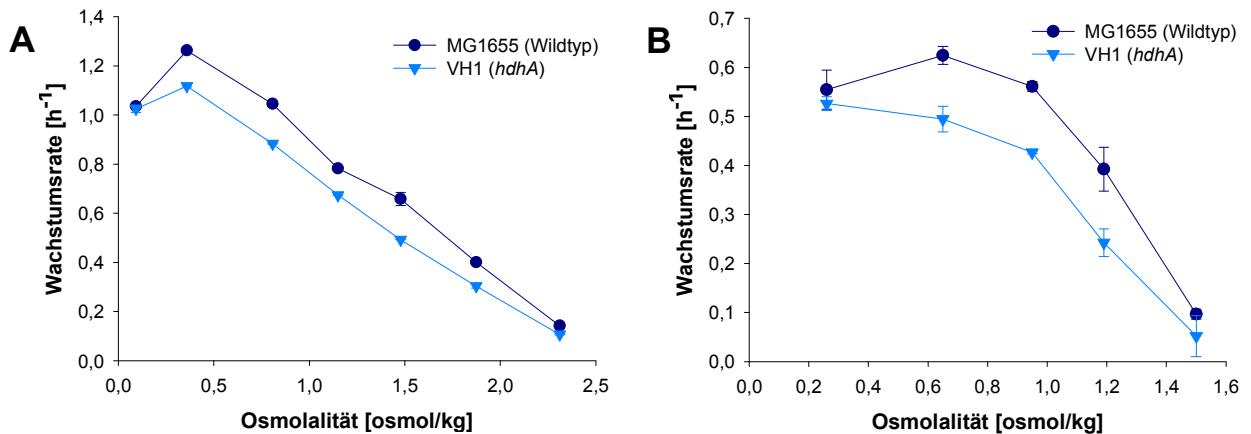


Abb. 3.42: Wachstumsraten von *E. coli* VH1 (*hdhA*) bei verschiedenen Osmolalitäten im Vergleich zum Wildtyp. (A) Aus einer Übernachtskultur wurden LB-Medien mit unterschiedlichsten NaCl-Konzentrationen (von 0 M bis 1,2 M NaCl) beimpft. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ verfolgt und die Wachstumsraten bestimmt. **(B)** Kulturen in K10-Minimalmedium wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 aerob kultiviert. Dann wurden die Kulturen aufgeteilt und verschiedene NaCl-Konzentrationen durch Zugabe einer hochkonzentrierten NaCl-Lösung (in Minimalmedium) eingestellt. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ weiter verfolgt. Die Wachstumsraten wurden nach erneutem Einsetzen von exponentiellem Wachstum bestimmt. Die Osmolalität der Medien wurde im Osmometer bestimmt.

Zum direkten Nachweis des Zusammenhanges der Deletion des *hdhA*-Gens und der verminderten Stressresistenz wurden Komplementationsexperimente durchgeführt. Da eine Komplementation mit einem plasmidvermittelten Überproduktionssystem keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielte (Hofer, 2007), wurde das *hdhA*-Gen mit den ursprünglichen regulatorischen Sequenzen (je 280 bp stromauf- und abwärts) und dem natürlichen Promotor kloniert. Das resultierende Plasmid pRShdhAreg3 wurde in den Stamm VH1 transformiert. Es wurden erneut Wachstumsversuche durchgeführt (Abb. 3.43). Während das Wachstum des Wildtyps und des Stammes VH1, einmal mit dem Kontrollplasmid pRS415 und einmal mit dem für *hdhA*-kodierenden Plasmids pRShdhAreg3, in K10-Minimalmedium ohne Zugabe von NaCl nahezu identisch war, zeigten sich nach Zugabe von 0,4 oder 0,6 M NaCl Unterschiede. Der Deletionsstamm mit dem Kontrollplasmid zeigte die gleiche Wachstumsrate wie Stamm VH1. Im Gegensatz dazu führte das Vorhandensein des plasmidkodierten *hdhA* zu einer Erhöhung der Wachstumsrate auf Wildtypniveau. Damit kann angenommen werden, dass HdhA in der Salzstressresistenz eine bedeutende Rolle übernimmt.

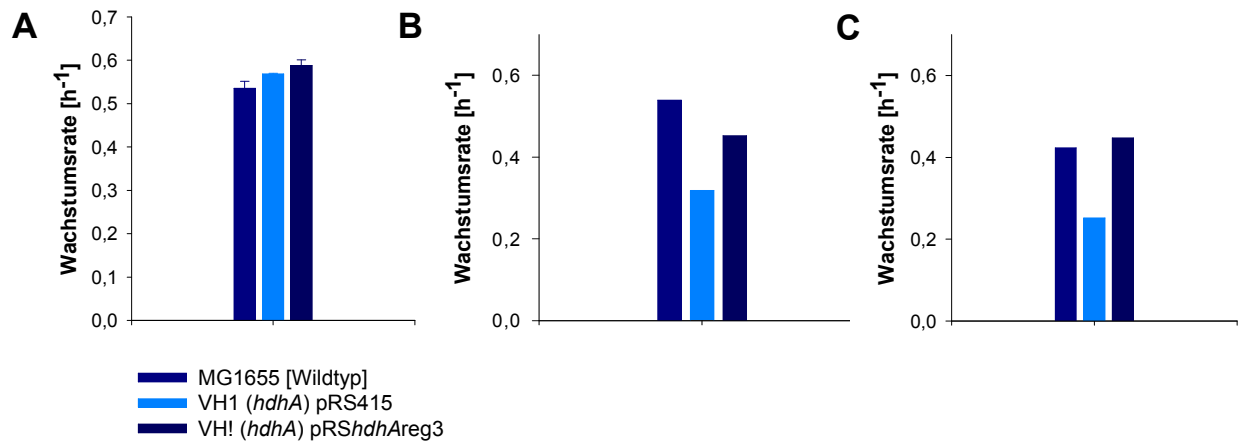


Abb. 3.43: Komplementation des Wachstumsdefizit des Stammes VH1 bei erhöhten NaCl-Konzentrationen. Kulturen von *E. coli* MG1655, VH1 pRS415 (Leervektor) und VH1 pRS*hdhAreg3* in K10-Minimalmedium wurden bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert (A). Die Kulturen wurden aufgeteilt und verschiedene NaCl-Konzentrationen (B: 0,4 M NaCl, C: 0,6 M NaCl) durch Zugabe einer hochkonzentrierten NaCl-Lösung (in Minimalmedium) eingestellt. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ weiter verfolgt. Die Wachstumsraten wurden nach erneutem Einsetzen von exponentiellem Wachstum bestimmt (B und C).

Weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion von HdhA in der Osmoadaptation wurden durch Proteomanalysen erbracht. Dabei wurden Unterschiede im Vorkommen einiger Proteine im Stamm VH1 im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Dies war allerdings nur unter Stressbedingungen der Fall. Drei Proteine waren in der Mutante in geringeren Menge vorhanden als im Wildtyp. Dabei handelte es sich um das periplasmatische Säurestress-Chaperon HdeB, das Protein YfdX mit unbekannter Funktion und die Glutamatdecarboxylase β GadB, welche die Zelle vor extremen Säurestress schützt. Die Proteine waren im Deletionsstamm um 90 % (HdeB), über 80 % (YfdX) um bis zu 40 % (GadB) im Verhältnis zum Wildtyp reduziert (Abb. 3.44). Bei den vier Proteinen, die in der *hdhA*-Mutante bei Salzstress in höherer Menge vorhanden waren als im Wildtyp, handelte es sich um die Threoninsynthase ThrC, das bifunktionelle Protein PheA, die Citratsynthase CisY und das DNA-schützende Protein Dps. In der *hdhA*-Deletionsmutante war die Menge an ThrC 3,9-fach, die an PheA 3,0-fach und die an CisY und Dps 2,2-fach im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 3.44).

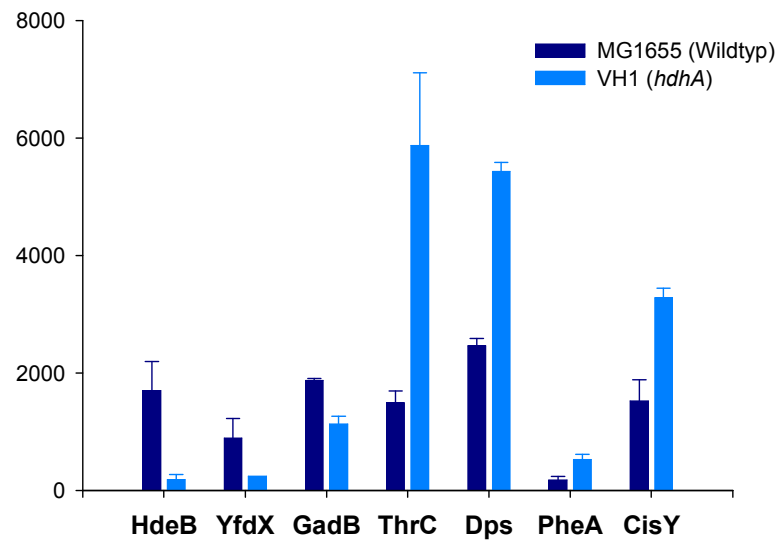


Abb. 3.44: Unterschiedlich regulierte Proteine nach 60 min Salzstress (0,4 M NaCl) in Minimalmedium in *E. coli* VH1 (*hdhA*) im Vergleich zum Wildtyp. *E. coli* MG1655 und VH1 wurden in Minimalmedium bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Es wurde NaCl (0,4 M) zugegeben und nach 60 min Zellextrakt präpariert und durch zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH Bereich von 4-7, in der zweiten Dimension in einem 13%igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Unterschiedlich regulierte Proteine wurden durch Massenspektrometrie identifiziert. Die Werte ergaben sich aus zwei unabhängigen Bestimmungen. Es sind absolute Abweichungen dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Proteomveränderungen bei osmotischem Stress

Um eine Übersicht über die Veränderungen bei osmotischem Stress in *E. coli* zu erhalten, wurde in dieser Arbeit mit Proteomanalysen gearbeitet. Durch diese Untersuchungen konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, deren Beteiligung an der Anpassung an erhöhte Osmolalitäten bisher nicht bekannt war oder nur auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden konnte. Die Verwendung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und Variation der Stressbedingungen zeigte, dass die Veränderungen auf Proteomebene nach hyperosmotischem Stress durch weitere Umgebungsparameter beeinflusst werden.

Die identifizierten Proteine werden im Weiteren kurz charakterisiert und die möglichen Funktionen bei der Adaptation diskutiert. Die gravierendsten Veränderungen wurden in *E. coli* Zellen, die in Minimalmedium aerob kultiviert wurden, detektiert. Zuerst soll auf die Proteine eingegangen werden, die sowohl durch osmotischen als auch durch Salzstress hochreguliert wurden (Abb. 4.1). Für einige dieser Proteine ist eine Funktion in der Osmostressantwort bereits bekannt. Eine Rolle in der Aufnahme oder dem Metabolismus von kompatiblen Soluten spielen dabei die Trehalose-6-phosphat-Phosphatase OtsB, die den letzten Schritt bei der Produktion des kompatiblen Solutes Trehalose katalysiert (Giaever *et al.*, 1988) sowie die cytoplasmatische Trehalase TreF (s. 4.6) und das periplasmatische Glycinbetain/Prolin-Bindeprotein ProX. ProX ist eine Untereinheit des ABC-Transporters ProU und neben BetP die einzige Möglichkeit die kompatiblen Solute Glycinbetain und Prolin aufzunehmen (Haardt *et al.*, 1995). Eine Akkumulation einer weiteren Untereinheit des Transporters, der Membran-assoziierten ATPase ProV konnte durch Analyse des Membranproteoms gezeigt werden. Sind keine kompatiblen Solute in der Umgebung vorhanden, ist die Trehaloseproduktion über OtsA und OtsB entscheidend für eine erfolgreiche Adaptation von *E. coli* an erhöhte Osmolalitäten (Giaever *et al.*, 1988). Die verstärkte Produktion des zweiten Enzyms OtsA wurde durch Verwendung eines komplementären Gelsystems im alkalischen pH-Bereich nachgewiesen. Zwei weitere Proteine, OsmC und OsmY, sind ebenfalls schon in früheren Studien der hyperosmotischen Stressantwort identifiziert worden (Barron *et al.*, 1986; Gutierrez und Devedjian, 1991). Das Protein OsmY besteht aus zwei BON-Domänen. Diese Domänen, die aus 60 Aminosäuren bestehen und mehrere hydrophobe Regionen bilden, haben membranbindende Eigenschaften (Yeats und Bateman, 2003). Man kann daher vermuten, dass OsmY die Zellwandstruktur mit äußerer Membran und Cytoplasmamembran bei hyperosmotischem Stress stabilisiert. OsmC hat eine andere Funktion. Die aufgelöste Kristallstruktur ähnelt Peroxiredoxinen. Es konnte eine

entsprechende Aktivität bei gereinigtem OsmC nachgewiesen werden (Lesniak *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004). Somit ist das Protein bei der Entgiftung von Sauerstoffradikalen in der Zelle beteiligt. Dies spiegelt sich auch in der erhöhten Sensitivität einer *osmC*-Mutante gegenüber oxidativem Stress wider (Conter *et al.*, 2001). Neben OsmC wurden noch weitere Proteine identifiziert, die am Schutz vor Sauerstoffradikalen beteiligt sind: das DNA-bindende Protein Dps und die Hydroxyperoxidase KatE. Dps bindet unspezifisch an DNA und schützt diese durch Bildung eines DNA/Protein-Kristalls vor Modifikationen während unterschiedlicher Stressbedingungen, vor allem bei oxidativem Stress und auch in der stationären Phase (Azam und Ishihama, 1999; Dukan und Touati, 1996; Martinez und Kolter, 1997; Wolf *et al.*, 1999). Dps besitzt eine Ferritin-ähnliche Struktur und bindet Eisen, das als Reduktionsmittel für Sauerstoffradikale dient (Zhao *et al.*, 2002). Die drei verschiedenen Isoformen, die durch die Proteomanalyse nachgewiesen wurden, können durch verschiedene Modifikationen, die für Dps bekannt sind, erklärt werden. Zum einen wurde eine Phosphorylierung von Dps nachgewiesen, zum anderen wird die Dps-Menge durch Proteolyse reguliert (Freestone *et al.*, 1998; Stephani *et al.*, 2003). Neben Dps schützt auch KatE vor Sauerstoffradikalen. Die Katalase-Aktivität ermöglicht den Abbau von Wasserstoffperoxid (Loewen und Switala, 1986). Hyperosmotischer Stress scheint also auch eine oxidative Stressantwort auszulösen. Dies wurde auch in anderen Organismen, z. B. in *B. subtilis* beobachtet (Höper *et al.*, 2006). Die Überlappung dieser beiden Stressantworten wird in 4.3 diskutiert. Eine weitere durch verschiedene Stressbedingungen hervorgerufene, problematische zelluläre Veränderung ist die Denaturierung und Fehlfaltung von Proteinen. Um dem entgegen zu wirken, werden Chaperone unter Stressbedingungen verstärkt produziert. Bei osmotischem Stress handelt es sich um das Chaperon HchA (Hsp31). Hsp31 hat eine nachgewiesene Funktion bei der Adaptation und dem Überleben von Hitze- und Säurestress (Mujacic *et al.*, 2004; Mujacic und Baneyx, 2007). Bei erhöhten Temperaturen bindet Hsp31 an entfaltete Proteine und stabilisiert diese, bis die Temperatur wieder sinkt (Sastry *et al.*, 2002). Eine ähnliche Funktion kann auch bei osmotischem Stress vermutet werden. Ein weiteres Protein, das infolge von osmotischem Stress hochreguliert wurde, ist das periphere Membranprotein PspA („phage shock protein“). Der gemeinsame Faktor aller bekannten *psp*-induzierenden Bedingungen ist ein entkoppelnder Effekt oder eine Verminderung der protonenmotorischen Kraft (Darwin, 2005). Eine Induktion findet bei osmotischem Stress aber auch bei Hitzestress oder Ethanolstress statt (Model *et al.*, 1997). PspA bindet an Phospholipide und verhindert, dass die Membran durchlässig für Protonen wird (Kobayashi *et al.*, 2007). Somit kann das Membranpotential aufrechterhalten werden. Ein weiteres identifiziertes Protein war die α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase HdhA. Da bei einer Deletion des entsprechenden Genes im Rahmen dieser Arbeit phänotypische Veränderungen bei osmotischem Stress nachgewiesen werden konnten, wurde die mögliche Rolle dieses Proteins detailliert untersucht und soll zusammenhängend weiter unter 4.5 diskutiert werden.

