
Mechanismen der zeitverzögerten Genexpression im Colicin E2 System

Andreas Mader



München 2016

Mechanismen der zeitverzögerten Genexpression im Colicin E2 System

Andreas Mader

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Andreas Mader
aus Traunstein

München, den 18. Oktober 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Einführende Grundlagen	11
2.1. Das Colicin E2 Operon	11
2.2. Transkriptionelle Regulation	15
2.3. Post-transkriptionelle Regulation	20
3. Material und Methoden	33
3.1. Klonierung	33
3.2. Sequenzierung des Colicin E2-P9 Plasmids	43
3.3. Durchführung der Experimente	45
3.4. Quantitative Analyse	50
3.4.1. Bildanalyse der Zeitserien	50
3.4.2. Schwellwertdefinition	52
4. Ergebnisse	55
4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression	55
4.1.1. Abhängigkeit der Expressionsdynamik von der Stresstärke	55
4.1.2. Regulation der Colicinmenge über die Expression des Lysisgens	69
4.1.3. Biologische Signifikanz der heterogenen Colicin E2 Produktion	72
4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von <i>cea</i> und <i>cel</i>	75
4.2.1. Einflussfaktoren der transkriptionellen Regulation	81
4.2.2. Regulation der Toxinabgabe durch CsrA	90
4.2.3. Beeinflussung der post-transkriptionellen Regulation durch sRNAs	96
4.2.4. Zeitliche Verzögerung der Expression des Lysisgens	105

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	109
A. Medien	115
B. Expression von <i>cel</i> im Stamm EMO3-C	117
C. Zeitliche Verzögerung zwischen <i>cea</i> und <i>cel</i>	121
D. Listen der verwendeten Plasmide, Primer und Stämme	127
E. Fitparameter und Tabellen	131
F. Liste der verwendeten Abkürzungen	135
Abbildungsverzeichnis	137
Tabellenverzeichnis	141
Literaturverzeichnis	143

Zusammenfassung

Bakterien stehen im andauernden Wettkampf um Nährstoffe und Lebensraum, in dem sie durch Produktion von Bakteriocinen, Proteinen, die für nah verwandte Bakterienarten giftig sind, einen Vorteil erreichen können. Eine Untergruppe der Bakteriocine stellen die Colicine der *E.coli* Bakterien dar, welche toxisch für nah verwandte *Enterobakterien* sind. Daher stellt sich die zentrale Frage, wie ein Toxinproduzent, in Anwesenheit von externem Stress, im Dilemma zwischen Suizid eines einzelnen Bakteriums durch die Produktion des Toxins und Überleben, einen Wettbewerbsvorteil für die gesamte Population sichern kann. Sowohl die Stochastizität als auch die Dynamik der Expression des Toxins und des Lysisgens wurden noch nicht im Detail untersucht. Zudem ist weitgehend unverstanden wie ein einzelnes Bakterium das Colicin Operon in effektiver Art und Weise exprimieren kann.

In dieser Arbeit wurde ein doppeltes Fluoreszenzreporterplasmid eingesetzt um die Dynamiken der beiden zentralen Proteine *cea* und *cel*, mit Hilfe der parallelen zeitaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie, zu quantifizieren. Die genetische Information für das Toxin Colicin E2 liegt auf dem Plasmid pColE2-P9 und ist Bestandteil des Colicin E2 Operons, bestehend aus einem SOS Promotor und Genen für die Produktion des Toxins (*cea*), des Immunitätsproteins (*cei*) sowie eines Proteins dessen Produktion zur Zellyse führt (*cel*). Die SOS Antwort der Bakterien, reguliert durch den Repressor LexA, führt in Kombination mit verschiedenen weiteren regulatorischen Elementen zu einem Zusammenspiel zwischen transkriptioneller und post-transkriptioneller Regulation der Produktion und Abgabe des Toxins. Die Translation des Lysisproteins und damit die Freisetzung des Toxins wird dabei vom globalen Regulator CsrA, im Zusammenspiel mit den sRNAs CsrB und CsrC, gehemmt. In dieser Arbeit soll zwischen zwei verschiedenen Szenarien unterschieden werden, durch die die Bakterien einen Vorteil für die gesamte Population erreichen können. Zum Einen durch eine genau abgestimmte Ar-

Zusammenfassung

beitsteilung zwischen Bakterien die das Toxin produzieren und solchen die dies nicht tun, erreicht durch heterogene Genexpression. Zum Anderen könnte der Vorteil durch einen zeitlichen Versatz zwischen der Expression des Toxins und des Lysisgens hervorgerufen werden, der zum Erreichen einer effektiven Toxinkonzentration führen würde.

Um zeitgleich die Expression der Gene für das Toxin und die Zellyse quantitativ analysieren zu können wurde doppeltes Fluoreszenzreporterplasmid erzeugt. Die Heterogenität der Expression des Colicin E2 Operons konnte mit Hilfe des Reporterplasmids bestätigt werden. Diese Heterogenität in der Produktion und Abgabe des Toxins verändert sich mit sich ändernden Umweltbedingungen. Bereits geringer äußerer Stress führt zum Umschalten von basaler phänotypischer Heterogenität in einen Zustand zeitlich heterogenen Anschaltens. Ein weiteres Ansteigen des Stresslevels führt zu einer synchronen Antwort nahezu aller Bakterien. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Zeitpunkt der Toxinabgabe hauptsächlich durch das mRNA-Bindeprotein CsrA reguliert wird und deshalb die Toxinabgabe durch die Zellyse ausgelöst wird.

Um einen möglichen zeitlichen Versatz zwischen der Toxin Produktion und Abgabe zu untersuchen wurden verschiedene Einflussfaktoren analysiert. Unterschiede in der Stärke der SOS Antwort der Bakterien, hervorgerufen durch veränderte Bindestellen für LexA auf dem Reporterplasmid, führen zu ähnlichen Effekten in der Expression von *cea* und *cel*. Dabei zeigen sich nur kleine Unterschiede im zeitlichen Versatz zwischen der Expression von *cea* und *cel*. Den größten Einfluss auf den zeitlichen Versatz hat die Veränderung der Bindewahrscheinlichkeit des CsrA an die *cel* mRNA, die je nach Mutation zur Verkürzung oder Verlängerung führen kann. Veränderungen in der Verfügbarkeit einer der sRNAs CsrB und CsrC, die Gegenspieler zu CsrA darstellen, zeigten nur kleine Effekte auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel*.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass sowohl die phänotypische Heterogenität als auch der Zeitpunkt der Toxinabgabe zur Effektivität der Toxinproduktion und damit zum Erfolg der Überlebensstrategie beitragen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die post-transkriptionelle Regulation durch den Regulator CsrA die phänotypische Heterogenität beeinflusst und sowohl die Effektivität der Toxinproduktion als auch den Zeitpunkt der Toxinabgabe steuert.

Summary

Bacteria live in a constant competition for nutrients and space with other bacteria and have evolved several strategies to gain a benefit throughout time. One way for bacteria to win this struggle is the production of bacteriocines, proteinaceous toxins. A special group of the bacteriocines are the plasmidally encoded colicins of *E. coli* bacteria, active against closely related *Enterobacteriaceae*. Therefore, the central question arises to how toxin producing bacteria ensure their competitive success at the population level in the dilemma between individual suicide events, through toxin production and survival, in the presence of external stress. So far, the stochastic nature and the dynamics of the expression of the toxin and the lysis gene have not been investigated in detail and little is understood about how a single bacterium expresses the colicin operon in an effective way.

In this thesis, a double fluorescent reporter plasmid was used to quantify the dynamics of the gene expression of the two central proteins *cea* and *cel* by means of parallelized fluorescence time-lapse microscopy. The Colicin E2 operon is encoded on the plasmid pColE2-P9 and consists of an SOS promoter and coding genes for the toxin (*cea*), the cognate immunity protein (*cei*) and the lysis protein (*cel*). The combination of the SOS response of bacteria, regulated via the repressor LexA, in concert with further regulatory elements, leads to a combination of transcriptional and post-transcriptional regulation of toxin production (*cea*) and release (*cel*). The global regulator CsrA (carbon storage regulator A) together with the sRNAs CsrB and CsrC, which act as sequestering elements for CsrA, inhibits the translation of the lysis gene and therefore the release of the toxin, via binding to the mRNA of the colicin operon. This thesis attempts to discriminate between two possible scenarios how bacteria can achieve a benefit for the whole population: a well-tuned division of labor between toxin producing and reproducing bacteria achieved by heterogeneous gene expression, or a delay between toxin

Summary

expression and release to gain an efficient toxin concentration.

As a quantitative readout, the double fluorescence reporter plasmid for the parallel observation of the expression of the toxin and the lysis gene was constructed. As expected the reporter plasmid revealed heterogeneous expression of the Colicin E2 operon. The heterogeneity of expression and release of the toxin changes with changing environmental conditions. A slight increase of external stress leads to a switch of the expression characteristics from basal phenotypic heterogeneity to an intermediate state of heterogeneous timing. A further increase of the stress level results in a synchronous response of nearly all bacteria. This enables the bacterial population to react to worsening environmental conditions.

This work demonstrates that the time-point of toxin release is mainly regulated by the mRNA binding protein CsrA. Accordingly, the time-point of the toxin release is triggered by cell lysis. To investigate a potential time-delay between the toxin expression and release, different influence factors were analysed. A different strength of the SOS response, realized by different binding sites for LexA on the reporter plasmid, leads to similar differences in the expression of *cea* and *cel* and exhibits only small effects on the time-delay between the expression of these genes. The biggest influence was observed by altering the CsrA binding probability to the *cel* mRNA. Lower binding probability due to a mutation of the reporter plasmid results in a much lower time-delay, the use of a plasmid with an improved binding site results in a longer time-delay. Therefore, altering the binding probability directly affects the length of the time delay and exhibits a possibility to tune the time-delay. Alterations in the availability of the sRNAs CsrB and CsrC, which are antagonists of CsrA, show only small effects on the delay between *cea* and *cel* gene expression.

In summary, this work shows, that both phenotypic heterogeneity and time-point of toxin release contribute to the effectiveness of toxin production and to the success of bacterial survival strategy. The findings presented in this work demonstrate that the post-transcriptional regulatory modul by the global regulator CsrA affects phenotypic heterogeneity and regulates the effectivity of toxin production and the time-point of toxin release.

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Dynamiken der Produktion und Abgabe des Colicin E2 Toxins. Hierbei wird der Focus darauf gelegt zu verstehen, wie diese Dynamiken dazu beitragen können, dem produzierenden Bakterium einen Wettbewerbsvorteil gegenüber nah verwandten Bakterien, die die selben Nährstoffe benötigen, zu verschaffen. Dazu ist es notwendig die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen zu verstehen. Entscheidende Ansatzpunkte sind dabei, zu verstehen, welchen Einfluss die transkriptionelle Regulation bzw. die post-transkriptionelle Regulation auf die Expression einzelner Gene ausübt und wie diese Einflüsse die Heterogenität des Systems verändern. Diese Mechanismen können mit einem Verständnis der theoretischen Grundlagen der Regulationen und insbesondere mit Hilfe von zeitaufgelöster Einzelzellmikroskopie in Verbindung mit quantitativer Auswertung der Messdaten untersucht werden. In der Einleitung wird daher zunächst auf allgemeine Regulationsmechanismen und die Grundlagen der Genetik eingegangen bevor in den Kapiteln 2.2 und 2.3, die für das Colicin E2 System spezifischen Mechanismen betrachtet werden.

Wissenschaft besteht aus Fakten wie ein Haus aus Backsteinen, aber eine Anhäufung von Fakten ist genau so wenig Wissenschaft wie ein Stapel Backsteine ein Haus ist.

Henri Poincaré

Die Eigenschaften eines Lebewesens basieren auf den Informationen, die auf dem Genom abgespeichert sind. Die Frage wie die im Genom enthaltene Information tatsächlich umgesetzt wird, wurde von Francis Crick 1958 mit der Aufstellung des zentralen Dogmas der Mikrobio-

1. Einleitung

logie beantwortet. Dieses besagt, dass Informationen die in der DNA (Desoxyribonucleinsäure) auf dem Genom gespeichert sind, abgelesen und in mRNA umgeschrieben werden. Die auf der mRNA codierten Informationen können im Anschluss in Proteine übersetzt werden [1]. Diesen Gesamtprozess bezeichnet man als Genexpression (siehe Abbildung 1.1).

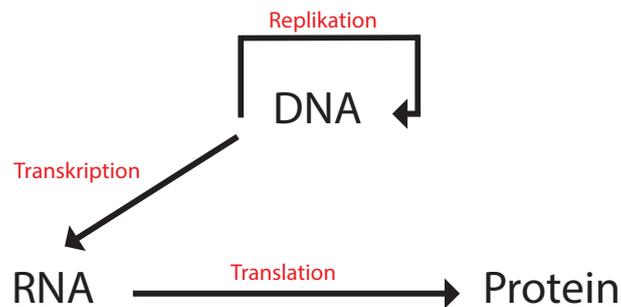


Abbildung 1.1.: Zentrales Dogma der Mikrobiologie: Darstellung der Informationsflussrichtungen nach Crick [1] im Pfeildiagramm. Die DNA repliziert sich selbst und kann in RNA umgeschrieben werden (Transkription). Diese wird im Anschluss in Proteine übersetzt (Translation).

Nach dieser Darstellung sind nicht alle Richtungen des Informationsflusses möglich. Erlaubt sind DNA Replikation (DNA→DNA), Transkription (DNA→RNA) und Translation (RNA→Protein) [1] (siehe Abbildung 1.1). Weitere in Spezialfällen ablaufende Prozesse sind die RNA Replikation, z.B. durch RNA abhängige RNA-Polymerasen in RNA-Viren [2], die reverse Transkription der RNA zur DNA z.B. in Retroviren [3] und die direkte Translation der DNA zu Proteinen die allerdings nur *in vitro* nachgewiesen wurde [4]. Sowohl die Transkription, (Übersetzung von DNA durch die DNA abhängige RNA Polymerase in RNA), als auch die Translation, (Übersetzung der mRNA durch die Ribosomen in Proteine) wird an vielen Stellen von unterschiedlichen Spielern reguliert. Prokaryoten ermöglicht dies auf sich verändernde Umweltbedingungen, Nahrungsquellen oder Gefahren zu reagieren [5, 6, 7]. Gleichzeitig wird durch die spezifische Regulation die Verschwendung von Ressourcen vermieden, da ein Gen nur dann exprimiert wird wenn das spezifische Genprodukt, beispielsweise ein Protein, tatsächlich gebraucht wird.

Dabei sind verschiedene Regulationsmechanismen möglich. Auf der Stufe der Transkription kann es entweder zur Aktivierung oder zu einer Repression der Genexpression [8] kommen. Das *E.coli* CAP Protein (Katabolit Aktivator Protein) stellt ein Beispiel für die Aktivierung der Transkription dar. Bindet cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) an CAP, führt das zur Verbesserung der Bindung zwischen CAP und der DNA [9, 10]. Dadurch wird die Bindung der DNA abhängigen RNA Polymerase zur DNA verstärkt [11]. Unter anderem wird die Transkription des Lac-Operons, das für den Transport und den Abbau von Laktose in Bakterien zuständig ist [12], von CAP aktiviert. Im Gegensatz dazu kann es auch zu einer Repression der Transkription kommen. Ein Beispiel hierfür ist das Protein LexA, das gebunden an eine Erkennungssequenz die meist mit der Promotorsequenz des regulierten Operons überlappt, die Bindung der DNA abhängigen RNA Polymerase [13] stört. Ein weiteres Beispiel der Repression, das Protein FUR, geht mit zweifach geladenen Metallionen eine Bindung ein, die es ihm ermöglicht an FUR-Boxen auf der DNA zu binden und die Transkription des jeweiligen Operons zu unterbinden [14]. Diese Regulationsmechanismen können zusätzlich von weiteren Proteinen beeinflusst werden. So wirkt zum Beispiel im Falle von LexA eine vermehrte Expression des Proteins RecA in Stresssituationen der Inhibition durch LexA entgegen [15]. Dabei kommt es zur Ausbildung von RecA-ssDNA Filamenten, die eine Selbstabspaltung von LexA induziert. Dadurch kann es zur Transkription des entsprechenden Operons [13] kommen. RecA und LexA üben also durch ihr regulatorisches Zusammenspiel einen Einfluss auf die Transkriptionsrate des regulierten Operons aus.

Neben der transkriptionellen Regulation kann auch die Translation durch verschiedene regulatorische Elemente beeinflusst werden [16, 17]. So können zum Beispiel mRNA-Bindeproteine die Anbindung der Ribosomen an die RBS (Ribosombindestelle) der mRNA verschlechtern bzw. verbessern. Ein Protein dieser Klasse ist CsrA, dass regulatorisch auf den Zuckerhaushalt der Bakterien wirkt [18]. Es bindet an spezifische mRNA Sequenzen, die sich häufig überlagern mit der Ribosom Bindestelle eines Proteins. Durch diese Bindung wird die Expression des Proteins verschlechtert oder ganz unterbunden [18]. Je nach Art der Bindestelle kann das Protein CsrA auch die Produktion von Proteinen aktivieren, z.B. wird die Translation des Proteins flhDC von CsrA aktiviert [19]. Nicht Protein codierende kurze RNA Stücke (sRNA,

1. Einleitung

shortRNA) stellen ebenfalls posttranskriptionelle Regulatoren dar [20, 21]. Zum Einen binden sie, wie z.B. CsrB und CsrC [22] mRNA-Bindeproteine, die dann nicht mehr für die Regulation der Translation zur Verfügung stehen. Zum Anderen können sRNA's direkt die Übersetzung von mRNA in Proteine beeinflussen, indem sie zum Abbau der mRNA führen noch bevor diese translatiert werden kann. Ein Beispiel hierfür stellt, wie in Prevost *et al.* [23] gezeigt, die sRNA RyhB dar, die durch ihre Bindung an die mRNA des Gens *sodB* die Degradation dieser mRNA induziert.

Neben diesen bereits weitgehend gut verstandenen Regulationsmechanismen gibt es weitere Spieler die die Regulation beeinflussen können. Ein Beispiel hierfür stellt die ssDNA (einzelssträngige DNA) dar, deren Anwesenheit die Expression von Genen beeinflussen kann. Einzelssträngige DNA, hervorgerufen durch die Schädigung der dsDNA (doppelsträngigen DNA), induziert die Expression des Proteins RecA und beeinflusst damit mittelbar, über die Induktion der Selbstabspaltung des LexA Proteins die SOS Antwort des Bakteriums [24].

Die Expression einzelner Gene, oder eines Operons, wie im Fall des Colicin E2 (Kapitel 2.1), hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Komplexe Regulationsnetzwerke führen in der Regel nicht zu einem einfachen „AN-AUS“ Verhalten, sondern die Expression ist über Gleichgewichte von Proteinen oder die Verknüpfung der einzelnen regulatorischen Elemente bestimmt.

Generell können komplexe biologische Prozesse in biochemische Reaktionen aufgeteilt werden, wobei sich diese Reaktionen in einem stationären Nichtgleichgewichtszustand [25] befinden, der durch freien Austausch von Energie und Materie mit der Umgebung gekennzeichnet ist [25]. Mit Hilfe der theoretischen Physik ist eine Modellierung dieser Prozesse möglich. Um die Voraussagen der Modelle zu überprüfen, bedarf es der experimentellen Bestätigung. Dabei sind Messungen auf Einzelzellebene nötig, da viele regulatorische Effekte im Mittel über eine ganze Population nicht erkennbar wären [26]. Die Analyse von dynamischen Prozessen, wie zum Beispiel der Expression eines bestimmten Proteins, auf Einzelzellebene kann mit Hilfe von zeitaufgelöster Einzelzellmikroskopie realisiert werden. Diese dynamischen Prozesse

sind oft äußerst komplex. Ziel dieser Arbeit war es die Dynamiken der Expression verschiedener Gene am Beispiel der Expression des Toxins (*cea*) und des Lysisgens (*cel*) des Colicin E2 Operons genauer zu studieren um einen Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen die der Toxinproduktion und Abgabe zu Grunde liegen zu erlangen. Durch zeitaufgelöste Analyse können die Dynamiken der einzelnen Regulationsschritte und der Zeitpunkt ihres Anschaltens ermittelt werden. Mit Hilfe der quantitativen zeitaufgelösten Einzelzellmikroskopie ist es möglich den zeitlichen Verlauf der Expression der Gene einzelner Proteine in einem Bakterium zu beobachten, Proteine über deren Menge bzw. Zeitpunkt der Produktion man mehr erfahren möchte sind zum Beispiel die Bakteriocine. Dabei handelt es sich um von Bakterien gebildete Toxine, die wirksam gegen andere Bakterien sind [27, 28]. Die Bakteriocine stellen eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Antibiotika, auf Grund ihrer Wirkungsweise, dar [27, 29]. Steigende Zahlen multi-resistenter Bakterienstämme lassen die herkömmlichen Antibiotika immer mehr an Wirkung verlieren [30, 31]. In dieser Arbeit wird ein Mitglied der Gruppe der Colicine, einer Untergruppe der Bakteriocine mit sehr engem Wirtstropismus untersucht [32, 33, 34]. Das auf einem Plasmid codierte Colicin E2 Operon, produziert unter Einfluss von Stress das Toxin Colicin E2, das aktiv ist gegen nah verwandte *Enterobakterien* [32]. Das Colicin E2 System stellt auf Grund seiner komplexen Regulation der Produktion und der Abgabe der Colicins [33] (siehe Abbildung 2.2) ein gutes Modellsystem dar. In diesem System findet ein Zusammenspiel verschiedener transkriptioneller und post-transkriptioneller Regulationsmechanismen statt. Dieses Zusammenspiel muss, um Bakteriocine und speziell Colicine gezielt einsetzen zu können, genau verstanden werden. Für das Verständnis wiederum ist eine genaue Analyse der Expression und Regulation der einzelnen Bestandteile des Operons nötig. In Kombination mit analytischen Modellen können dadurch exakte Aussagen über die Schnelligkeit, Stärke und Effektivität der Colicin Produktion und Abgabe getroffen werden.

Eine Möglichkeit die regulatorischen Zusammenhänge, also das Zusammenspiel der Proteine und weiterer regulatorischer Elemente zu ermitteln, stellen fundierte biologische Studien dar. Eine quantitative Aussage kann dennoch, aus diesen Studien meist nicht getroffen werden. Durch eine physikalische Herangehensweise wird die quantitative Auswertung der gemesse-

1. Einleitung

nen Daten ermöglicht. Zudem kann auf Grund der höheren Sensitivität und besseren zeitlichen Auflösung eine Auswertung der Daten hinsichtlich der zu Grunde liegenden Reaktionskinetiken erfolgen. In dieser Arbeit wird zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 3.3) eingesetzt um hoch sensitiv schnelle Änderungen oder sehr kleine Unterschiede in der Genexpression zu detektieren. Dabei werden unter Verwendung diverser gentechnisch erzeugter Mutanten (siehe Kapitel 3.1) die Unterschiede in den Kinetiken der Regulationsmechanismen analysiert die die Expression der einzelnen Gene des Colicin E2 Operons beeinflussen.

In den folgenden Kapiteln werden als einführende Grundlagen (Kapitel 2) die Funktion und der Aufbau des Colicin E2 Operons, die Grundlagen der Regulation auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene gezeigt, außerdem wird ein erstes Modell vorgestellt, das die post-transkriptionelle und die transkriptionelle Regulation des Colicin E2 Operons berücksichtigt. Im Kapitel Materialien und Methoden (Kapitel 3) werden die Klonierung der Mutanten, die Sequenzierung des gesamten pColE2-P9 Plasmides und die Durchführung der Experimente beschrieben. Die Dynamik der Expression der Gene des Colicin E2 Operons und die biologische Signifikanz einer zeitlichen Verzögerung zwischen der Toxinexpression und der Abgabe durch Zellyse werden in Kapitel 4 dargestellt und diskutiert. Außerdem wird auf den Einfluss von Veränderungen in den Elementen der transkriptionellen als auch der post-transkriptionellen Regulation der Expression eingegangen. Kapitel 5 fasst die Ergebnisse aus Kapitel 4 im Bezug auf die Effektivität und den möglichen Nutzen der Bacteriocin Plasmide zusammen und gibt einen Ausblick auf mögliche weitere Forschungsansätze.

2. Einführende Grundlagen

2.1. Das Colicin E2 Operon

Um eine Analyse der Dynamiken der Expression einzelner Gene durchführen zu können, ist es notwendig im Vorfeld zu verstehen wie genetische Information auf dem Genom codiert ist und welche Faktoren möglicherweise die Expression der Gene beeinflussen. Häufig sind genetische Informationen in Cluster, so genannten Operons zusammengefasst. Das Konzept der Organisation genetischer Elemente in diesen Clustern geht auf F. Jacob und J. Monod [35] zurück. Von ihnen wurde im Jahr 1960 das Konzept des Operons für die im Laktose Stoffwechsel in *E.coli* beteiligten genetischen Elemente entwickelt [35] und ein Jahr später um regulatorische Elemente erweitert [36]. Nach den Entdeckern besteht ein Operon aus drei grundlegenden Elementen, einem Promotor, der durch die Anbindung der DNA abhängigen RNA Polymerase die Transkription der DNA zu mRNA ermöglicht. Des Weiteren aus Operatoren, die an spezifische Gensequenzen (regulatorische Elemente) binden können und aus den Genen die die genetische Information zur Bildung von Proteinen enthalten. Im Lac-Operon sind diese Element durch den Repressor LacI, eine Promotorsequenz, sowie drei offenen Leserahmen für Proteine LacZ, LacY und LacA realisiert [35]. Der Aufbau eines Operons und dessen Regulation wird am Beispiel des Laktose Operons in Abbildung 2.1 dargestellt.

Der Zusammenhang zwischen der Anbindung eines Operators an die DNA und der Produktion der spezifischen mRNA (siehe Abbildung 2.1) stellt die Basis der Regulation der produzierten mRNA Mengen in einer bakteriellen Zelle dar. Im Colicin E2 Operon sind die drei

2. Einführende Grundlagen

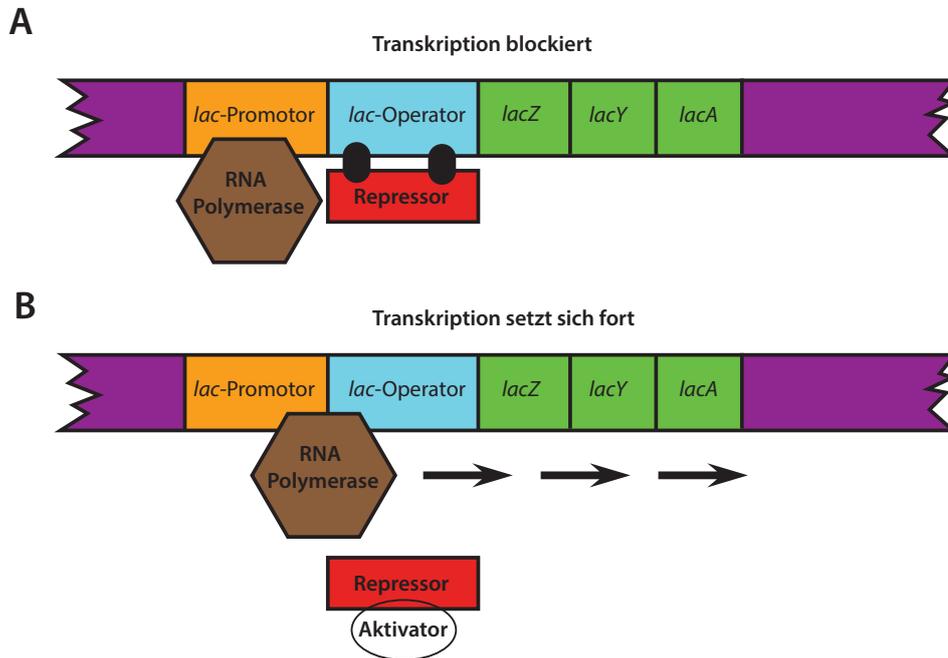


Abbildung 2.1.: Schema der strukturellen Elemente eines Operons am Beispiel des Laktose Operons aus *E.coli*: Teil A zeigt einen DNA Strang mit den Elementen *lac*-Promotor, *lac*-Operator, sowie den Strukturgenen *lacZ*, *lacY* und *lacA*. Außerdem ist die RNA Polymerase und der Repressor des Laktose Operons dargestellt. Durch die Bindung des Repressors an den Operator wird die Transkription der DNA durch die DNA abhängige RNA Polymerase in RNA verhindert. Teil B zeigt den Einfluss des Aktivators, der die Bindung zwischen dem Repressor und dem Operator verhindert und dadurch die Transkription der DNA ermöglicht.