Der Initiationsfaktor IF-2 (InfB) akkumulierte ebenfalls nach Erhöhung der extrazellulären Osmolalität. IF-2 ist einer von drei Initiationsfaktoren der Translation in *E. coli*. IF-2 konnte auch in erhöhten Mengen bei Kältestress nachgewiesen werden, und Mutationen im entsprechenden Gen führen zu einem kältesensitiven Phänotyp (Jones *et al.*, 1987; Laursen *et al.*, 2003). Die genaue Funktion unter diesen Bedingungen ist allerdings unklar. Da Kälte- und hyperosmotischer Stress zu ähnlichen physiologischen Reaktionen, wie z.B. der Akkumulation von kompatiblen Soluten führen (Angelidis und Smith, 2003; Özcan *et al.*, 2007), kann vermutet werden, dass die Rolle des Initiationsfaktors unter beiden Stressbedingungen vergleichbar ist. Ebenfalls kam es zu einer Erhöhung der Menge an TalA und TktB, die beide im nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatweges angesiedelt sind. Für beide Enzyme sind Isoenzyme beschrieben (TalB und TktA). TktA katalysiert in nicht-gestressten, exponentiell wachsenden Zellen die entsprechenden Reaktionen, während TktB in der stationären Phase und unter Stressbedingungen aktiv ist, da es durch RpoS reguliert wird (Jung *et al.*, 2005).

Wurde Salz als Osmolyt eingesetzt, akkumulierten zusätzliche Proteine (Abb. 4.1). Dabei handelte es sich u. a. um die Enzyme AcnA, PoxB und MetL. Im Falle von AcnA ist die Situation ähnlich der für TalA und TktB beschriebenen. Auch hier existiert ein Isoenzym: AcnB. Zelluläres AcnA ist allerdings resistenter gegenüber oxidativem Stress und Eisenmangelbedingungen als AcnB (Varghese *et al.*, 2003). Damit kann durch eine bevorzugte Produktion von AcnA unter Stressbedingungen eine Unterbrechung des Citrat-Zyklus durch eine Inhibierung der Aconitase-Aktivität verhindert werden. Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und osmotischem Stress hin. Die Pyruvatoxidase PoxB katalysiert einen alternativen Weg des Pyruvatmetabolismus unabhängig von der Pyruvat-Dehydrogenase. Für das identifizierte Protein MetL, eine Aspartatkinase II/Homoserin-Dehydrogenase ist auch ein mögliches Isoenzym bekannt. Dabei handelt es sich um ThrA. Über die Regulation der entsprechenden Gene unter verschiedenen Stressbedingungen ist zum jetzigen Zeitpunkt wenig bekannt. Allgemein scheint durch die Akkumulation von Isoenzymen, das reibungslose Ablaufen des Metabolismus auch bei erhöhten Osmolalitäten sichergestellt zu werden.

Bei Salzstress wird neben Dps ein weiteres DNA-bindendes Protein akkumuliert, das Einzelstrang-bindende Ssb („single-strand-binding“). Eine wichtige Funktion des Proteins scheint ebenfalls der Schutz der DNA unter Stressbedingungen zu sein, da gebundenes Ssb die Bindung anderer Proteine wie Exo- und Endonukleasen an die DNA verhindert (Meyer und Laine, 1990). Homologe Proteine wurden beispielsweise bei der Säurestressadaptation von *Streptococcus mutans* verstärkt nachgewiesen (Len *et al.*, 2004).

Neben einigen Proteingemischen wurden in NaCl-gestressten Zellen eine ganze Reihe von Proteinen unbekannter Funktion in größeren Mengen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen. Diese wurden als YciE, YciF, YjbJ, YgaU, Ycel und YhbO identifiziert. YciE und YciF bestehen aus der gleichen Einzeldomäne unbekannter Funktion (DUF892) und liegen

benachbart auf dem *E. coli*-Genom. Basierend auf der 3D-Struktur von YciF wurde eine Eisenbindende Funktion für dieses Protein diskutiert (Hindupur *et al.*, 2006). Das Protein YjbJ wird der Gruppe der „Hydrophiline“ zugeordnet. Diese Proteine sind stark hydrophil und haben einen hohen Glycingehalt. Proteine der gleichen Gruppe werden z. B. auch in höheren Pflanzen und in keimenden Samen bei Trockenheit angehäuft (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Das durch Salzstress verstärkt synthetisierte Protein YgaU besteht aus zwei strukturellen Domänen, einer BON- und einer LysM-Domäne. Die BON-Domäne ist wahrscheinlich für eine Membranassoziation verantwortlich (Yeats und Bateman, 2003). Die LysM-Domäne ist in diversen Enzymen zu finden, die im bakteriellen Zellwandabbau eine Rolle spielen und besitzt vermutlich eine allgemeine Peptidoglycanbindefunktion (Bateman und Bycroft, 2000). Aufgrund der Art der beiden strukturellen Domänen ist es wahrscheinlich, dass es sich auch bei YgaU um ein periplasmatisches Protein handelt. Möglicherweise unterstützt es unter hyperosmotischen Bedingungen die Stabilisierung der Struktur aus zwei Membranen und Peptidoglycan, das die *E. coli*-Zelle umgibt. YceI ist ein periplasmatisches Protein und wird auch bei erhöhtem pH-Wert verstärkt synthetisiert (Stancik *et al.*, 2002). YceI ist homolog zu einem Polyisoprenoidbindeprotein (TT1927b) von *Thermus thermophilus* (Handa *et al.*, 2005). Der Ligand von YceI ist ebenfalls ein Polyisoprenoid (Patskovsky *et al.*, 2004). Diese Verbindungen sind ein Bestandteil der Atmungskette und wichtig bei der Kontrolle von oxidativem Stress (Soballe und Poole, 1999). Weiterhin wurde YhbO, eine putative Protease, als osmotisches Stressprotein identifiziert. YhbO gehört zur DJ-1/ThiJ/Pfp1-Superfamilie zu der unter anderem auch das bereits beschriebene Hsp31 gezählt wird. Eine *yhbO*-Mutante zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativen, pH- und osmotischem Stress (Abdallah *et al.*, 2007). Die genaue Funktion bleibt allerdings weiter ungeklärt. Die Deletionsmutanten für die Gene *yceI*, *ygaU*, *yjbJ*, *yciG*, *osmY*, *yciE*, *yciF* und *yciG* zeigten keine Erniedrigung der Stressresistenz (Hofer, 2007).

Allgemein kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass Salzstress eine stärkere Reaktion auslöst als osmotischer Stress, wahrscheinlich hervorgerufen durch den zusätzlichen ionischen Stress. Deshalb wurde die Osmoadaptation unter anaeroben Bedingungen nur nach Zugabe von NaCl untersucht. In Abwesenheit von Sauerstoff zeigte sich für zahlreiche Proteine keine Akkumulation oder eine deutlich abgeschwächte (Abb. 4. 1). Dies kann einerseits auf die ebenfalls verringerte Menge an RpoS unter diesen Bedingungen zurückgeführt werden, da der größte Teil der erwähnten Proteine Teil des RpoS-Regulons ist, andererseits werden viele der Proteine unter anaeroben Bedingungen generell negativ reguliert wie beispielsweise *talA* und *acnA*, die negativ durch ArcA reguliert werden, oder *katE* und *poxB*, die ebenfalls in Gegenwart von Sauerstoff reprimiert werden (Chang *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 2005; Schellhorn und Hassan, 1998). Außerdem scheinen auch viele Proteine am Schutz vor Sauerstoffradikalen mitzuarbeiten und erhöhte Radikalkonzentrationen sind für die volle Auslösung der

Stressantwort von Bedeutung (s. 4.3). Unter anaeroben Bedingungen wurde allerdings kein erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen.

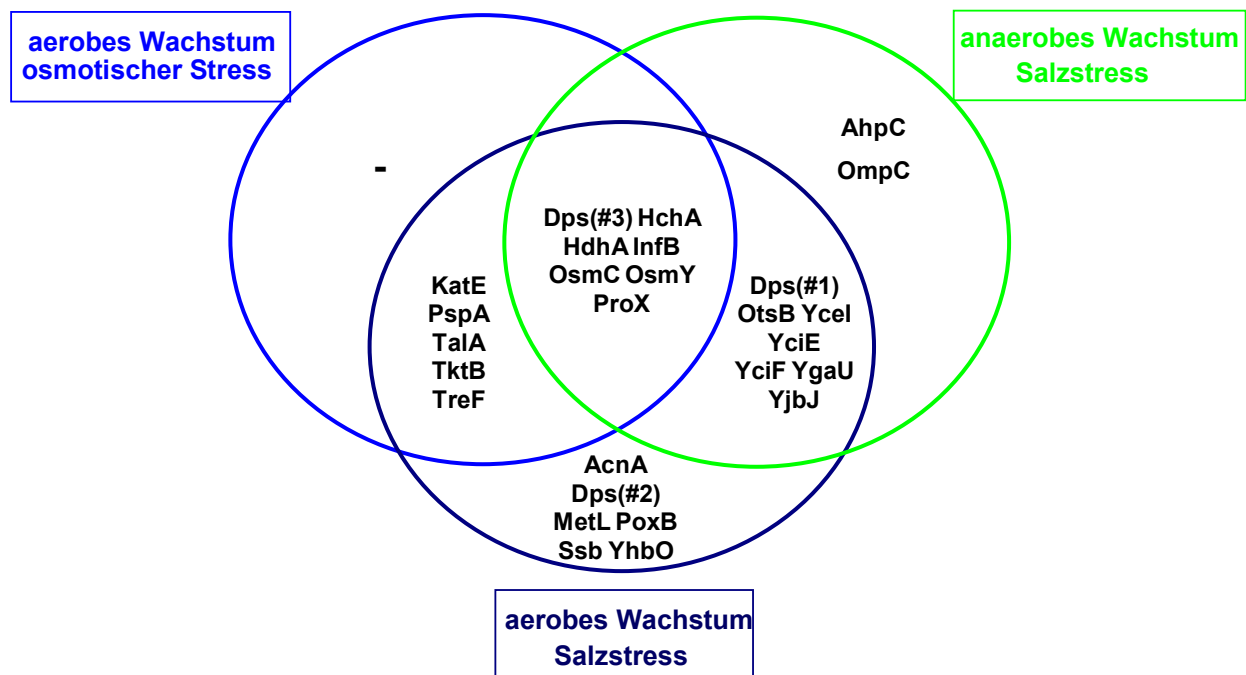


Abb. 4.1 : Identifizierte Proteine, die unter den verschiedenen osmotischen Stressbedingungen in erhöhten Mengen nachgewiesen wurden. Genauere Erläuterungen s. Text.

Unter anaeroben Bedingungen wurde nur für zwei zusätzliche Proteine (Abb. 4.1) und ein Proteingemisch eine Akkumulation nach Erhöhung der Osmolalität gezeigt. Das Porin der äußeren Membran OmpC war eines dieser Proteine. Unter hyperosmolalen Bedingungen verändert sich das Verhältnis der Porine OmpF und OmpC, da die Expression von *ompF* reprimiert und die von *ompC* induziert wird (Jovanovich *et al.*, 1988). Die transkriptionelle Regulation erfolgt durch das EnvZ/OmpR-System (Hall und Silhavy, 1981; Mizuno und Mizushima, 1990). Es ist bekannt, dass sich die Expressionsmuster von OmpC und OmpF sowohl in Abhängigkeit der externen Osmolalität als auch der Sauerstoffverfügbarkeit ändern (Bhriain *et al.*, 1989). Eine zusätzliche Regulation durch die Sensorkinase ArcB führt dazu, dass die Expression von *ompC* unter anaeroben Bedingungen schon bei niedrigen Osmolalitäten induziert wird. (Matsubara *et al.*, 2000). Die gemessenen Mengen für OmpC zwischen gestressten und nicht-gestressten Zellen differierten in An- und Abwesenheit von Sauerstoff lediglich um den Faktor 2. Eine Induktion von *ompC* infolge von Osmostress unter aeroben Bedingungen wurde durch die Proteomanalysen wie auch in einer Transkriptomanalyse nicht nachgewiesen (Weber und Jung, 2002).

AhpC war das zweite Protein, das speziell bei Salzstress unter anaeroben Bedingungen akkumulierte. AhpC ist eine Alkyl-Hydroxyperoxid-Reduktase und dient neben KatE und KatG zur Entgiftung von H₂O₂ in *E. coli* (Seaver und Imlay, 2001). Frühere Ergebnisse belegen eine

Repression von *ahpC* bei hyperosmotischem Stress unter aeroben Bedingungen (Weber und Jung, 2002).

Es wurden also Proteine identifiziert, die in die verschiedensten zellulären Prozesse eingreifen und somit der Zelle eine Adaptation an erhöhte Osmolalität ermöglichen. Bis auf wenige Ausnahmen ist für alle identifizierten Proteine eine RpoS-abhängige Regulation nachgewiesen worden (Somalinga *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005). Zu diesen Ausnahmen zählen PspA, InfB, YceI, AcnA, MetL und Ssb. Es ist allerdings durchaus möglich, dass diese Proteine dennoch durch RpoS reguliert werden. Durch die unterschiedliche Regulation aller identifizierten Proteine unter verschiedenen Bedingungen wird klar, dass das RpoS-Regulon stark modifizierbar ist und das bei den meisten Genen zahlreiche weitere Faktoren in die Regulation eingreifen. Dies wurde auch durch die Ergebnisse zum Einfluss von Glycinbetain auf die Proteomveränderungen deutlich. Die Anwesenheit von Glycinbetain führte zwar zu einer generellen Verminderung der RpoS-Menge bei hyperosmotischem Stress, dies resultierte aber nicht in einer verminderten Akkumulation aller identifizierten Proteine, für die eine RpoS-abhängige Regulation gezeigt wurde. In manchen Fällen wurde sogar eine verstärkte Produktion festgestellt wie z. B. für die cytoplasmatische Trehalase TreF unter aeroben Bedingungen (s. 4.6). Die Feinregulation des RpoS-Regulons wird auch in den zeitabhängigen Untersuchungen der Akkumulation der einzelnen Proteine deutlich. Während für einige Proteine bereits erhöhte Mengen in den ersten 10 Minuten festgestellt wurden (ProX, InfB und OsmC), nahm die Menge anderer Proteine kontinuierlich im ganzen untersuchten Zeitraum zu, oder erreichte bereits nach 30 min einen maximalen Wert.

Unter allen Bedingungen wurde nur eine kleine Anzahl von Proteinen identifiziert, bei denen sich die Menge bei hyperosmotischem Stress erniedrigte. Dies lässt sich durch den relativ milden Stress erklären, der auch kaum Einfluss auf die Wachstumsrate nahm.