Bestandteile eines Operons durch den Promotor mit den -35 und -10 Signalen [37], die SOS Box an deren Sequenz das Protein LexA binden kann [38] und drei offenen Leserahmen für das Toxin (*cea*), das Immunitätsprotein (*cei*) sowie das Lysisgen (*cel*) gegeben [37] (siehe dazu Abbildungen 2.2 und 3.6). Durch einen zusätzlichen Promotor P_{cei} wird eine konstitutive Expression des Immunitätsgens erreicht und damit eine Schädigung der eigenen DNA durch das in der Zelle produzierte Toxin unterbunden [39, 40]. Eine weitere Möglichkeit zur Unterbindung der Schädigung stellt eine translationelle Kopplung der Expression des Toxins und des Immunitätsgens [39] dar. Bekannt ist diese Kopplung, bei der das Stopcodon des vorangehenden Gens mit der Ribosombindestelle des folgenden Gens überlappt, bereits für das Tryptophan [41] und das Galaktose [42] Operon von *E.coli*. Im Colicin E2 Operon finden sich Indikatoren für beide Regulationsarten. Zum Einen kann eine Promotorsequenz mit den

Bestandteilen (-35, 5'-GTGACC) und (-10, 5'-CATATGG) im passenden Abstand von Transkriptionsstart gefunden werden [39]. Zum Anderen befindet sich die Ribosombindestelle des *cei* Gens (5'-TAAG) innerhalb des offenen Leserahmens des Toxin Gens was für eine gekoppelte Expression der beiden Gene sprechen würde [39]. Der effektive Schutz der eigenen DNA vor dem in der Zelle produzierten Toxin, wird somit wahrscheinlich durch eine doppelte Regulation gewährleistet.

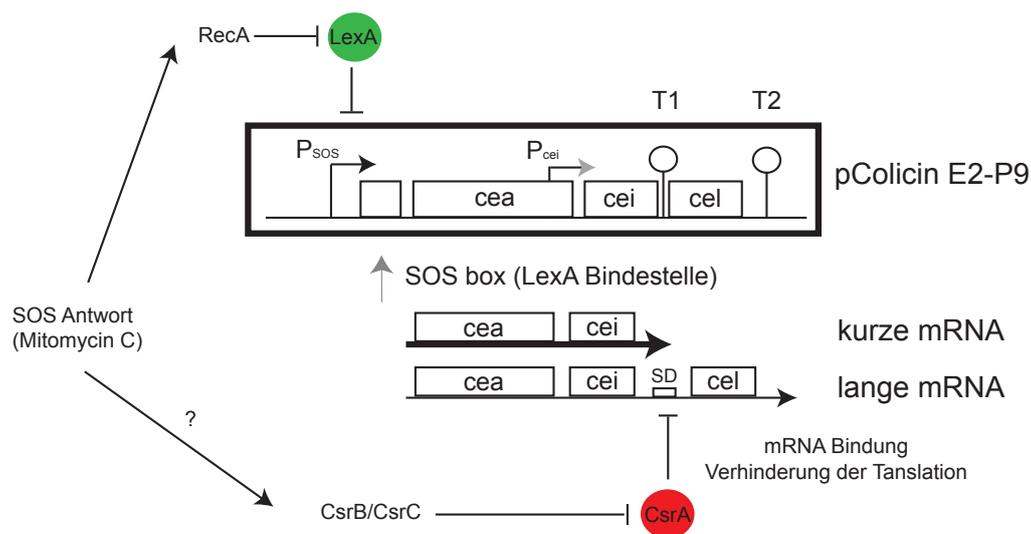


Abbildung 2.2.: Das Colicin E2 Operon: Darstellung des Colicin E2 Operons mit den Genen *cea*, *cei* und *cel* sowie den Promotoren P_{SOS} , P_{cei} , den Terminatoren T1 und T2, sowie der Bindestelle für LexA. Desweiteren sind die zwei verschiedenen mRNA Transskripte; kurze und lange mRNA mit der CsrA Bindestelle, überlappend mit der Shine-Dalgarno Sequenz des *cel* Gens, gezeigt. Unterhalb der beiden mRNA Stücke ist der potentielle Einfluss (gekennzeichnet durch ein ?) der der sRNAs CsrB und CsrC auf die post-transkriptionelle Regulation durch die Bindung von CsrA an die lange mRNA dargestellt.

Die Regulation der Expression des gesamten Operons ist gesteuert über eine SOS-Box, die eine sich überlappende Bindestelle für zwei LexA Dimere enthält [38, 43, 44]. Somit ist während des exponentiellen Wachstums, durch die Bindung der LexA Dimere an die SOS Box, die Expression des Operons unterdrückt. Nach einer Schädigung der DNA wird die Bildung von RecA Nucleoproteofilamenten induziert [45, 46]. Diese Filamente entstehen durch die Bindung von RecA an einzelsträngige DNA (ssDNA). In der Folge wird durch die Selbstabspaltung der LexA Dimere, induziert durch die RecA Proteofilamente bei Bakterien die so genannte SOS Antwort ausgelöst [45]. Dabei wird die Bindung von LexA an die Promotor-

2. Einführende Grundlagen

sequenzen getrennt und zum Beispiel die Expression von UvrABC [46], einem System zur DNA Reparatur, ermöglicht.

Betrachtet man das Colicin E2 Operon so wird durch die Abspaltung des LexA, die zuvor verhinderte Transkription der mRNA ermöglicht. Durch das Vorhandensein zweier verschiedener Terminatoren T1 und T2 (siehe Abbildung 2.2) können zwei unterschiedlich lange mRNAs gebildet werden [40, 47]. Zum Einen die kurze mRNA, die nur die Gensequenzen für die Toxinproduktion (*cea*) und die Produktion des Immunitätsproteins (*cei*) enthält und mit dem Terminator T1 endet. Kann dieser Terminator überlesen werden, entsteht zum Anderen eine lange mRNA, die zusätzlich zu den Genen für das Toxin und das Immunitätsprotein noch die Sequenz für die Produktion des Lysisproteins (*cel*) beinhaltet.

Auf Grund der Tatsache, dass zur Bildung langer mRNA ein Terminator überlesen werden muss, sollte wesentlich mehr kurze mRNA als lange mRNA gebildet werden und somit im Vergleich zur Toxinmenge die Menge des Lysisproteins kleiner sein. Dies wurde von Yang *et al.* 2010 [47] für das zum Colicin E2 sehr ähnliche Colicin E7 Operon postuliert. Die beiden Operons weisen Homologien in den Sequenzen auf, die sich über die regulatorischen Sequenzen, sowohl für die transkriptionelle als auch für die post-transkriptionelle Regulation, erstrecken. Deshalb kann vermutet werden, dass die Regulation des Colicin E2 Operons in ähnlicher Weise wie die des Colicin E7 Operons von statten geht [33]. Auf post-transkriptioneller Ebene ist die Translation des Lysisproteins durch die Bindung des mRNA Bindeproteins CsrA [48] an eine Doppelbindestelle, die im Bereich des Terminators T1 liegt, und mit der Ribosombindestelle (RBS) des Lysisproteins überlappt [33, 47], gehemmt (siehe Abbildung 2.2). Erst nach Auflösung dieser Bindung, kann es zur Translation des Lysisgens (*cel*) kommen.

Die verfügbare Menge an CsrA Proteinen und somit die Translation des Lysisgens (*cel*) wird unter anderem beeinflusst durch die beiden regulatorischen sRNAs CsrB und CsrC [47]. Die sRNA CsrB besitzt 18 potentielle Bindestellen für CsrA und kann bis zu 9 CsrA Dimere binden [49], CsrC hingegen weist nur 9 Bindestellen auf und kann somit maximal 5 CsrA Dimere binden [50]. In Abwesenheit einer der beiden sRNAs, wird die andere sRNA überexprimiert

um die Aufgaben der jeweils anderen mit zu übernehmen [50]. Deshalb wurde zur Untersuchung der Effekte der sRNAs auf die Expression des *cel* und *cea* Gens, eine Doppelmutante mit Knockouts von CsrB und CsrC im Genom des BZB1011 erstellt (siehe Kapitel 3.1 und Tabelle D.4). Yang *et al.* [47] führt die post-transkriptionelle Regulation im Colicin E7 Operons auf den Rückgang der Menge an sRNAs CsrB und CsrC unter Stress zurück. Da die Menge an CsrA Protein während des Stresses als konstant angenommen wird[47], wird ein Einfluss auf die Regulation über die Expression von CsrA verneint.

2.2. Transkriptionelle Regulation am Beispiel des Colicin E2 Operons

Das Colicin E2 Operon wird wie im Kapitel 2.1 dargestellt sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene reguliert. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das gesamte Operon heterogen exprimiert wird [51, 52, 53]. Die Regulation der Heterogenität und der Einfluss der Heterogenität auf die Expression des Toxin (*cea*) und Lysis (*cel*) Gens sind allerdings noch nicht verstanden. Hieraus ergeben sich folgende Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- Worauf wirkt die transkriptionelle Regulation? Ist die Wirkung dieser Regulation auf die Expression des Toxin Gens beschränkt oder wirkt sie ebenso auf die Expression des Lysisgens?
- Wirkt die post-transkriptionelle Regulation nur auf die Expression des Lysisgens?
- Wie beeinflussen diese Regulationsmechanismen die Heterogenität?
- Welche biologische Signifikanz steckt hinter dieser Art der Regulation?

2. Einführende Grundlagen

Im folgenden wird ausgehend von allgemeiner transkriptioneller Regulation auf die transkriptionelle Regulation des Colicin E2 Operons eingegangen. Um effektiv auf Gefahren reagieren zu können, ist es notwendig, dass die transkriptionelle Regulation in Bakterien mit hoher zeitlicher und ereignisorientierter Genauigkeit abläuft. Deshalb bildet der Beginn der Transkription und somit die Bindung der RNA Polymerase an die DNA die Schlüsselstelle der Regulation [8]. Durch DNA Bindeproteine kann es entweder zu einer Aktivierung (Verbesserung der Bindung der Polymerase an die DNA) [54] oder zu einer Repression (Verhinderung bzw. Verschlechterung der Bindung an die DNA) [55] kommen. Einer der am besten untersuchten bakteriellen Repressoren ist das DNA Bindeprotein LexA [13], das mit verschiedenen hohen Homologien in vielen Prokaryoten vorkommt [13]. Das LexA Protein bindet als Dimer an Erkennungssequenzen innerhalb der Promotorsequenz der Gene oder des Operons und verhindert dadurch das Anbinden der σ -Faktoren, die wiederum für die Bindung der Polymerase an die Promotorsequenz nötig sind [8]. Das LexA Protein stellt den Hauptregulator des SOS-Systems der *E. coli* Bakterien dar und ist in die Regulation von über 40 in die Reparatur der DNA und die Stressantwort involvierter Gene [13] eingebunden. Das Protein RecA bildet den Gegenspieler zu LexA. Wird die eigene DNA geschädigt kann es zur Bildung von einzelsträngiger DNA kommen. Diese katalysiert die Bildung von RecA-Proteofilamenten, die im Anschluss zur Selbstspaltung der gebundenen LexA Dimere an der Stelle Ala84 und Gly85 [13] führen. Die LexA Monomere können nicht mehr an die DNA binden, dadurch kommt es zur Aktivierung der bisher durch die gebundenen LexA Dimere gehemmten Promotoren [13]. Dieses Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des SOS Systems sollte zum Einen sehr schnell von statten gehen, um adäquat auf negative Umweltbedingungen reagieren zu können. Zum Anderen muss es nach Beendigung des Stresses wieder in den Ausgangszustand der Repression der SOS Gene zurückkehren können [56]. Die durch das LexA/RecA System regulierten Gene zeigen häufig phänotypische Heterogenität [57], dadurch ist es Bakterien möglich auf Veränderungen in den Umweltbedingungen zu reagieren die nicht vorhersehbar waren [57]. Die transkriptionelle Regulation spielt dadurch eine große Rolle bei der Regulation der Expression von Bakteriocinen [38], deren Transkription durch die Bindung von LexA an eine 16 Basen lange Bindesequenz, die LexA Bindestelle oder SOS Box genannt wird [58], gehemmt wird. Die Sequenz der Bindestelle beeinflusst die Stärke der Bindung der

LexA Dimere an die jeweilige SOS Box [38].

Einzelne Reaktionen, wie zum Beispiel die Bildung von RecA Filamenten oder die Abspaltung von LexA von der SOS Box, lassen sich in Regulationsschemata zusammenfassen. Daraus können Netzwerke entwickelt werden, die aus unterschiedlichen Bausteinen (Reaktionen) zusammengesetzt sind. Die einfachsten dieser Bausteine stellen Reaktionen dar, im Rahmen derer das Gen y , ohne die Anwesenheit weiterer äußerer Einflüsse, vom Transkriptionsfaktor x reguliert wird. Beispiele hierfür sind: Die negative Autoregulation (NAR) bei der das Protein (ein Transkriptionsfaktor) das aus einem Gen gebildet wird als sein eigener Repressor wirkt; sowie die positive Autoregulation (PAR), bei der der gebildete Transkriptionsfaktor die Transkription des eigenen Gens aktiviert (siehe hierzu Abbildung 2.3) [59].

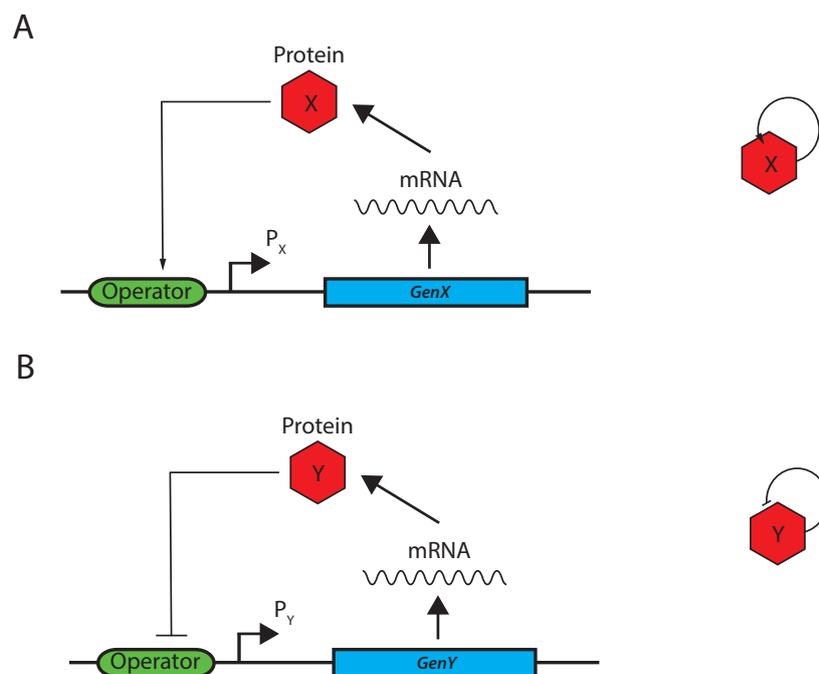


Abbildung 2.3.: Einfache Regulationselemente: Im Teil A der Abbildung ist das Schema der positiven Autoregulation dargestellt. Es wird die mRNA für das Gen x gebildet und anschließend in das Protein übersetzt. Dieses Protein führt dann, durch Bindung an den Operator, zu einer Erhöhung der Aktivität des eigenen Promotors. In Teil B ist die negative Autoregulation dargestellt, bei der es nach Bildung des Proteins Y zur Inhibition des Promotors durch die Bindung des Proteins Y an den Operator vor dem eigenen Promotor kommt.

2. Einführende Grundlagen

Ein Beispiel für die negative Autoregulation (NAR), die in transkriptionellen Netzwerken von Prokaryoten weit verbreitet ist [60], stellt die SOS Antwort der *E.coli* Bakterien dar. Der Repressor LexA reprimiert unter anderem auch seinen eigenen Promotor, was zu einer schnelleren Antwort des Systems und einer reduzierten Zell zu Zell Varianz der LexA Proteine führt [59, 61]. Beides sind für ein SOS System der einzelnen Bakterien einer Population wichtige Eigenschaften um schnell und gleichzeitig auf Stress reagieren zu können. Aus diesen und weiteren Bausteinen können dann komplexe regulatorische Netzwerke, wie zum Beispiel das Netzwerk der Regulation der Transkription in *E.coli* [62] aufgebaut werden. Die Zell zu Zell Varianz der Expression einzelner Proteine, die unter anderem von der Menge an mRNA und deren Varianz zwischen den Zellen abhängt, fördert die Flexibilität der Bakterien, die für eine Reaktion auf rasch wechselnde Umweltbedingungen nötig ist. Des Weiteren ist durch diese Varianzen eine Ausbildung phänotypischer Heterogenitäten genotypisch gleicher Bakterien möglich [63].

Einen Weg um transkriptionelle Regulation theoretisch zu analysieren, stellen deterministische Ratengleichungen dar, die für ein einfaches Modell nach Kaern *et al.* [63], wie folgend aufgestellt werden können:

$$\frac{d[M]}{dt} = \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} \frac{s_A}{V} + \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} \frac{s_R}{V} - \delta_M[M] \quad (2.1)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = s_P[M] - \delta_P[P] \quad (2.2)$$

Dabei spielen das Zellvolumen V , die Degradationsraten der mRNA und des mRNA Bindeproteins $\delta_P[M]$ bzw. $\delta_P[P]$, die Rate der Proteinsynthese $s_P[M]$, die Raten k_{on} und k_{off} , die den Übergang vom aktiven in den reprimierten Zustand des Promotors beschreiben und die Rate der aktivierten s_A bzw. reprimierten s_R mRNA Synthese eine Rolle. Systeme die diesen Gleichungen gehorchen müssen zwei Randbedingungen erfüllen, um das Rauschen in diesem gekoppelten Gleichungssystem klein zu halten [63]. Das an sich stochastische System kann dann durch diese deterministischen Ratengleichungen angenähert werden, wenn zum Einen

das makroskopische Limit vorliegt, das bedeutet die Raten der mRNA Synthese (s_A und s_R) und das Zellvolumen V werden, bei gleich bleibenden Verhältnissen s_A/V und s_R/V , groß. Zum Anderen muss das Limit schneller chemischer Kinetiken gelten, das bedeutet die Raten k_{on} und k_{off} steigen an bei gleichbleibendem Verhältnis zueinander [63]. Hier zeigt sich, dass kleines Volumen oder langsames Umschalten der Promotoren, bei gleichbleibenden weiteren Parametern, zum Ansteigen des Rauschens führt [63]. Zusammen mit einer schnellen Expressionskinetik der Promotoren kann Rauschen im System, ein Indikator für das Auftreten von phänotypischer Heterogenität darstellen [63]. Elowitz *et al.* [64] zeigen in ihrer Arbeit das dieses Rauschen sich aus zwei verschiedenen Bestandteilen zusammensetzt, dem Rauschen das dem biochemischen Prozess der Expression des regulierten Gens inhärent ist (intrinsisches Rauschen) und den Fluktuationen anderer zellulärer Komponenten (extrinsisches Rauschen). Jede Genexpression die intrinsisches Rauschen zeigt, ist für andere Komponenten wieder eine Quelle extrinsischen Rauschens [64]. Dieses Rauschen kann ebenfalls einen Grund für das Auftreten von phänotypischer Heterogenität darstellen [64]. Das Zusammenspiel von LexA und RecA, zweier Regulatoren des SOS Systems von *E.coli* [7], führt zusätzlich durch transkriptionelle Regulation eines Colicin Operons zur Ausbildung von phänotypischer Heterogenität [57]. Colicin Operons zeigen keine basale Expression, daher hängt die Ausbildung der phänotypischen Heterogenität nach Kamensek *et al.* [57] primär von stochastischen Faktoren (Rauschen) und der Bindestärke der LexA Bindestellen im Bereich des Promotors des Colicin E2 Operons ab. Friedman *et al.* [26] beschreiben in ihrer Arbeit das Antwortverhalten des für die Reparatur von DNA verantwortlichen Netzwerks in *E.coli*. Dieses Netzwerk wird, wie die Expression von Colicin Operons, reguliert durch LexA und RecA in der SOS Antwort der *E.coli* Bakterien [26]. Dabei wurde eine pulshafte oszillierende Promotoraktivität die zu einer oszillierenden Expression der regulierten Gene führt beobachtet, die Zahl der beobachteten Oszillationen hängt von der Stärke der vorangegangenen Schädigung der DNA ab [26]. Für das Colicin E2 Operon ist zu erwarten, dass die transkriptionelle Regulation die heterogene Expression des Colicin E2 beeinflusst und unter der Voraussetzung, das die Bakterien nur kurz äußerem Stress ausgesetzt sind, vielleicht ebenfalls ein oszillierendes Verhalten der Expression der Gene beobachtet werden kann. Das Colicin E2 Operon weist neben den LexA Bindestellen der transkriptionellen Regulation weitere Bindestellen und Terminatoren auf, die auf

eine post-transkriptionelle Regulation der Translation des Lysisproteins hinweisen. Deshalb wird im Kapitel 2.3 zunächst auf die allgemeinen Eigenschaften der post-transkriptionellen Regulation eingegangen. Im Anschluss daran wird in ein erstes Modell zur theoretischen Beschreibung des Colicin E2 Operons und seiner Regulation dargestellt.

2.3. Post-transkriptionelle Regulation und theoretische Betrachtung des Colicin E2 Operon

Wie im Kapitel 2.2 beschrieben wird für die transkriptionelle Regulation sowohl ein Einfluss auf die Expression des Toxingens (*cea*), als auch die des Lysisgens (*cel*) erwartet. Im Gegensatz dazu erwartet man für die post-transkriptionelle Regulation in erster Linie einen Einfluss auf die Expression des Lysisgens, da die Bindestellen, die im Zusammenspiel mit dem mRNA Bindeprotein CsrA die Expression post-transkriptionell regulieren, kurz vor bzw. überlappend mit dem Transkriptionsstart des Lysisproteins liegen (siehe Kapitel 2.1). Die post-transkriptionelle Regulation setzt nach Bildung der mRNA ein und dient zur Regulation der Übersetzung der mRNA in das tatsächliche Protein. Die Regulation auf dem Level der Translation wird häufig zur schnellen Reaktion auf Änderungen in den Umweltbedingungen oder zur Feinabstimmung des gesamten Regulationsprozesses genutzt [65]. Der Prozess der Translation kann zum Beispiel durch mRNA Bindeproteine oder sRNAs beeinflusst werden [66]. Generell kann die post-transkriptionelle Regulation durch mRNA-Bindeproteine nach van Assche *et al.* [66] auf verschiedene Art und Weise erfolgen:

- **Beeinflussung der Degradation von sRNA und mRNA durch verschiedene RNasen:** Durch die Bindung des mRNA-Bindeproteins kann es sowohl zur schnelleren Degradation der mRNA, als auch zum Schutz der mRNA vor Degradation kommen.
- **Veränderung der Zugänglichkeit der Ribosombindestelle der mRNA:** Wichtig für

die Bindung des Ribosoms an die mRNA sind die Basen -20 bis +19 relativ zum Start Codon der mRNA [67]. Die mRNA-Bindeproteine können entweder durch direkte Konkurrenz um die Bindestelle oder durch Hervorrufen einer Veränderung der Sekundärstruktur der mRNA die Menge an translatiertem Protein beeinflussen [68, 69, 70].

- **Rekrutierung und Unterstützung bei der Interaktion der mRNA mit anderen Molekülen:** Meist kommt es zur Interaktion mit RNasen die zu einer schnelleren Degradation der mRNA führen, die mRNA-Bindeproteine wirken hier als Vermittler und binden sowohl die mRNA als auch ein weiteres Protein oder eine sRNA, die dann als Effektor wirken [66].
- **Regulation der Bildung von Terminatoren bzw. Antiterminatoren für die Transkription:** Die Struktur wird durch die Bindung eines mRNA-Bindeproteins an eine Terminator/Antiterminator Struktur stabilisiert [66].

Die post-transkriptionelle Inhibition wird hervorgerufen durch die Bindung der mRNA-Bindeproteine an eine spezifische Erkennungsstelle, die meist mit der Ribosombindestelle (RBS) der abzulesenden mRNA überlappt [66]. Ein Beispiel hierfür ist das Protein CsrA des Kohlenstoffhaushaltssystems Csr [48] der *E.coli* Bakterien. Ähnlich zum SOS System mit dem Regulator LexA [71], ist das Csr System weit verbreitet unter den Bakterienarten [72]. Die Konsensusbindestelle für CsrA an die mRNA zeichnet sich durch zu 100% konservierte Stellen „GGA“, „ACA“ und „GU“ aus. Durch weitere Basen, die allerdings nicht so stark konserviert sind, wird sie zur Bindestelle 5'-RUACARGGAUGU-3' (R stellt einen Platzhalter für eine beliebige Base dar)[69]. Die Bindestellen überlappen häufig mit Ribosombindestellen auf der mRNA. Beim Colicin E2 Operon gibt es zwei für CsrA spezifische Bindestellen, beide Bindestellen besitzen das GGA Motiv und weisen aber Abweichungen zur optimalen Bindestelle nach Baker *et al.* [69] auf. Eine mögliche Bindestelle liegt im Bereich der Ribosombindestelle des *cel* Gens, das zweite Motiv befindet sich im Bereich des Terminators T1 (siehe Abbildung 2.2), der eine gefaltete Haarnadelstruktur aufweist. In Abbildung 2.4 sind die zwei Bindestellen des Colicin E2 Operons im Vergleich zur Konsensussequenz nach

2. Einführende Grundlagen

Baker *et al.* [69] dargestellt.

```
pMO3  3'-AUU UAA ACA GGG CUG AAA UAU GAA UGC CGG UUG UUU AUG GAU GAA UGG CUG GCA UUC UUU CAC AAC AAG GAG UCG UUA UGA AAA AAA UA-5'
pMO6  3'-AUU UAA ACA GGG CUG AAA UAU GAA UGC CGG UUG UUU AUG GAU GAA UGG CUG GCA UUC UUU CAC AAC AAG GAU GUG UUA UGA AAA AAA UA-5'
pMO7  3'-AUU UAA ACA GGG CUG AAA UAU GAA UGC CGG UUG UUU AUG GAU GAA UGG CUG GCA UUC UUU CAC AUU AAG GAG UCG UUA UGA AAA AAA UA-5'
Konsensussequenz der CsrA Bindestelle      3'-R UAC ARG GAU GU-5'                               3'-R UAC ARG GAU GU-5'
```

Abbildung 2.4.: Vergleich der CsrA Bindestellen mit der Konsensussequenz für die CsrA Bindung in *E.coli*: In der Abbildung sind die Bindestellen für pMO3 (Reporterplasmid in EMO3-C und EMO3-S), sowie pMO6 (Plasmid in CsrA1) und pMO7 (Plasmid in CsrA2) dargestellt. Die zwei Bindestellen (vordere im Bereich des Terminators T1 in rot und hintere im Bereich der Shine Dalgarno Sequenz in hellgrün gekennzeichnet) werden mit der Konsensussequenz nach Dubey *et al.* [68] für die Bindung von CsrA an die mRNA verglichen. Die Veränderungen zwischen den einzelnen Plasmiden im Bereich der hinteren Bindestelle sind in fetten hellgrünen Buchstaben dargestellt. Im Falle von pMO6 wird die Sequenz der Bindestelle an die Konsensussequenz angenähert, was zu einer Verbesserung der Bindung von CsrA an die mRNA führen sollte. Für die Mutation im Plasmid pMO7 gilt das Gegenteil, sie sollte also zu einer Verschlechterung der Bindung von CsrA führen.

Dubey *et al.* [68] konnten zeigen, dass das Zusammenspiel aus zwei Bindesequenzen, von der eine die RBS überlagert, mit der Sekundärstruktur der mRNA zu einer besonders effektiven Bindung führt. Des Weiteren könnte hier auch einer der weiteren in der Arbeit von Assche *et al.* [66] dargestellten möglichen regulatorischen Einflüsse des mRNA-Bindeproteins CsrA zum tragen kommen. Als Antagonisten der Bindung von CsrA an die mRNA treten die beiden sRNAs CsrB und CsrC auf, durch ihre große Anzahl an CsrA Bindestellen könnten diese zu einem Titrationseffekt von CsrA führen [49, 50]. Der Einfluss der post-transkriptionellen Regulation innerhalb des Colicin E2 Operons auf die Produktion des Lysisproteins sollte wesentlich größer sein, als der Einfluss auf die Produktion des Toxins und des Immunitätsproteins, da sich die Bindestellen von CsrA nur auf der langen mRNA (siehe Kapitel 3.1) im Bereich der Ribosombindestelle des Lysisgens befinden. Somit ist diese Regulation maßgeblich für die Effektivität der Produktion des Toxins, da sie mit dem Zeitpunkt der Zelllyse das Ende der Toxinproduktion und dessen anschließende Freisetzung bestimmt. Durch die geringere Anzahl an langen mRNAs im Vergleich zur Menge an kurzer mRNA (siehe Kapitel 2.1) und die zusätzliche Repression der Translation des Lysisgens durch CsrA, ist es zu erwarten, dass es zu einer „natürlichen“ Zeitverzögerung zwischen der Expression des Toxins und des Lysisgens

kommt. Im Hinblick auf diese Vermutung wurde von Mathias Schwarz¹ im Rahmen seiner Masterarbeit ein erstes Model für die post-transkriptionelle Regulation des Colicin E2 Ope-
rons entwickelt das im folgenden dargestellt wird. Diese theoretische Arbeit stellt einen ersten
Versuch der Modellierung der Expressionsdynamiken des Colicin E2 Systems dar.

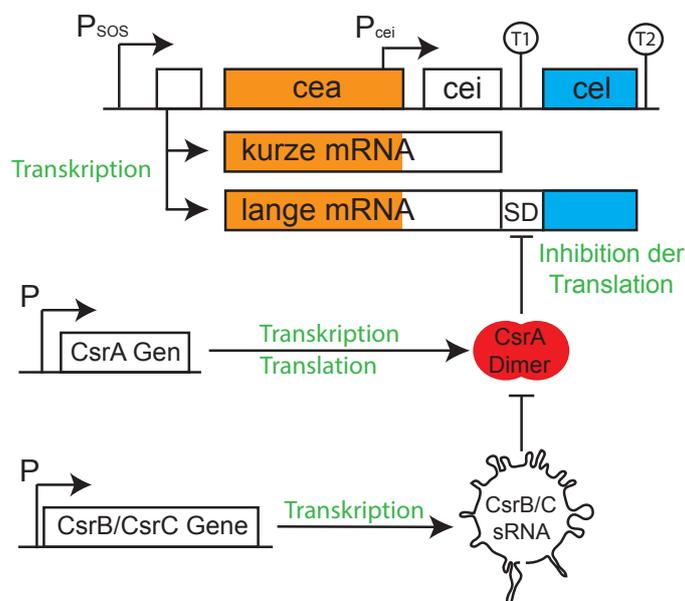


Abbildung 2.5.: Schema zur post-transkriptionellen Regulation des Colicin E2 Systems: Für die post-transkriptionelle Regulation ist zum Einen die Menge verfügbarer mRNA, reguliert über die Transkription in kurze und lange mRNA verantwortlich. Zum Anderen spielt die Transkription und Translation des CsrA Gens, wodurch die Menge an mRNA-Bindeprotein beeinflusst wird, das an die Bindestellen nahe der Shine Dalgarno Sequenz (SD) des *cel* Gens bindet, eine Rolle. Einen weiteren Einflussfaktor stellt die Transkription der beiden sRNAs CsrB und CsrC dar, die beide multiple CsrA Bindestellen aufweisen und dadurch die verfügbare Menge an CsrA Protein reduzieren können. Die involvierten Prozesse sind in grüner Farbe dargestellt.

Nur die lange mRNA (siehe Abbildung 2.5) wird post-transkriptionell reguliert, da auf der kurzen mRNA die Bindestellen für die Regulation, die im Bereich der Shine Dalgarno (SD) Sequenz des Lysisgens liegen nicht vorhanden sind (siehe Kapitel 2.1). Das für die Abgabe des Toxins durch Zellyse verantwortliche Gen *cel* wird durch die Bindung des mRNA-Bindeproteins CsrA, an der Translation gehindert. Nativ liegt CsrA als Dimer vor [73] und bindet an spezifische RNA Sequenzen im Bereich eines konservierten GGA Motivs [18, 69]. Zwei dieser Bindestellen sind im Abstand von 28nt im Bereich der SD Sequenz des *cel* Gens,

¹Regulation of Colicin E2 release in *Escherichia coli*, Mathias Schwarz, München 2012

2. Einführende Grundlagen

wobei eine der Sequenzen mit der SD Sequenz überlagert ist. Von Mercante *et al.*[73] wurde gezeigt, dass zwei Bindestellen in dieser Anordnung von einem CsrA Dimer zur Anbindung genutzt werden können und dadurch die Translation inhibiert wird.

Für die Modellierung ist wichtig, dass bevor es zur Inhibition kommen kann das *CsrA* Gen in mRNA umgeschrieben und in ein Protein übersetzt werden muss. Die Konzentration an freiem CsrA wird zudem von den sRNAs CsrB und CsrC beeinflusst, die zuvor von dem jeweiligen Gen gebildet werden müssen. Somit wird die zur Bindung an die mRNA verfügbare Menge an freiem CsrA bestimmt durch:

- die Produktion und Degradation von CsrA
- die Regulation durch die sRNAs CsrB und CsrC
- die Menge an vorhandener langer mRNA des Colicin E2 Operons

Für das vereinfachte Model der post-transkriptionellen Regulation des Colicin E2 Operons wurden von Mathias Schwarz² folgende Annahmen gemacht:

- Die beiden sRNAs CsrB und CsrC wurden auf Grund ihrer Ähnlichkeit und ihres weitestgehend gleichen Verhaltens zu einer effektiven sRNA zusammengefasst, die die Summe aus den CsrA Bindestellen von CsrB und CsrC enthält.
- Die Regulation der Transkription der langen mRNA, von CsrA und den sRNAs wurden vernachlässigt. Nach Kaern *et al.* [63] können Promotorkinetiken in vielen Modellen der Genexpression von Prokaryoten als schnell im Vergleich zu Produktion und Degradation angenommen. Daher lässt sich der Zustand des Promotors gut mit Hilfe seines

²Die folgenden theoretischen Betrachtungen zur post-transkriptionellen Regulation des Colicin E2 Operons sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, der Masterarbeit von Mathias Schwarz: Regulation of Colicin E2 release in *Escherichia coli*, Mathias Schwarz, München 2012 entnommen.

Gleichgewichtszustandes beschreiben [63] und durch eine effektive Transkriptionsrate angenähern.

- Das System wurde als homogen, also als unabhängig von lokalen Gradienten oder Konzentrationen angenommen.

Mit diesen Annahmen können Ratengleichungen für die Konzentration der Lysisproteine, der langen mRNA, der CsrA Proteine, der Komplexe zwischen CsrA und mRNA, der Komplexe zwischen CsrA und der sRNAs an sich, zum Zeitpunkt t , aufgestellt werden. Diese führen nach Vereinfachungen auf ein reduziertes System von 3 Ratengleichungen:

$$\dot{M} = \alpha_m - \delta_m M - k_m M A \quad (2.3)$$

$$\dot{A} = \beta_a - \delta_a A - k_m p_m M A - k_s p_s A S \quad (2.4)$$

$$\dot{S} = \alpha_s - \delta_s S - A k_s S \quad (2.5)$$

In diesen Ratengleichungen wird die Anzahl freier langer mRNA durch M , der Anzahl der freien CsrA Dimere durch A , der Anzahl der freien effektiven sRNAs durch S , den jeweiligen Transkriptionsraten durch α , den Translationsraten durch β , den Komplexbildungsraten durch k und den Degradationsraten durch δ dargestellt. Die Parameter p_M und p_S beschreiben die jeweilige Wahrscheinlichkeit mit der ein CsrA Dimer im Prozess Degradation des jeweiligen Komplexes (mit langer mRNA für p_M und mit sRNA für p_S) ebenfalls degradiert wird.

Für diese vereinfachten Ratengleichungen wurde davon ausgegangen, dass die Bildung von Komplexen der einfachere und schnellere Prozess im Vergleich zur Transkription der langen

2. Einführende Grundlagen

mRNA, *CsrA* und der beiden sRNAs sowie der Translation von *CsrA* ist. Zudem wurden die Bindungen der *CsrA* Dimere an die beiden sRNAs, durch eine Bindung eines Dimers an eine Stelle einer effektiven sRNA, die die Summe aus den Bindestellen von *CsrB* und *CsrC* als Anzahl der Bindestellen aufweist, zusammengefasst.

Die in Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.5 beschriebenen Ratengleichungen zeigen eine komplexe Dynamik. Hierbei spielen die gekoppelten Degradationsprozesse von *CsrA* Dimeren mit langer mRNA und effektiver sRNA eine große Rolle.

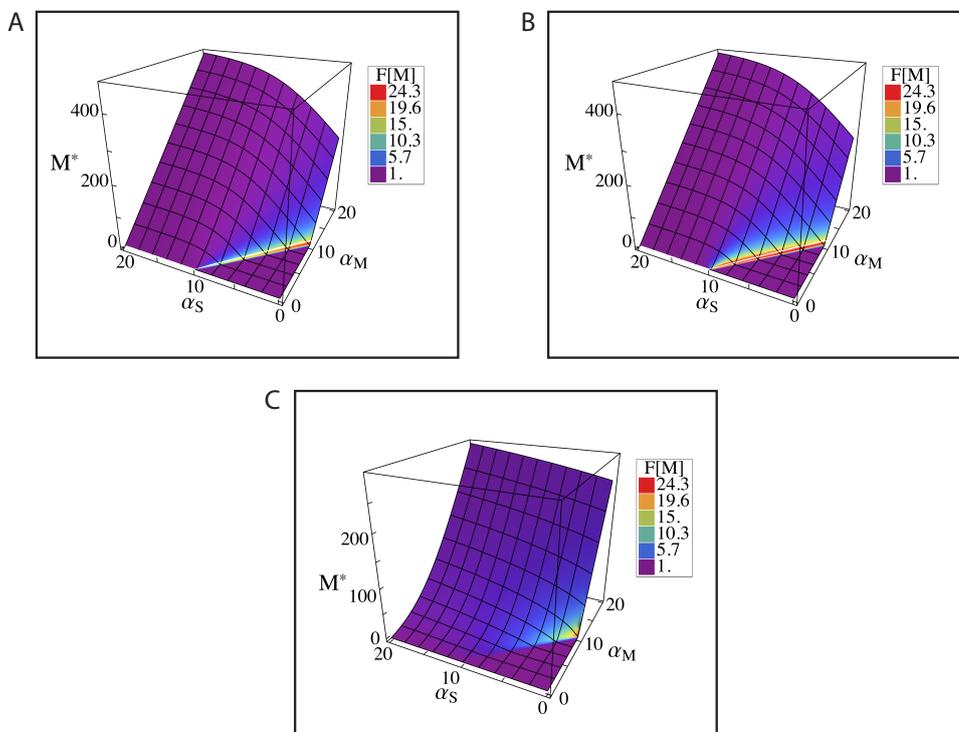


Abbildung 2.6.: Eigenschaften des Schwellwertes der freien langen mRNA: Gezeigt sind stationäre Lösungen des Gleichungssystems (siehe Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.5) bei denen im Vergleich zu den originalen Parametern jeweils einer verändert wurde (Parameter: $\beta_a = 10$, $\delta_m = 0.04$, $\delta_a = 0.01$, $\delta_s = 0.3$, $k_m = 0.5$, $k_s = 0.5$, $p_m = 1$, $p_s = 1$). Der Fano Faktor, der die Fluktuationen der freien langen mRNA beschreibt, ist als Farbcodierung in jede der 3 Teilgraphen integriert. Teilgraph A: Verkleinerung der Degradationsrate der sRNA um einen Faktor 100 auf $\delta_s = 0.03$; Teilgraph B: Vergrößerung der Komplexbildungsrate der sRNA um einen Faktor 100 auf $k_s = 50.0$; Teilgraph C: Darstellung der Lösung für den originalen Parametersatz; (Nach Masterarbeit Mathias Schwarz).

Die Lösung dieses, durch die Menge an freiem CsrA (A), gekoppelten Differentialgleichungssystems (Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.5) ergibt für den stationären Fall (der analytischen Lösung des Gleichungssystems ohne Variation der Parameter) einen Schwellwert, ab dem freie lange mRNA vorliegt (siehe Abbildung 2.6). Die Schärfe dieses Schwellwertes kann durch Veränderungen in den Parametern ($\beta_a, \delta_m, \delta_a, \delta_s, k_m, k_s, p_m, p_s$) beeinflusst werden. So zeigt sich, wie in Abbildung 2.6 dargestellt, dass die Verkleinerung der Degradationsrate der sRNA δ_s um einen Faktor 100, oder die Vergrößerung der Komplexbildungsrate der sRNA (k_s) um einen Faktor 100, einen Einfluss auf den Schwellwert besitzen. Biologisch wäre ein sehr genau definierter Schwellwert sinnvoll, da dann die einzelne Bakterie, durch eine genau definierte Antwort, die ab einer vorgegebenen Menge an freiem CsrA zu einem Ansteigen der Menge an freier langer mRNA führt, auf Veränderungen in der Verfügbarkeit von freiem CsrA reagieren könnte. Ein sehr genau definierter Schwellwert geht allerdings einher mit stark steigenden Fluktuationen in der Menge an freier langer mRNA, dies zeigt sich durch steigende Fano Faktoren, die eine mit dem Mittelwert gewichtete Varianz der betrachteten Größe darstellen (siehe Abbildung 2.6). Diese Darstellung der relativen Größe von Fluktuationen in regulatorischen Netzwerken wurde bereits von Thattai *et al.* [74] zur Beschreibung von Fluktuationen in verschiedenen Regulationsnetzwerken verwendet. Mit Hilfe dieser Darstellung lässt sich ableiten, dass bei kleinen Abweichungen vom Schwellwert die Fluktuationen die Menge an freier langer mRNA stark verändern. Die Fluktuationen sind im Bereich des Schwellwertes lokalisiert, da in diesem Bereich die Anzahl der Moleküle sehr klein ist dadurch die Fluktuationen ansteigen können (stochastisches Regime). Der Bereich des Schwellwertes ist auch der Bereich in dem freie mRNA, freies CsrA und effektive sRNA miteinander interagieren können, denn das Ansteigen entweder der freien mRNA bzw. effektiven sRNA oder der Menge an freiem CsrA führt zu einer starken Verringerung des jeweiligen Gegenspielers. Durch Gillespie Simulationen konnten die stationären Lösungen des Gleichungssystems verifiziert werden. Die Ergebnisse der Simulationen weichen für den Erwartungswert der Anzahl langer freier mRNA nur im Bereich des Schwellwertes geringfügig nach unten von der stationären Lösung ab. Somit zeigt sich, dass die in den stationären Lösungen vernachlässigten statistischen Schwankungen der Anfangsparameter, nur einen geringen Einfluss auf das sich einstellende Gleichgewicht und somit auf den Schwellwert der freien langen mRNA, haben.

2. Einführende Grundlagen

Die Größe der Fluktuationen der Anzahl der langen mRNA, dargestellt mit Hilfe des Fano Faktors, kann über eine lineare Näherung des Systemrauschens beschrieben werden. Starke Fluktuationen nahe des Schwellwertes lassen sich nach Elf und Ehrenberg [75] über eine Antikorrelation verschiedener Komponenten erklären. Sinken die Fluktuationen in einer Komponente, wird das in dieser Beschreibung durch den Anstieg der Fluktuationen in der antikorrelierten Komponente kompensiert. Im Colicin E2 System stellen solche Komponenten die Menge an freiem CsrA und die Menge an langer mRNA dar. Die dritte Komponente der Regulation, die Menge an freier sRNA verhält sich, wie die Menge freier langer mRNA, sie steigt also nur dann an wenn kein freies CsrA vorhanden ist. Die Fluktuationen der drei Komponenten spielen in der Nähe des Schwellwertes eine große Rolle, da dort die jeweiligen Erwartungswerte für die Menge an freiem CsrA, freier sRNA bzw. die Menge an freier langer mRNA, klein sind und somit Fluktuationen stärker ins Gewicht fallen.

Um Stress für das Bakterium zu simulieren, wird in dem von Mathias Schwarz aufgestellten Modell die Produktionsrate der langen mRNA um einen Faktor drei erhöht, in Abbildung 2.7 wird der Stress bei 200 min erhöht und bei 500 min wieder abgesenkt (senkrechte gestrichelte schwarze Linien in Abbildung 2.7). Diese Rate symbolisiert in Anlehnung an das biologische System bei dem durch Stress induzierte Bildung von RecA Proteofilamenten die Selbstabspaltung von LexA induziert und damit die Produktion von mRNA aktiviert wird, den Anstieg des externen Stresses. Die Anhebung des externen Stresses führt, nach dem der Vorrat an CsrA aufgebraucht ist, zu einem Ansteigen der freien langen mRNA (siehe Abbildung 2.7). Dabei kommt es zu einer Zeitverzögerung die mit dem Verbrauch der verfügbaren CsrA Moleküle korreliert. Das bedeutet, der Anstieg der freien langen mRNA verzögert sich um einige Minuten im Vergleich zum Beginn des externen Stresses (siehe Teil B in Abbildung 2.8). Innerhalb dieser Zeit wird die vorhandene Menge an freiem CsrA aufgebraucht (siehe Teil C in Abbildung 2.8), erst dann kann es zu einem Anstieg der freien langen mRNA kommen. Die Menge der freien kurzen mRNA, die nicht über das CsrA Protein reguliert wird, steigt hingegen sofort nach Beginn des äußeren Stresses an (siehe Teil A in Abbildung 2.8).

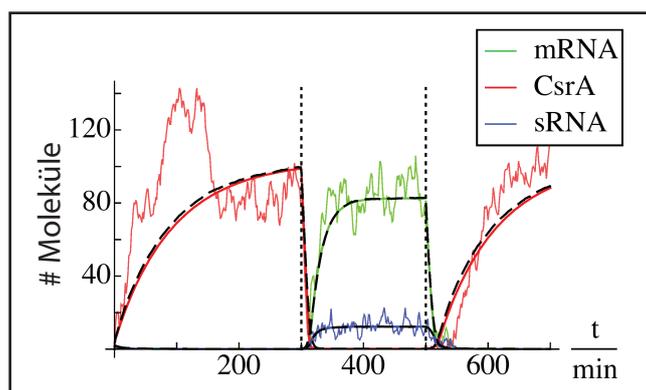


Abbildung 2.7.: Dynamische Stressantwort auf eine Änderung der Produktionsrate der freien langen mRNA α_m : Zwischen den beiden vertikalen schwarz gepunkteten Linien wird Stress für das System durch die Veränderung der Produktionsrate der langen mRNA, von $\alpha_m = 3$ auf $\alpha_m = 12$ erzeugt. Es ist die deterministische Lösung (glatte farbige Kurven), eine Simulation für eine einzelne Zelle (gezackte farbige Kurven) und der Mittelwert aus 5000 Gillespie Simulationen (schwarze gestrichelte Kurven) gezeigt. Verschiedene Farben sind unterschiedlichen Komponenten zugeordnet, die # der freien langen mRNA ist in grün, die der CsrA Moleküle in rot und die der effektiven sRNAs in blau dargestellt. Alle weiteren Parameter wurden konstant gehalten. Es ist ein kleiner zeitlicher Versatz im Beginn des Anstiegs der mRNA Menge zu beobachten, der durch das Aufbrauchen noch vorhandener CsrA Moleküle erklärt werden kann (Nach Masterarbeit Mathias Schwarz).

Um Auswirkungen des Stresses auf die Dynamik des Systems und die zeitliche Verzögerung genauer zu analysieren, werden verschiedene Parameter (Produktionsrate der freien langen mRNA α_m , Degradationsrate der sRNA δ_s und die Rate mit der die sRNA einen Komplex mit CsrA bildet k_s) verändert und die Auswirkungen auf die Menge der freien langen mRNA untersucht. Der Zeitunterschied zwischen SOS Signal und Anstieg in der freien mRNA hängt sowohl von der Menge an verfügbarem CsrA Protein ab, als auch von der Stärke des angelegten Stresses, die im Model über eine Veränderung der Produktionsrate α_m der freien langen mRNA realisiert wird (siehe Abbildung 2.7) ab. Die Schärfe des Übergangs zwischen nahezu keiner freien langen mRNA und einem Überfluss an freier langer mRNA wird zudem beeinflusst von den Eigenschaften der sRNA (der Degradationsrate δ_s und der Komplexbildungsrate k_s). Dieser Einfluss wird in der Abbildung 2.6 deutlich. Teil A zeigt das Verhalten für eine reduzierte Degradationsrate der sRNA, was ebenso wie eine Erhöhung der Komplexbildungsrate (Abbildung 2.6 Teil B) zu einem schärferen Schwellwert, im Vergleich zum vorher verwendeten Parametersatz (Abbildung 2.6 Teil C), führt. Damit zeigt sich, dass durch

2. Einführende Grundlagen

die Eigenschaften der effektiven sRNA, in diesem System die Stärke der Fluktuationen rund und Schärfe des Schwellwerts beeinflusst werden.

Die Expression des Colicin E2 Operons ist nicht nur post-transkriptionell sondern auch transkriptionell (siehe Kapitel 3.1) reguliert. Diese transkriptionelle Regulation kann in Anlehnung an die Arbeit von Shimoni *et al.* [76] simuliert werden. Diese Simulation wurde von Matthias Schwarz auf das Colicin E2 System angepasst. Den wichtigsten Parameter in diesem Zusammenhang stellt c_p dar, dieser Parameter beschreibt die Stärke der Fähigkeit von RecA die Selbstabspaltung von LexA von seiner Bindestelle zu induzieren. Somit kann durch verändern dieses Parameters das fiktive Stresslevel für das Bakterium verändert werden. Im Vergleich zum im vorigen Unterkapitel, zur Simulation externen Stresses verwendeten Parameters α_m der nur die Produktion der freien langen mRNA beschreibt, integriert der Parameter c_p die Menge von LexA und die SOS Antwort von RecA mit in das Modell. Die Einführung dieses Parameters war nötig, da der Anstieg des externen Stresses nicht direkt auf die Menge an freier langer mRNA wirkt, sondern der Anstieg durch die SOS Antwort des Bakteriums vermittelt wird. Durch das Zusammenspiel von LexA und RecA kommt es zur phänotypischen Heterogenität der Expression der Proteine, die durch LexA reguliert ist [57].

Mit Hilfe der beiden Teilmodelle kann das gesamte Colicin E2 System angenähert werden. Die Dynamik des transkriptionellen Anteils wird in das Model der post-transkriptionellen Regulation über Veränderungen in den Ratengleichungen eingebaut. Aus der Simulation dieses Gesamtbildes ergibt sich die Voraussage, dass die post-transkriptionelle Regulation in Abhängigkeit von der Stärke des anliegenden Stresses zu einer zeitlichen Verzögerung der Produktion von freier langer mRNA (verantwortlich für die Produktion des Lysisproteins) im Vergleich zur kurzen mRNA führt. Dies ist exemplarisch in Abbildung 2.8 dargestellt, hier wird durch eine Veränderung des Parameters c_p (innerhalb der schwarzen gestrichelten Linien) von null nach sechs das Stresslevel erhöht, was eine zeitliche Verzögerung der Produktion der freien langen mRNA von ungefähr 60 min zur Folge hat. Hier zeigt sich im Gegensatz zur Abbildung 2.7 ein deutlicher Unterschied zwischen der numerischen Integration der Ratengleichungen (durchgezogene farbige Linie in den Teilgraphen in Abbildung 2.8) und dem

Mittelwert aus 2000 stochastischen Gillespie Simulationen (schwarz gepunktete Linie in den Teilgraphen in Abbildung 2.8). Diese Beobachtung spiegelt die intrinsische Stochastizität des LexA/RecA Systems wieder [76], die hier über die transkriptionelle Regulation mit einbezogen wurde. Ein zeitlicher Versatz zwischen der Toxin Produktion (Start der Produktion der kurzen mRNA) und dessen Freigabe durch die Produktion des Lysisgens die einhergeht mit dem ansteigen der freien langen mRNA (siehe Abbildung 2.8), ist im Sinne einer effektiven Verteidigung biologisch signifikant. Das Bakterium kann dann eine möglichst effektive Menge an Toxin produzieren, bevor es während der Abgabe des Toxins durch Lyse stirbt. Durch dieses Verhalten kann ein Bakterium zum Erfolg der Überlebensstrategie einer Population beitragen und helfen einen Vorteil im Kampf um Lebensraum und Nahrungsquellen zu erlangen.

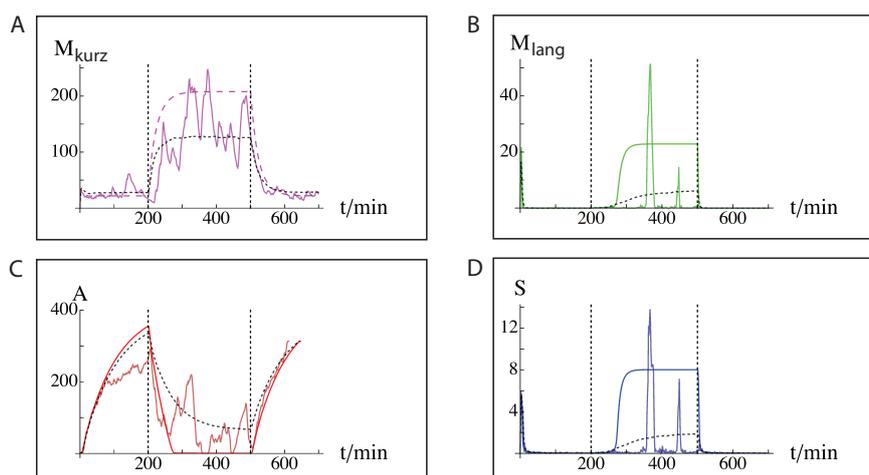


Abbildung 2.8.: Darstellung des zeitlichen Versatzes zwischen der kurzen und der freien langen mRNA:

In allen vier Teilgraphen ist jeweils die numerische Integration der Ratengleichungen (durchgezogene farbige Linie), eine einzelne Simulation (gezackte farbige Linie), sowie der Mittelwert aus 2000 Gillespie Simulationen (schwarz gepunktet), dargestellt. Zwischen den beiden horizontalen Linien wird der Stress durch die Veränderung des Parameters c_p , der den Einfluss von RecA auf die Selbstspaltung von LexA beschreibt, von 0.0 nach 6.0 erhöht. Die Anzahl an kurzer mRNA (Teilgraph A) reagiert sofort auf den geänderten Stresslevel, wohingegen die Antwort der freien langen mRNA mit einer zeitlichen Verzögerung von ungefähr 60 min eintritt (Teilgraph B). Die Anzahl an freien CsrA Proteinen (Teilgraph C) erreicht im Rahmen dieser Verzögerung nahezu den Wert 0. Das im Teilgraph D gezeigte Verhalten der Menge an freien sRNAs, ist sehr ähnlich zum Verhalten der freien langen mRNA (Nach Masterarbeit Mathias Schwarz).