Im Allgemeinen korrelieren die erhaltenen Ergebnisse sehr gut mit bereits vorhandenen Transkriptomdaten (Weber und Jung, 2002). So wurde eine Induktion der Gene *osmC*, *osmY*, *dps*, *treF*, *hchA*, *hdhA*, *katE*, *talA*, *tktB*, *poxB*, *otsB*, *gadA*, *gadB*, *yciF*, *yjbJ*, *ygaU* und *yhbO* beschrieben. Allerdings wurden durch Transkriptom-Analysen noch weitere Gene identifiziert, die durch die Proteomanalysen nicht gefunden wurden. Da allerdings viele regulierende Schritte auf der post-transkriptionellen Ebene stattfinden, z. B. auf der Ebene der Proteinstabilität, sollten Proteomanalysen ein präziseres Bild der Veränderungen in der lebenden Zelle unter verschiedenen Bedingungen geben. Natürlich ist die geringere Anzahl an identifizierten Proteinen im Vergleich zu den induzierten Genen unter Anderem auch durch die Limitationen der verwendeten Gelsysteme in Bezug auf Proteingröße und pI-Wert zu erklären.

Außerdem werden hydrophobe Proteine in der konventionellen 2D-Gelelektrophorese ebenfalls wenig effizient aufgetrennt. Es wurde versucht, diese Nachteile durch Verwendung eines alternativen Gelsystems (BAC/SDS-PAGE) und die Analyse von Membranfraktionen zu

umgehen. Dadurch konnte ein weiteres Protein identifiziert (ProV) werden. Allerdings waren die Verunreinigungen mit peripheren und membranassoziierten Proteinen immer noch sehr stark wie durch die Erstellung eines Referenzgels gezeigt werden konnte. Es bleibt auch unklar inwiefern Membranproteine überhaupt aufgetrennt wurden. Allerdings konnte die Auftrennung von gereinigten Proteinen mit mehreren transmembralen Helices durch BAC/SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden (Niefnecker, 2005).

Eine weitere Alternative zu den verwendeten gelbasierten Systemen zur Proteomanalyse und damit zum Nachweis globaler Veränderungen in Zellen sind gelfreie Methoden. Gelfreie Methoden werden zurzeit erst etabliert. Diese Techniken bestehen im Allgemeinen aus einer chromatographischen Auftrennung, gefolgt von einer massenspektrometrischen Analyse. Die Vorteile des gelfreien Ansatzes im Vergleich zum gelbasierten, sind eine einfachere Probenaufbereitung und eine komplette Abdeckung aller Proteine (Reinders *et al.*, 2006). Die Nachteile der gelfreien Ansätze sind die noch fehlenden, geeigneten Quantifizierungsmethoden wie auch der hohe experimentelle Aufwand (Reinders *et al.*, 2004). Somit bleibt im Moment die Proteomanalyse durch konventionelle 2D-Gelelektrophorese die Methode der Wahl, um neue Komponenten oder neue regulierende Prozesse in der bakteriellen Physiologie zu finden. Es ist möglich einen Großteil der Proteine, die in physiologischen und metabolischen Reaktionen involviert sind, in einem gelbasierten System zu visualisieren, wie es beispielsweise für *B. subtilis* gezeigt wurde (Hecker und Völker, 2004). Das spiegelt sich auch in der großen Anzahl an Publikationen, die ähnliche Ansätze betreffen, wider (Hoffmann *et al.*, 2002; Höper *et al.*, 2006; Lelong *et al.*, 2007; Riedel und Lehner, 2007).

4.2 Einfluss der Kaliumaufnahme auf die Proteomveränderungen bei Salzstress in Minimal- und Komplexmedium

Die Proteomveränderungen in einer K^+ -Aufnahmemutante infolge von osmotischem Stress wiesen einen Einfluss der K^+ -Akkumulation auf die nachfolgende adaptive Antwort von *E. coli* nach. Wenn *E. coli*-Zellen in Abwesenheit von kompatiblen Soluten kultiviert (Minimalmedium) und einem Salzstress ausgesetzt wurden, zeigten die Proteomanalysen der K^+ -Aufnahmemutante eine schwache Akkumulation von nur drei Proteinen: OsmC, Dps und PspA. Der Großteil der Proteine unter der Kontrolle von RpoS, die normalerweise bei Salzstress akkumulieren (3.1.1 und 3.1.2), fehlten, obwohl eine schwache Erhöhung der RpoS-Menge im Immunoblot nachgewiesen werden konnte. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stoppte das Wachstum der Mutante nach Zugabe von NaCl. Die Zellen starben nicht ab, da es zu keiner offensichtlichen Abnahme diverser metabolischer Enzyme oder ribosomaler Proteine kam. Die

Analyse der RpoS-Menge wies eine bereits erhöhte RpoS-Menge vor der Zugabe von Salz im Vergleich zum Wildtyp nach, die sich nach Zugabe nur um etwa das 4-fache erhöhte. Da die RpoS-Menge unter osmotischen Stressbedingungen hauptsächlich post-translational und nicht auf Transkriptionsebene reguliert ist (Lange und Hengge-Aronis, 1994), wäre es möglich, dass die verminderte K^+ -Akkumulation die Stabilisierung des Regulators beeinflusst. Zusätzlich könnte K^+ einen direkten Effekt auf die Regulation von Genen haben, die dem RpoS-Regulon zugerechnet werden. Zumindest für die RpoS-abhängige Transkription des *osmY*-Promotors wurde bereits ein stimulatorischer Effekt von K^+ in Kombination mit Glutamat *in vitro* nachgewiesen (Lee und Gralla, 2004). Basierend auf Promotor-Sequenz-Vergleichen wurde ein entsprechender Effekt auf die entsprechenden Promotoren der Gene *otsB* und des *proU*-Operons, das *proX* beinhaltet, postuliert.

Es wurde eine erhöhte Menge an zwei Proteinen, die zum RpoS-Regulon gehören (Dps und OsmC) in der Mutante nach Salzstress nachgewiesen. Dies würde einer vermuteten fehlgeschlagenen Induktion des RpoS-Regulons widersprechen. Allerdings wird *osmC* zusätzlich durch den LysR-ähnlichen Regulator NhaR und den Antwort-Regulator RcsB reguliert (Sturny *et al.*, 2003). Auch für das *dps*-Gen ist eine zusätzliche RpoS-unabhängige Regulation durch OxyR in der exponentiellen Wachstumsphase beschrieben (Altuvia *et al.*, 1994). Diese Regulationsmechanismen könnten die Regulation dieser Proteine in der Mutante sogar bei niedrigen RpoS-Konzentrationen erklären.

Ein anderes Protein, das im Mutantenstamm nach Salzstress akkumulierte wurde war PspA („phage shock protein“). PspA wird, wie bereits unter 4.1 beschrieben, durch eine Vielzahl von Stressbedingungen, die einen Einfluss auf den Zustand der Membran haben, hochreguliert. (Darwin, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007; Model *et al.*, 1997). Da die Transkription des *pspABCDE*-Operons unabhängig von RpoS ist, und die Transkription durch den alternativen Sigmafaktor σ^{54} initiiert wird, kann auch dieses Ergebnis trotz einer fehlenden Induktion des RpoS-Regulons in der K^+ -Aufnahmemutante erklärt werden.

Um ausschließlich den Einfluss der K^+ -Aufnahme auf die osmotische Stressreaktion zu testen, ohne Effekte auf das Wachstum in Kauf nehmen zu müssen, wurden analoge Experimente mit Zellen durchgeführt, die auf Komplexmedium kultiviert wurden. Wie erwartet wurde in der Mutante nach Zugabe von NaCl keine K^+ -Aufnahme beobachtet. Die folgende Proteomanalyse offenbarte, dass in der Mutante die Akkumulation der Proteine ProX, TnaA, GalM, GatY, CadA und AspA in unterschiedlichem Maße vermindert war. Frühere Untersuchungen belegten bereits die Abhängigkeit der Transkription des, unter anderem für ProX kodierenden *proU*-Operons von der cytoplasmatischen K^+ -Konzentration (Sutherland *et al.*, 1986). Während die Funktion von ProX als Untereinheit eines ABC-Transporters für kompatible Solute (ProU) offensichtlich ist, ist die Bedeutung der anderen Enzyme im Osmoadaptationsprozess unklar. Die Tryptophanase TnaA katalysiert sowohl den Desulphydrase-Schritt beim Abbau von Cystein als auch die

Spaltung von Tryptophan in Indol, Pyruvat und Ammoniak (Awano *et al.*, 2003; Newton und Snell, 1964). AspA, die Aspartat-Ammonium-Lyase ist am Abbau von Aspartat und Glutamat, der Umwandlung von Aspartat in Asparagin, wie auch bei der Biosynthese dieser Aminosäuren beteiligt (Takagi *et al.*, 1985). Möglicherweise sind diese Enzyme für die Umwandlung von Aminosäuren in kompatible Solute nötig. Eine vergleichbare Funktion kann für die akkumulierten Enzyme GalM und GatY postuliert werden. GalM, eine Aldose-1-Epimerase verbindet den Galaktose- mit dem Laktose-Metabolismus und ist im Periplasma lokalisiert. GatY, eine Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase 2 ist am Galaktitol-Abbau beteiligt. CadA, eine Säurestress-induzierte Decarboxylase (Küper und Jung, 2005), konnte bereits vor Setzen des Stresses in der Mutante nachgewiesen werden. CadA wurde auch verstärkt im Wildtyp detektiert, allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt. Der pH-Wert des Cytoplasmas könnte in der Mutante durch eine erhöhte H⁺-Akkumulation erniedrigt sein. Durch die Aufnahme von Protonen könnte die Zelle versuchen, den Mangel an positiven Ladungen, die durch den Mangel an K⁺ verursacht werden, auszugleichen. Der gegenläufige Effekt konnte für *E. coli* bei Säurestress nachgewiesen werden (Booth, 1985).

Der RpoS-Gehalt der Mutante war signifikant höher als der des isogenen Wildtypstammes. In Übereinstimmung wurden Gene des RpoS-Regulons in der Mutante induziert.

In Abb. 4.2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst. In *E. coli*-Zellen, die in Minimalmedium wachsen und Salzstress ausgesetzt sind, kommt es zu einer vorübergehenden Akkumulation von K⁺ und einer transienten Erhöhung des Stress-Sigmafaktors RpoS. Dies führt zu einer Induktion des RpoS-Regulons und zur erfolgreichen Adaptation. In der K⁺-Aufnahmemutante steigt die RpoS-Menge nur langsam an und das RpoS-Regulon wird in diesem Stamm nicht induziert.

Zellen, die in Komplexmedium kultiviert werden, reagieren anders auf Salzstress. Die Induktion des RpoS-Regulons im Wildtyp ist nur schwach. Die Adaptation wird in diesem Fall vor allem durch die verstärkte Produktion einiger Enzyme erreicht, die in den Aminosäure- und Zuckermetabolismus eingreifen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Veränderung des Aminosäure- und Zuckerstoffwechsels, um organische Verbindungen aus dem Komplexmedium als kompatible Solute zu nutzen. In der K⁺-defizienten Mutante wird aufgrund der fehlenden K⁺-Akkumulation die Hochregulation dieser Enzyme verhindert. Daher kommt es in der Mutante nach Salzstress zu einer starken Induktion des RpoS-Regulons. Dies ist unter anderem auch durch den weitaus größeren Einfluss der erhöhten Osmolalität auf die Wachstumsrate zu erklären.

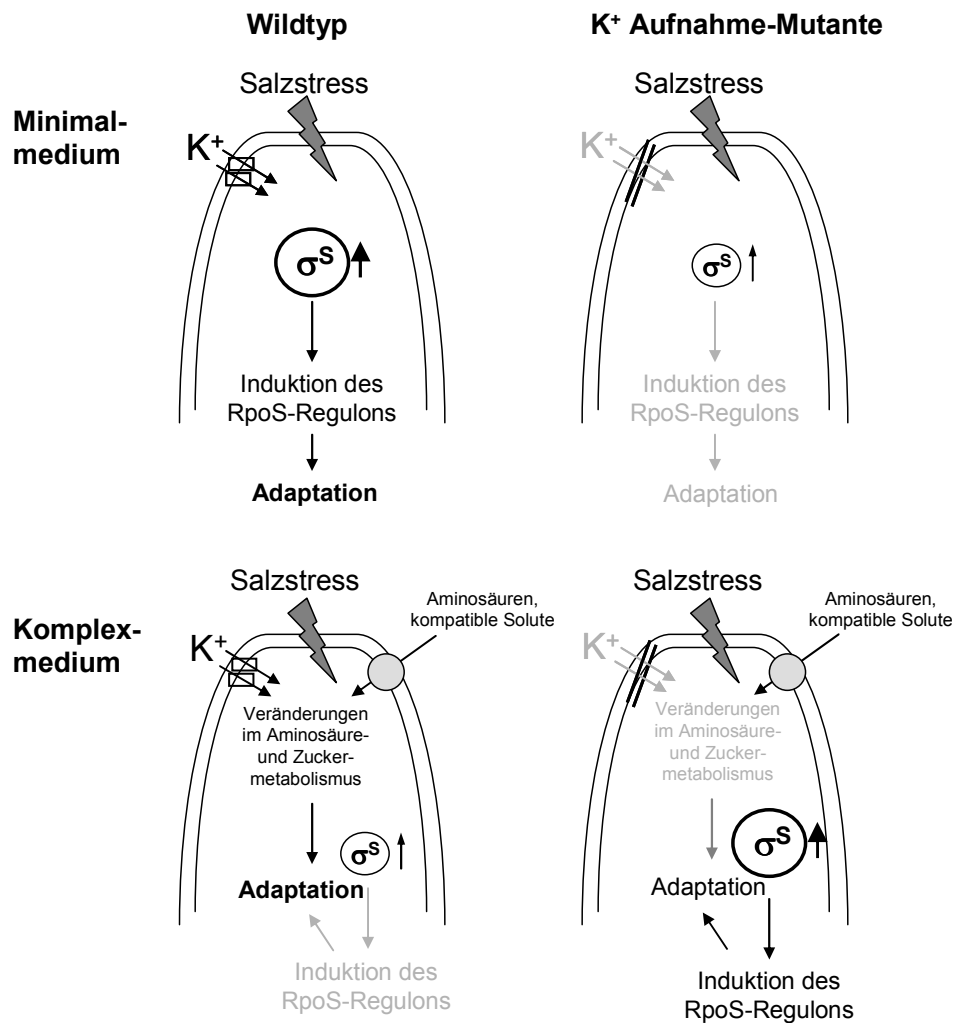


Abb. 4.2: Modell zur Veränderung der Osmoadaptation des *E. coli*-Wildtyps und der K⁺-Aufnahmemutante LB650 nach Kultivierung in verschiedenen Medien. Die *E. coli*-Stämme FRAG1 (Wildtyp) und LB650 (K⁺-Aufnahmemutante) wurden in Minimal- und Komplexmedium kultiviert und Salzstress (0,4 M NaCl) ausgesetzt. Prozesse, die an der Adaptation beteiligt sind, sind in schwarz dargestellt, unterdrückte Prozesse in grau. Für eine genaue Erläuterung siehe Text.

4.3 Verstärkung der osmotischen Stressreaktion durch Radikale

Wie unter 4.1 diskutiert, wurden in der Proteomanalyse diverse Proteine identifiziert, die durch osmotischen Stress hochreguliert werden und im Zusammenhang mit dem Schutz vor oxidativem Stress stehen. Es ist bekannt, dass osmotischer Stress in eukaryotischen Nierenzellen zu oxidativem Stress führt (Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Außerdem spielen Radikale als Signalmoleküle in eukaryotischen Zellen eine Rolle (Finkel *et al.*, 2003). Beispielsweise trägt die Sauerstoffradikalbildung nach einer Erhöhung der Osmolalität zur Aktivierung des Regulators TonEBP/OREBP bei (Zhou *et al.*, 2005). Dieser Regulator induziert die Transkription osmotisch regulierter Gene wie z.B. eines Transporters für das compatible Solute Glycinbetain oder von Chaperonen (Na *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2002).