2. Einführende Grundlagen

Mit dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Doppelreporterplasmid für die Expression des Toxin bzw. Lysis Gens und der zeitaufgelösten Einzelzellmikroskopie (siehe Kapitel 3.3) ist es möglich die Dynamiken, die in diesem Modell beschrieben werden, experimentell zu analysieren und die Ergebnisse mit den Voraussagen dieser Theorie zu vergleichen. Möglicherweise müssen im Anschluss daran die Parameter des Modells angepasst oder neue Annahmen getroffen werden. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 4 dargestellt und die gemessenen Übereinstimmungen bzw. Differenzen diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1. Klonierung

Das Doppelreporterplasmid pMO3

Um das von Cole *et al.* 1985 [37] entdeckte Colicin E2 Operon (siehe Kapitel 2.1) hinsichtlich seiner Regulation und deren Dynamik quantitativ und zeitaufgelöst zu untersuchen, wurde ein Doppelreporterplasmid konstruiert. Dadurch ist es möglich, die Dynamik und Stärke der Expression des Toxingens (*cea*) und des Lysisgens (*cel*) durch die Detektion und Analyse der Expression zweier verschiedener Fluoreszenzproteine zu beobachten. Die bekannte Sequenz des Colicin E2 Operons (NCBI M29885 [37]) wurde, an Stellen die die Regulation nicht beeinflussen, durch den Einbau von Restriktionsschnittstellen verändert (pEX-K-Colicin, Tabelle D.2). Mit Hilfe der Schnittstellen *ClaI* und *HindIII* wurde der Vektor pMO1 [33] (Tabelle D.2) mit einem Ampicillin resistenten Vektorgerüst aus pBad24-GFP (NCBI X81837) [77] und der veränderten Sequenz des Colicin E2 Operons aus pEX-K-Colicin (Tabelle D.2) kloniert. Die Fluoreszenzproteine mVenus (aus pKES258, Tabelle D.2 mit Primern Tabelle D.3) und mCerulean (aus pKHB1 Tabelle D.2 mit Primern Tabelle D.3) wurden durch PCR vervielfältigt und im Anschluss in den Vektor pMO1 (Tabelle D.2) integriert. Der Vektor pMO2 [33] (Tabelle D.2) enthält an Stelle des *cea* Gens im Operon, das mit Hilfe der Schnittstellen *EcoRI* und *SacI* integrierte Fluoreszenzprotein mVenus (ein Derivat des gelb fluoreszierenden YFP Proteins [78]). Im Vektor pMO2 wurde im Anschluss das Lysigen durch das Fluores-

3. Material und Methoden

enzprotein mCerulean, einem Derivat des cyan fluoreszierenden CFP Proteins (Schnittstellen *AgeI* und *BamHI*) ersetzt. Das daraus resultierende Plasmid pMO3 [33] (Tabelle D.2, Abbildung 3.1) stellt ein Doppelreporterplasmid (Vergleich mit pColE2-P9 in der Abbildung 3.2) dar, mit dem gleichzeitig die Expression von *cea* (durch YFP) und die Expression von *cel* (durch CFP) untersucht werden kann. Durch die im Vergleich zum Plasmid pColE2-P9 unveränderten zur Regulation beitragenden Gensequenzen sollten die Regulationsmechanismen des originalen Operons im Plasmid pMO3 unverändert erhalten bleiben.

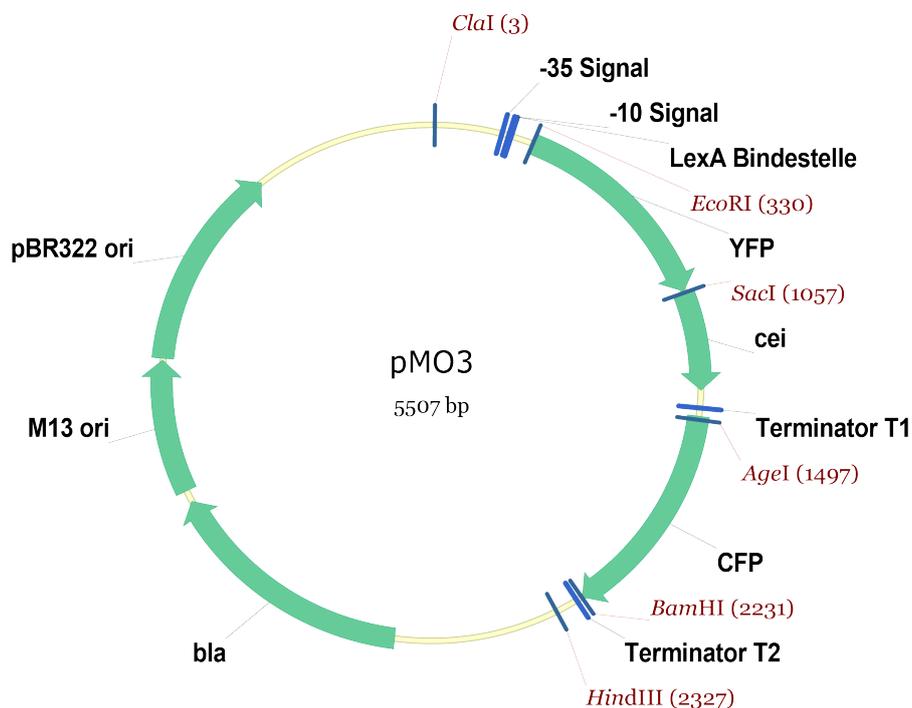


Abbildung 3.1.: Plasmidkarte des Vektors pMO3: In der Karte sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen (*ClaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *SacI*, *AgeI*, *BamHI*), die ORFs für die verwendeten Fluoreszenzproteine CFP und YFP, sowie für das Immunitätsgen des Colicin E2 Operons *cei*, die verbleibenden *ori* aus pBad24-GFP (pBR322, M13), und die Position des Gens für die Ampicillinresistenz (*bla*) gezeigt.

Das Plasmid pMO3 wurde im Anschluss in die Stämme BZB1011E2C [79], der das Colicin E2 produzierende Plasmid pColE2-P9 [37] besitzt und BZB1011 [79], dem das zur Produktion von Colicin nötige Plasmid fehlt, transformiert. Die hieraus entstandenen Stämme wurden mit EMO3-C (Colicin Produzierer) und EMO3-S (kann kein Colicin produzieren) benannt (Tabelle D.4). Das native pColE2-P9 Plasmid im EMO3-C ist in einer mittleren Anzahl von

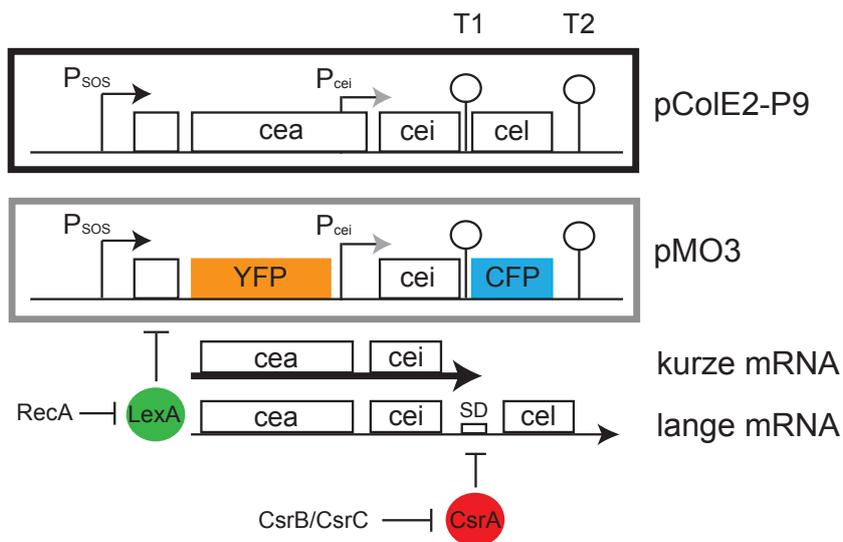


Abbildung 3.2.: Vergleich der Operons auf den Plasmiden pColE2-P9 und pMO3: Darstellung des Colicin E2 Operons auf dem Plasmid pColE2-P9 mit den Genen *cea*, *cei* und *cel* sowie den Promotoren P_{sos} , P_{cei} , den Terminatoren T1 und T2, sowie der Bindestelle für LexA. Des Weiteren sind die zwei verschiedenen mRNA Transskripte, kurze und lange mRNA mit der CsrA Bindestelle in der Shine-Dalgarno Sequenz des *cei* Gens auf der langen mRNA, gezeigt (siehe Kap 2.1). Im Vergleich dazu die veränderte Sequenz des Doppelreporterplasmids pMO3 mit den Genen für die Fluoreszenzproteine *mVenus* und *mCerulean*.

10-20 Plasmiden [32, 37] enthalten, im Vergleich dazu hat das Doppelreporterplasmid, das den *ori* aus dem pBad System enthält, ungefähr 55 Kopien [80, 81] pro Bakterie. Das Gerüst des Vektors pBad24-GFP [77] wurde auf Grund seiner hohen Kopienzahl pro Bakterie, die hohe individuelle Fluoreszenzwerte erwarten lässt und dadurch eine quantitative Auswertung ermöglicht, sowie wegen seiner geringen Fluktuationen in der Kopienzahl zwischen den einzelnen Bakterien, ausgewählt. Bartosik *et al.* [82] konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass pro Chromosom 50 Plasmide von pBad24 Typ gebildet werden. Die Variation in der Anzahl der Kopien des Plasmids pro Bakterie liegen nach Megerle *et al.* [77] unter 7.5 Plasmiden pro Bakterie. Dadurch wird eine Grundheterogenität aus veränderlicher Anzahl an Plasmiden pro Bakterie auf ein Minimum reduziert. Die hohe Anzahl an Plasmiden pro Bakterie ermöglicht eine genaue zeitliche Bestimmung des Startpunktes der Expression, da eine Veränderung in der Regulation sich auf alle Plasmide in einem Bakterium gleichzeitig auswirkt und dadurch verstärkt wird.

Genetische Modifizierungen zur Veränderung der Transkriptionsrate des Colicin E2 Operons

Um den Einfluss der transkriptionellen Regulation zu untersuchen, wurde das Reporterplasmid durch ortsspezifische Punktmutationen innerhalb der Bindestelle für LexA wie in Abbildung 3.3 gezeigt, verändert. Die Veränderungen an der Bindestelle wurden vorgenommen, um eine Verschlechterung bzw. Verbesserung der Bindestärke zu erhalten. Änderungen in der Basensequenz wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Lewis *et al.* [83] zur Bindung von LexA an Bindestellen auf dem Genom von *E.coli* und Mrak *et al.* zur Bindung von LexA an die Bindestelle des ColicinK Operons [84], sowie von Gillor *et al.* [38] zum Bindeverhalten von LexA an sich überlappende Bindestellen verschiedener Colicin Operons erstellt.

Nach Lewis *et al.* [83] kann die Stärke einer LexA Bindestelle durch einen HI Index beschrieben werden, der nach folgender Formel berechnet wird:

$$\text{HI} = \sum_{i=0}^{N=\text{Sequenzlänge}} \ln \left[\frac{n_{\text{consensus}} + 0.5}{n_{\text{aktuell}} + 0.5} \right] \quad (3.1)$$

Der HI Wert beschreibt die gewichtete Abweichung von der optimalen Sequenz, ermittelt aus bekannten Bindestellen. Als Konsensussequenz wurde für jede Base der Bindestelle die Base die in allen Bindestellen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auftritt gewählt. Die Häufigkeit mit der die Base der Konsensussequenz an der jeweiligen Position der Bindestelle steht wird durch $n_{\text{consensus}}$ dargestellt, n_{aktuell} zeigt die Häufigkeit mit der die Base der untersuchten Sequenz sich an dieser Position, aller in Betrachtung gezogenen Bindestellen, befindet. In dieser Arbeit wurden zur Berechnung des HI Indexes 19 bekannte LexA Bindestellen und die Häufigkeiten mit denen jede Base sich an der jeweiligen Position zu befinden zu Grunde gelegt. Nach Lewis *et al.* [83] erhält man daraus eine optimale Bindesequenz zusammengesetzt aus den an jeder Position am häufigsten auftretenden Base (siehe Tabelle 3.1).

Der HI Wert dieser optimalen Sequenz ist 0, sie wird als Konsensussequenz bezeichnet. Je höher ein HI Wert ist, umso weiter ist die Sequenz in seiner Basensequenz von der Konsen-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T	A	C	T	G	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	C	A	G	T	A

Tabelle 3.1.: Konsensus Sequenz für die Bindung von LexA an DNA: Dargestellt ist die Konsensus Sequenz für die Bindung von LexA an DNA nach Lewis *et al.* [83], für jede der 20 Positionen ist die am häufigsten, in den bis dato bekannten LexA Bindestellen auftretende Base dargestellt.

sussequenz entfernt. Damit tritt mit steigendem HI eine Verschlechterung der Bindung von LexA an die jeweilige Bindestelle ein. Im Plasmid pColE2-P9 befindet sich im Colicin Ope-
ron eine sich überlappende doppelte Bindestelle für LexA beginnend 79 Basenpaare vor dem
Startcodon des Toxin Gens. Nach Fernandez de Henestrosa *et al.* [85] hat die erste Binde-
stelle einen größeren Einfluss auf die Regulation als die Zweite. Im folgenden wird deshalb
die Stärke der ersten Bindestelle variiert. Die originale Bindestelle hat nach Gleichung 3.1,
wenn man die Häufigkeitstabelle von Lewis *et al.*[83] verwendet, einen HI Wert von 12.44
für die erste Bindesequenz und 12.97 für die zweite Bindesequenz. Diese Werte liegen relativ
nahe bzw. knapp über dem Grenzwert von 12.6, ab dem nur noch eine sehr schlechte Bindung
möglich sein sollte [84]. Ab einem HI Wert von 15 sollte die Bindung komplett verloren ge-
hen [84]. Durch Arbeiten von Mrak *et al.* [84] und Wertmann *et al.*[86] wurde gezeigt, dass
Veränderungen, in den innerhalb der verschiedenen Bindestellen am stärksten konservierten
Basen, den größten Effekt hervorrufen. Deshalb wurden die Mutationen um eine stärkere Bin-
dung von LexA zu erzielen (Abb. 3.3, pMO4 Tabelle D.4) und um die Bindestelle für LexA zu
verschlechtern (Abb. 3.3, pMO5 Tabelle D.4) am Beginn der Bindesequenz im TACTG Motiv
eingeführt, da diese Sequenz am stärksten konserviert ist und somit der größte Effekt auf den
HI Wert und damit auf die mögliche LexA Bindung zu erwarten ist. In der ersten Bindestelle
des Plasmids pMO4 wurde an den ersten beiden Basen TA zu AT verändert (siehe Abbildung
3.3) wodurch eine Verschiebung des HI Wertes nach 8.6 erreicht werden konnte. Somit soll-
te es insgesamt zu einer Verbesserung der Bindung von LexA an die Bindestelle kommen.
Dadurch sollte das Plasmid weniger häufig abgelesen werden, was zu einer reduzierten Tran-
skriptionsrate führen würde. Im Plasmid pMO5 wurde das erste CTG Motiv (Position 3-5)
der ersten LexA Bindestelle zu CCC verändert, was zu einer Verschlechterung des HI auf
21.13 führt. Diese Mutante sollte demnach eine schwächere Affinität für LexA aufweisen,

3. Material und Methoden

bzw. LexA nach der gezeigten Definition des HI Wertes an der ersten Bindestelle nicht mehr binden können.

Mutante	Sequenz	erwartete LexA Bindungsstärke
pMO3	5'-TTGATCTGTACATAAAACAGTGGTTTTATGTACAGTATTAA-3' 3'-AACTAGACATGTATTTTGGTCACCAAATACATGTCATAATT-5' 1. Bindestelle: CTGTACATAAAACAGT 2. Bindestelle: CACCAAATACATGTC	stark
pMO4	5'-TTGATGCTGTACATAAAACAGTGGTTTTATGTACAGTATTAA-3' 3'-AACATGACATGTATTTTGGTCACCAAATACATGTCATAATT-5' 1. Bindestelle: GCTGTACATAAAACAGT 2. Bindestelle: CACCAAATACATGTC	mehr als pMO3
pMO5	5'-TTGATCCCTACATAAAACAGTGGTTTTATGTACAGTATTAA-3' 3'-AACTAGGGATGTATTTTGGTCACCAAATACATGTCATAATT-5' 1. Bindestelle: CCTACATAAAACAGT 2. Bindestelle: CACCAAATACATGTC	weniger als pMO3
pMO::LexA Bind.	5'-TTGGGTACCA-----TTAA-3' 3'-AACCCATGGT-----AATT-5'	keine

Abbildung 3.3.: Veränderungen der LexA Bindestelle: Mutationen in der Sequenz der LexA Bindestelle im Vergleich zwischen nativem System (pMO3), den beiden schwächeren (pMO5) bzw. stärkeren (pMO4) Bindestellen und der Mutante in der die Bindestelle komplett deletiert wurde (pMO3 Δ LexA). Die in rot dargestellten Basen sind nach Lewis *et al.* [83] für nahezu alle LexA Bindestellen konserviert. Deswegen sollte eine Veränderung dieser Basen (grüne Buchstaben) eine große Veränderung in der Bindestärke des LexA zur Folge haben.

Nach Walter *et al.* [87] ist eine Deletion von LexA für *E.coli* letal, wenn nicht mindestens noch das Gen *SulA* deletiert wird. Die Deletion von LexA würde sonst zu einer Verhinderung der Zellteilung durch SulA führen, da die Expression von SulA nicht mehr durch LexA reprimiert werden könnte [87]. Eine Deletion von LexA würde sich zudem auf die Expression von vielen weiteren Genen, in deren Regulation es involviert ist auswirken [88] und es somit sehr schwierig machen, Beobachtungen den Veränderungen in der Expression des Colicin E2 Operons zuzuordnen. Daher wurden zur Beobachtung der Veränderungen sämtliche Mutationen am Colicin E2 Operon selbst durchgeführt, um alle anderen Regulationspartner möglichst unbeeinflusst zu lassen und einen Vergleich verschiedener Mutationen der LexA Bindestelle zu ermöglichen.

Um die transkriptionelle von der post-transkriptionellen Regulation zu entkoppeln, wurde die Bindestelle von LexA komplett entfernt (EMO3-S Δ LexA, Abbildung 3.3, Tabelle D.4), dies

führt wie in Abbildung 3.4, im Vergleich zum Stamm EMO3-S (Teil A) zu sehen ist zu konstitutiver Expression des Operons, in allen Bakterien. Dargestellt ist die Expression von YFP ohne äußeren Stress, dabei zeigt sich von Beginn an für alle Bakterien eine Fluoreszenzintensität von im Mittel 1000 FE für den Stamm EMO3-S Δ LexA (Teil B) im Vergleich zu einer Fluoreszenzintensität von im Mittel 30 FE (Abbildung 3.4 Teil A). Da für die Mutante EMO3-S Δ LexA bereits alle Zellen YFP stark exprimieren geht in diesem Fall die Heterogenität des Anschaltens der YFP Expression verloren.

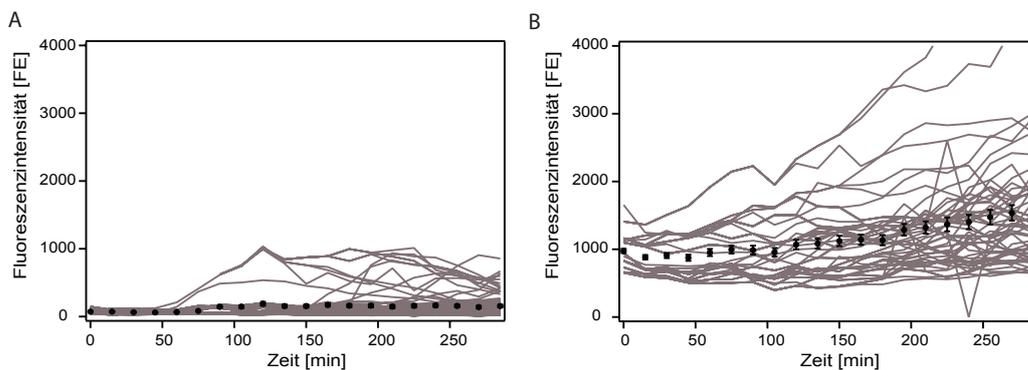


Abbildung 3.4.: Konstitutive Expression des Toxins (*cea*) in der Mutante EMO3-S Δ LexA im Vergleich zu EMO3-S: In beiden Teilen sind Zeitverläufe der YFP Fluoreszenz einzelner Zellen ohne äußeren Stress, als graue Linien dargestellt, schwarze Kreise stellen den Mittelwert zu jedem Zeitpunkt dar. Teil A zeigt den Verlauf für den Stamm EMO3-S. Wird der Einfluss der SOS Antwort durch die Deletion der LexA Bindestelle verhindert so zeigt sich, wie in Teil B für den Stamm EMO3-S Δ LexA dargestellt, eine konstitutive Expression aller Bakterien von Beginn an die sich im Verlauf der Zeit leicht erhöht.

Von Kamensek *et al.* wurde zudem ein Einfluss des AsnC Proteins [89], eines Regulators der Asparaginsynthetase [90], auf die transkriptionelle Regulation und damit auf das Einsetzen der YFP Expression beschrieben. In ihrer Arbeit wurde gezeigt, dass der Startpunkt der Expression des Operons für einige DNA verändernde Colicine (wie Colicin E8 und Colicin E2 [32]) in Abwesenheit von AsnC früher eintritt. Für Colicin E2 wurde neben dem Einfluss des AsnC Proteins eine Beeinflussbarkeit des AsnC mittels Zugabe von L-Asparagin gezeigt [89]. Alle Plasmide wurden für die Messungen in den Stamm BZB1011 transformiert, der kein Colicin und Lysisprotein produzieren kann (EMO4-S, EMO5-S, EMO3-S Δ LexA, Tabelle D.4). Dieser Stamm wurde gewählt da im Stamm BZB1011E2-C durch die Produktion des Toxins und Lysisproteins und des damit einhergehenden Zelltodes bei äußerem Stress eine Messung

über längere Zeit nicht möglich wäre.

Genetische Veränderungen zur Modifikation der Translationsrate des Lysisgens

Um neben der transkriptionellen auch die post-transkriptionelle Regulation untersuchen zu können wurden von Alexandra Götz¹ im Rahmen ihrer Masterarbeit verschiedene Mutanten erstellt. Eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Regulation des Colicin E2 Operons spielt das mRNA-Bindeprotein CsrA. Dieses Protein ist für die *E.coli* Zellen nach Timmermans *et al.* [91] ein konstitutionell essentielles Protein, nach dessen Deletion nur noch ein Wachstum auf Medien die Brenztraubensäure (Pyrovat) enthalten möglich ist. Um weiterhin mit M63 Medium (siehe Anhang A) arbeiten zu können und daher vergleichbare Resultate zu erhalten und auf Grund des schlechten Wachstums der Bakterien auf Brenztraubensäure, das zu einen erhöhten Stress und damit zu einer Beeinflussung der Messergebnisse führen würde, wurde für die Untersuchung der Einflüsse der CsrA Bindung auf die Regulation des Colicin E2 Operons ein anderer Ansatz gewählt. Zur Analyse der Bindungsstärke wurde nicht das Protein in der Bakterie, das zudem in viele weitere Prozesse involviert ist [16] eliminiert, sondern die Bindestelle auf dem Reporterplasmid verändert. Ein weiterer Vorteil dieser Herangehensweise ist es, dass die anderen Prozesse auf die das CsrA Protein zum Beispiel als Zuckerhaushaltsregulator im Bakterium einen Einfluss ausübt [16] nicht beeinflusst werden. Daher kann es auch nicht zu Interferenzen der gemessenen Veränderungen kommen. Die aus dem Colicin E2 Operon gebildete mRNA, weist im Bereich des Terminators T1, der sich vor dem 5'-Ende des *cel* Gens befindet (siehe auch Kapitel 2.1 und Abbildung 2.2), zwei Bindestellen für das mRNA-Bindeprotein CsrA [33] auf. Die Voraussage der Sekundärstruktur [92] eines 89 bp langen Abschnittes der mRNA Sequenz ist in Abbildung 3.5 Teil A, die auch in Teil B die eingeführten Veränderungen erläutert, gezeigt.

¹Transkriptionelle Regulation des Colicin E2 Operons durch CsrA, Alexandra Götz, München 2015

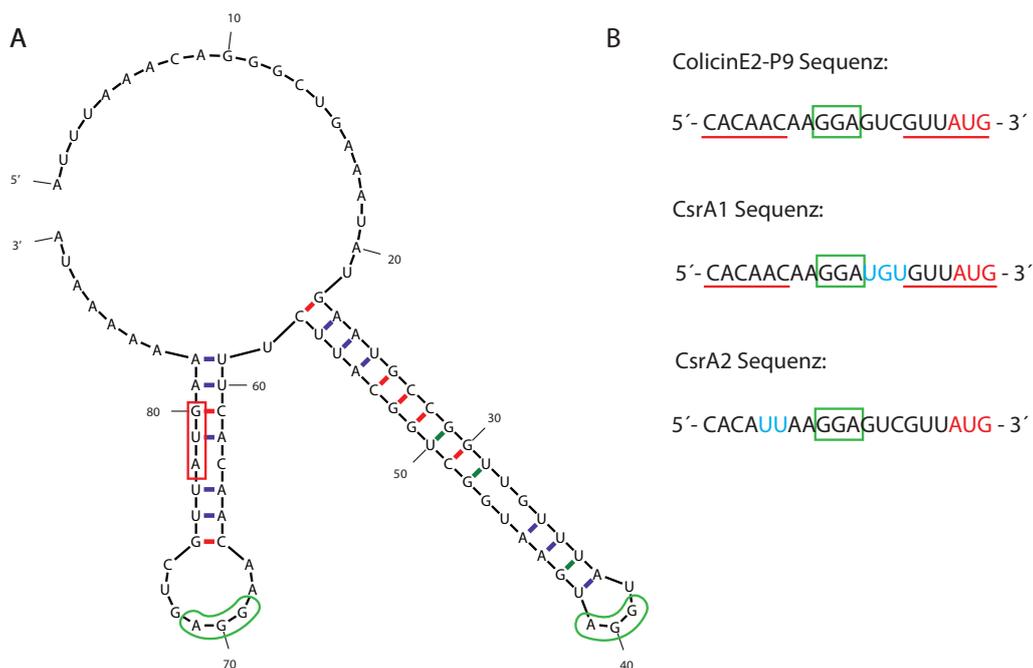


Abbildung 3.5.: Sekundärstruktur der mRNA in der Umgebung der CsrA Bindestellen und Veränderungen in der Sequenz: A: Mit der Freeware mFold [92] vorhergesagte Sekundärstruktur der mRNA im Bereich der beiden CsrA Bindestellen (zentrales GGA Motiv grün umrandet). Das Startcodon des Lysisproteins AUG ist rot umrandet. Es zeigt sich die prominente Stellung der beiden Bindestellen am Ende der mRNA Haarnadelstrukturen, was nach [40, 47, 68] die Bindung des CsrA an die RNA beeinflusst. B: Die Veränderungen in der Sequenz im Vergleich zum Original (Colicin E2) sind in blauer Schrift, das Startcodon des Lysisproteins in roter Schrift, das zentrale GGA Motiv in der Bindestelle in einem grünem Kasten, sowie die Teile, die sich zu einer Schleife verbinden mit einem roten Strich unter der Sequenz dargestellt. Durch die Veränderung ist für die mRNA des Plasmides mit der Mutation CsrA2 die Ausbildung der Haarnadelstruktur in der mRNA Sekundärstruktur nicht mehr möglich.

Das zentrale GGA Motiv der Bindestellen des CsrA (grün umrandet in Abbildung 3.5) an die mRNA, hat neben der Sekundärstruktur der mRNA einen großen Einfluss auf die Bindung des CsrA Proteins [40, 47, 68]. Die Veränderung im Bereich der Bindestelle in der Nähe des Startcodons des *cel* Gens (roter Rahmen in Abbildung 3.5) von einem 5'-ACAAGGA-3' zu einem 5'-UUAGGA-3', führt nach Hol *et al.* [40] auf Grund der sich nicht mehr ausbildenden Sekundärstruktur (fehlender roter Strich in Abbildung 3.5 Teil B) zu einer starken Veränderung der Bindestärke (Abschwächung). Diese Mutation wurde durch gezielte Punktmutation mit den Primern pMO6 sense und pMO6 antisense (siehe Tabelle D.3) mit Hilfe des Quick-

ChangeII Kits (Agilent Genomics, Waldbronn) erstellt. Eine weitere Mutation wurde mit dem Ziel erstellt, die optimale Bindestelle für CsrA an die mRNA zu imitieren [93]. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Primer pMO7sense und pMO7antisense (siehe Tabelle D.3) die Sequenz von 5'-GGAGUC-3' zu 5'-GGAUGU-3' verändert. Die Mutation, die eine stärkere Bindung von CsrA zur Folge haben sollte, wird im folgenden als CsrA1 Mutation (Plasmid pMO7, Tabelle D.2) bezeichnet. Die Mutante, die das Plasmid (pMO6, Tabelle D.2) mit der schwächeren Affinität für CsrA enthält, wird als CsrA2 bezeichnet.