Ähnliche Regulationsmechanismen sind für bakterielle Zellen bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Radikalen in aerob kultivierten *E. coli*-Zellen direkt nach Salzstress ansteigt. Der Ursprung der Radikale ist noch unklar. Unter normalen Wachstumsbedingungen werden Radikale ständig durch unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff zu H₂O in der Atmungskette produziert. Nach der Erhöhung der extrazellulären Osmolalität stoppt die Atmung vorübergehend. Man geht davon aus, dass dies durch die Deformation der Membran aufgrund der Plasmolyse ausgelöst wird (Houssin *et al.*, 1991; Meury, 1994). Es ist also möglich, dass die transiente Hemmung der Atmungskette die Ursache der erhöhten Radikalbildung ist. In Eukaryoten wurde gezeigt, dass Mitochondrien, die ebenfalls prokaryotischen Ursprungs sind, für die Radikalbildung bei osmotischem Stress verantwortlich sind (Zhou *et al.*, 2006). Weiterhin schleusen osmotisch gestresste Zellen das Polyamin Putrescin aus, um das Ungleichgewicht an Ladungen im Cytoplasma durch die schnelle erste Akkumulation von K⁺-Ionen auszugleichen (Munro *et al.*, 1972). Da bekannt ist, dass die intrazelluläre Radikal- gegenläufig zur Polyaminkonzentration ist, könnte das Ausschleusen von Putrescin an der Radikalzunahme beteiligt sein. Tatsächlich konnte für *E. coli* gezeigt werden, dass eine Abnahme der intrazellulären Polyaminkonzentration endogenen oxidativen Stress auslöst, da Polyamine Sauerstoffradikale neutralisieren (Tkachenko *et al.*, 2007).

Um zu testen, ob Radikale als Signal für die osmotische Stressreaktion dienen, wurde die Radikalbildung in *E. coli* inhibiert. Die Inhibierung durch Ascorbat führte zu einer verminderten Resistenz gegenüber extremem NaCl-Stress. Durch die Zugabe von Ascorbat zeigten sich keine Wachstumsdefekte in nicht-gestressten Zellen oder bei moderatem osmotischem Stress. Außerdem konnte kein Einfluss von Ascorbat auf das Überleben von Zellen bei extremem Salzstress unter anaeroben Bedingungen festgestellt werden.

Allerdings war Radikalbildung alleine, durch die Zugabe von oxidativen Stress-Agenzien wie Paraquat, nicht ausreichend um typische, osmotisch regulierte Gene zu induzieren. Radikale sind also ein zusätzliches Signal bei osmotischem Stress. Das entspricht den Ergebnissen globaler Transkriptomstudien bei Superoxid-Stress, in denen ebenfalls keine Induktion von osmotisch regulierten Genen nachgewiesen wurde (Pomposiello *et al.*, 2001).

Durch Analyse der Proteomveränderungen konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Produktion von Proteinen, die in der Langzeit-Adaptation gegenüber osmotischem Stress beteiligt sind, durch die Inhibierung der Radikalbildung vermindert wurde. Eines der betroffenen Proteine war OtsB, ein Schlüsselenzym der Trehalosesynthese. Trehalose ist das einzige compatible Solut, das von *E. coli de novo* produziert werden kann (Larsen *et al.*, 1987). Die Regulation weiterer RpoS-regulierter Proteine (HchA, HdhA, OsmY und YgaU) war ebenfalls durch die Radikalbildung betroffen. Es ist unklar, wie die Radikalbildung und die Regulation einiger, aber nicht aller Osmostress-Proteine koordiniert werden. Es konnte kein Einfluss von Ascorbat und

damit der Radikalmenge auf die transiente Akkumulation des globalen Stressregulators RpoS nachgewiesen werden. Es ist aber bekannt, dass die Induktion osmotisch induzierter Gene, die unter der Kontrolle von RpoS stehen, durch zusätzliche regulatorische Faktoren beeinflusst werden, um eine optimale Adaptation an verschiedene Stressbedingungen zu gewährleisten (Weber *et al.*, 2005). Der Radikaleffekt auf die Gene des RpoS-Regulons könnte indirekt sein, aber auch durch unbekannte weitere Regulatoren vermittelt werden. Durch Analyse der mRNA-Mengen entsprechender osmotisch regulierter Gene konnte nur ein schwacher Einfluss der Radikalbildung auf die Regulation nach Zugabe von NaCl nachgewiesen werden. Die Effekte waren weitaus stärker auf Proteomebene. Dies spricht für einen Einfluss der Radikale auf post-transkriptionelle oder translationale Prozesse. Im Falle des bereits erwähnten eukaryotischen Regulators TonEBP/OREBP konnten Effekte hauptsächlich auf Aktivitätsebene gezeigt werden, wobei die transkriptionelle Ebene nicht untersucht wurde (Zhou *et al.*, 2005).

Die Radikalbildung ist also ein Stimulus für die komplette Auslösung der osmotischen Stressantwort. Gleichzeitig werden die schädlichen Konsequenzen der Radikalbildung durch eine RpoS-abhängige Produktion von schützenden Proteinen und Enzymen wie KatE, Dps und OsmC schnell verhindert. Daher führt osmotischer Stress nur zu einer transienten Zunahme der Radikalmenge.

Weitere Untersuchungen wurden mit Stämmen durchgeführt, denen die Radikal-abbauenden Enzyme Katalase und Superoxiddismutase fehlen. Diese *E. coli* Stämme hatten eine erhöhte osmotische Stressresistenz im Vergleich zum Wildtyp. Die erhöhte Resistenz ist durch eine Verstärkung der osmotischen Stressantwort durch erhöhte Radikalkonzentrationen erklärbar. Für den *katE*-Mutantenstamm wurde diese verbesserte Stressresistenz allerdings nur in Minimalmedium und nicht in Komplexmedium nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die verminderte Expression von *katE* in Komplexmedium (etwa 60 %) im Vergleich zu Minimalmedium (Mulvey *et al.*, 1990). Weiterhin konnte durch Wachstumsversuche nachgewiesen werden, dass ein *E. coli*-Stamm, der keine funktionellen Superoxiddismutasen und Katalasen besitzt, kaum in Minimalmedium wachsen konnte, in Komplexmedium aber ebenfalls eine erhöhte Stressresistenz zeigte. Der Wachstumsdefekt in Minimalmedium kann, wie bereits gezeigt wurde, auf das Fehlen der Superoxiddismutasen zurückgeführt werden (Imlay und Fridovich, 1992). In der zitierten Arbeit wurde in Analogie zu den hier dargestellten Ergebnissen eine erhöhte Wachstumsrate eines *sodA sodB* Stammes in Minimalmedium bei Erhöhung der Osmolalität festgestellt. Da die erhöhte osmotische Stressresistenz sowohl in Katalase-Mutanten wie auch in Superoxiddismutase-Mutanten nachgewiesen wurde, war eine weitere Eingrenzung der Art der akkumulierten Sauerstoffradikale nicht möglich.

4.4 Interaktionsstudien und Veränderungen im Periplasma bei osmotischem Stress

Durch Quervernetzung von Proteinkomplexen in Zellen, die wenige Minuten zuvor einem Salzstress ausgesetzt wurden, sollte nachvollzogen werden, wie sich die Proteininteraktionen im Gegensatz zu ungestressten Zellen verändern. Da die Auftrennung der Komplexe schwierig war, wurden diese durch Erhitzen der Proben aufgelöst und dann die entsprechenden Fraktionen einer vorangegangenen Gelfiltration verglichen. Dabei zeigten sich reproduzierbare Unterschiede. Durch Vergleich der Fraktionen des löslichen Extrakts der gestressten und ungestressten Zellen, konnte nachgewiesen werden, dass einige Proteine in den Fraktionen aus dem Zellextrakt der gestressten Zellen in reduzierten Mengen vorhanden waren. Es handelte es sich um ribosomale Proteine und Enzyme des zentralen Stoffwechsels. Die verringerten Mengen können dadurch erklärt werden, dass diese Proteine durch Salzstress denaturieren oder z. B. mit Chaperonkomplexen interagieren und damit in den entsprechenden Fraktionen fehlen oder die Menge vermindert ist. In diesen Ergebnissen spiegelt sich wohl auch die vorübergehende Hemmung metabolischer Prozesse und die Inhibierung der Proteintranslation bei hyperosmotischem Stress wider, die den vorübergehenden Wachstumsarrest bei Salzstress auslöst. Im Gegensatz dazu wurden in den Fraktionen der gestressten Zellen mehrere Proteine in größeren Mengen als in den analogen Fraktionen der Kontrollzellen detektiert. Dabei handelte es mehrheitlich um periplasmatische Bindeproteine von Transportsystemen. Bis auf CysP, das Thiosulfat bindet, sind alle anderen dieser Proteine am Transport von Peptiden oder Aminosäuren beteiligt. Wodurch diese veränderte Fraktionierung verursacht wurde, ist unklar. Die Proteine könnten unter isoomotischen Bedingungen an die weiteren Untereinheiten der entsprechenden Transporter gebunden sein oder mit anderen Proteinen interagieren und bei Stress freigesetzt werden. Damit würden sie der Vernetzung mit der Membran oder großen Komplexen entgehen, und damit verstärkt in den Proben vorhanden sein. Besonders auffallend waren die erhöhten Mengen des Dipeptid-Bindeprotein DppA und des Oligopeptid-Bindeproteins OppA. Darum wird auf diese im Weiteren kurz eingegangen. OppA ist das Bindeprotein des Opp-Transportsystems, das bei Bakterien weit verbreitet ist. Es kann Peptide aus 2-5 Aminosäuren binden, besitzt aber eine Präferenz für Tripeptide (Guyer *et al.*, 1986). OppA ist eines der Proteine mit dem höchsten Molekulargewicht im Periplasma und liegt dort in hohen Konzentrationen vor (bis zu 1 mM) (Higgins und Hardie, 1983). Obwohl OppA an der Peptidaufnahme beteiligt ist, wird das *opp*-Operon in Komplexmedium reprimiert (Urbanowski *et al.*, 2000). OppA werden neben der Bindung von Peptiden zum Transport in die Zelle auch weitere Funktionen zugeschrieben. *In vitro* kann OppA die Aggregation von Proteinen bei erhöhten Temperaturen verhindern und besitzt damit Chaperonaktivität (Richarme und Caldas, 1997). Möglicherweise kann diese Funktion eine Erklärung für das veränderte

Interaktionsmuster bei Stress bieten. Das Dipeptid-Bindeprotein DppA weist eine höhere Spezifität für bestimmte Peptide auf als OppA, vor allem Dipeptide werden bevorzugt gebunden (Smith *et al.*, 1999). DppA ist auch an der Peptidchemotaxis über den Chemorezeptor Tap beteiligt (Manson *et al.*, 1986).

Das veränderte Interaktionsmuster kommt möglicherweise durch den Wechsel der Lokalisation der Proteine im Periplasma nach Salzstress zustande. Um dies zu untersuchen, wurden GFP-Hybridproteine verwendet (Bauer, 2007). Durch diese Untersuchungen konnte eine tendenzielle Lokalisation von OppA am Pol und von DppA seitlich des Pols gezeigt werden. Es zeigte sich eine verstärkt laterale Lokalisation von GFP-DppA bei erhöhter Salzkonzentration im Vergleich zu GFP alleine (Bauer, 2007). Diese Beobachtungen geben also erste Hinweise auf eine veränderte Lokalisation der Proteine direkt nach Erhöhung der Osmolalität durch NaCl.

Die phänotypische Analyse entsprechender Deletionsmutanten ergab keine Hinweise auf eine veränderte Stressresistenz (Bauer, 2007). Bei der *dppA*-Mutante konnte eine Deregulation des Schwimmverhaltens und der Biofilmbildung beobachtet werden. Dies ist auf eine veränderte Hydrophobizität der Zellen zurückzuführen.

Sowohl die Interaktionsanalysen als auch die mikroskopischen Betrachtungen sprechen also für große Veränderungen im Periplasma unter hyperosmotischem Stress. Allerdings gibt es kaum Untersuchungen zur Stressreaktion im Periplasma. Durch Proteomanalysen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einige periplasmatische Proteine bei osmotischem Stress verstärkt produziert werden. Dabei handelte es sich um potentielle Zellwand-stabilisierende Proteine wie OsmY und YgaU und ein Protein unbekannter Funktion (YceI).

Unterschiedliche Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass Cytoplasma und periplasmatischer Raum isoosmotisch sind (Cayley *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 1977). Damit muß auch der periplasmatische Raum auf osmotischen Stress aktiv reagieren. Dies passiert durch umfassende Veränderungen auf Proteinebene nach einem osmotischen Stress. Sowohl die Lokalisation einiger Proteine wie auch die Proteinzusammensetzung verändern sich nachweislich.

4.5 Bedeutung von HdhA bei der Osmoadaptation

Das Protein HdhA wurde nach osmotischem Stress in erhöhten Mengen in den durchgeführten Proteomanalysen nachgewiesen. Während phänotypische Untersuchungen von Mutantenstämmen in denen die Gene *yceI*, *yjbJ*, *ygaU*, *yciEF* und *ygaU* durch eine Resistenzkassette ersetzt wurden, keine oder nur minimale Unterschiede zum Wildtyp aufzeigten, resultierte das Fehlen von HdhA in einem Stress-sensitiven Phänotyp des entsprechenden Stammes (Hofer, 2007). Der Stamm VH1 wuchs langsamer in Medien mit

erhöhter Osmolalität, unabhängig von der Art des Mediums. Weiterhin war die Sensitivität der Mutante gegenüber oxidativem Stress erhöht, sowie die Beweglichkeit und Biofilmbildung im Vergleich zum isogenen Wildtyp erniedrigt. Das Wachstumsdefizit bei erhöhten Osmolalitäten konnte durch Einbringen einer Plasmids, das für HdhA kodiert, komplementiert werden. Weiterhin zeigten sich Unterschiede auf Proteomebene zwischen Wildtyp und *hdhA*-Mutante, allerdings nur bei erhöhten Osmolalitäten, nicht bei Kultivierung in Minimalmedium ohne NaCl. HdhA fungiert *in vitro* als NAD⁺-abhängige 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (EC 1.1.1.159) und zählt zur SDR („short-chain dehydrogenase/reductase“)-Familie. *In vitro* oxidiert dieses als Homotetramer vorliegende Enzym alle Gallensäuren, die eine α -Hydroxylgruppe an Position C7 des Steroidgerüsts besitzen (Yoshimoto *et al.*, 1991). Allerdings ist die SDR-Familie für ein weites Substratspektrum (Alkohole, Ribitole und Zucker) bekannt (Tanaka *et al.*, 1996). *In vivo*-Untersuchungen über die Funktion von HdhA liegen nicht vor. Um *E. coli* vor Gallensäuren im Gastrointestinaltrakt zu schützen, indem es diese oxidiert und somit die Gallensäuren ihre Detergenzeigenschaften verlieren, müsste HdhA eigentlich aus der Zelle ausgeschleust werden. Bereits durch das Eindringen der Gallensäuren in die Zelle sollte eine Schädigung der Membran hervorgerufen werden. Es gibt allerdings keine Hinweise auf eine Sekretion von HdhA. Somit kann angenommen werden, dass HdhA *in vivo* andere Reaktionen katalysiert.

Hinweise auf eine mögliche Funktion von HdhA geben Interaktionsanalysen (Arifuzzaman *et al.*, 2006). Dabei konnte eine Interaktion von HdhA unter anderem mit UspG nachgewiesen werden. UspG ist ein Mitglied der „universellen Stress Protein“ (Usp)-Familie (Kvint *et al.*, 2003). Usp-Proteine erhöhen die Widerstandsfähigkeit von Zellen gegenüber verschiedenen Stressbedingungen und spielen eine Rolle bei der Beweglichkeit und Adhäsion (Nachin *et al.*, 2005). Eine *uspG*-Mutante weist ähnliche phänotypische Eigenschaften wie eine *hdhA*-Mutante auf, nämlich eine eingeschränkte Biofilmbildung und erhöhte Sensitivität gegenüber Sauerstoffradikalen (Nachin *et al.*, 2005). Möglicherweise ist eine gegenseitige Interaktion für diese Vorgänge entscheidend.

Des Weiteren wurde eine Interaktion von HdhA mit QseB, dem Antwortregulator des QseB/QseC-Zweikomponentensystems beschrieben (Arifuzzaman *et al.*, 2006). Beim QseB/QseC-Zweikomponentensystem handelt es sich um eine Komponente der „quorum sensing“-Regulationskaskade, das in der Regulation von Genen involviert ist, die am Flagellenaufbau und an der Beweglichkeit beteiligt sind (Sperandio *et al.*, 2002). Wie die *hdhA*-Mutante zeigt eine *qseB*-Mutante eine beeinträchtigte Beweglichkeit (Gonzalez Barrios *et al.*, 2006). Sollte eine Interaktion mit HdhA für die Funktion des Transkriptionsregulators QseB notwendig sein, könnte dadurch auch die verringerte Beweglichkeit der *hdhA*-Mutante erklärt werden.

Durch Proteomanalysen von in Minimalmedium kultivierten Zellen konnten in der *hdhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine Veränderung der Menge einiger Proteine bei osmotischem

Stress nachgewiesen werden. In verringerter Menge wurden HdeB, YfdX und GadB detektiert. HdeB ist ein Chaperon, das während eines Säurestress' an periplasmatische Proteine bindet und deren Aggregation verhindert. Daher zeigen entsprechende Mutantenstämme eine verringerte Überlebensrate bei Säurestress (Kern *et al.*, 2007). Die Funktion von YfdX ist unbekannt. Die Glutamatdecarboxylase β , GadB, spaltet Glutamat in CO_2 und in das neutrale γ -Aminobutyrat (GABA), wodurch Protonen verbraucht werden. Das Enzym ist in den Säureschutz während der Magenpassage involviert (Lee *et al.*, 2003; Tramonti *et al.*, 2006). Die Induktion von *gadB* erfolgt auch bei Salzstress (DeBiase *et al.*, 1999). Die verminderte Produktion dieser schützenden Enzyme könnte möglicherweise zu dem beobachteten Phänotyp führen.

Bei den vier Proteinen, die in der *hdhA*-Mutante in höheren Mengen vorhanden waren als im Wildtyp, handelte es sich um ThrC, PheA, CisY und Dps. ThrC katalysiert einen Schritt der Threonin-Synthese. Das bifunktionelle Protein PheA (Chorismatmutase/Prephenatdehydratase) ist ebenfalls an der Biosynthese von Threonin und der aromatischen Aminosäure Phenylalanin beteiligt (Nelms *et al.*, 1992). CisY ist als Citratsynthase im Citratzyklus involviert und Dps ist ein Ferritin-ähnliches Protein, das wie bereits beschrieben unspezifisch an DNA bindet und diese vor oxidativem Stress (Martinez und Kolter, 1997), Nukleasen und anderen Stressbedingungen (Almiron *et al.*, 1992) wie z.B. Osmostress schützt. Für mögliche Aufgaben der verstärkt synthetisierten Proteine ThrC, PheA und Dps bei hyperosmotischen Bedingungen konnten keine genauen Aussagen getroffen werden. Ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Synthese von ThrC und der verminderten Synthese von HdeB ist nicht auszuschließen, da gezeigt werden konnte, dass *hdeB* in einer Threonin-überproduzierenden Mutante vermindert exprimiert wird (Lee *et al.*, 2003). Eine verstärkte Akkumulation des DNA-schützenden Proteins Dps wäre als kompensatorische Reaktion unter hyperosmotischen Bedingungen denkbar.

4.6 Bedeutung von *TreF* bei der Regulation der intrazellulären Trehalosekonzentration

Trehalose ist bei hyperosmotischem Stress ein bedeutendes kompatibles Solut in *E. coli*. Die Akkumulation dieser Verbindung ist unabdingbar, um sich an erhöhte Osmolaritäten in der Umgebung anzupassen, wenn keine anderen kompatiblen Solute zur Verfügung stehen. Die in 4.1 diskutierten Proteomanalysen zeigten, dass die Akkumulation verschiedener Enzyme des Trehalose- und Zuckermetabolismus bei hyperosmotischem Stress sowohl von der Verfügbarkeit von Sauerstoff als auch der Anwesenheit von anderen kompatiblen Soluten abhängt. Besonders offensichtlich war dies im Fall von *TreF* und *OtsB*. Während *OtsB* den

letzten Schritt der Synthese von Trehalose katalysiert, baut die cytoplasmatische Trehalase TreF das kompatible Solut ab. Beide werden bei hyperosmotischem Stress hochreguliert. TreF wurde bereits *in vitro* charakterisiert (Horlacher *et al.*, 1996). Die genaue Funktion des Enzyms und die regulatorische Funktion auf die Trehalosekonzentration in der Zelle, blieben jedoch unklar. Erste Hinweise auf einen Einfluss von TreF auf die Trehalosekonzentration zeigten sich in der erhöhten Wachstumsrate einer *treF*-Mutante bei erhöhter Osmolalität im Vergleich zum Wildtyp. Diese Beobachtung ist durch die gemessenen erhöhten Trehalosekonzentrationen in diesem Stamm erklärbar. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TreF die Trehaloseakkumulation unter aeroben Bedingungen dereguliert ist. TreF scheint also entscheidend für die Einstellung der Trehalosekonzentration in der Zelle in Gegenwart von Sauerstoff zu sein. Eine vergleichbare Erhöhung der Trehalase-Aktivität unter Stressbedingungen wurde z.B. in *Saccharomyces sp.* beschrieben (Voit, 2003). Vor allem die Trehalose-Akkumulation bei Hitzestress ist hier gut untersucht. Ungeachtet, der ersten Vermutung, dass die Erhöhung der Trehalaseaktivität bei Stress der erfolgreichen Adaptation entgegenarbeitet, konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Trehalaseaktivität entscheidend für eine koordinierte Hitzestressantwort ist. Sobald die Zelle effektiv auf eine erhöhte Temperatur reagiert hat, entstehen durch die erhöhte Trehalosekonzentration Probleme, da sich diese negativ auf die Renaturierung partiell ungefalteter Proteine auswirkt. Eine ähnliche Funktion von TreF in *E. coli* unter osmotischen Stressbedingungen wäre denkbar, konnte aber nicht experimentell nachgewiesen werden.

Anwesenheit von Glycinbetain unter aeroben Bedingungen führte zu einer Hochregulation von TreF. Glycinbetain inhibiert aber gleichzeitig die Induktion des *otsAB*-Operons. Dies konnte durch die erniedrigte Menge von OtsB unter diesen Bedingungen in Proteomuntersuchungen bestätigt werden. Es konnten keine Unterschiede der Trehalosemengen unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Die erhöhte TreF-Menge spielt eine untergeordnete Rolle, da die Produktion von Trehalose durch Glycinbetain über eine Hemmung der *otsAB*-Transkription verhindert wird.

Unter anaeroben Bedingungen wurde TreF nicht hochreguliert, und es konnten folglich auch keine Unterschiede im Wildtyp im Vergleich zur *treF*-Mutante nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei Zugabe des kompatiblen Solutes Glycinbetain ein anderes Bild. TreF konnte in erhöhten Mengen nachgewiesen werden, die aber deutlich unter denen in Gegenwart von Sauerstoff lagen. Gleichzeitig konnte eine Deregulation der Trehaloseakkumulation in der *treF*-Mutante beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür ist, dass unter diesen Bedingungen die Synthese von Trehalose trotz Gegenwart von Glycinbetain nicht inhibiert wird. Daher kam es auch im Wildtyp zu einer transienten Akkumulation von Trehalose, der durch TreF entgegen gewirkt wurde.

Die Induktion von *treF* ist nicht absolut RpoS abhängig. Auch wenn keine oder nur eine schwache Akkumulation von RpoS nachzuweisen war, wie in Gegenwart von Glycinbetain, wurde TreF akkumuliert. Es muss also weitere Regulationsmechanismen geben, die von der Sauerstoffverfügbarkeit und der Anwesenheit von extrazellulären kompatiblen Soluten gesteuert werden. Es ist möglich, dass Glycinbetain direkt auf den Promotorkomplex am *treF*-Promotor wirkt, ähnlich wie es für Kaliumglutamat bei der Transkription von *osmY* gezeigt wurde (Lee und Gralla, 2004).

4.7 Abschließendes Modell der Osmoadaptation in *E. coli*

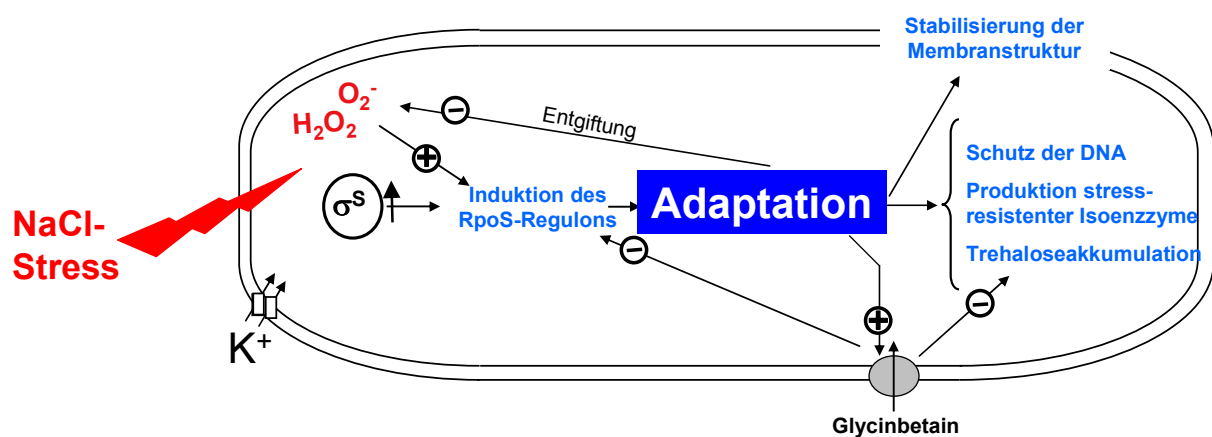


Abb. 4.3: Modell der Osmoadaptation von *E. coli* in Minimalmedium. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind in das Modell eingearbeitet. Erläuterung siehe Text.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann das Modell der Osmoadaptation von *E. coli* erweitert werden (Abb. 4.3). Osmotischer Stress in Abwesenheit von kompatiblen Soluten führt zur schnellen Aufnahme von K^+ und der Akkumulation von Sauerstoffradikalen. K^+ stellt in Komplexmedium eine Art „second messenger“ dar, der für die veränderte Produktion einiger Enzyme und eines Transporters bedeutend ist. Auch die Radikalbildung verstärkt die, durch die Induktion des RpoS-Regulons hervorgerufene Akkumulation zahlreicher Proteine. Die Proteine bewirken beispielsweise den Schutz der DNA vor Modifikationen. Außerdem werden stressresistente Isoenzyme angehäuft. Im Periplasma ergeben sich weitreichende Veränderungen. Möglicherweise wird dadurch eine Stabilisierung der Zellwand- und Membranstruktur erreicht. Ein weiterer entscheidender Mechanismus ist die Akkumulation des kompatiblen Soluts Trehalose. Darüber hinaus werden Enzyme produziert, die die entstandenen Sauerstoffradikale entgiften. Die Reaktion auf hyperosmotischen Stress führt auch zur Hochregulation von Transportern für kompatible Solute. Ist Glycinbetain in der Umgebung vorhanden, wird sowohl die Osmoadaptation auf Proteomebene abgeschwächt, als

auch die Trehalase TreF vermehrt synthetisiert bzw. die Expression der Enzyme der Trehalosesynthese herunterreguliert.

5 Zusammenfassung

Ein Habitat von *Escherichia coli* ist der Gastrointestinaltrakt von Säugetieren, der sich durch anaerobe Bedingungen und eine hohe Osmolalität auszeichnet. *E. coli* ist aber auch freilebend in Gegenwart von Sauerstoff in der Umwelt bei variierenden Osmolalitäten nachzuweisen. Eine Adaptation an diese ständig wechselnden Umweltbedingungen ist entscheidend für Wachstum und Überleben. In dieser Arbeit wurde der Adaptationsprozess an erhöhte Osmolalitäten durch globale Proteomanalysen untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene Aspekte des Prozesses im Detail analysiert, um weitere regulatorische Komponenten aufzudecken.

- Es wurden globale Proteomveränderungen im pI-Bereich 4-7 nach osmotischem Stress unter aeroben Bedingungen zeitabhängig visualisiert. Es konnte eine verstärkte Produktion von 12 Proteinen nachgewiesen werden. 11 zusätzliche Proteine akkumulierten in Zellen, die einem osmotischen Stress ausgesetzt waren, der durch Zugabe des Salzes NaCl ausgelöst wurde. Der Großteil der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine waren Proteine mit allgemeiner Schutzfunktion, die auf transkriptioneller Ebene vom globalen Stressregulator RpoS reguliert werden. Der Vergleich von aeroben und anaeroben Bedingungen ergab eine Überlappung der akkumulierten Proteine von 50 %.
- Durch ergänzende Proteomanalysen mit alternativen Gelsystemen konnten zwei weitere Proteine identifiziert werden, die an der Osmostressantwort beteiligt sind.
- Die Zugabe des kompatiblen Soluts Glycinbetain resultierte in einer verminderten Akkumulation von 9 RpoS-regulierten Proteinen bei Salzstress unter aeroben Bedingungen. Für mindestens zwei Proteine konnte eine gegenläufige Regulation nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen verminderte Glycinbetain die Akkumulation eines Proteins (ProX) nach Zugabe von NaCl.
- Es wurden Proteomanalysen einer K⁺-Aufnahmemutante im Vergleich zum Wildtyp bei hyperosmotischem Stress erstellt, um den Einfluss der erhöhten intrazellulären K⁺-Konzentration auf die nachfolgende Stressantwort zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von zwei Proteinen (ProX und TnaA) von der K⁺-Akkumulation abhängig ist. Das Regulationsmuster weiterer Proteine, insbesondere metabolischer Enzyme, war durch die fehlende Akkumulation von K⁺ in der Mutante beeinflusst.

- Es wurde eine Methode entwickelt, um Veränderungen der Proteininteraktionen direkt nach Salzstress aufzuzeigen. Durch Fixierung der Zellen mit Formaldehyd und anschließender Fraktionierung der Proteine konnten umfassende Veränderungen im Interaktionsmuster periplasmatischer Proteine nachgewiesen werden.
- Eine Bildung von Sauerstoffradikalen bei hyperosmotischem Stress konnte unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes erstmalig in *E. coli* nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Radikalbildung durch Inkubation mit Natriumascorbat führte zu einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen bei sehr hohen NaCl-Konzentrationen. Zellen, die in Gegenwart von Natriumascorbat einem Salzstress ausgesetzt waren, wiesen verminderte Mengen bestimmter Osmostress-involvierter Proteine auf. Für *E. coli* Stämme, denen Sauerstoffradikal-abbauende Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutase fehlten, wurde eine erhöhte Salzstressresistenz gezeigt.
- Die phänotypische Analyse einer *hdhA* Mutante ergab verminderte Wachstumsraten bei erhöhten Osmolalitäten. Die Mutante war im Vergleich zum Wildtyp durch reduzierte Biofilmbildung und Beweglichkeit sowie Veränderungen im Proteom nach hyperosmotischem Stress gekennzeichnet.
- Die osmotisch induzierte, cytoplasmatische Trehalase TreF reguliert die intrazelluläre Trehalosekonzentration bei Salzstress unter aeroben Bedingungen. Unter anaeroben Bedingungen konnten keine Unterschiede in den Trehalosekonzentrationen in einer *treF*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Die Zugabe des kompatiblen Solutes Glycinbetain führte unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit zur verstärkten Produktion von TreF.