Eliminierung der sRNAs CsrB und CsrC

Um die weiterführende post-transkriptionelle Regulation des Operons zu verstehen, wurde der Einfluss der beiden sRNAs CsrB und CsrC auf das Gesamtsystem untersucht. Die beiden sRNAs CsrB und CsrC des Csr Systems in *E. coli* zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus CsrA Moleküle zu binden [49, 50] und damit die Menge an freiem CsrA, das an die freie lange mRNA binden kann zu reduzieren, aus. Mit Hilfe des pRED/ET Systems (Kit Nr.6, GeneBridges, Heidelberg) wurde das jeweilige Gen der sRNA (CsrB, CsrC oder beide sRNAs) im Leserahmen durch eine Antibiotikaresistenz ersetzt. Zu diesem Zweck wurden PCR Produkte generiert, die Sequenzen, homolog zu Stellen direkt vor bzw. nach dem Gen das gelöscht werden soll aufweisen und diese im Anschluss durch die RedET Rekombinase in das Genom des *E. coli* Stammes eingebaut [94, 95]. Mit den Primern CsrB sense und CsrB antisense (siehe Tabelle D.3) wurde die sRNA CsrB (369nt lang [49]) durch eine Kanamycin Resistenz ersetzt. Dieser Stamm wird nach der Transformation des Reporterplasmids pMO3, EMO3-S Δ CsrB genannt. Als weitere sRNA wurde auch CsrC (245nt lang [50]), mit den Primern CsrC sense und CsrC antisense aus Tabelle D.3) durch eine Kanamycin Resistenz ersetzt. Durch Transformation des Reporterplasmids entsteht der Stamm EMO3-S Δ CsrC (siehe Tabelle D.4). Der Stamm mit der Deletion von CsrC wurde als Template für die Erstellung einer Doppeldeletion der beiden sRNAs CsrC und CsrB verwendet. Hierzu wurde ein PCR Produkt, mit Homologiearmen für CsrB, aus den Primern CsrB sense und CsrB antisense (siehe Tabelle D.3) und

einem Gen das die Resistenz gegen Chloramphenicol codiert, verwendet. In den daraus resultierenden Stamm wurde ebenfalls das Reporterplasmid pMO3 transformiert (EMO3-S Δ B/C, siehe Tabelle D.4).

3.2. Sequenzierung des Colicin E2-P9 Plasmids

Die Sequenz des Plasmides pColE2-P9 dessen Colicin E2 Operon ursprünglich von Cole *et al.* [37] charakterisiert wurde, war nur in Teilen bekannt. Cole *et al.* [37] veröffentlichten 1985 einen 2640 bp umfassenden Teil der Sequenz des Plasmides pColE2-P9, der das Colicin E2 Operon enthält (NCBI M29885). In dieser Arbeit werden die Bestandteile des Operons, drei offene Leseraster (ORFs), eine SOS Box (LexA Bindestelle), zwei Terminatoren (T1 und T2) und den -10 , sowie -35 Signalen für den Promotor des Operons dargestellt. Ein weiterer Teil wurde 1989 von Yasueda *et al.* veröffentlicht [96]. Dieser, 2363 bp (NCBI D30054) umfassende Teil beschreibt Proteine, die für die eigenständige Replikation nötig sind [96]. Die 1754 bp fehlenden Basenpaare wurden zusammen mit den bereits bekannten Teilen mit Hilfe von Sequenzierprimern (siehe Tabelle D.1) sequenziert (MWG Eurofins, Ebersberg, Germany). Die ermittelten Sequenzen sind mit den von Cole *et al.* [37] und Yasueda *et al.* [96] veröffentlichten Teilen identisch. Die aus der Gesamtsequenz erstellte Vektorkarte (siehe Abbildung 3.6) enthält die drei ORFs des Operons, das *cea* Gen für die Bildung des Toxins, das *cei* Gen, das die Immunität gegen das selbst gebildete Toxin vermittelt und das *cel* Gen zur Freisetzung des Toxins durch Zelllyse.

Der Replikationsursprung ColE2 *ori* führt zusammen mit dem Replikationsprotein (Rep), das von der antisense RNA *incA* reguliert wird [97], zu einer autonomen Replikation des Plasmides, bei der die Anzahl der Kopien des Plasmides in der Zelle durch das Zusammenspiel von *incA* und Rep reguliert ist [97]. Durch die Region für den Start der Einzelstrangsynthese (*ssiE2*)[96] könnte es im Rahmen der RCR Replikation (Rolling Circle Replication)[98] auch zur Akkumulation einzelsträngiger DNA (ssDNA) [99] kommen. Ein Vergleich der Sequenz von

3. Material und Methoden

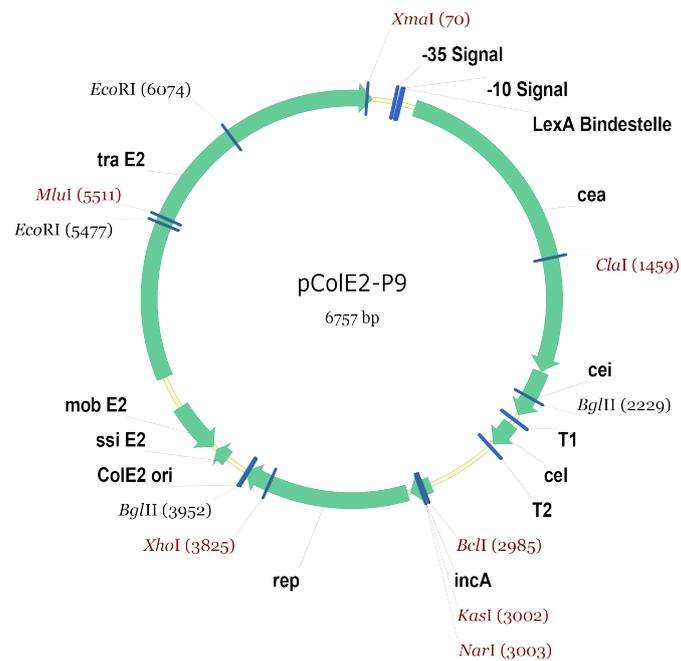


Abbildung 3.6.: Plasmidkarte des Vektors pColE2-P9: In der Karte sind die Bestandteile des Colicin E2 Operons (*cea*, *cei*, *cel*, LexA Bindestelle, Terminatoren T1 und T2, sowie das -10 und -35 Signal des Promotors) dargestellt. Außerdem werden die weiteren, für die autonome Replikation wichtigen Teile (*rep*, ColE2 ori) und die regulatorische Sequenz (*ssi E2*), das Mobilisierungsprotein (*mob E2*) und der offene Leseraster eines Proteins, das im Prozess des horizontalen Gentransfers (*tra E2*) beteiligt ist, gezeigt.

pColE2-P9 mit einer Nukleotiddatenbank (Genbank, NCBI) ergibt noch zwei weitere offene Leseraster, da diese zu mehr als 97% homolog zu den Genen auf dem Plasmid pColE3-CA38 (NCBI KM287568) [99] sind, werden die Gene in Anlehnung an dieses Plasmid, als *mob E2* (Protein für die Mobilität) und *tra E2* (Protein beteiligt am horizontalen Gentransfer) benannt.

3.3. Durchführung der Experimente

Fluoreszenzmikroskopie

Um die Dynamiken der Expression der Fluoreszenzproteine YFP und CFP, die stellvertretend für die Expression des Toxins Colicin E2 (*cea*) und des Gens des Lysisproteins (*cel*) stehen (siehe Kapitel 3.1) quantifizieren zu können, ist es notwendig den zeitlichen Verlauf der Expression dieser Fluoreszenzproteine in einer Bakterie zu untersuchen. Eine Möglichkeit hierzu stellt die zeitaufgelöste Aufnahme der Entwicklung der Fluoreszenzintensität in Einzelzellen dar. Dazu wurde ein Axiovert 200M (Carl Zeiss, Deutschland) mit einer Andor Kamera, einer Temperaturkammer, die eine konstante Proben temperatur von 37 °C über einen langen Zeitraum ermöglicht und einem Zeiss EC Plan-Neofluar 100x/1.3 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Für die Detektion der gelben (YFP) Fluoreszenz wurde neben einem Strahlteiler BS520 und einem Anregungsbandpassfilter HC500/24, ein Emissionsbandpass HC542/27 verwendet. Zur Aufnahme der blauen Fluoreszenz (CFP) wurde ein Strahlteiler BS458, ein Anregungsbandpass HC438/24 und ein Emissionsbandpass HC483/32 genutzt. Durch Mutanten deren Plasmide zum Einen nur YFP (pKES258, Tabelle D.2) und zum Anderen nur CFP (pKHB1, Tabelle D.2) enthalten, wurde bestätigt, dass es zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen unter Verwendung der genannten Filtersätze kein Übersprechen zwischen den beiden Kanälen gibt. Um tagesabhängige Schwankungen der Fluoreszenzlampe und dadurch eintretende Veränderungen in den Fluoreszenzwerten zu minimieren, wurde an jedem Messtag die Intensität der Fluoreszenzlampe mit Hilfe homogener fluoreszierender Kugeln (FocalCheck fluorescence microscopy test slide # 3, Invitrogen, USA) kalibriert. Durch dieses Verfahren ist es zudem möglich verschiedene Fluoreszenzlampen zu verwenden und die Ergebnisse durch die Korrektur mit Hilfe der Fluoreszenzkugeln miteinander zu vergleichen.

Für eine quantitative Einzelzellanalyse über einen längeren Zeitraum ist es notwendig die Bakterien zu fixieren. Für die Messungen werden dazu Ibidi μ -slides VI^{0.4} (Ibidi GmbH, Mün-

3. Material und Methoden

chen) die mindestens zwei Stunden mit 50 µl Poly-L-Lysine (Biochrome, Berlin) beschichtet wurden, verwendet. Im Anschluß wurden die Kanäle der Objektträger dreimal mit Wasser und zweimal mit M63-Medium (siehe Anhang A) gespült. Die Bakterien wurden, wie im Abschnitt Wachstumsbedingungen beschrieben angezogen, wenn notwendig wurde die Kultur vor dem Transfer in die Kanäle des Objektträgers nochmals verdünnt um eine optimale Zelldichte für eine Einzelzellanalyse zu erhalten. In jedem Kanal wurden 50 µl der verdünnten Bakteriensuspension für 7.5 min bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung nicht adhärenter Bakterien, wird im Anschluss der Kanal vier mal mit M63-Medium gespült.

Zur Aufnahme von Zeitserien wurde das kostenfreie Programm Micromanager (Version 1.3) [100] verwendet. Nach Aufnahme des ersten Bildes einer Serie wurde der Kanal, falls für das Experiment erforderlich, mit M63-Medium, das Mitomycin C in der gewünschten Konzentration enthält, gespült. In der Folge wurde jeweils nach 15 min ein Hellfeld, YFP und CFP Bild aufgenommen.

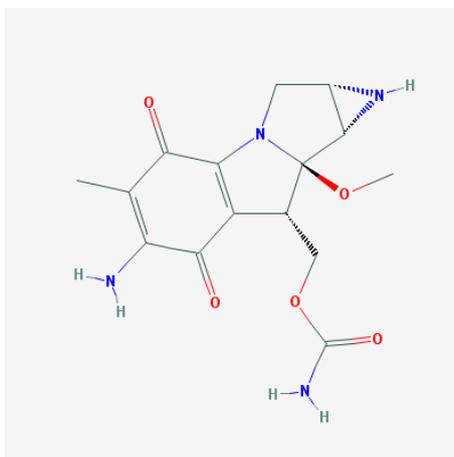


Abbildung 3.7.: Struktur des Antibiotikums Mitomycin C: Es ist die chemische Strukturformel des Antibiotikums Mitomycin C ($C_{15}H_{18}N_4O_5$) das in den Versuchen als Stressor für die Bakterien eingesetzt wird dargestellt (National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5746, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5746> (abgerufen am 26.04.2016)).

Das als Stressor eingesetzte Antibiotikum Mitomycin C ($C_{15}H_{18}N_4O_5$) vernetzt mit hoher Effektivität die DNA des Bakteriums [101, 102] und führt daher zur Aktivierung des SOS Systems in *E.coli* [52, 103]. Die Stärke der Antwort des SOS Systems hängt von der eingesetzten

Konzentration des Mitomycin C ab [102]. Der Vorteil des in Abbildung 3.7 dargestellten, chemischen Stressors Mitomycin C, im Vergleich zu anderen in der Literatur verwendeten Umwelteinflüssen die Stress auf die Bakterien ausüben (wie z.B. UV-Licht) [104], liegt in der bessern Dosierbarkeit des Stresses und der geringeren Tagesschwankungen der verschiedenen angelegten Stresslevels.

Wachstumsbedingungen

Die Bakterien wurden über Nacht in M63-Minimalmedium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (siehe Tabellen D.4 und D.2) bei 37 °C angezogen. Die Übernachtskultur wurde auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0.05 verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0.2, was dem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase entspricht, angezogen. Aus dieser Tagkultur wurden 50 μ l für die Messungen, wie im Abschnitt Fluoreszenzmikroskopie beschrieben verwendet. Um den Einfluss, des zur Simulation von Stress eingesetzten Antibiotikas zu untersuchen, wurden Messungen in einem Mikrotiterplatten Messgerät und einem optischen Filter von 600 nm durchgeführt. Analog zur Messung auf dem Mikroskop wurden eine Tagkultur bis OD 0.2 angezogen und im Anschluss die 48 Töpfchen der Mikrotiterplatte (Nunc 48 well untreated) mit 500 μ l Kultur des jeweiligen Stammes befüllt. In Abbildung 3.8 sind die Wachstumskurven (Veränderung der optischen Dichte OD_{600}), für unterschiedliche Stämme (siehe Tabelle D.4) und unterschiedliche Mitomycin C Konzentrationen gezeigt.

Es zeigt sich, dass die Mitomycin C Konzentration das Wachstum der Bakterien beeinflusst. Je höher die Konzentration, des die DNA schädigenden Antibiotikas [101], Mitomycin C im Medium ist, desto größer sind die Schwankungen in der gemessenen optischen Dichte (siehe Abbildung 3.8). Grundsätzlich ist für die verwendeten Konzentrationen der Einfluss auf das Wachstum der Bakterienkultur als klein anzusehen. Zusätzlich zeigt sich auf den Mikroskopiebildern (Abbildung 3.9), dass sich das Mitomycin C, wie auch von Suzuki *et al.* [105] für

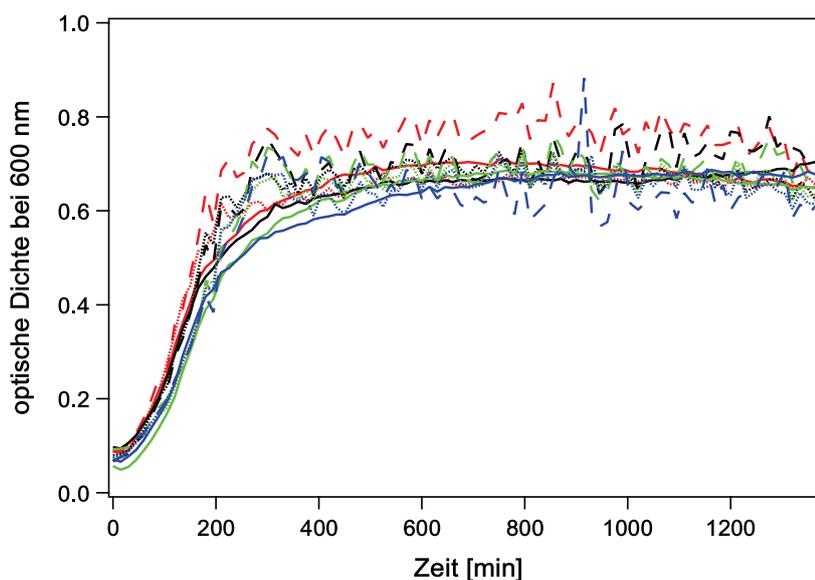


Abbildung 3.8.: Wachstum in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der optischen Dichte für verschiedene Stämme mit ansteigenden Mitomycin C Konzentrationen. Unterschiedliche Stämme sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, EMO3-S in rot, EMO3- Δ CsrB in schwarz, EMO3- Δ CsrC in grün und EMO3- Δ CsrB/C in blau. Durchgezogene Linien kennzeichnen den uninduzierten Fall (0.00 μ g/ml Mitomycin C), gepunktete Linien eine Konzentration von 0.05 μ g/ml Mitomycin C und gestrichelte Linien eine Konzentration von 0.25 μ g/ml Mitomycin C.

E. coli B, beobachtet auf die Länge der einzelnen Zelle auswirken kann. Die Zugabe von Mitomycin C führt zu stark verlängerten Zellen, die sich bis zum Ende der Messung hin (nach fünf Stunden) teilweise über den ganzen aufgenommenen Bildausschnitt erstrecken. Dieser Effekt ist in Abbildung 3.9 exemplarisch für Bakterien nach Zugabe von 0.70 μ g/ml Mitomycin C, der höchsten in den Versuchen verwendeten Konzentration, dargestellt. Nach Suzuki *et al.* [106] wirken sich Konzentrationen von bis zu 0.1 μ g/ml bakteriostatisch und ab 5 μ g/ml bakteriolytisch aus. Demnach befinden wir uns mit den eingesetzten Mitomycin C Konzentrationen am oberen Ende des bakteriostatischen Bereichs. Somit kann die auftretende Lyse der Bakterien kein Mitomycin C Effekt sein sondern entsteht durch die aktivierte Produktion des Lysisproteins des Colicin E2 Operons (siehe Kapitel 2.1).

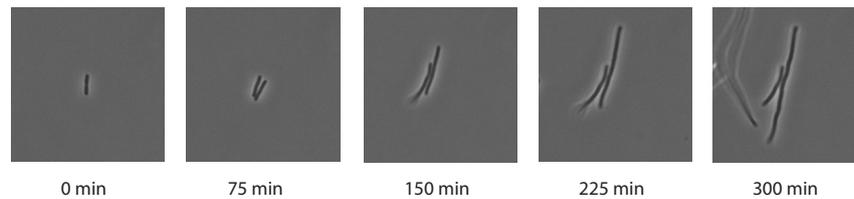


Abbildung 3.9.: Einfluss von Mitomycin C auf die Zelllänge: Verschiedene ausgewählte Zeitpunkte einer Messung des Stammes EMO3-S mit der höchsten eingesetzten Mitomycin C Konzentration von $0.70 \mu\text{g/ml}$ zur Veranschaulichung des Einflusses von Mitomycin C.

Maturationszeiten der Fluoreszenzproteine

Da mit dem Doppelreporterplasmid in einer Bakterie parallel die Fluoreszenz sowohl für YFP als auch für CFP ausgelesen werden soll, ist es notwendig, die Maturationszeiten der Proteine in den jeweiligen Stämmen zu untersuchen. Von Heibisch *et al.* wurde 2013 gezeigt, dass die Maturation von Proteinen von dem jeweils verwendeten Stamm und Plasmid sowie deren Kombination abhängt. Daher wurden die Maturationszeiten der Proteine in pMO3 im Stamm EMO3-C mit vergleichbaren Messbedingungen (zeitaufgelöste Einzelzellmikroskopie) zur Bestimmung der Kinetiken von *cea* und *cel* (gemessen durch die Fluoreszenzwerte von YFP bzw. CFP) nach der Methode von [77, 107] bestimmt. Hierzu wurden je nach Stressorkonzentration ($0.10 \mu\text{g/ml}$ oder $0.40 \mu\text{g/ml}$) nach 60 min bzw. 45 min zur Inhibition einer weiteren Translation von mRNA, das das Ribosom hemmende Antibiotikum Chloramphenicol ($200 \mu\text{g/ml}$) zugegeben und der weitere Anstieg der Fluoreszenz, resultierend aus der Faltung bereits vorhandener Proteine [77, 107], durch die Aufnahme von Bildern alle 3 min für 30 min, bestimmt. An die Fluoreszenzkurven wurde mit IgorPro (Version 6.22) eine Exponentialfunktion angefüttet (3.2).

$$y = \exp\left(-\frac{1}{\tau} * x\right) \quad (3.2)$$

Um einen Einfluss der Konzentration des Stressors auszuschließen wurden verschiedene Mito-

3. Material und Methoden

mycin C Konzentrationen verwendet, diese ergaben keinen signifikanten Unterschied in den Maturationszeiten. Die Maturationzeiten von YFP als auch von CFP lagen unterhalb von 12 min und waren im Rahmen der Messungenauigkeiten gleich. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten die, *in vitro* gemessen für mVenus (YFP) 7.0 min [108] und für mCerulean (CFP) 3.1 min [109] bestimmen. Die Abweichungen zu den Literaturwerten lassen sich durch die unterschiedlichen Messbedingungen *in vitro* und *in vivo* erklären. Die bestimmten Maturationszeiten liegen damit unterhalb der Auflösungsgrenze der Messungen von 15 min und werden auf Grund der Tatsache das für beide Fluoreszenzproteine der gleiche Wert gemessen wird in der Bestimmung der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea*, dargestellt durch YFP und der Expression von *cel*, dargestellt durch CFP, nicht berücksichtigt.

3.4. Quantitative Analyse

3.4.1. Bildanalyse der Zeitserien

Die einzelnen Bilder der Messungen wurden mit Hilfe eines Makros der Software ImageJ zu Zeitserien zusammengesetzt. Es wurden nur im Hellfeld eindeutig identifizierbare, nicht im Teilungsprozess befindliche Zellen mit in die Auswertung übernommen. Für die verschiedenen Kanäle, Hellfeld, YFP und CFP wurde jeweils eine eigene Zeitserie erzeugt. In den Hellfeld Zeitserien wurden Einzelzellen mit Hilfe der ImageJ Erweiterung Cell Evaluator [110] über die Zeit verfolgt und markiert. In den zugehörigen Fluoreszenzkanälen wurde dann die mittlere Fluoreszenz pro Fläche der markierten Bereiche bestimmt (siehe hierzu Abbildung 3.10). Daraus wurden Einzelzellzeitserien extrahiert, die die jeweiligen Fluoreszenzwerte für YFP und CFP beinhalten. Diese Daten wurden mit IgorPRO (Version 6.22) weiterverarbeitet.

Während der Aufnahme der Bilder werden die einzelnen Farbstoffmoleküle mehrfach be-

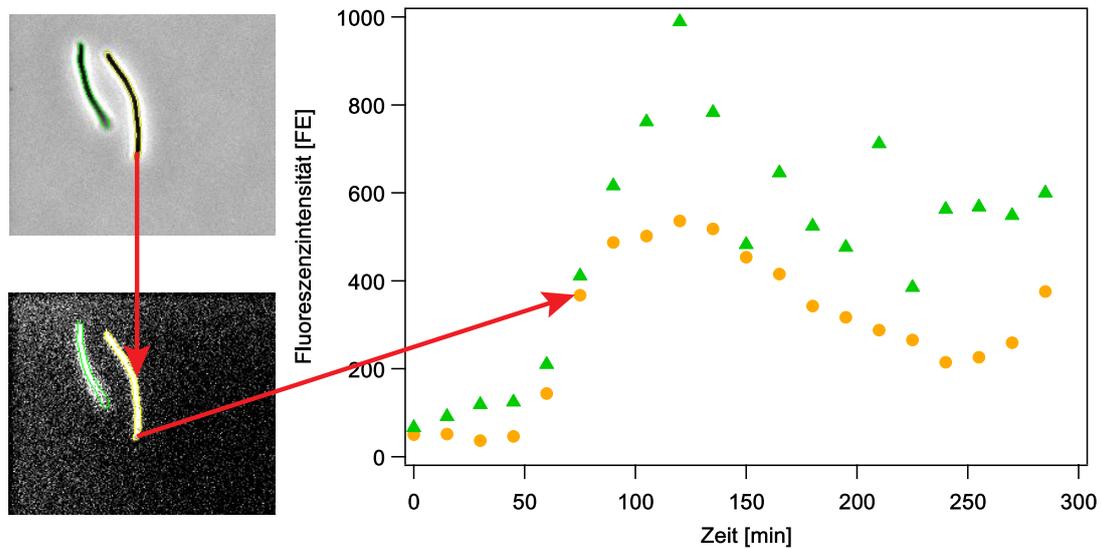


Abbildung 3.10.: Darstellung der Auswertung der Zeitserien: Exemplarisch sind zwei Zellen im Hellfeld und im YFP Kanal dargestellt. Im Hellfeld werden die Zellen identifiziert und markiert. Diese Markierung wird im Anschluss verwendet, um die Fluoreszenzwerte aus den jeweiligen Fluoreszenzbildern auszulesen. Diese bilden dann die Grundlage für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Entwicklung der Fluoreszenzintensität in den Einzelzellen.

leuchtet und damit gebleicht. Um ein Bleichen der Farbstoffe während der Hellfeldaufnahmen zu verhindern wurde ein oranges Farbglas, das alle Wellenlängen unterhalb von 570 nm abschneidet, verwendet. Dies führt dazu, dass weder YFP noch CFP in den Hellfeldaufnahmen angeregt und damit auch nicht gebleicht werden. Die Anregungswellenlängen für YFP liegen oberhalb der Emmissionswellenlänge von CFP und können somit nicht zum Bleichen von CFP beitragen. Das vom Bleichen stärker betroffene Protein ist YFP, da es von den Anregungswellenlängen des CFP, die im nahen UV Bereich liegen (siehe Filter in Kapitel 3.3), gebleicht wird. Da für die Aufnahmen eine kurze Belichtungszeit von 25 ms verwendet wurde und nur 20 Aufnahmen pro Zeitserie angefertigt werden, ist der Fehler, der sich durch die Berechnung einer Bleichkorrektur ergeben würde, größer als der Fehler, der durch die Vernachlässigung des Bleichens entsteht. Als Bleichkorrektur wäre ein Verfahren wie in den zusätzlichen Informationen zu der Arbeit von Ajo-Franklin *et al.* [111] für Eukaryoten beschrieben denkbar. Die Autoren beschreiben eine diskrete Herangehensweise, in der die Anteile der gebleichten Proteine mit dem Anteil der noch nicht gebleichten Proteine addiert wird.

Diese Summe wird dann für jedes Bild neu gebildet und damit der Tatsache Rechnung getragen, dass es Anteile gibt die schon mehrmals, einmal oder noch nie beleuchtet (gebleicht) wurden. Auf Grund der zusätzlichen Unsicherheiten und Schwankungen die durch die Berechnung der Bleichkorrektur entstehen würden, wurde in dieser Arbeit auf den Einsatz einer Bleichkorrektur verzichtet.