6 Literaturverzeichnis

- Abdallah, J., T. Caldas, F. Kthiri, R. Kern, and G. Richarme.** 2007. YhbO protects cells against multiple stresses. *J. Bacteriol.* **189**: 9140-9144
- Aiba, H., S. Adhya, and B. de Crombrughe.** 1981. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **256**:11905-11910
- Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong, and R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**:2646-2654
- Altuvia, S., M. Almiron, G. Huisman, R. Kolter, and G. Storz.** 1994. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol.* **13**:265-272
- Angelidis, A. S., and G. M. Smith.** 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7492-7498
- Arifuzzaman, M., M. Maeda, A. Itoh, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. C. Huang, A. Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-UI-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada, and H. Mori.** 2006. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K12. *Genome Res.* **16**:686-691
- Ausubel, F.M., R. E. Brent, D. D. Kingston, J. G. Moore, K. A. Seidman, Smith, and K. Struhl.** 1987, updated 1991. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates and Wiley Interscience, John Wiley and Sons, New York.
- Awano, N., M. Wada, A. Kohdoh, T. Oikawa, H. Takagi, and S. Nakamori.** 2003. Effect of cysteine desulhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:239-243
- Azam, T. A., and A. Ishihama.** 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* **274**:33105-33113

- Barron, A., G. May, E. Bremer, and M. Villarejo.** 1986. Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **167**:433-438
- Batchelor, E., and M. Goulian.** 2006. Imaging OmpR localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **59**: 1767-1778
- Bateman, A., and M. Bycroft.** 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**:1113-1119
- Bauer, T.** 2007. Zelluläre Veränderungen während der Osmoadaptation in *Escherichia coli* am Beispiel periplasmatischer Peptidbindende Proteine und der Osmolytzusammensetzung. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Biologie I
- Becker, G., E. Klauck, and R. Hengge-Aronis.** 1999. Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: The response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turn-over element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 6439-6444
- Bhriain, N. N., C. J. Dorman, and C. F. Higgins.** 1989. An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **3**:933-942
- Blattner, F.R., G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474
- Boos, W., U. Ehmman, E. Bremer, A. Middendorf, and P. Postma.** 1987. Trehalase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**:13212-13218
- Booth, I. R.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**:359-378
- Borges, N., A. Ramos, N. D. Raven, R. J. Sharp, and H. Santos.** 2002. Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**:209-216

- Bossemeyer, D., A. Schlosser, and E. P. Bakker.** 1989. Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. *J. Bacteriol.* **171**:2219-2221
- Botsford, J. L.** 1990. Analysis of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**:355-360
- Bouvier, J. S., S. Gordia, G. Kampmann, R. Lange, R. Hengge-Aronis, and C. Gutierrez.** 1998. Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, H-NS and Lrp on transcription of the gene *osmC*. *Mol. Microbiol.* **28**:971-980
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Bremer, E. and R. Krämer.** 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, p. 79-97. *In* G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Britton, K. L., P. J. Baker, M. Fisher, S. Ruzheinikov, D. J. Gilmour, M.-J. Bonete, J. Ferrer, C. Pire, J. Esclapez, and D. W. Rice.** 2006. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferox mediterranei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:4846-4851
- Cánovas, D., S. A. Fletcher, M. Hayashi, and L. N. Csonka.** 2001. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* **183**:3365-3371
- Cayley, D. S., H. J. Guttman, and M. T. Record.** 2000. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**:1748-1764
- Cayley, S., and M. T. Record.** 2003. Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochem.* **42**:12596-12609
- Chakrabortee, S., C. Boschetti, L. J. Walton, S. Sarkar, D. C. Rubinsztein, and A. Tunnacliffe.** 2007. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**:18073-18078

- Cherepanov, P.P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9-14
- Clark, D., and J. Parker.** 1984. Proteins induced by high osmotic pressure in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:81-83
- Colland, F., M. Barth, R. Hengge-Aronis, and A. Kolb.** 2000. Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: a role of CRP, IHF and Lrp transcription factors. *EMBO J.* **19**:3028-3037
- Conter, A., C. Gangneux, M. Suzanne, and C. Gutierrez.** 2001. Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Res. Microbiol.* **152**:17-26
- Cortón, M., G. Villuendas, J. I. Botella, J. L. San Millán, H. F. Escoabr-Morreale, and B. Peral.** 2004. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* **4**: 438-441
- Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121- 147
- Csonka, L. N., and W. Epstein.** 1996. Osmoregulation, p. 1210-1223. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss, E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Culham, D. E., A. Lu, M. Jishage, K. A. Krogfelt, A. Ishihama, and J. M. Wood.** 2001. The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, ProP, ProU and other systems. *Microbiology* **147**:1657-1670
- Culham, D. E., J. Henderson, R. A. Crane, and J. M. Wood.** 2003. Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* **42**:410-420
- Darwin, A. J.** 2005. The phage-shock-protein response. *Mol. Microbiol.* **57**:621-628

- De Biase, D., A. Tramonti, F. Bossa, and P. Visca.** 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
- Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid, and E. P. Bakker.** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**:348-357
- Dukan, S., and D. Touati.** 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* **178**:6145-6150
- Eisenberg, H., M. Mevarech, and G. Zaccai.** 1992. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Protein Chem.* **43**:1-62
- Epstein, W., and B. S. Kim.** 1971. Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **108**:639-644
- Freestone, P., S. Grant, M. Trinei, T. Onoda, and V. Norris.** 1998. Protein phosphorylation in *Escherichia coli* L-form NC-7. *Microbiology* **144**:3289-3295
- Galinski, E. A.** 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**:272-328
- Galinski, E. A., and H. G. Trüper.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:95-108
- Garay-Arroyo, A., J. M. Colmenero-Flores, A. Garcarrubio, and A. A. Covarrubias.** 2000. Highly hydrophobic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* **275**:5668-5674
- Giaever, H. M., O.B. Styrvold, I. Kaasen, and A. R. Strom.** 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:2841-2849
- Gonzalez Barrios, A. F., R. Zuo, Y. Hashimoto, L. Yang, W. E. Bentley, and T. K. Wood.** 2006. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J. Bacteriol.* **188**:305-316

- Goswami, M., S. H. Mangoli, and N. Jawali.** 2006. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 949-954
- Grothe, S., L. Krogsrud, D. J. McClellan, J. L. Milner, and J. M. Wood.** 1986. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **166**:253-259
- Gutierrez, C., M. Ardourel, E. Bremer, A. Middendorf, W. Boos, and U. Ehmman.** 1989. Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **217**:347-354
- Gutierrez, C., and J. C. Devedjian.** 1991. Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **220**:959-973
- Guyer, C. A., D. G. Morgan, and J. V. Staros.** 1986. Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**:775-779
- Haardt, M., B. Kempf, E. Faatz, and E. Bremer.** 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
- Hall, M. N., and T. J. Silhavy.** 1981. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **151**:1-15
- Hartinger, J., K. Stenius, D. Högemann, and R. Jahn.** 1996. 16-BAC/SDS-PAGE: A Two-Dimensional Gel Electrophoresis System Suitable for the Separation of Integral Membrane Proteins. *Anal. Biochem.* **240**:126-133
- Han, M. J., and S. Y. Lee.** 2006. The *Escherichia coli* proteome: Past, present, and future prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:362-439
- Hecker, M., and U. Völker.** 2004. Towards a comprehensive understanding of *Bacillus subtilis* cell physiology by physiological proteomics. *Proteomics* **4**: 3727-3750
- Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:373-395

- Hengge-Aronis, R., R. Lange, N. Henneberg, and D. Fischer.** 1993. Osmotic regulation of *rpoS* dependent genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**:259-265
- Higgins, C. F. and M. M. Hardie.** 1983. Periplasmic protein associated with the oligopeptide permeases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **155**:1434-1438
- Hindupur, A., D. Liu, Y. Zhao, H. D. Bellamy, M. A. White, and R. O. Fox.** 2006. The crystal structure of the *E. coli* stress protein YciF. Protein Sci. **15**:2605-2611
- Hofer, V.** 2007. Bedeutung bestimmter Proteine unbekannter Funktion bei der Osmoadaptation in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Biologie I
- Hoffmann, T., A. Schütz, M. Brosius, A. Völker, U. Völker, and E. Bremer.** 2002. High-salinity induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **184**:718-727
- Höper, D., J. Bernhardt, and M. Hecker.** 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: A physiological proteomics approach. Proteomics **6**:1550-1562
- Horlacher, R., K. Uhland, W. Klein, M. Ehrmann, and W. Boos.** 1996. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**:6250-6257
- Houssin, C., N. Eynard, E. Shechter, and A. Ghazi.** 1991. Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta **1056**:76-84
- Ignatova, Z., and L. M. Gierasch.** 2007. Effects of osmolytes on protein folding and aggregation in cells. Methods Enzymol. **428**:355-372
- Imlay, J. A., and I. Fridovich.** 1992. Suppression of oxidative envelope damage by pseudoreversion of a superoxide dismutase-deficient mutant of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**:953-961
- Ishihama, A.** 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annu. Rev. Microbiol. **54**:499-518
- Jones, P. G., R. A. VanBogelen, and F. C. Neidhardt.** 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**:2092-2095

- Jovanovich, S. B., M. Martinell, M. T. Record, Jr., and R. R. Burgess.** 1988. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**:534-539
- Jung, I. L., K. H. Physo, and I. G. Kim.** 2005. RpoS-mediated growth-dependent expression of the *Escherichia coli tkt* genes encoding transketolases isoenzymes. *Curr. Microbiol.* **50**: 314-318
- Jung, K., M. Krabusch, and K. Altendorf.** 2001. Cs(+) Induces the *kdp* Operon of *Escherichia coli* by Lowering the Intracellular K(+) Concentration. *J. Bacteriol.* **183**:3800-3803
- Kanamaru, K., and T. Mizuno.** 1992. Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*: a novel mutant of the positive regulator, OmpR, that functions in a phosphorylation-independent manner. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**: 425-430
- Kamekura, M.** 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**:289-295
- Kandror, O., A. DeLeon, and A. L. Goldberg.** 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:9727 -32
- Kennedy, S. P., W. V. Ng, S. L. Salzberg, L. Hood, and S. DasSarma.** 2001. Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.* **11**:1641-1650
- Kern, R., A. Malki, J. Abdallah, J. Tagourti, and G. Richarme.** 2007. *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J. Bacteriol.* **18**:603-610
- Keseler, I. M., J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil, and P. D. Karp.** 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **33**:D334-D337
- Klauck, E, M. Lingnau, and R. Hengge-Aronis.** 2001. Role of the response regulator RssB in σ^S recognition and initiation of σ^S proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**:1381-1390

- Kobayashi, R., T. Suzuki, and M. Yoshida.** 2007. *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol. Microbiol.* **66**:100-109
- Küper, C, and K. Jung.** 2005. CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**:26-39
- Kvint, K., L. Nachin, A. Diez, and T. Nystrom.** 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:140-145
- Lange, R., M. Barth, and R. Hengge-Aronis.** 1993. Complex transcriptional control of the σ^S -dependent stationary phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary phase response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:7910-917
- Lange, R., and R. Hengge-Aronis.** 1994. The cellular concentration of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8**:1600-1612
- Larsen, P. I., L. K. Sydnnes, B. Landfald, and A. R. Strom.** 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acids, and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147**:1-7
- Laursen, B. S., I. Siwanowicz, G. Larigauderie, J. Hedegaard, K. Ito, Y. Nakamura, J. M. Kenney, K. K. Mortensen, and H. U. Sperling-Petersen.** 2003. Characterization of Mutations in the GTP-binding Domain of IF2 Resulting in Cold-sensitive Growth of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **326**:543-551
- Leder, P., D. Tiemeier, and L. Enquist.** 1977. EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: the lambda gt WES system. *Science* **196**:175-177
- Lee, J. H., D. E. Lee, B. U. Lee, and H. S. Kim.** 2003. Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant stain. *J. Bacteriol.* **185**:5442-5451
- Lee, S. J., and J. D. Gralla.** 2004. Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol. Cell* **14**:153-162

- Lelong, C., K. Aguiluz, S. Luche, L. Kuhn, J. Garin, T. Rabilloud, and J. Geiselmann.** 2007. The Crl-RpoS regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**:648-659
- Len, A. C., D. W. Harty, and N. A. Jacques.** 2004. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* **150**:1339-1351
- Lesniak, J., W. A. Barton, and D. B. Nikolov.** 2003. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci.* **12**:2838-2843
- Loewen, P. C., and J. Switala.** 1986. Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell. Biol.* **64**:638-646
- Lopez-Campistrous, A., Semchuk, P., Burke, L., Palmer-Stone, T., Brokx, S. J., Broderick, G., Bottorff, D., Bolch, S., Weiner, J. H., and M. J. Ellison.** 2005. Localization, Annotation, and Comparison of the *Escherichia coli* K-12 Proteome under Two States of Growth. *Mol. Cell. Proteomics* **4**:1205-1209
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- Macfarlane, D. E.** 1989. Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride – sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal. Biochem.* **176**:457-463.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Manson, M. D., V. Blank, G. Brade, and C. F. Higgins.** 1986. Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature* **321**:253-256
- Marschall, C., V. Labrousse, M. Kreimer, D. Weichart, A. Kolb, and R. Hengge-Aronis.** 1998. Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on σ^S and requires activation by cAMP-CRP. *J. Mol. Biol.* **276**:339-353
- Martinez, A., and R. Kolter.** 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA binding protein Dps. *J. Bacteriol.* **179**:5188-5194

- Matsubara, M., S. I. Kitaoka, S. I. Takeda, and T. Mizuno.** 2000. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by His-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **5**:555-569
- McLaggan, D., J. Naprstek, E. T. Buurman, and W. Epstein.** 1994. Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:1911-1917
- Metzner, M. J., J. Germer, and R. Hengge.** 2004. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σ^S -dependent *csiD-ygaF-gabDTB* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **51**:799-811
- Meury, J.** 1988. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **149**: 232-239
- Meury, J.** 1994. Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**:281-286
- Meury, J., A. Robin, and P. Monnier-Champeix.** 1985. Turgor-controlled K⁺ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **151**:613-619
- Meyer, R. R., and P. S. Laine.** 1990. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **54**:342-380
- Mizuno, T., and S. Mizushima.** 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* **4**:1077-1082
- Model, P., G. Jovanovic, and J. Dworkin.** 1997. The *Escherichia coli* phage shock protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* **24**:255-261
- Möker, N., M. Brocker, S. Schaffer, R. Krämer, S. Morbach, and M. Bott.** 2004. Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol. Microbiol.* **54**:420-438

- Möker, N., P. Reihlen, R. Krämer, and S. Morbach.** 2007. Osmosensing properties of the histidine kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **282**:27666-27677
- Morbach, S., and R. Krämer.** 2003. Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**:69-75
- Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange, and R. Hengge-Aronis.** 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:1607-1613
- Mujacic, M., M. W. Bader, and F. Baneyx.** 2004. *Escherichia coli* Hsp31 functions as a holding chaperone that cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE system in the management of protein misfolding under severe stress conditions. *Mol. Microbiol.* **51**:849-859
- Mujacic, M., and F. Baneyx.** 2007. Chaperone Hsp31 contributes to acid resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1014-1018
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.** 1992. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**:17-27
- Mulvey, M. R., J. Switala, A. Borys, and P. C. Loewen.** 1990. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6713-6720
- Munro, G. F., K. Hercules, J. Morgan, and W. Sauerbier.** 1972. Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium. *J. Biol. Chem.* **247**:1272-1280
- Na, K. Y., S. K. Woo, S. D. Lee, and H. M. Kwon.** 2003. Silencing of TonEBP/NFAT5 transcriptional activator by RNA interference. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 283-288
- Nachin, L., U. Nannmark, and T. Nystrom.** 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J. Bacteriol.* **187**:6265-6272

- Nelms, J., R. M. Edwards, J. Warwick, and I. Fotheringham.** 1992. Novel mutations in the *pheA* gene of *Escherichia coli* K12 which result in highly feedback inhibition-resistant variants of chorismate mutase/prephenate dehydratase. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2592-2598
- Newton, W. A., and E. E. Snell.** 1964. Catalytic properties of tryptophanase, a multifunctional pyridoxal phosphate enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**:382-389
- Niefnecker, J.** 2005. Membranproteomanalyse von *Escherichia coli* unter hyperosmotischen Stressbedingungen und Funktionsanalyse von TrkH. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Biologie I
- Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32
- Nossal, N. G., and L. A. Heppel.** 1966. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* **241**:3055-3062
- Olsson, I., K. Larsson, R. Palmgren, and B. Bjellqvist.** 2002. Organic disulfides as a mean to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* **2**:1630-1632
- Özcan, N., C. S. Ejsing, A. Shevchenko, A. Lipski, S. Morbach, and R. Krämer.** 2007. Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **189**: 7485-7496
- Patskovsky, Y. V., B. Strokopytov, U. Ramagopal, and S. C. Almo.** 2004. Crystal structures of the *Escherichia coli* Ycel protein. New York Structural Genomics Research Consortium (NYSGRC), Burley, S.K.
- Patten, C. L., M. G. Kirchhof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton, and H. E. Schellhorn.** 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genomics* **272**:580-591
- Peterson, G.L.** 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**:346-356
- Pivetti, C. D., M.-R. Yen, S. Miller, W. Busch, Y.-H. Tseng, I. R. Booth, and M. H. Saier, Jr.** 2003. Two families of mechanosensitive channels. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:66-85

- Pratt, L. A., and T. J. Silhavy.** 1995. Porin regulation of *Escherichia coli*, p. 105-127. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (eds.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
- Prinz, W. A., C. Spiess, M. Ehrmann, C. Schierle, and J. Beckwith.** 1996. Targeting of signal sequenceless proteins for export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. EMBO J. **15**:5209-5217
- Promega.** 1994. Technical manual: Altered sites II *in vitro* mutagenesis systems.
- Purvis, J. E., L. P. Yomano, and L. O. Ingram.** 2005. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. Appl. Environ. Microbiol. **71**:3761-3769
- Racher, K. I., R. T. Voegelé, E. V. Marshall, D. E. Culham, J. M. Wood, H. Jung, M. Bacon, M. T. Cairns, S. M. Ferguson, W. J. Liang, P. J. Henderson, G. White, and F. R. Hallett.** 1999. Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. Biochemistry **38**:1676-1684
- Reinders, J., U. Lewandrowski, J. Moebius, Y. Wagner, and A. Sickmann.** 2004. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. Proteomics **4**:3686-3703
- Reinders, J., R. P. Zahedi, N. Pfanner, C. Meisinger, and A. Sickmann.** 2006. Towards the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. J. Proteome Res. **5**:1543-1554
- Reinehr, R. S., A. Becker, A. Hongen, and D. Haussinger.** 2004. The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptors and CD95. J. Biol. Chem. **279**:23977-23987
- Repoila, F., and C. Gutierrez.** 1991. Osmotic induction of the periplasmic trehalase in *Escherichia coli* K12: characterization of the *treA* gene promoter. Mol. Microbiol. **5**:747-755
- Repoila, F., N. Majdalani, and S. Gottesman.** 2003. Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: The RpoS paradigm. Mol. Microbiol. **48**:855-861

- Richarme, G., and T. D. Caldas.** 1997. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**:15607-15612
- Riedel, K., and A. Lehner.** 2007. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics* **7**:1217-1231
- Rimmele, M., and W. Boos.** 1994. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:5654-5664
- Roberts, M. F.** 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems* **1**:5
- Roth, W. G., M. P. Leckie, and D. N. Dietzler.** 1985a. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:434-441
- Roth, W. G., S. E. Porter, M. P. Leckie, B. E. Porter, and D. N. Dietzler.** 1985b. Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:442-449
- Ruebenhagen, R., H. Roensch, H. Jung, R. Kraemer, and S. Morbach.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-741
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**:5463-5467
- Santini, C. L., A. Bernadac, M. Zhang, A. Chanal, B. Ize, C. Blanco, and L. F. Wu.** 2001. Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J. Biol. Chem.* **276**:8159-8164
- Sastry, M. S., K. Korotkov, Y. Brodsky, and F. Baneyx.** 2002. Hsp31, the *Escherichia coli* *yedU* gene product, is a molecular chaperone whose activity is inhibited by ATP at high temperatures. *J. Biol. Chem.* **277**:46026-46034

- Schlösser, A., A. Hamann, M. Schleyer, and E. P. Bakker.** 1992. The K⁺-uptake systems TrkG and TrkH from *Escherichia coli*: A pair of unusual transport systems involved in osmoregulation. In: Palmieri, F. and Quagliariello, E. (eds) Molecular mechanism of transport. Elsevier, Amsterdam, pp 51-58
- Seaver, L. C., and J. A. Imlay.** 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:7173-7181
- Seel, W., G. Hendry, N. Atherton, and J. Lee.** 1991. Radical formation and accumulation *in vivo*, in desiccation tolerant and intolerant mosses. *Free Radic. Res. Commun.* **15**:133–141
- Shin, D. H., I. G. Choi, D. Busso, J. Jancarik, H. Yokota, R. Kim, and S. H. Kim.** 2004. Structure of OsmC from *Escherichia coli*: a salt-shock-induced protein. *Acta Crystallogr. D* **60**:903–911
- Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96
- Smirnova, G. V., N. G. Muzyka, and O. N. Oktyabrsky.** 2000. The role of the antioxidant enzymes in response of *Escherichia coli* to osmotic upshift. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**:209-213
- Smith, M. W., D. R. Tyreman, G. M. Payne, N. J. Marshall, and J. W. Payne.** 1999. Substrate specificity of the periplasmic dipeptide-binding protein from *Escherichia coli*: experimental basis for the design of peptide prodrugs. *Microbiology* **145**:2891-2901
- Soballe, B., and R. K. Poole.** 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology.* **145**:1817-1830
- Somalinga, R. V., S. R. Vijayakumar, M. G. Kirchhof, C. L. Patten, and H. E. Schellhorn.** 2004. RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random *lacZ* fusion mutagenesis. *J. Bacteriol.* **186**:8499-8507
- Sperandio, V., A. G. Torres, and J. B. Kaper.** 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **43**:809-21

- Stancik, L. M., D. M. Stancik, B. Schmidt, D. M. Barnhart, Y. N. Yoncheva, and J. L. Slonczewski.** 2002. PH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:4246-4258
- Stenberg, F., P. Chovanec, S. L. Maslen, C. V. Robinson, L. L. Ilag, G. von Heijne, and D. O. Daley.** 2005. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Biol. Chem.* **280**:34409-34419
- Stephani, K., D. Weichart, and R. Hengge.** 2003. Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**:1605-1614
- Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman.** 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**:7850-7861
- Stumpe, S., and E. P. Bakker.** 1997. Requirement of a large K⁺-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **167**:126-136
- Sturny, R., K. Cam, C. Gutierrez, and A. Conter.** 2003. NhaR and RcsB independently regulate the *osmCp1* promoter of *Escherichia coli* at overlapping regulatory sites. *J. Bacteriol.* **185**:4298-4304
- Sutherland, L., J. Cairney, M. J. Elmore, I. R. Booth, and C. F. Higgins.** 1986. Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.* **168**:805-814
- Takagi, J. S., N. Ida, M. Tokushige, H. Sakamoto, and Y. Shimura.** 1985. Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Escherichia coli* W. **13**:2063-2074
- Tanaka, N., T. Nonaka, T. Tanabe, T. Yoshimoto, D. Tsuru, and Y. Mitsui.** 1996. Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**:7715-7730
- Tani, T. H., A. Khodursky, R. M. Blumenthal, P. O. Brown, and R. G. Matthews.** 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13471-13476
- Tkachenko, A. G., and M. V. Fedotova.** 2007. Dependence of protective functions of *Escherichia coli* polyamines on strength of stress caused by superoxide radicals. *Biochem. (Moscow)* **72**:109-116

- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354
- Tramonti, A., M. De Canio, I. Delany, V. Scarlato, and D. De Biase.** 2006. Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the *gadA* and *gadBC* gene promoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:8118-8127
- Tsatskis, Y., J. Khambati, M. Dobson, M. Bogdanov, W. Dowhan, and J. M. Wood.** 2005. The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *J. Biol. Chem.* **280**:41387-41394
- Urbanowski, M. L., L. T. Stauffer, and G. V. Stauffer.** 2000. The *gvcB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **37**:856-868
- Van der Heide, T., and T. Poolman.** 2000. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7102-7106
- Varghese S., Y. Tang, and J. A. Imlay.** 2003. Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *J. Bacteriol.* **185**:221-230
- Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:504-544
- Voit, E. O.** 2003. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observation and canonical model analysis. *J. Theor. Biol.* **223**:55-78
- Walter, R. P., J. G. Morris, and D. B. Kell.** 1987. The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 259-266

- Warren, C. M., P. R. Krzesinski, and M. L. Greaser.** 2003. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* **24**:1695-1702
- Weber, A., and K. Jung.** 2002. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J. Bacteriol.* **184**:5502-5507
- Weber, A.** 2003. Transkriptom- und Proteom-Analysen von *Escherichia coli* unter hyperosmotischen Stressbedingungen und biochemische Charakterisierung von UspG. Dissertation, Universität Osnabrück, Fachbereich Biologie/Chemie
- Weber, A., S. A. Kögl, and K. Jung.** 2006. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:7165-7175
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, and R. Hengge.** 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**:1591-1603
- Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter, and A. Minsky.** 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **400**:83-85
- Woo, S. K., S. D. Lee, K. Y. Na, W. K. Park, and H. M. Kwon.** 2002. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5753-5760
- Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman, T. Van der Heide, and L. T. Smith.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **130**:437-460
- Yang, T., A. Zhang, M. Honegger, D. E. Kohan, D. Mizel, K. Sanders, J. R. Hoidal, J. P. Briggs, and J. B. Schnermann.** 2005. Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin. *J. Biol. Chem.* **280**:34966-34973
- Yanish-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119

- Yeats, C., and A. Bateman.** 2003. The BON domain: a putative membrane binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **28**:352–355
- Yoshimoto, T., H. Higashi, A. Kanatani, X. S. Lin, H. Nagai, H. Oyama, K. Kurazono, and D. Tsuru.** 1991. Cloning and Sequencing of the 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene from *Escherichia coli* HB101 and Characterization of the Expressed Enzyme. *J. Bacteriol.* **173**:2173-2179
- Zhang, X., N. I. Dmitrieva, J. H. Park, R. L. Levine, and M. B. Burg.** 2004. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and *in vivo*, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:9491-9496
- Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone, and N. D. Chasteen.** 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**:27689-27696
- Zhou, Y., S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi, and S. Wickner.** 2001. The RssB response regulator directly targets σ^S for degradation by ClpXP. *Genes & Dev.* **15**:627-637
- Zhou, X., J. Ferraris, Q. Cai, A. Anupam, and M. B. Burg.** 2005. Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP. *A. J. P. Renal* **289**:377-385
- Zhou, X., J. D. Ferraris, and M. B. Burg.** 2006. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**: 1169-1176

Anhang

Durch MALDI-TOF identifizierte Proteine- Identifizierungsdaten.

Protein	Beschreibung	NCBI Accession number	MASCOT score	Gelsystem
AceA	Isocitrat-Lyase	gi 16131841	70	BAC/SDS-PAGE
AceA	Isocitrat-Lyase	gi 16131841	128	1D-SDS-PAGE
AceE	Pyruvatdehydrogenase (Decarboxylase Komponente)	gi 16128107	330	BAC/SDS-PAGE
AceF	Pyruvatdehydrogenase	gi 16128108	152/112	BAC/SDS-PAGE
AcnA	Aconitat-Hydratase I	gi 16129237	278	2D-SDS-PAGE (4-7)
AcrA	Acridin-Efflux-Pumpe	gi 16128447	164	BAC/SDS-PAGE
AdhE	Acetaldehyd-CoA-Dehydrogenase und Eisen-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	gi 16129202	256/222	BAC/SDS-PAGE
AhpC	Alkylhydroperoxid- Reduktase	gi 16128588	143	2D-SDS-PAGE (4-7)
ArgG	Argininosuccinat- Synthetase	gi 16131063	134	BAC/SDS-PAGE
AspA	Aspartat- ammonia Lyase	gi 90111690	175	2D-SDS-PAGE (4-7)
AtpA	membrangebundene ATP-Synthase, (F1-Sektor), α -Untereinheit	gi 16131602	167/70	BAC/SDS-PAGE
AtpD	membrangebundene ATP-Synthase, (F1-Sektor), β -Untereinheit	gi 16131600	224/146	BAC/SDS-PAGE
AtpF	membrangebundene ATP-Synthase, (FO-Sektor), Untereinheit B	gi 16131604	64	BAC/SDS-PAGE
Bfr	Bacterioferritin	gi 16131215	198	2D-SDS-PAGE (4-7)
BtuB	Rezeptor der äußeren Membran für den Transport von Vitamin B12	gi 16131804	354	BAC/SDS-PAGE
CadA	Lysindecaboxylase	gi 1790573	92	2D-SDS-PAGE (4-7)
CisY	Citratsynthase	gi 16128695	187	2D-SDS-PAGE (4-7)

CysA	Sulfat/Thiosulfat-Transporter, ATP-Bindeprotein	gi 16130348	105	BAC/SDS-PAGE
CysP	Periplasmatisches Thiosulfat-bindendes Protein	gi 16130350	79	1D-SDS-PAGE
DacA	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase A	gi 16128615	176	BAC/SDS-PAGE
DacC	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase C	gi 16128807	171	BAC/SDS-PAGE
DegP	Protease Do	gi 16128154	64	BAC/SDS-PAGE
Dld	D-Laktat-Dehydrogenase	gi 16130071	186	BAC/SDS-PAGE
DnaK	Chaperon Hsp70	gi 16128008	164	BAC/SDS-PAGE
DppA	Periplasmatisches Dipeptid-bindendes Protein	gi 1827807	118	1D-SDS-PAGE
Dps	DNA-bindendes Protein mit einer Ferritin-ähnlichen Domäne	gi 16128780	65	BAC/SDS-PAGE
Dps(#3) ³	DNA-bindendes Protein mit einer Ferritin-ähnlichen Domäne	gi 1787032	157	2D-SDS-PAGE (4-7)
FecA	Rezeptor der äußeren Membran, Citrat-abhängiger Eisentransport	gi 16132112	238/87	BAC/SDS-PAGE
FepA	Ferrienterobactin-Rezeptor	gi 16128567	104	BAC/SDS-PAGE
FhuA	Rezeptor der äußeren Membran für Ferrichrom, Colicon M und Phagen T1, T5 und Phi8	gi 16128143	248	BAC/SDS-PAGE
FliC	Flagellin	gi 16129870	64	BAC/SDS-PAGE
FliY	Periplasmatisches Cystin-bindendes Protein	gi 16129867	146	1D-SDS-PAGE
FtsH	Zellteilungs-Protease	gi 16131068	191/66	BAC/SDS-PAGE
FtsI	Peptidoglykan-Synthetase	gi 16128077	141	BAC/SDS-PAGE
FtsZ	Tubulin-ähnliches GTP-bindendes Zellteilungsprotein und GTPase	gi 16128088	97	BAC/SDS-PAGE
FusA	Elongationsfaktor EF-G	gi 16131219	60	BAC/SDS-PAGE
GadB	Glutamatdecarboxylase β	gi 1787769	147	2D-SDS-PAGE (4-7)