3.4.2. Schwellwertdefinition

In der vorliegenden Arbeit spielen vor allen quantitative Fragestellungen eine Rolle. Es wird hierbei analysiert wie viel Fluoreszenzprotein (Menge in FE), zu welcher Zeit t in der Zelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit (Rate r) gebildet wird. Für diese Fragestellungen ist eine genaue quantitative Analyse notwendig, bei der es insbesondere für die Untersuchung der Anschaltzeitpunkte (t_{ON} der Expression von YFP und CFP), notwendig ist sich über die Definition eines Schwellwertes, für die gemessenen Fluoreszenzwerte Gedanken zu machen. Generell setzt sich jeder Messwert aus der Autofluoreszenz der bakteriellen Zelle und der Fluoreszenz hervorgerufen durch die Expression eines Gens des untersuchten Operons (Reporterplasmid pMO3, siehe Kapitel 3.1) zusammen. In der Fluoreszenz des Operons wird zwischen der basalen Fluoreszenz (Fluoreszenz ohne Aktivierung des zugehörigen Promotors) und der induzierten Fluoreszenz mit Aktivierung des Promotor unterschieden. Daher ist es notwendig, um Zellen die viel Fluoreszenzprotein (YFP oder CFP) exprimieren, von solchen zu unterscheiden, die nur basal exprimieren, einen passenden Schwellwert zu definieren, der einen Messwert für die Aktivierung des Promotors des Colicin E2 Operons darstellt. Dabei muss ein Schwellwert definiert werden, durch den es ermöglicht wird, die Zellen die nur Basalfluoreszenz (Zellen im „AUS“ Zustand) zeigen, eindeutig von Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden, zu unterscheiden. Während der ersten drei Zeitpunkte (0 min, 15 min und 30 min) zeigt keine Zelle, weder in YFP noch in CFP Expression, einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzwerte FE (siehe Kapitel 4). Die zu diesen Zeitpunkten gemessenen Werte stellen ein Maß für die Summe aus Autofluoreszenz der Bakterie und basaler Fluoreszenz

durch das Operon im Reporterplasmid dar. Daher wird der Mittelwert dieser drei Werte als Referenzfluoreszenz jeder individuellen Zelle zugeordnet (rote Linie in Abbildung 3.11). Ein

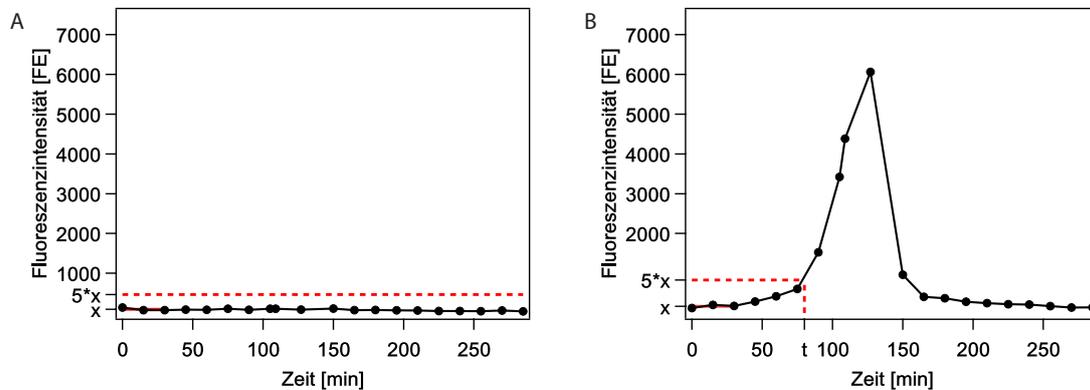


Abbildung 3.11.: Exemplarische Darstellung von Zellen im „AN“ und „AUS“ Zustand: Teil A zeigt die Fluoreszenzintensitäten einer Zelle, die nicht über den fünffachen Wert (rote gepunktete Linie bei $5x$) des Anfangsmittelwertes (rote Linie bei x) kommt (die Zelle bleibt also im „AUS“ Zustand), gegen die Zeit aufgetragen. Teil B zeigt eine Zelle die nach 75 min den Schwellwert (rote gepunktete Linie) erreicht und damit zu diesem Zeitpunkt in den „AN“ Zustand wechselt.

Anschalten der Zellen wird mit dem Erreichen des fünffachen Wertes der Basalfluoreszenz der jeweiligen Zelle gleichgesetzt (siehe Abbildung 3.11 Teil B). Diese Zellen können eindeutig von Zellen, die sich noch im „AUS“ Zustand befinden (Abbildung 3.11 Teil A), unterschieden werden. Der Zeitpunkt zu dem der fünffache Referenzwert überschritten wird, wird als Anschaltzeitpunkt t_{ON} festgelegt. Die Festlegung eines Schwellwertes ermöglicht die Quantifizierung der Menge an Zellen die eines der beiden Fluoreszenzproteine (YFP oder CFP) herstellen und somit entweder das Toxin (Cea) und oder das Lysisprotein (Cel) des Colicin E2 Operons produzieren (siehe Kapitel 3.1).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression und ihrer Charakterisierung. Dabei wird darauf eingegangen wie sich ein Toxin Produzent einen Vorteil im Kampf um Nahrung und Lebensraum sichern kann. Insbesondere spielt der Aspekt einer genau definierten Arbeitsteilung zwischen Produzenten und nicht Produzenten eine Rolle. Diese Arbeitsteilung kann durch heterogene Toxin Expression erreicht werden, die für die jeweilige Spezies eine effektive Möglichkeit darstellt das eigene Überleben zu sichern und im Vergleich zu Konkurrenten einen Vorteil zu erreichen. In diesem Zusammenhang wird analysiert ob und wie die Expression des Toxins und des Lysisgens von der Anwesenheit oder der Stärke des Stresses, der auf das Bakterium einwirkt, abhängt.

4.1.1. Veränderung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression in Abhängigkeit von der Stärke des Stresses

Exprimiert eine Zelle das Colicin E2 Operon führt dies in der Folge zum Zelltod (siehe Kapitel 2.1). Aus diesem Grund wäre es für die bakterielle Population von Vorteil, wenn das Operon nur von einem Teil der Zellen exprimiert wird. Für andere Colicine, wie Colicin K,

4. Ergebnisse

wurde in den Arbeiten von Mulec *et al.* und Mrak *et al.* [84, 112], durch Messungen auf dem Populationslevel gezeigt, dass diese heterogen exprimiert werden. Diese Heterogenität wurde auch für das in dieser Arbeit eingehend untersuchte Colicin E2 Operon auf dem Populationslevel gezeigt [51, 53, 113, 114]. Bei diesen Studien wird allerdings die Dynamik der Colicin Expression nicht berücksichtigt. Auch eine Unterscheidung dieser Dynamik im Bezug auf Toxin Produktion (Expression des *cea* Gens) und Toxin Abgabe (Expression des *cel* Gens) fand in diesen Arbeiten nicht statt. Dies ist aber notwendig um zu verstehen welche Mechanismen es dem Toxin Produzenten ermöglichen sich gegenüber anderen, nah verwandten Bakterien durchzusetzen. Hierfür ist eine Analyse der Dynamiken der Expression in einzelnen Bakterien notwendig, denn sie kann im Gegensatz zur Analyse der Gesamtpopulation folgende Fragestellungen beantworten:

- Ab welchem Zeitpunkt t_{ON} wird das Operon in den ersten Zellen exprimiert?
- Ist der Anschaltzeitpunkt t_{ON} für alle Zellen der gleiche?
- Wie viele Zellen schalten zu einem gegebenen Zeitpunkt an?
- Ist das Anschaltverhalten für *cea* (Toxinproduktion) und *cel* (Toxinabgabe) unterschiedlich?
- Wie lange dauert es vom Beginn der Expression einer Zelle bis zur maximalen Expression oder bis zur Lyse der einzelnen Zelle?
- Wie schnell kann die Zelle auf externen Stress reagieren?
- Wie verändert sich das Anschaltverhalten in Abhängigkeit von der Stärke des äußeren Stresses?

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

Durch die Beantwortung dieser Fragen kann analysiert werden wie sich die Dynamik der heterogenen Expression in Abhängigkeit von der Stresstärke verändert. Des weiteren können die Auswirkungen auf die Toxinproduktion und die Toxinabgabe studiert werden. Dieses Wissen trägt dazu bei zu verstehen, wie ein Toxin Produzent sicherstellen kann, effektiv Toxin abzugeben und damit das Überleben der eigenen Population zu sichern.

Diese Fragen, nach den Dynamiken und der Expression auf Einzelzellebene können nur, wie im folgenden Kapitel beschrieben, mit Hilfe von zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 3.3) untersucht werden. Im weiteren Verlauf wird außerdem auf einen möglichen Unterschied in der Expression der Gene für die Toxinsynthese und die Lysisproteinproduktion eingegangen. Von Yang *et al.* wurde 2010 ein Zusammenhang der Regulation der Expression des Lysisgens des Colicin E7 Operons mit dem mRNA-Bindeprotein CsrA (Carbon-Storage-Regulator A) in *E.coli* nachgewiesen. Auf Grund der hohen Homologie zwischen dem Colicin E7 und Colicin E2 [32] Operon, sowie dem Vorhandensein der CsrA Bindestellen (siehe Abbildung 2.2) und der nötigen Faltung der mRNA an dieser Stelle (siehe Abbildung 3.5) kann von einem ähnlichen Einfluss des CsrA Proteins im Colicin E2 Operon ausgegangen werden. Die Expression des Lysisgens wird im ColicinE7 Operon post-transkriptionell durch Bindung eines Homodimers des CsrA Proteins reguliert [47]. Dieses bindet an eine Bindestelle die am Ende einer mRNA Schleife liegt und mit der Ribosombindestelle des Lysisgens überlappt [16, 47, 69]. Durch diese Bindung wird das Anbinden des Ribosoms und damit die Translation der mRNA verhindert [47, 69]. Auf Grund dessen, wird ein die Translation hemmender Einfluss von CsrA auf das *cel* Gen (Lysisgen) des Colicin E2 Operons, vermutet. Dieser sollte sich in einer im Vergleich zwischen Toxin (*cea*) und Lysisgen (*cel*) in veränderten Startzeiten t_{ON} der Expression bzw. Unterschieden in der heterogenen Expression zeigen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wird das Doppelreporterplasmid pMO3 (siehe 3.1) zusätzlich zum bereits vorhandenen Plasmid pColE2-P9 (siehe 3.2) in den Stamm BZB1011-E2C transformiert (EMO3-C, Tabelle D.4). Mit Hilfe von zeitaufgelöster Einzelzellmikroskopie wird parallel die Expression der beiden Fluoreszenzreporter YFP und CFP, die stellvertretend für die Expression des Toxins *cea* und des Lysisgens *cel* stehen, untersucht. Durch

4. Ergebnisse

die Integration aller die Regulation bestimmenden Elemente des Colicin E2 Operons (siehe Kapitel 2.1 und 3.1) in das Doppelreporterplasmid sollten alle Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel ein möglicher Colicin Feedback [115, 116], in gleicher Art und Weise wie im Plasmid pColE2-P9 zu Tage treten und die Auswertung der Fluoreszenz von YFP und CFP direkt die Genexpression von *cea* und *cel* widerspiegeln. Durch dieses Reporterplasmid wird eine quantitative, zeitaufgelöste Analyse der Expressionskinetiken des Toxins (*cea*) und des Lysingens (*cel*) ermöglicht. Daraus wird die exakte Bestimmung der Anschaltzeitpunkte (t_{ON}) sowie die Quantifizierung der Expressionsstärke (FE_{max}) und die Anteile der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden, sowohl für die Toxin als auch für die Expression des Lysingens bestimmt. Da sich die Maturationszeiten von Fluoreszenzproteinen abhängig vom Protein und Stamm stark unterscheiden können [107], wurden um zu verifizieren, dass die Maturationszeiten der Fluoreszenzproteine YFP und CFP, im Rahmen der Messungen gleich sind und geringer als die Auflösungsgrenze von 15 min, die Maturationszeiten *in vivo*, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, gemessen. Innerhalb der Fehlergrenzen ist die Maturationszeit beider Fluoreszenzproteine gleich lang und mit unter 12 min in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten [108, 109].

Die Bakterien der Tagkultur werden zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase für die Mikroskopie präpariert und dann fortlaufend, unter nativen oder Stress induzierten Bedingungen (verschiedene Konzentrationen von Mitomycin C), untersucht (siehe Kapitel 3.3). Der durch die Zugabe von Mitomycin C hervorgerufene Stress, wirkt im Colicin E2 Operon auf die transkriptionelle Regulation durch die Aktivierung des SOS Systems (siehe Kapitel 2.1). Das SOS System ist unter nativen Bedingungen, also ohne externen Stress, nur in einer geringen Zahl von Zellen aktiv [51]. Dies kann durch die natürliche Stochastizität des LexA/RecA Systems [76] das in der SOS Antwort eine wichtige Rolle spielt hervorgerufen werden, was der Bakterienpopulation dazu dienen könnte, schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können [117]. Erst durch die Reaktion auf äußeren Stress wird das System induziert [52] und das SOS System der Bakterien aktiviert. Durch die Betrachtung des Systems unter Stress können die Antwortdynamiken des Colicin E2 Operons untersucht werden. Dadurch kann analysiert werden, ob die Geschwindigkeit der Antwort, die Zeit in der das System

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

antwortet, die Menge an produziertem Colicin oder die Zeit bis es zur Reaktion aller Zellen kommt von der Stärke des angelegten Stresses abhängt. Vergleicht man die Antwort des Colicin E2 Systems auf die Induktion mit Mitomycin C (MitC), mit der Induktion des Laktose Operons, zeigen sich markante Unterschiede. Für das Laktose Operon zeigen sich nach Ozbudak *et al.* [118] je nach Menge an verfügbarer Glukose und Laktose unterschiedliche Ergebnisse. In einem bestimmten Konzentrationsbereich kommt es zum Beispiel zur Ausbildung einer bistabilen Antwort [118]. Auch für das sehr gut untersuchte Laktose Operon sind noch keine genauen Studien zur Dynamik der Expression der einzelnen beteiligten Gene verfügbar. Um die Antwortdynamiken und die Dynamik der Expression sowie die Unterschiede in der Expression, der im Colicin E2 Operon wichtigen Gene *cea* (Toxinproduktion) und *cel* (Produktion des Lysisgens) besser zu verstehen werden in den folgenden Kapiteln diese mit Hilfe des Reporterplasmides pMO3 und seiner Derivate (siehe Kapitel 3.1 und Tabelle D.2) analysiert.

Für das dem Colicin E2 Operon ähnliche Colicin E7 Operon wurde von Yang *et al.* [47] der Einfluss der Bindung des CsrA Gens auf die Produktion des Lysisgens untersucht. Mit Hilfe eines Stamms, der ein verändertes CsrA Protein produziert [119], das nicht mehr an die Bindestellen der mRNA anbinden kann, wurde gezeigt, dass die Produktion des Lysisproteins des Colicin E7 Operons durch CsrA beeinflusst wird [47]. Zwischen den verwendeten Stämmen gab es einen Unterschied im Beginn der Zelllyse gemessen durch eine Verringerung der Trübung der Bakterienlösung. Die Verschiebung der Zelllyse hin zu früheren Zeitpunkten deutet auf eine Veränderung eines vorhandenen zeitlichen Versatzes zwischen der Produktion des Toxins und der Produktion des Lysisgens, nach erfolgter Induktion durch äußeren Stress, hin [47]. Da die Elemente die zur Regulation beitragen im Colicin E2 Operon sehr ähnlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesem Operon ein zeitlicher Versatz zwischen der Expression des Toxingens (*cea*) und des Lysisgens (*cel*) besteht.

Entgegen der Erwartungen, aus der Theorie (siehe Kapitel 2.3) und der Arbeit von Yang *et al.* [47], zeigen in den Experimenten die Expressionskinetiken von *cea* und *cel* für den Stamm EMO3-C nahezu gleiches Verhalten. In der Bilderserie in Abbildung 4.1 ist dieses Verhal-

4. Ergebnisse

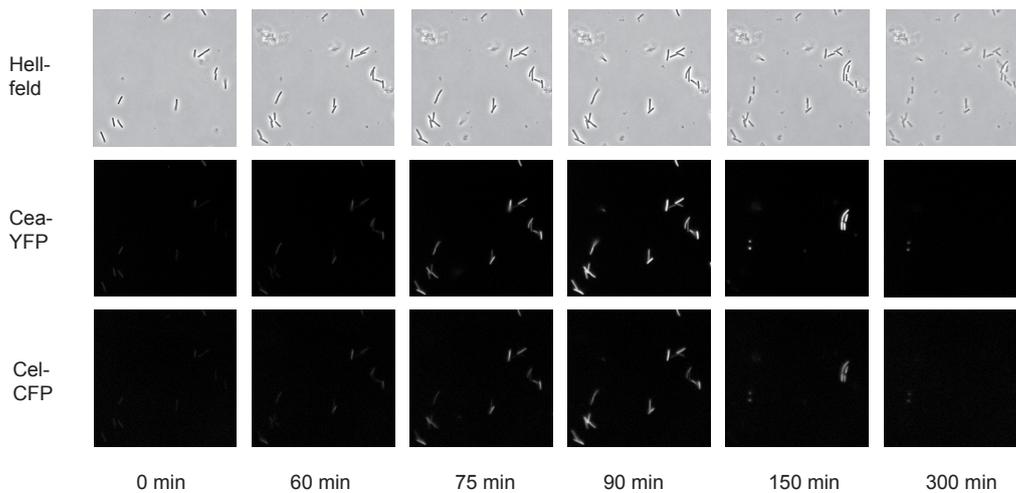


Abbildung 4.1.: Bilderserie mit Beispielbildern für Hellfeld, YFP und CFP: Messung unter hohem Stress (0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MitC) die ausgewählte Zeitpunkte für Hellfeld, YFP Fluoreszenz (*cea* Expression) und CFP Fluoreszenz (*cel* Expression) zeigt. Zu den frühen Zeitpunkten kann eine ansteigende Fluoreszenz, parallel in YFP und CFP beobachtet werden. Zu den späteren Zeitpunkten kommt es vermehrt durch die Expression von *cel* zur Lyse einzelner Bakterien und somit zur Reduktion des Fluoreszenzsignals (verändert nach [33]).

ten zu erkennen, dabei sind exemplarisch für verschiedene Zeitpunkte Hellfeld, Cea-YFP und Cel-CFP Bilder gezeigt. Die Zeitserie ist mit einer hohen Stressinduktion (0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MitC) aufgenommen worden um mit hoher Wahrscheinlichkeit viele Zellen die in den „AN“ Zustand schalten zu beobachten. Hier ist für die späteren Zeitpunkte eindeutig eine Abnahme des Fluoreszenzsignals und ein „Ausbleichen“ der Zellen im Hellfeldbild (Abbildung 4.1) zu erkennen, was durch die Lyse der jeweiligen Bakterie, durch die Expression des *cel* Gens (beobachtbar durch die CFP Fluoreszenz), zu erklären ist. Zum Zeitpunkt der Lyse läuft das Zytosol des Bakteriums aus, die Fluoreszenzproteine sind im Anschluss daran nicht mehr detektierbar.

Die Analyse der Fluoreszenzwerte über die Zeit ergibt für YFP und CFP (*cea* bzw. *cel* Expression) im Fall ungestresster Bakterien, dem System unter normalen Bedingungen, einige wenige Zellen die zu späten Zeitpunkten (nach mehr als 200 min, siehe Abbildung 4.3) deutlich ansteigende Werte aufweisen. Zur weiteren quantitativen Analyse der Daten wurde ein Schwellwert definiert (siehe Kapitel 3.4.2) ab dem eine Zelle sich im „AN“ Zustand befindet

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

und der Zeitpunkt des Überschreiten des Schwellwertes als Anschaltzeitpunkt t_{ON} definiert. Damit zeigt sich, dass das System bei normalen Bedingungen nur in einigen wenigen Zellen in der stationären Wachstumsphase aktiviert wird. Die Anzahl der in Abbildung 4.3 zu sehenden Zellen die in YFP (Teil A in Abbildung 4.3) bzw. CFP (Teil B in Abbildung 4.3) anschalten stimmt mit Ergebnissen früherer Populationsanalysen für verschiedene Colicine überein [112]. Es zeigt sich somit eine phänotypische Heterogenität des uninduzierten, natürlichen Systems. Die gleichzeitige Expression des Toxins und des Lysis Gens im Stamm EMO3-C, die nicht nur bei sehr hoher oder keiner Induktion durch den Stressor Mitomycin C vorliegt, sondern über den ganzen Bereich der verwendeten Mitomycin C Konzentrationen vorzufinden ist zeigt die Abbildung 4.2. Es ist der Prozentsatz der Zellen, der sich im „AN“ Zustand befindet gegen die jeweilig eingesetzte Konzentration des Mitomycin C zum Zeitpunkt 75 min, der Zeit bei der bei hohen Mitomycin C Konzentrationen ein maximales Anschalten vorgefunden wurde, aufgetragen. Die Wahl des Zeitpunktes, für den Vergleich, 75 min nach Induktion mit Mitomycin C hat sich durch den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten der Messungen des Stammes EMO3-C als sinnvoll erwiesen. Nach diesem Zeitpunkt nimmt bei hoher Induktion die Fluoreszenz durch Lyse der produzierenden Zellen wieder ab (siehe Abbildung 4.1). Für den prozentualen Anteil der Bakterien die sich im „AN“ Zustand befinden (Abbildung 4.2) zeigt sich ein Anstieg bis zu einer Mitomycin C Konzentration von 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dann geht die Kurve, die diese Anteile beschreibt, in eine Sättigung über und bleibt im Rahmen der Messungengenauigkeiten gleich. Dieses Verhalten ist nahezu gleich für die Anteile von *cea* und *cel* zu beobachten es zeigt sich allerdings, dass die Werte für die Anteile der *cel* Expression über den ganzen Messbereich hinweg geringer oder gleich sind. Damit konnte gezeigt werden, dass bereits bei dieser Konzentration das maximale Stresslevel erreicht ist. Daher ist eine weitere Erhöhung der Mitomycin C Konzentration und damit des Stresslevels für die Bakterien, nicht sinnvoll. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mitomycin C Konzentrationen im Bereich von 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bakteriostatisch und Konzentrationen im Bereich von 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bakteriolytisch wirken [105, 106, 120]. Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen zwischen 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C liegen demnach klar unter der für die *E. coli* Zellen tödlichen Level [106, 120]. Die in den Hellfeldbildern beobachtbare Verlängerung der einzelnen Zellen nach der Zugabe von Mitomycin C wurde in der Arbeit

4. Ergebnisse

von Suzuki *et al.* in ähnlicher Weise für *E.coli* B Zellen (gestresst durch eine Konzentration von 0.10 µg/ml Mitomycin C), beobachtet [105]. Der Konzentrationsabhängige Verlauf der Anteile der Zellen, die die Expression des *cea* bzw. *cel* Gens anschalten, wurde mit einer sigmoidalen Funktion angefitet (siehe Gleichung 4.1).

$$y = y_0 + \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{x_{1/2}-x}{r}\right)} \quad (4.1)$$

In dieser Gleichung stellen y_0 den minimalen Anteil an Zellen, A den maximalen Anteil, $x_{1/2}$ die Mitomycin C Konzentration bei der die sigmoidale Funktion die größte Steigung besitzt und r die Rate mit der Funktion an dieser Stelle steigt, dar. Da die Anteile der Zellen in % sich nur in einem Bereich von 0 – 100% bewegen können und mit steigendem Stress (Erhöhung der Konzentration von Mitomycin C) ansteigt, ist eine sigmodale Funktionen eine geeignete Fitfunktion um diese Daten zu quantifizieren. Vergleicht man die Anteile der Zellen im „AN“ Zustand für die Expression von *cea* und *cel*, zeigt sich in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration, ein sehr ähnliches Verhalten (Abbildung 4.2, Tabelle E.1). Die Saturation tritt bei ungefähr 75% bzw. 68% für *cea* bzw. *cel* ein [33]. Der konzentrationsabhängige Anstieg zeigt hohe Übereinstimmung mit anderen Arbeiten [51, 52, 53], die diese Anteile auf dem Populationslevel ermitteln.

Bakterien die sich in einer natürlichen, stressfreien Umgebung befinden (siehe Abbildung 4.3) zeigen nur Anschalten einzelner Bakterien, meist erst in der stationären Wachstumsphase. Dies lässt sich mit stochastischen Schwankungen der LexA/RecA Proteine [57, 76] oder spontan auftretender DNA Schäden, erklären. Durch diese Veränderungen kommt es zum Auslösen der SOS Antwort [103]. Deshalb kommt es zu der in der Literatur beschriebenen [51, 52] phänotypischen Heterogenität, die sich durch die Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen bei identischem genetischen Hintergrund auszeichnet [117]. Der in Abbildung 4.3 dargestellte Anteil der Zellen die in den „AN“ Zustand schalten (rote Fluoreszenzverläufe) weist im Vergleich zur Literatur [51, 52] leichte Abweichungen auf, die durch die verschiedenen Bedingungen unter denen die Experimente durchgeführt wurden erklärt werden können.

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

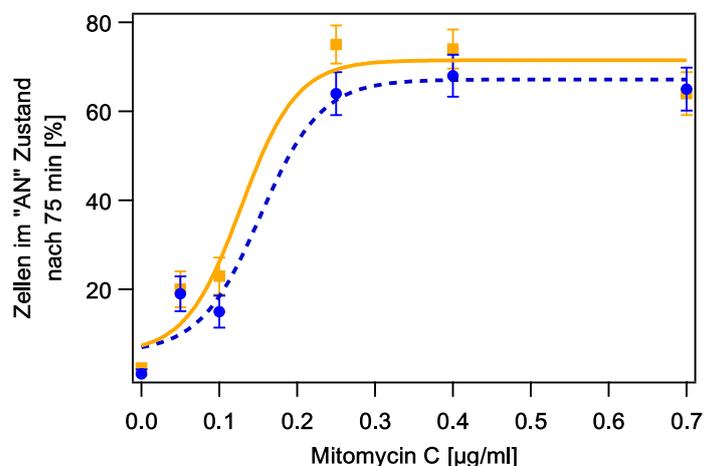


Abbildung 4.2.: Verlauf des prozentualen Anteils der Zellen im „AN“ Zustand in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration: Die Anzahl der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden, sind für den Zeitpunkt 75 min nach Mitomycin C Induktion, gegen die jeweilige Mitomycin C Konzentration aufgetragen. Die Expression des *cea* Gens ist in orangenen Quadraten, die des *cel* Gens mit blauen Kreisen, jeweils mit dem Standardfehler, dargestellt. Die Daten wurden mit einer sigmoidalen Funktion gefittet, deren Fitparameter der Tabelle E.1 entnommen werden können (verändert nach [33]).

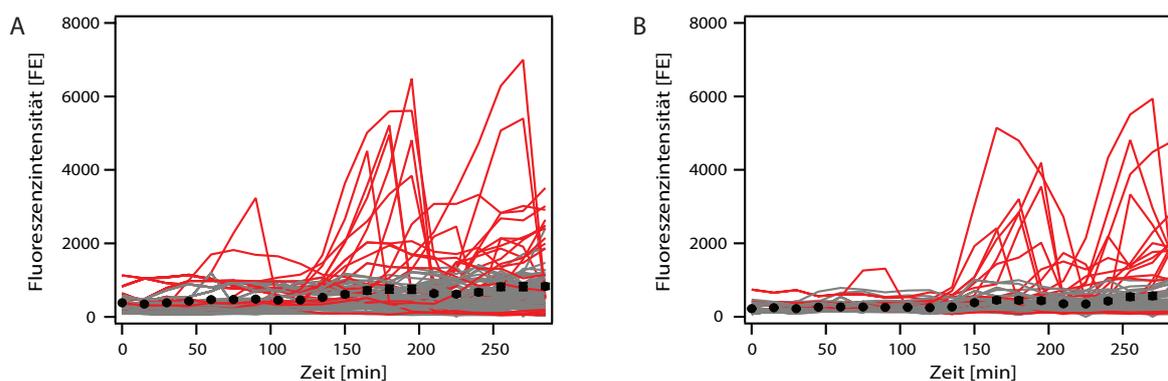


Abbildung 4.3.: Vergleich von *cea* und *cel* Expression ohne Induktion durch Mitomycin C: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz einzelner Bakterien (graue Linien) und der mittleren Fluoreszenz (schwarze Quadrate) mit den Fehleren der Mittelwertbildung, für den uninduzierten Fall. In Teil A ist die Fluoreszenz von YFP (representiert *cea*) und in Teil B die Fluoreszenz von CFP (representiert *cel*) gezeigt. Die Zellen, die im Lauf der Messzeit von 5 Stunden in den „AN“ Zustand schalten sind in rot dargestellt.

4. Ergebnisse

Nachdem wie in Abbildungen 4.2 und 4.3 gezeigt wurde, sich das Verhalten der Expression von *cea* und *cel* für alle Mitomycin C Konzentrationen nicht unterscheidet, werden im Anschluss nur Daten der Expression des Toxins (*cea*) gezeigt (siehe auch Mader *et al.*[33]), die dazu äquivalenten Daten der Expression von *cel* sind im Anhang B dargestellt.

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben zeigt zu einem gegebenen Zeitpunkt ein prozentualer Anteil der gesamten Population eine SOS Antwort, was mit der zeitaufgelösten Einzelzellmikroskopie in unserer Studie bestätigt werden konnte (Abbildung 4.2). Im Unklaren blieben bisher allerdings die Fragen, ob während der Zeit alle Bakterien eine SOS Antwort zeigen und ob diese Antworten immer die gleiche Intensität aufweisen?

Mit Hilfe der zeitaufgelösten Einzelzellmikroskopie können, im Gegensatz zu den früheren Studien, diese Fragen beantwortet werden. Werden die Bakterien verschiedenem Stress ausgesetzt (durch die Zugabe verschiedener Mitomycin C Konzentrationen) kann, wie in Abbildung 4.4 gezeigt ist, eine Veränderung des Verhaltens der Bakterienpopulation beobachtet werden. Mit ansteigendem Stresslevel zeigen mehr und mehr Zellen eine Expression von *cea* (YFP) zu früheren Zeitpunkten (siehe Abbildung 4.4). Die Expression von *cel* zeigt eine sehr ähnliche Charakteristik, die Daten dazu sind im Anhang B zu finden. Der Mittelwert der Anschaltzeitpunkte t_{ON} der Zellen im „AN“ Zustand verschiebt sich, mit von 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu 0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ steigender Mitomycin C Konzentration, von 150 min nach Induktion zu 75 min nach Induktion. In Übereinstimmung mit den von Kamensek *et al.* [89] ermittelten kürzest möglichen Startzeitpunkten der Expression, zeigt sich in Abbildung 4.4 das keine Zelle schneller als 45 min nach Induktion die Expression von *cea* (YFP) anschaltet. In dieser Arbeit wird diese Art der zeitlichen Verzögerung zwischen der Induktion und dem Beginn der Expression, auf den neben der Regulation durch LexA zusätzlichen Einfluss des Regulators AsnC zurückgeführt [89]. Bei schwacher Induktion verteilt sich der Beginn der Expression über ein großes Zeitfenster von ungefähr 200 min (siehe Abbildung 4.4 Teil A). Je stärker hingegen die Induktion wird, umso kürzer wird das Zeitfenster in dem es zum Beginn der Expression nahezu aller beobachteten Zellen kommt. Hier wird bei Mitomycin C Konzentrationen von 0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine Reduktion in der Halbwertsbreite der Verteilung auf circa 30 min beobachtet. Dies kann

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

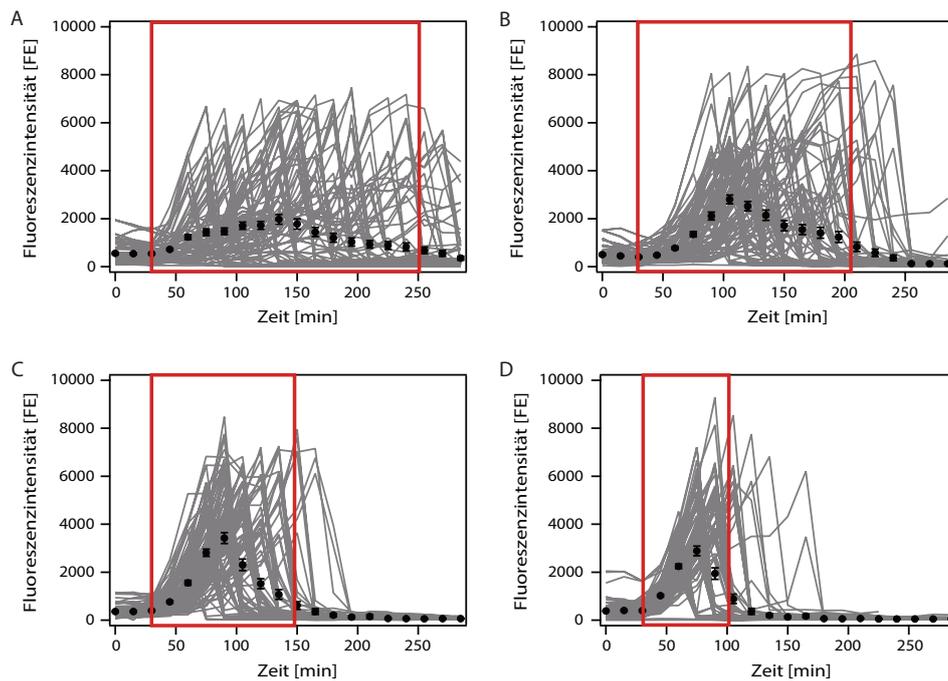


Abbildung 4.4.: Expression von *cea* induziert mit verschiedenen Mitomycin C Konzentrationen: Die Teile A-D zeigen die Fluoreszenzintensitäten einzelner Bakterien (graue Linien) für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen 0.05 µg/ml, 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml und 0.70 µg/ml in ihrem zeitlichen Verlauf. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten ist zu jedem Zeitpunkt als schwarzer Kreis (der eingezeichnete Fehler ist der Standardfehler aus der Mittelwertberechnung) dargestellt. Der Bereich in dem nahezu alle Zellen in den „AN“ Zustand schalten ist mit einem roten Kasten umrandet. Es kann ein Übergang von einer zeitlich heterogenen Stressantwort bei geringen Mitomycin C Konzentrationen (A,B), hin zu einer zeitlich synchronisierten Antwort bei hohen Konzentrationen (C,D) beobachtet werden. Die äquivalenten Daten für die Expression von *cel* (CFP Fluoreszenz) sind im Anhang B zu finden.

einem Strategiewechsel gleichgesetzt werden. Bei geringem Stress reichen wenige Zellen die das Toxin produzieren aus, um dem Toxin Produzenten einen Vorteil zu verschaffen. Nimmt der Stress zu, wird es nötig um die Population zu erhalten, dass nahezu alle Zellen sofort beginnen das Toxin zu produzieren. Dies zeigt einen Wechsel von zeitlich heterogenem Anschalten hin zu einer synchronisierten Antwort der ganzen Population auf steigenden Stress von außen.

4. Ergebnisse

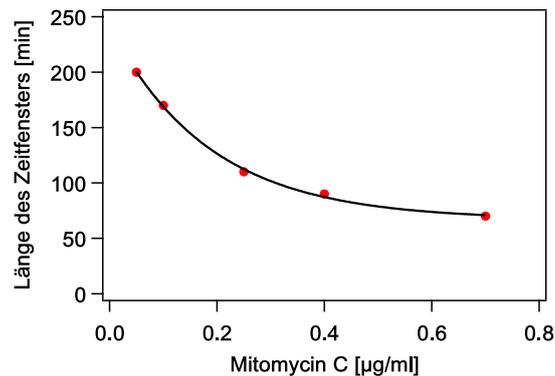


Abbildung 4.5.: Darstellung der Verkürzung des Zeitfensters in dem nahezu alle Zellen die Expression des Toxins (*cea*) beginnen: Die Dauer des in Abbildung 4.4 mit roten Kästen dargestellten Anschlagzeitfensters wird in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Stressors (Mitomycin C) gezeigt. Bei ansteigender Mitomycin C Konzentration ist eine Verkürzung des Zeitfensters von 200 min bei 0.05 µg/ml Mitomycin C hin zu 70 min bei 0.70 µg/ml Mitomycin C zu beobachten. Die Punkte wurden durch eine Exponentialfunktion angenähert (schwarze Linie).

Bereits bei relativ geringen Konzentrationen des Stressors Mitomycin C (0.05 µg/ml, Teil A in Abbildung 4.4) ist ein großer Unterschied zum uninduzierten Fall (wie in Abbildung 4.3 gezeigt) zu erkennen. Während ohne Induktion nur einzelne Zellen in der stationären Wachstumsphase in den „AN“ Zustand übergehen, schalten selbst bei geringer Induktion durch MitC, im Verlauf der Messzeit von fünf Stunden, nahezu alle Zellen in den „AN“ Zustand. Dieses Phänomen lässt sich als zeitlich heterogenes Anschalten beschreiben und wurde unter anderem von Megerle *et al.* für das Arabinose System gezeigt [77]. Dieses Verhalten zeigt sich vor allem für geringe Induktion, im Mitomycin C Bereich bis zu 0.10 µg/ml, (Abbildung 4.4 Teil A, B) und geht im Anschluss in ein gleichzeitiges Anschalten vieler Zellen, das als eine Art zeitlicher Synchronisation beschrieben werden kann, über.

Bei hoher Induktion schalten alle Zellen in den „AN“ Zustand und es kommt zu einer Verkürzung des Zeitfensters in dem die Zellen in den „AN“ Zustand wechseln. Die Daten zur Verkürzung des Zeitfensters bei steigenden Mitomycin C Konzentrationen wurden an den Verlauf einer Exponentialfunktion angepasst (schwarze Linie in Abbildung 4.5). Dabei zeigt sich eine Abnahme der Breite des Zeitfensters mit einer Rate von 5.37 ± 0.44 ml/µg auf einem

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

Wert von 66.94 ± 3.58 min. Neben der Verkürzung des Zeitfensters von ungefähr 200 min auf 70 min (siehe Abbildung 4.5), verschieben sich die Zeitpunkte zu denen die Zellen anschalten nach vorne. Allerdings kann keine Zelle beobachtet werden, die in einen Zeitfenster kürzer als 45 min nach der Induktion schaltet. Von Kamensek *et al.* wurde gezeigt, dass diese Zeitverzögerung vor dem Anschalten zusätzlich von AsnC, einem Aktivator der Asparaginesynthetase A [90], beeinflusst wird [89]. Es wurde, in dieser Populationsstudie, gezeigt, dass der Start der Transkription DNA schädigender Colicine (zu dieser Gruppe gehören unter anderem Colicin E7, Colicin E8 und Colicin E2 [32]), durch ein Zusammenspiel von LexA mit AsnC reguliert wird [89]. Für die Expression von *cel* wurde, im Bezug auf die Zeitpunkte des Beginns der Expression und die Abhängigkeit vom externen Stress ähnliches Verhalten beobachtet, die Graphen hierzu sind im Anhang B dargestellt. Um den Einfluss des externen Stresses durch Mitomycin C auf den Zeitpunkt und die Menge der Zellen die in den „AN“ Zustand wechseln quantitativ zu analysieren wurde die Anzahl der Zellen die zu den jeweiligen Zeitpunkten in den „AN“ wechseln in Abbildung 4.6 Teil A-E im Bezug auf die einzelnen Zeitpunkte als Histogramme dargestellt (die Schwellwertdefinition ist in Kapitel 3.4.2 beschrieben).

Für die geringste untersuchte Mitomycin C Konzentration ($0.05 \mu\text{g/ml}$) zeigen die Zellen über einen Zeitraum von mehr als 200 min eine SOS Antwort, hierbei zeigt die Verteilung der Anzahl der Zellen die zum jeweiligen Zeitpunkt anschalten ein Maximum bei 101 ± 4 min.

$$y = y_0 + A \cdot \exp\left(-\left(\frac{x - x_0}{w}\right)^2\right) \quad (4.2)$$

Ermittelt wurden diese Werte aus dem Maximum x_0 einer Gaußfunktion (siehe Gleichung 4.2) welche an die Histogramme gefittet wurde. Ihre Halbwertsbreite w gibt die Länge des Anschaltzeitfensters wieder, die weiteren Parameter y_0 und A beschreiben den Startwert der Menge an anschaltenden Zellen bzw. den maximalen Prozentsatz an Zellen die zu einem Zeitintervall anschalten (dieser Wert wird bei x_0 erreicht). Bei der höchsten Konzentration ($0.70 \mu\text{g/ml}$ MitC) reduziert sich das Zeitfenster auf unter 15 min und das Maximum tritt bereits bei 60.0 ± 0.5 min auf [33]. Zusammenfassend zeigen diese Daten für geringe Induktion

4. Ergebnisse

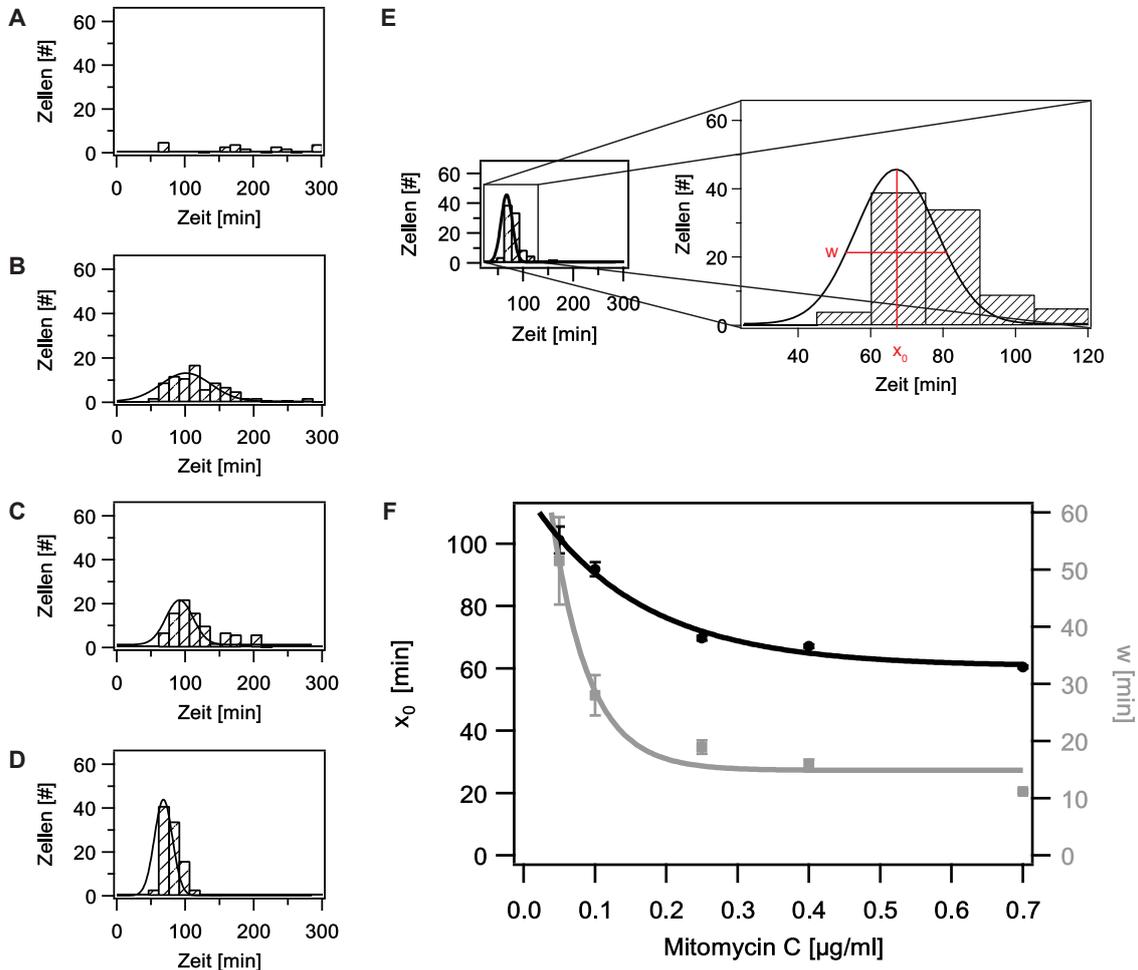


Abbildung 4.6.: Bestimmung des Anschlagzeitfensters für die Expression von *cea* in Abhängigkeit von der verwendeten Mitomycin C Konzentration: Die Histogramme zum Anschalten von Zellen für jeden Zeitpunkt sind in den Teilen A - D für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen (A: 0.00 $\mu\text{g/ml}$, B: 0.05 $\mu\text{g/ml}$, C: 0.10 $\mu\text{g/ml}$, D: 0.25 $\mu\text{g/ml}$) abgebildet. Teil E zeigt eine Vergrößerung des Histogramms für 0.40 $\mu\text{g/ml}$ in der die Bestimmung der Halbwertsbreite beim halben Maximum (rote waagrechte Linie und rotes w) und die Bestimmung des Maximums (rote senkrechte Linie und x_0) aus den Gaußfits an die einzelnen Verteilungen demonstriert wird. Die so bestimmten Werte sind in Teil F in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration dargestellt, mit ansteigender Induktion sind sowohl eine Abnahme der Halbwertsbreite w (graue Quadrate und grauer exponentieller Fit, siehe Tabelle E.3) und eine Verschiebung des Maximums (schwarze Kreise und schwarzer exponentieller Fit, siehe Tabelle E.3) hin zu früheren Zeiten zu beobachten. Die Daten für die *cel* Expression und die Parameter der einzelnen Fits sind in Anhang B.2 bzw. Tabelle E.4 dargestellt.

das Auftreten von zeitlicher Heterogenität in der Expression von *cea* bzw. *cel*, das bei hohem äußeren Stress zu Gunsten einer synchronisierten SOS Antwort verloren geht. Das System adaptiert an die Stärke des Stresses und wechselt zwischen drei verschiedenen Zuständen:

- Ohne externem Stress zeigt sich phänotypische Heterogenität (eventuelles Anschalten weniger Zellen)
- Mit geringem externen Stress ein zeitlich heterogenes Anschalten nahezu aller Zellen (MitC $\leq 0.10 \mu\text{g/ml}$)
- Bei hohem externen Stress (MitC $\geq 0.25 \mu\text{g/ml}$) zeigt sich eine synchronisierte Stressantwort aller Zellen

Die heterogene Expression des Toxins, bzw. insbesondere der Strategiewechsel von phänotypischer Heterogenität über zeitlich heterogenes Anschalten der Bakterien hin zu einer synchronisierten Expression bei hohem äußeren Stress, ermöglicht den Toxin Produzenten in einer effektiven Art der Arbeitsteilung auf Veränderungen in ihrer Umwelt zu reagieren. Dadurch hat der Toxinproduzent im Vergleich zu anderen verwandten Arten einen Wettbewerbsvorteil und zeigt sich anpassungsfähiger auf sich verändernde Umwelteinflüsse.

4.1.2. Regulation der Colicinmenge über die Expression des Lysisgens

Neben der Frage nach dem Beginn der Expression des Toxins und der Beeinflussung durch von außen einwirkendem Stress, stellt sich zudem die wichtige Frage, warum der Zeitpunkt der Colicin (Toxin) Abgabe von der Stressstärke abhängig ist. Gibt es möglicherweise eine minimale Toxin Konzentration, ab der es zur Abgabe kommt oder spielen noch weitere Faktoren eine Rolle? Dies wird im folgenden quantitativ untersucht. Zuerst ist zu bemerken, dass

4. Ergebnisse

die mittlere maximale Fluoreszenzintensität der Expression von *cea*, der Bakterien im „AN“ Zustand, stark von der Konzentration des eingesetzten Mitomycin C beeinflusst wird. Für den uninduzierten Fall erhält man eine mittlere Fluoreszenzintensität von 2905 FE [33], wohingegen die mittleren Fluoreszenzintensitäten für induzierte Populationen sich zwischen 4592 und 5138 FE bewegen (siehe auch Tabelle E.2). Die Werte der induzierten Populationen unterscheiden sich für alle eingesetzten Mitomycin C Konzentration (0.05 µg/ml → 0.70 µg/ml) nur geringfügig. Es zeigt sich daher, dass die Menge des produzierten Proteins unabhängig von der Höhe des Stresslevels ist. Dies deutet darauf hin, dass die Menge des produzierten Colicins pro Zelle unabhängig ist von der Konzentration des Mitomycin C. Es stellt sich aber weiterhin die Frage, wie das Erreichen dieser maximalen Menge an Colicin reguliert wird. Gibt es einen Schwellwert an Toxin in der einzelnen Zelle, der zur Zelllyse und damit zur Abgabe des Giftes führt?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Doppelreporterplasmid in einen Stamm, der das originale Plasmid (pColE2-P9) nicht enthält, transformiert. Dieser Stamm (EMO3-S) kann daher auch kein Toxin und kein Lysisprotein herstellen. Wie die Abbildung 4.7 zeigt, ist die Expression von *cea* im EMO3-S und EMO3-C bis zu einem gewissen Zeitpunkt gleich. Dieser Zeitpunkt stimmt mit dem Zeitpunkt der maximalen mittleren Fluoreszenzintensität im Stamm EMO3-C (Abbildung 4.4, schwarze Kreise) als auch mit dem Zeitpunkt des maximalen Anschaltens (Abbildung 4.6 und Tabelle E.3) der Bakterien überein. Nach diesem Zeitpunkt geht im EMO3-C die YFP Fluoreszenz wegen der einsetzenden Zelllyse auf nahezu null zurück. Der Stamm EMO3-S, dessen Bakterien nicht lysieren, da kein Lysisprotein gebildet werden kann, zeigt hier ein anderes Verhalten. Die YFP Fluoreszenz steigt nach besagtem Zeitpunkt weiter an (Abbildung 4.7). Dieser Anstieg zeigt sich unabhängig von der Konzentration des Stressors Mitomycin C (Abbildung 4.7). Diese Daten zeigen, dass die Menge an Colicin die in die Umgebung abgegeben wird, unabhängig ist von einer internen Schwellwertkonzentration an Colicin. Die Regulation läuft statt dessen über die Regulation der Expression des *cel* Gens ab, das zur Lyse der Zellen führt. Der Zeitpunkt der Toxinabgabe ist also über das Einsetzen der Zelllyse gesteuert und damit von der Expression des Lysigens (*cel*), das post-transkriptionell reguliert ist, abhängig (siehe Kapitel 2.1 und 2.3).

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

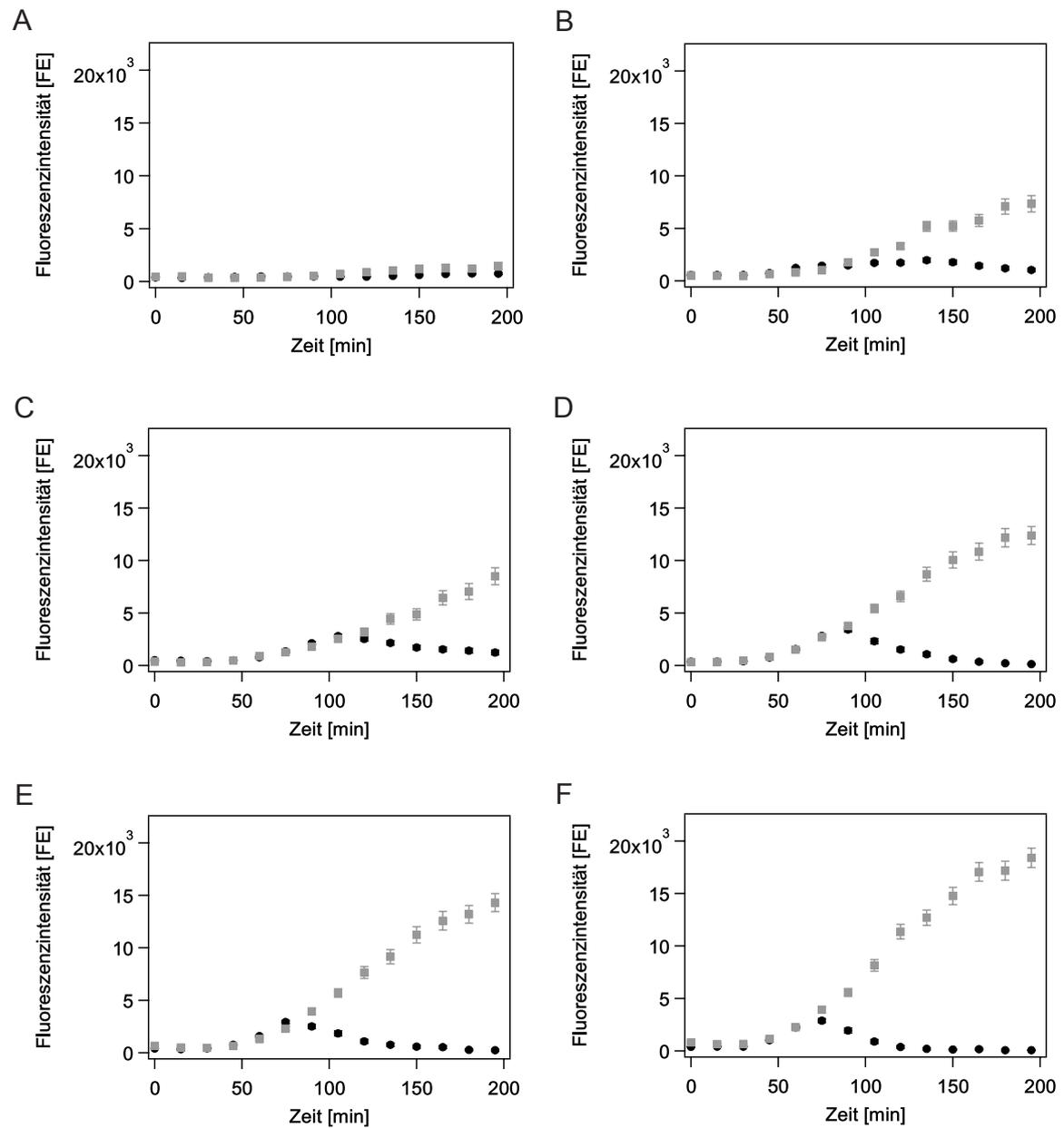


Abbildung 4.7.: Vergleich der Expression von *cea* in den Stämmen EMO3-C und EMO3-S: A - F Mittlere YFP Fluoreszenzintensitäten (*cea* Expression) gegen die Zeit aufgetragen für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen (A: 0.00 $\mu\text{g/ml}$, B: 0.05 $\mu\text{g/ml}$, C: 0.10 $\mu\text{g/ml}$, D: 0.25 $\mu\text{g/ml}$, E: 0.40 $\mu\text{g/ml}$, F: 0.70 $\mu\text{g/ml}$). Der Stamm EMO3-C (pColE2-P9 und pMO3) ist dargestellt mit schwarzen Kreisen, der Stamm EMO3-S (pMO3) mit grauen Quadraten. Die Fehlerbalken zeigen die Fehler der Mittelwerte. Die korrespondierenden Daten für die Expression von *cel* sind in Abbildung B.3 gezeigt. (verändert nach Mader *et al.* [33])

4.1.3. Biologische Signifikanz der heterogenen Colicin E2 Produktion

In diesem Teil der Arbeit, der in Mader *et al.* 2015 [33] publiziert wurde, wurde zum ersten Mal die Expressionskinetik des Colicin E2 Operons quantitativ untersucht. Dabei wurde zwischen der Expressionsdynamik des *cea* Gens (Toxin Produktion) und des *cel* Gens (Lysisproteinproduktion) unterschieden. Durch den Austausch der *cea* und *cel* Gene die Fluoreszenzreporterproteine YFP bzw. CFP, unter Beibehaltung aller für die Regulation wichtigen Elemente (siehe Kapitel 3.1), konnten die Fragen nach den Unterschieden in der Heterogenität zwischen *cea* und *cel* Expression und nach Unterschieden im Anschaltverhalten zwischen *cea* und *cel* Expression, adressiert werden. Im Gegensatz zum für Colicin E7 [47] gezeigten und dem in der Theorie für das Colicin E2 Operon vorhergesagten Ergebnis (siehe Kapitel 2.3), war kein signifikanter Unterschied in den Expressionkinetiken von *cea* und *cel* im Stamm EMO3-C zu beobachten. Die Expression beider Gene begann zur gleichen Zeit. Daher ist davon auszugehen, dass die post-transkriptionelle Regulation durch CsrA im Stamm EMO3-C zu keinem zeitlichen Versatz führt. Eine mögliche Erklärung ist, dass obwohl es sich bei CsrA um ein im Überfluß vorkommendes Protein handelt [48, 121], es zu Verdrängungseffekten, hervorgerufen durch die zusätzlichen Bindestellen im Doppelreporterplasmid in EMO3-C, kommt. Das originale Plasmid liegt nur in circa 10-20 Kopien pro Bakterium [32] vor, im Gegensatz dazu weist das Reporterplasmid pMO3 eine Anzahl von ungefähr 50 Plasmiden pro Bakterium auf. Daraus resultiert ein Unterschied von ungefähr 100 Bindestellen zwischen dem originalen System und dem Stamm EMO3-C. Verschiedene Veröffentlichungen zeigen dass die Menge an freiem CsrA streng reguliert wird [122, 123] und zuviel freies CsrA auch schädlich für ein Bakterium sein kann [122]. Daher könnte die Erhöhung der Anzahl der Bindestellen die post-transkriptionelle Regulation des *cel* Gens durch eine Sequestration von freien CsrA Proteinen beeinflussen. Einen weiteren Einflussfaktor würde eine gesteigerte Expression der beiden sRNAs CsrB und CsrC darstellen, die nach Romeo *et al.* [16] CsrA binden. Dadurch würde die Menge an freiem CsrA verändert und damit auch den Zeitpunkt der Colicin Abgabe verschoben.