GalM	Aldose-1-epimerase	gi 16128724	223	2D-SDS-PAGE (4-7)
GatY	Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase	gi 90111384	124	2D-SDS-PAGE (4-7)
GlgA	Glykogensynthase	gi 16131303	112	BAC/SDS-PAGE
GlgB	1,4- α -Glukan verzweigendes Enzym	gi 16131306	81	BAC/SDS-PAGE
GpmA	Phosphoglycerat-Mutase 1	gi 16128723	100	1D-SDS-PAGE
GroL	GroEL, Hsp60	gi 16131968	64	BAC/SDS-PAGE
HchA	Hsp31	gi 16129913	94	2D-SDS-PAGE (4-7)
HdeB	Periplasmatisches Säurestresschaperon	gi 162135912	80	2D-SDS-PAGE (4-7)
HdhA	α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, NAD-abhängig	gi 16129577	72	2D-SDS-PAGE (4-7)
HemX	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	gi 16131655	113	BAC/SDS-PAGE
HflC	Protease für Phagen λ cII Repressor	gi 16131997	108	BAC/SDS-PAGE
HflK	Regulator der FtsH Protease	gi 16131996	77	BAC/SDS-PAGE
HisJ	Periplasmatisches Histidin-bindendes Protein	gi 1610244	131	1D-SDS-PAGE
Imp	Organische Lösungsmittel-Toleranzprotein (OstA)	gi 16128048	147/59	BAC/SDS-PAGE
InfB	Initiationsfaktor IF-2	gi 12053640	153	2D-SDS-PAGE (4-7)
KatE	Hydroxyperoxidase II	gi 48994891	197	2D-SDS-PAGE (4-7)
L12	Ribosomales Protein	gi 1789713	149	1D-SDS-PAGE
LivJ	Periplasmatisches Bindeprotein für Leucin, Isoleucin und Valin	gi 49176358	134	1D-SDS-PAGE
ManX	Mannose-spezifisches PTS-Enzym IIAB	gi 16129771	93	BAC/SDS-PAGE
Mdh	Malat-Dehydrogenase	gi 1789632	125	1D-SDS-PAGE
Mdh/ GapA	Malat-Dehydrogenase/Glycerolaldehyd-1-phosphat-Dehydrogenase	gi 1789632/ gi 16129733	177	1D-SDS-PAGE

MetL	Aspartokinase und Homoserin-Dehydrogenase II	gij15804537	95	2D-SDS-PAGE (4-7)
MetQ	D-Methionin-bindendes Lipoprotein	gij16128190	190	BAC/SDS-PAGE
MltA	lytische Mureintransglycosylase A	gij16130720	58	BAC/SDS-PAGE
MrdA	Penicillin-bindendes Protein 2	gij16128618	120	BAC/SDS-PAGE
MsbA	ATP-bindendes Transportprotein ; Multicopy-Suppressor von HtrB	gij16128881	65	BAC/SDS-PAGE
Ndh	NADH-Dehydrogenase	gij16129072	66	BAC/SDS-PAGE
NlpB	Lipoprotein-34	gij90111442	119	BAC/SDS-PAGE
NuoC	NADH-Quinon-Oxidoreduktase C/D	gij16130221	209	BAC/SDS-PAGE
NuoF	NADH-Quinon-Oxidoreduktase F	gij16130219	97	BAC/SDS-PAGE
NuoG	NADH-Quinon-Oxidoreduktase G	gij49176206	167	BAC/SDS-PAGE
OmpA	Protein der äußeren Membran 3a	gij16128924	125-71	BAC/SDS-PAGE
OmpC	Porin C der äußeren Membran	gij16130152	205	2D-SDS-PAGE (4-7)
OmpC/ OmpF	Porine der äußeren Membran	gij16130152/ gij16128896	223	1D-SDS-PAGE
OmpF	Protein der äußeren Membran 1a	gij16128896	114	BAC/SDS-PAGE
OppA	Periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein	gij16129204	123	BAC/SDS-PAGE
OppA	Periplasmatisches Oligopeptid-bindendes Protein	gij16129204	146	1D-SDS-PAGE
OsmC	Osmotisch induzierbare Peroxidase	gij16129441	105	2D-SDS-PAGE (4-7)
OsmY	Periplasmatisches Protein	gij16132194	121	2D-SDS-PAGE (4-7)
OtsA	Trehalose-6-phosphat-Synthase	gij16129848	133	2D-SDS-PAGE (6-11)
OtsB	Trehalose-6-phosphat-Phosphatase	gij16129849	133	2D-SDS-PAGE (4-7)
Pal	Peptidoglycan-assoziiertes Protein	gij16128716	62	BAC/SDS-PAGE

PfIB	Formiat-Acetyltransferase 1	gi 16128870	240	2D-SDS-PAGE (4-7)
PheA	Chorismatmutase/Prephenatdehydratase	gi 16130520	169	2D-SDS-PAGE (4-7)
PlsB	Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase	gi 90111678	104	BAC/SDS-PAGE
PntA	NAD(P)-Transhydrogenase, α -Untereinheit	gi 16129561	81	BAC/SDS-PAGE
PoxB	Pyruvat-Dehydrogenase/Oxidase	gi 1009039	90	2D-SDS-PAGE (4-7)
PpiD	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase D	gi 16128426	71	BAC/SDS-PAGE
ProV	Glycinbetain/L-Prolin –Transporter, ATP-bindendes Protein	gi 16130591	128	BAC/SDS-PAGE
ProX(#1) ³	Periplasmatisches Glycinbetain-Bindeprotein	gi 16130593	67	2D-SDS-PAGE (4-7)
PspA	Phage shock protein A	gi 16129265	111	2D-SDS-PAGE (4-7)
PyrD	Dihydroorotat-Dehydrogenase	gi 16128912	106	BAC/SDS-PAGE
RpsA	30S ribosomales Protein S1	gi 16128878	165	BAC/SDS-PAGE
S4/L3	Ribosomale Proteine	gi 16131175/ gi 16131199	240	1D-SDS-PAGE
SdhA	Succinat-Dehydrogenase-Flavoprotein	gi 16128698	139	BAC/SDS-PAGE
SecD	Proteinexportprotein	gi 16128393	130	BAC/SDS-PAGE
SohB	Putative Protease	gi 16129233	67	BAC/SDS-PAGE
Ssb	Einzelstrang-bindendes Protein	gi 1790494	82	2D-SDS-PAGE (4-7)
SucA	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E1	gi 16128701	74	BAC/SDS-PAGE
SucB	2-Oxoglutarat -Dehydrogenase -Dihydrolipoyllysin-Succinyltransferase	gi 16128702	107	BAC/SDS-PAGE
TalA	Transaldolase A	gi 16130389	156	2D-SDS-PAGE (4-7)
TalB	Transaldolase B	gi 1786189	80	1D-SDS-PAGE
ThrC	Threoninsynthase	gi 1786185	238	2D-SDS-PAGE (4-7)

TktB	Transketolase B	gi 16130390	155	2D-SDS-PAGE (4-7)
TktB	Transketolase B	gi 16130390	136	1D-SDS-PAGE
TnaA	Tryptophanase	gi 87082323	215	2D-SDS-PAGE (4-7)
TolB	Periplasmatisches Protein beteiligt bei der TonB-unabhängigen Aufnahme von Gruppe A Colicinen	gi 16128715	98	BAC/SDS-PAGE
TolC	Kanal der äußeren Membran	gi 90111528	204	BAC/SDS-PAGE
TreF	Cytoplasmatische Trehalase	gi 16131391	306	2D-SDS-PAGE (4-7)
Tsx	Nucleosidkanal	gi 16128396	110	BAC/SDS-PAGE
TufA	Elongationsfaktor EF-Tu	gi 16131218	102	BAC/SDS-PAGE
WzzE	Putatives Transportprotein	gi 90111649	63	BAC/SDS-PAGE
YaeT	Assembly-Faktor der äußeren Membran	gi 16128170	221/133	BAC/SDS-PAGE
YbdR	Hypothetische Zink-Alkoholdehydrogenase	gi 1788012	114	2D-SDS-PAGE (4-7)
YbiL	Putatives Eisentransportprotein der äußeren Membran	gi 16128773	146	BAC/SDS-PAGE
YcbZ	Putatives Protease La Homolog	gi 16128922	74	BAC/SDS-PAGE
Ycel	Periplasmatisches Protein, wahrscheinlich sekretiert	gi 16129019	81	2D-SDS-PAGE (4-7)
YciE	Konserviertes Protein	gi 1787511	64/66	2D-SDS-PAGE (4-7)
YciF	Konserviertes Protein	gi 16129219	63	2D-SDS-PAGE (4-7)
YdgA	Hypothetisches Protein	gi 16129572	248	BAC/SDS-PAGE
YeaF (MipA)	MltA-interagierendes Protein	gi 16129736	78	BAC/SDS-PAGE
YeaG	Konserviertes Protein	gi 26248042	231	2D-SDS-PAGE (4-7)
YfdX	Protein unbekannter Funktion	gi 16130307	103	2D-SDS-PAGE (4-7)
YfgL	putative Dehydrogenase	gi 16130437	176	BAC/SDS-PAGE

YfgM	Hypothetisches Protein	gij16130438	62	BAC/SDS-PAGE
YfhM	Hypothetisches Lipoprotein	gij16130445	65	BAC/SDS-PAGE
YgaU	Konserviertes, hypothetisches Protein	gij16130579	87	2D-SDS-PAGE (4-7)
YggB (MscS)	Mechanosensitiver Kanal	gij16130825	87	BAC/SDS-PAGE
YhbO	Putative intrazelluläre Proteinase	gij90111548	141	2D-SDS-PAGE (4-7)
YhiU (MdtE)	Putatives Membranprotein	gij16131385	98	BAC/SDS-PAGE
YhjG	Hypothetisches Protein	gij16131396	74	BAC/SDS-PAGE
YicH	Hypothetisches Protein	gij16131526	128	BAC/SDS-PAGE
YjbJ	Protein unbekannter Funktion	gij16131871	83	2D-SDS-PAGE (4-7)
YraM	Putative Glycosylase	gij16131039	125	BAC/SDS-PAGE
YtfM	Hypothetisches Protein	gij16132042	169	BAC/SDS-PAGE

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Stephanie Anna Kögl
Geburtsdatum/ -ort	06.07.1979 in Schongau
Familienstand	ledig

Ausbildung:

seit 05/2004	Promotion am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Prof K. Jung
02/2004	Abschluss als Diplom-Biologin (Note 1,0)
05/2003 – 02/2004	Diplomarbeit am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Prof. V. Müller Titel: Osmoadaptation in <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1: Nähere Charakterisierung zweier Transporter für kompatible Solute und Untersuchungen zum Cholinstoffwechsel
10/1998 – 02/2004	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fächer: Mikrobiologie (Hauptfach), Immunologie, Biochemie und Humangenetik/Anthropologie (Nebenfächer)
Schulabschluss	Abitur 1998, Ignaz-Kögler-Gymnasium, Landsberg am Lech

Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen, national:

Arbeitstagung für Mikromethoden in der Proteinchemie 2004 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

VAAM-Jahrestagung 2005 in Göttingen

Poster: Kögl S. A., Niefnecker J., Weber. A. and K. Jung. Analyzing osmoadaptation of *Escherichia coli* on a global scale by complementary proteomic methods

VAAM-Jahrestagung 2006 in Jena

Poster: Kögl S. A. and K. Jung. Trehalose accumulation in *Escherichia coli* – integration of various signals

Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen, international:

Workshop on Osmosensing and Osmoregulation 2004, Universität Osnabrück

Vortrag: The response of *Escherichia coli* towards osmotic stress – a time-dependent proteomic analysis

Gordon Research Conference on Cellular Osmoregulation 2005, Salve Regina University, Newport, RI, USA

Poster: Kögl S. A., Niefnecker J., Weber. A. and K. Jung. The response of *Escherichia coli* towards osmotic stress – a time-dependent proteomic analysis

Workshop on Osmosensing and Osmoregulation 2006, Universität zu Köln

Vortrag: From global analysis to individual components of osmoadaptation in *Escherichia coli*

Gordon Research Conference on Cellular Osmoregulation 2007, Aussois, Frankreich

Poster: Kögl S. A., Hofer V., Bauer T. und K. Jung. From proteomic data to function – in search of new components in osmoadaptation of *Escherichia coli*

Veröffentlichungen:

†Weber A., †**Kögl S. A.** and K. Jung (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth conditions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188(20) 7165-7175

† *authors contributed equally*

Schmidt S., Pflüger K., **Kögl S.**, Spanheimer R. and V. Müller (2007). The salt-induced ABC transporter Ota of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 is a glycine betaine transporter. *FEMS Microbiol. Lett.* 277(1): 44-49

Spanheimer R., Hoffmann M., **Kögl S.**, Schmidt S., Pflüger K. and V. Müller (2007). Differential regulation of Ota and Otb, two primary glycine betaine transporters in the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *JMMB*, in press

Kögl S. A., Zigann K. and K. Jung (2007). Oxygen radicals modulate *Escherichia coli* osmoadaptation. *In preparation*

Kögl S. A. and K. Jung (2007). The cytoplasmic trehalase TreF regulates the intracellular trehalose content in *Escherichia coli* under osmotic stress conditions in dependence of oxygen and external availability of glycine betaine. *In preparation*

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kirsten Jung für die Bereitstellung des außerordentlich interessanten Themas, für die umfassende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Besonders herzlich möchte ich dafür danken, dass ich die Möglichkeit hatte, an diversen Tagungen teilzunehmen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann, der sich als Zweitgutachter für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kirsten Jung für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, für inhaltliche Diskussionen, Beantwortung von Fragen und für das angenehme Arbeitsklima. Dies gilt auch für die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung. Dabei sollten natürlich besonders meine Mit-Doktoranden Nina, Tobi, Christoph, Tina und Christiane hervorgehoben werden. Aber auch ohne die moralische und technische Unterstützung von Korinna und später auch Sonja würde diese Arbeit heute bestimmt anders aussehen. Danke auch an Arnim, der mich am Anfang bei der praktischen Einarbeitung unterstützte und natürlich auch an Ralf. Und Frau C. Urban sollte auch nicht vergessen werden.

An dieser Stelle sei ebenfalls Tilman Schlunck und Axel Imhof vom Zentrallabor für Proteinanalytik (Medizinische Fakultät) gedankt. Erst durch diese Kooperation war es mir möglich, die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine durchzuführen.

Danke auch an meinen Freund Günther und meine „Nicht-Biologen“-Freunde. Ihr habt einiges aushalten müssen, wenn der Stress und die Belastung mal wieder groß waren. Aber ihr habt mich immer wieder abgelenkt und aufgebaut.

Ohne die moralische und finanzielle Unterstützung und das Vertrauen meiner Familie und ohne den Zusammenhalt auch in schweren Zeiten wäre mein Studium und auch diese Arbeit bestimmt weniger erfolgreich verlaufen. Vielen Dank für alles.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den

.....