4.1. Charakterisierung der Dynamik der heterogenen Colicin E2 Expression

Für die Reduktion der verfügbaren freien CsrA Moleküle gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten:

- a) Verdrängungseffekte durch zusätzliche Bindestellen
- b) Gesteigerte Produktion von CsrB und CsrC hervorgerufen durch Stress

Populationstudien anderer Colicine wie zum Beispiel Colicin-K [57, 84, 112] zeigen, wie auch solche für Colicin E2 [51, 52, 53], in Übereinstimmung mit den durchgeführten Einzelzellanalysen für den uninduzierten Fall phänotypische Heterogenität in der stationären Wachstumsphase. Durch den Einsatz von zeitaufgelöster Einzelzellanalyse und des Doppelreporterplasmides kann zwischen der Expression der beiden Gene *cea* und *cel* unterschieden werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse in Mader *et al.* [33] und die Ergebnisse der Populationsstudien darauf hin, dass es sich bei der heterogenen Expression um eine gemeinsame Eigenschaft der Gruppe der Colicine handelt. Der Anteil der Zellen die das *cea* oder *cel* Gen exprimieren nimmt mit steigender Konzentration des Induktionsmittels Mitomycin C zu und die Startzeit der Expression nimmt exponentiell ab. Dies zeigt, dass bereits sehr geringe Konzentrationen von Mitomycin C von einzelnen Zellen wahrgenommen werden. Diese Zellen sind allerdings nicht in Lage schneller als in 45 min nach Induktion, Toxin zu produzieren und abzugeben [89].

Selbst bei der geringsten untersuchten Konzentration des Induktionsmittels fingen nahezu alle Zellen im Zeitfenster von fünf Stunden an *cea* und *cel* zu exprimieren. Hierbei kann es sich um eine Strategie des bakteriellen Systems handeln, um mit externem Stress um zu gehen. Wenige Zellen nehmen den Stress wahr und starten die Produktion von Toxin und Lysisprotein während die anderen Zellen nicht anschalten. Falls der externe Stress weiterhin andauert schalten mit der Zeit alle Zellen an. Diese Strategie sichert bei andauerndem Stress das Überleben der Gemeinschaft. Dieses Verhalten, dass Zellen über eine lange Zeit zu verschiedenen Zeitpunkten reagieren, wurde bereits für das Arabinose System in *E.coli* gezeigt und als zeitliche Heterogenität des Anschaltens beschrieben [77]. Aus den hier gezeigten Daten lässt sich

4. Ergebnisse

folgern, dass die zeitliche Heterogenität im Anschalten eine charakteristische Eigenschaft des Colicin E2 Operons für geringe Mitomycin C Konzentrationen (geringer Stress für die Bakterien) darstellt.

Bei einer Erhöhung des Stresslevels (höhere Mitomycin C Konzentration) geht die Heterogenität sukzessive verloren. Hierbei zeigte sich dass alle Zellen in einem Zeitfenster von 15 min auf den angelegten Stress reagieren, was einen Verlust der Heterogenität gleich kommt. Allerdings tritt auch hier die erste Reaktion nicht schneller als 45 min nach Induktion auf, was auf die Wirkung des AsnC hindeutet [89]. Die Daten in Abbildung 4.4 zeigen einen Übergang zwischen den verschiedenen Antworttypen bei mittleren Mitomycin C Konzentrationen. Das Verhalten bei kleinen Mitomycin C Konzentrationen kann unter Umständen von stochastischen Fluktuationen der Proteine des SOS Systems [7], der DNA Reparatur [124] oder durch zelluläre Pumpen für die Aufnahme/Abgabe von Antibiotika [125, 126] beeinflusst werden. Diese Einflüsse können bei hohen Mitomycin C Konzentrationen, die eine maximale SOS Antwort hervorrufen, verloren gehen. Für die gesamte Population ist es sinnvoll, dass bei hohem Stress nahezu alle Bakterien die Produktion von Toxin und Lysisprotein starten, denn bereits eine überlebende Zelle würde ausreichen um eine neue Kolonie zu gründen. Je mehr Zellen zuvor Gift produziert und freigesetzt haben, umso höher ist die Chance, dass alle Konkurrenten getötet wurden und das Überleben der eigenen Spezies gesichert werden konnte.

Die letztendlich freigesetzte Menge an Toxin ist nicht über einen internen Schwellwert an Gift reguliert, sondern über die Expression des *cel* Gens und die anschließende Lyse der Zelle. Nichts desto weniger kann ein kleiner Einfluss der internen Konzentration an Colicin nicht ganz ausgeschlossen werden. Wenn äußerer Stress von einer Zelle sensiert wird, bevorzugt die gesamte Population eine schnelle Antwort im Vergleich zu einer Maximierung der Toxinproduktion. Dies zeigt sich in der Tatsache, dass die mittleren Fluoreszenzwerte der Zellen (mittlere Menge an produziertem Gift) im „AN“ Zustand nahezu unabhängig sind von der zugegebenen Mitomycin C Menge. Die Effektivität der Antwort der gesamten Population wird erhöht durch eine Erhöhung des Anteils der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden und somit das Gift produzieren und freisetzen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich die Regulationsmechanismen des Colicin E2 Operons und damit die Stärke und Art der Heterogenität der Colicin E2 Expression in Anpassung an Umweltfaktoren (äußerer Stress) verändern können [33]. Maximale Heterogenität der Colicin E2 Expression im Bezug auf den Anschlagzeitpunkt und die Anzahl der anschaltenden Zellen, zeigt sich daher bei geringen bis mittleren Stresstärken. Dies betont die biologische Signifikanz der phänotypischen Heterogenität in der Colicin E2 Expression, sich die Möglichkeit offen zu lassen schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Realisiert wird diese Reaktion durch ein Umschalten von basaler phänotypischer Heterogenität, über die Zwischenstufe des zeitlich heterogen verteilten Anschaltens hin, zu einem synchronisierten Start der Expression des Colicin E2 Operons. Eine hohe Toxinmenge wird durch Steigerung der Synchronisation der Abgabe und nicht durch eine Erhöhung der Toxinabgabe einzelner Zellen erreicht.

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Toxinproduktion und Abgabe

Um das Überleben der eigenen Population zu sichern, muss ein Stamm der Toxin produziert einen Wettbewerbsvorteil gegenüber seinen Mitbewerbern durch die Produktion des Toxins erhalten, da sonst die Produktion eines weiteren Proteins (Toxin) auf Grund der Schonung von Ressourcen nicht ablaufen würde. Eine Möglichkeit einen Vorteil zu erlangen, ist die in den vorigen Kapiteln beschriebene Strategie, die Expression auf die Stärke des externen Stresses anzupassen. Eine weitere Möglichkeit würde das Auftreten eines zeitlichen Versatzes zwischen der Expression des Toxins und des Lysisgens darstellen, da sich in diesem Fall das Toxin im Bakterium anreichern würde und somit eine höhere und damit effektivere Menge an Toxin bei der Lyse jeder Zelle freigesetzt werden würde. Im Folgenden wird analysiert ob im Stamm EMO3-C ein zeitlicher Versatz zwischen der Toxin (*cea*) und Lysisgen (*cel*) Expression vorliegt. Um einen Vorteil gegenüber Konkurrenten zu erhalten sind für Toxin produzierenden

4. Ergebnisse

de Bakterien zwei Dinge essentiell, zum Einen die Ausschüttung hoher Toxinkonzentrationen und zum Anderen das möglichst schnelle Erreichen einer effektiven Toxinkonzentration. Dies kann durch die Verhinderung der Ausscheidung kleiner Toxinmengen erreicht werden. Eine Möglichkeit hierzu würde ein zeitlicher Versatz zwischen dem Start der Toxinproduktion und seiner Abgabe durch Zellyse darstellen. Dadurch wäre es dem Bakterium möglich eine effektive Konzentration von Toxinmolekülen zu produzieren, bevor der Zelltod durch Lyse eintritt. Betrachtet man die zeitlichen Verläufe der Toxin Expression und Abgabe einzelner Zellen im Stamm EMO3-C, der neben dem Reporterplasmid pMO3 das originale Plasmid pColE2-P9 enthält, zeigt sich im Vergleich der Expression von *cea* und *cel* jeder einzelnen Zelle, dass im Mittel nur ein sehr kurzer zeitlicher Versatz (siehe Tabelle C.1) erkennbar ist (für eine Zelle ist der zeitliche Versatz in Abbildung 4.8 dargestellt). Der zeitliche Versatz wird zu jeder Zelle, die sowohl in YFP als auch in CFP in den „AN“ Zustand wechselt, als diejenige Differenz bestimmt, die zwischen den jeweiligen Anschaltpunkten liegen (siehe Gleichung 4.3).

$$\Delta t_{CeaCel} = t_{OnCel} - t_{OnCea} \quad (4.3)$$

Für Messungen im Stamm EMO3-C (Reporterplasmid und Originalplasmid pColE2P9 enthalten) zeigt sich aus dem Mittelwert der Histogramme für die Zeitverzögerungen (siehe Abbildung C.1), dass in diesem Stamm die Expression des Lysisgens (*cel*) direkt nach der Expression des Giftes (*cea*) beginnt und kein zeitlicher Versatz erkennbar ist. Die Mittelwerte der Histogramme bewegen sich für die verschiedenen Konzentrationen des externen Stressors zwischen -0.2 ± 2.2 min und 8.8 ± 2.4 min (siehe Tabelle C.1). Diese Werte liegen alle unterhalb der Auflösungsgrenze der Messungen von 15 Minuten, was somit für die Gleichzeitigkeit des Beginns der Expression von *cea* und *cel* spricht. Im Mittel ist zu beobachten, dass mit steigender Mitomycin C Konzentration die Breite der Verteilungen in den Histogrammen der zeitlichen Verzögerung abnimmt. Dieser Effekt ist auf die Synchronisation der Expression [33] die im Kapitel 4.1 bereits beschrieben wurde, zurückzuführen.

Da im Stamm EMO3-C ist kein zeitlicher Versatz zu erkennen ist, stellt sich die Frage, ob

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

dies einen von der Natur gewollten Effekt darstellt oder ob es sich hier um ein Artefakt der Messungen handelt. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, betrachten wir in den folgenden Kapiteln den Stamm EMO3-S, der im Gegensatz zum Stamm EMO3-C das Plasmid pColE2-P9 nicht enthält. EMO3-S enthält nur das Reporterplasmid pMO3 (siehe Kapitel 3.1 und Tabellen D.2 und D.4) und kann somit das originale Toxin und Lysisprotein nicht bilden. Dies führt zu einer längeren Messbarkeit als beim Stamm EMO3-C, da es im Stamm EMO3-S nicht zur Zelllyse, hervorgerufen durch das Lysisprotein des Colicin E2 Operons, kommen kann. Dieser Stamm wird in den folgenden Kapiteln 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.4 genutzt um gezielt den Einfluss der transkriptionellen und der post-transkriptionellen Regulation, auf die Expression des Colicin E2 Operons und den zeitlichen Versatz zu untersuchen.

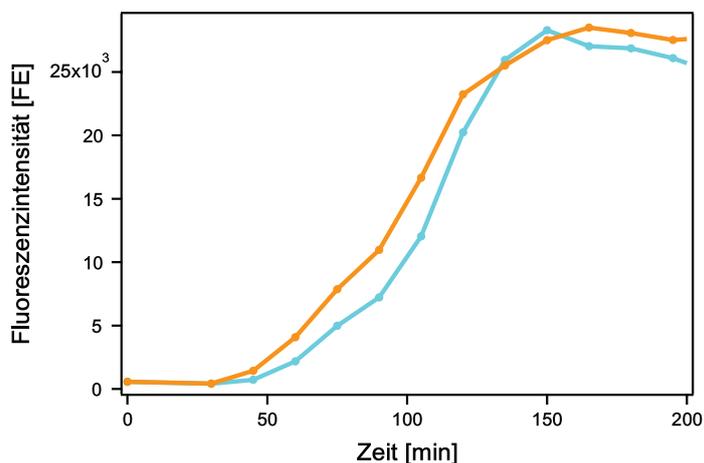


Abbildung 4.8.: Bestimmung der Zeitverzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel*: Im Graph sind exemplarisch die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensitäten einer Zelle für die Expression von *cea* (YFP, gelb) und *cel* (CFP, blau) dargestellt. Die Verzögerung wird bestimmt aus der Differenz der Zeitpunkte zu denen die jeweiligen Zellen in den „AN“ Zustand (siehe Kapitel 3.4.2) der Expression von YFP bzw. CFP wechseln.

Wird die zeitliche Verzögerung für den Stamm EMO3-S, der nur das Reporterplasmid pMO3, nicht aber das original Plasmid pColE2-P9 enthält, berechnet, ergeben sich mittlere Verzögerungen, die für die eingesetzten Mitomycin C Konzentrationen die im Bereich von 65 ± 7 min bis 84 ± 6 min liegen (siehe Tabelle C.2 und Abbildung 4.9), gemittelt über alle Mitomycin C Konzentrationen ergibt sich eine zeitliche Verzögerung von 75 ± 6 min. Sowohl die mittlere zeitliche Verzögerung an sich, als auch die Breite der Verteilungen hängen nicht von der

4. Ergebnisse

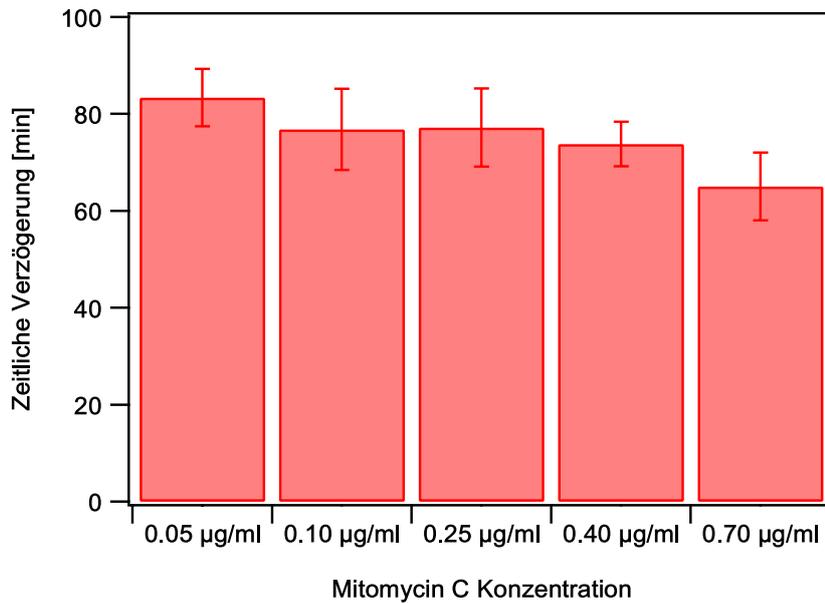


Abbildung 4.9.: Zeitverzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* im Stamm EMO3-S: Darstellung der mittleren Zeitverzögerung zwischen dem Einsetzen der Expression von *cea* und *cel* für unterschiedliche Mitomycin C Konzentrationen in Minuten. Der eingetragene Fehler stellt den Standardfehler der Mittelwertbildung dar.

Mitomycin C Konzentration ab (siehe Abbildung 4.9 und Tabelle C.2).

Aus den Histogrammen zur zeitlichen Verzögerung (siehe Abbildung C.2) wird deutlich, dass es sich nahezu unabhängig von der Stärke des Stresses (Mitomycin C Konzentration) um eine breite Verteilung ohne erkennbare Präferenzen handelt. Nur bei sehr hohem Stress (0.40 µg/ml und 0.70 µg/ml Mitomycin C) ist eine leichte Tendenz einer Verschiebung zu kürzerer Verzögerung erkennbar, was sich aber nur wenig auf den Mittelwert und die Standardabweichung auswirkt. Für 0.00 µg/ml Mitomycin C ist auf Grund der geringen Zahl an Zellen die Colicin E2 spontan exprimieren [51], die erreichbare Statistik zu klein, um eine Aussage über die mittlere Zeitverzögerung zu treffen.

Zwischen den Stämmen EMO3-C und EMO3-S gibt es also einen großen Unterschied im Bezug auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Toxin und der Lysis Gen Expression. Der Stamm EMO3-C zeigt im Mittel keine zeitliche Verzögerung, der Stamm EMO3-S exprimiert

hingegen das Lysisgen mit einer Verzögerung von 75 ± 6 min im Mittel über alle Mitomycin C Konzentrationen. Tritt kein zeitlicher Versatz auf deutet dies auf eine Strategie hin, bei der der Schnelligkeit der Toxinfreisetzung mehr Gewicht beigemessen wird als der Toxinmenge. Die Stämme EMO3-S und EMO3-C unterscheiden sich nur durch das original Plasmid pColE2-P9, das dem Stamm EMO3-S im Gegensatz zu EMO3-C fehlt. Zwei Effekte könnten durch die Abwesenheit des originalen Plasmides auftreten. Zum Einen verändert sich die Anzahl an Plasmiden pro Zelle, zum Anderen könnte das Toxin oder das Lysis Gen selbst, das im Reporterplasmid nicht mehr codiert ist (siehe Kapitel 3.1) einen Einfluss auf die Regulation ausüben. Die Anzahl an Plasmiden sollte eine untergeordnete Rolle spielen, da das Reporterplasmid das vom pBAD System abstammt mit circa 55 Kopien pro Zelle [80, 81] (siehe Kapitel 3.1) und einer relativ kleinen Varianz von 7.5 Plasmiden [77] die dominante Rolle im Vergleich zum Plasmid pColE2-P9 mit 10-20 Plasmiden pro Zelle [32, 37] einnimmt. Die Plasmidanzahl könnte die Regulationen beeinflussen, da mehr Plasmide in gleicher Art und Weise reguliert werden müssen, könnte es zu einem Titrationseffekt kommen und die in der Regulation involvierten Proteine LexA und CsrA nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Ein Einfluss auf LexA kann nahezu ausgeschlossen werden, da nach Butala *et al.* [24] ungefähr 20 % des in der Zelle vorhandenen LexA frei ist, was einer Anzahl von ungefähr 240 Molekülen entspricht. Daher sollte eine Veränderung um 40 Bindestellen (maximal 20 Plasmide mit je einer doppelten Bindestelle für LexA) hier keinen messbaren Einfluss zeigen. Ein Vergleich der Histogramme für die Stämme EMO3-C und EMO3-S (siehe Abbildung 4.10), die den Zeitpunkt des Wechsels in den „AN“ Zustand zeigen (siehe Kapitel 3.4.2), ergibt für die Expression des Toxin Gens (YFP Expression) nahezu keinen Unterschied. Daher kann die beobachtete Veränderung in der zeitlichen Verzögerung nicht von einer Verschiebung der Expression des Toxins zu früheren Zeiten, im Stamm EMO3-C im Vergleich zum EMO3-S, kommen.

In den Histogrammen für die Expression des Lysisgens hingegen ist ein eindeutiger Unterschied erkennbar. Während im Stamm EMO3-C das Lysis Gen gleichzeitig mit dem Toxin Gen exprimiert wird und in den Anschaltzeiten, für Stressorkonzentrationen höher als $0.10 \mu\text{g/ml}$, sich eine relativ schmale Verteilung mit Mittelwerten um 75 min zeigt (siehe Ab-

4. Ergebnisse

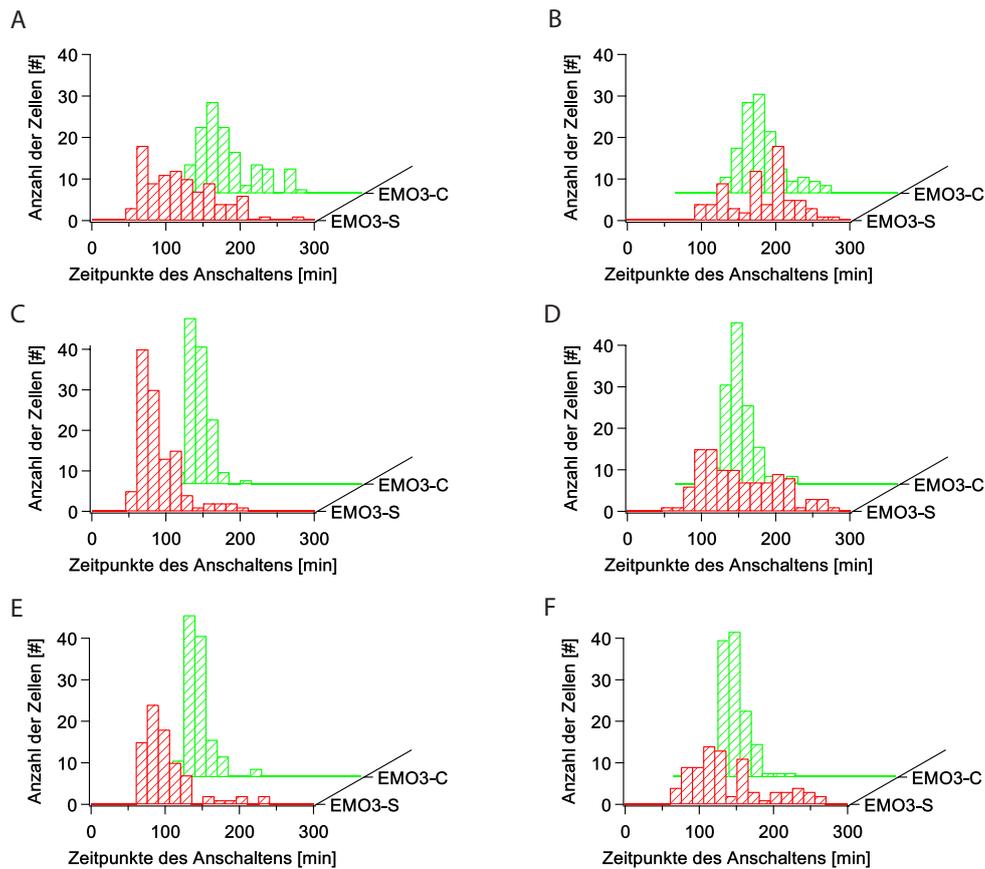


Abbildung 4.10.: Vergleich der Histogramme für das Anschalten der Expression von *cea* (YFP) und *cel* (CFP) in den Stämmen EMO3-C und EMO3-S: Dargestellt ist der Vergleich der Histogramme für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen (A und B: 0.10 µg/ml; C und D: 0.25 µg/ml; E und F 0.40 µg/ml). Die Teile A,C,E zeigen die Histogramme für die Expression von *cea*, die Teile B,D,F die Histogramme für die Expression von *cel*. Die Stämme EMO3-C und EMO3-S sind in den Farben grün und rot dargestellt.

bildung B.2), wird das Verhalten von EMO3-S im Anschalten des Lysis Gens durch eine breite Verteilung mit zu späteren Zeitpunkten verschobenen Mittelwerten gekennzeichnet (Teile B,D,F in Abbildung 4.10). Somit zeigt sich, dass der Unterschied in der zeitlichen Verzögerung zwischen den Stämmen EMO3-C und EMO3-S, durch eine Beeinflussung der Elemente der post-transkriptionellen Regulation hervorgerufen wird. Eine Titration von CsrA hervorgerufen durch die unterschiedliche Zahl an Plasmiden in beiden Stämmen ist auf Grund der Fülle der CsrA Proteine pro Zelle [48, 121] unwahrscheinlich. Ein möglicher Einfluss auf die Regulation könnte durch das gebildete Toxin ausgeübt werden, das nach Pugsley *et al.* [116]

und Ghazaryan *et al.* [115] eine Selbstinduktion, durch Schädigung der DNA der eigenen Zelle, hervorrufen kann. Die Ergebnisse aus den Stämmen EMO3-C und EMO3-S deuten darauf hin, dass auf Grund des sehr ähnlichen Verhaltens der Expression von YFP (*cea* Expression) in beiden Stämmen (Abbildung 4.10) [33] die Selbstinduktion durch das Toxin im Rahmen der Regulation nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Durch die weiteren Elemente des Plasmids pCOLE2-P9 (siehe Kapitel 3.2) könnten, neben der autonomen Replikation („rolling circle replication“) [98, 99], weitere auf dem Plasmid codierte Proteine (siehe Kapitel 3.2) eine Rolle spielen. In den folgenden Kapiteln wird daher untersucht welche regulatorischen Elemente den zeitlichen Versatz zwischen der Expression von *cea* und *cel* beeinflussen können um zu verstehen warum sich die Stämme EMO3-C und EMO3-S in ihrem zeitlichen Versatz so deutlich unterscheiden.

4.2.1. Einflussfaktoren auf die transkriptionelle Regulation

In diesem Kapitel soll analysiert werden inwiefern die transkriptionelle Regulation die zeitliche Verzögerung zwischen *cea* und *cel* beeinflusst. In diesem Kapitel wird ebenso wie in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.3 der Stamm BZB1011 mit einem veränderten Reporterplasmid verwendet um den Einfluss der Elemente der transkriptionellen Regulation auf den zeitlichen Versatz zu analysieren.

Um Veränderungen in der transkriptionellen Regulation zu erreichen, wurden die in Kapitel 3.1 erzeugten punktuell veränderten Plasmide pMO4 und pMO5 verwendet. Durch diese Mutationen wird die Transkriptionsrate des Operons, durch Mutationen im Bereich der Bindestelle für LexA, verändert. Auf Grund dessen sollte ein Einfluss auf die Genexpression der einzelnen Bestandteile des Operons, sowie auf die Dynamik der Expression und damit auch auf den zeitlichen Versatz der Expression von *cea* und *cel* messbar sein. Die Experimente wurden analog zur Beschreibung in Kapitel 3.3 durchgeführt. Nach ihrer Transformation in den Stamm BZB1011 werden die entstehenden Stämme, wegen ihrer fehlenden Eigenschaft

4. Ergebnisse

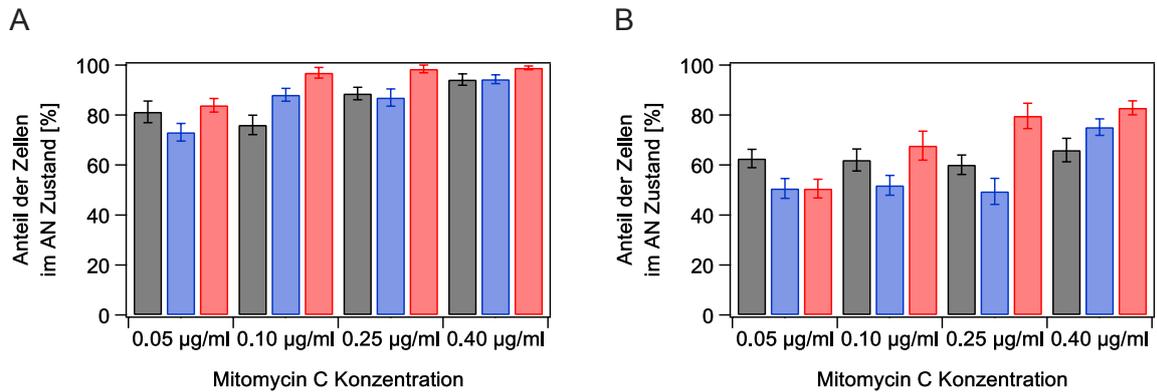


Abbildung 4.11.: Vergleich der prozentualen Anteile für YFP und CFP der Zellen im „AN“ Zustand:

Für die Stämme EMO3-S (rot), EMO4-S (blau) und EMO5-S (schwarz) wird der Anteil der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden (siehe Kapitel 3.4.2) beschrieben. In Teil A sind die Anteile der Zellen die im Bezug auf die YFP Fluoreszenz den „AN“ Zustand, in Abhängigkeit von verschiedenen Mitomycin C Konzentrationen erreicht haben, gezeigt. Im Teil B ist der Graph im Bezug auf die CFP Fluoreszenz zu sehen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

das Toxin und das Lysisprotein zu produzieren, EMO4-S und EMO5-S genannt (siehe Tabelle D.4). Die Mutation im Plasmid pMO4, das in den Stamm EMO4-S transformiert wurde, sollte zu einer Verbesserung der Bindung von LexA an die SOS Box (sich überlappende doppelte Bindestelle für LexA) des Plasmides führen, da sich der HI Wert für die Bindungsstärke dem Optimum annähert. In Abbildung 4.11 ist im Vergleich der roten (EMO3-S) und der blauen Balken (EMO4-S) im Teil A zu sehen, dass der Anteil der Zellen die in den „AN“ Zustand wechseln für die YFP Fluoreszenz (*cea* Expression), für alle gemessenen Mitomycin C Konzentrationen, im Stamm EMO4-S im Mittel niedriger ist als im Stamm EMO3-S. Auf Grund der besseren Anbindung von LexA an die Bindestelle zeigt sich hier der Einfluss von LexA auf die transkriptionelle Regulation. Der Anteil an Zellen die den Schwellwert für den „AN“ Zustand überwinden können, wird durch eine geringere Produktion von mRNA, hervorgerufen durch die bessere Bindung von LexA an die DNA, reduziert (siehe Kapitel 2.1, 2.2 und 3.4.2). Aus dieser Beobachtung kann auf ein Sinken der effektive Transkriptionsrate geschlossen werden.

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

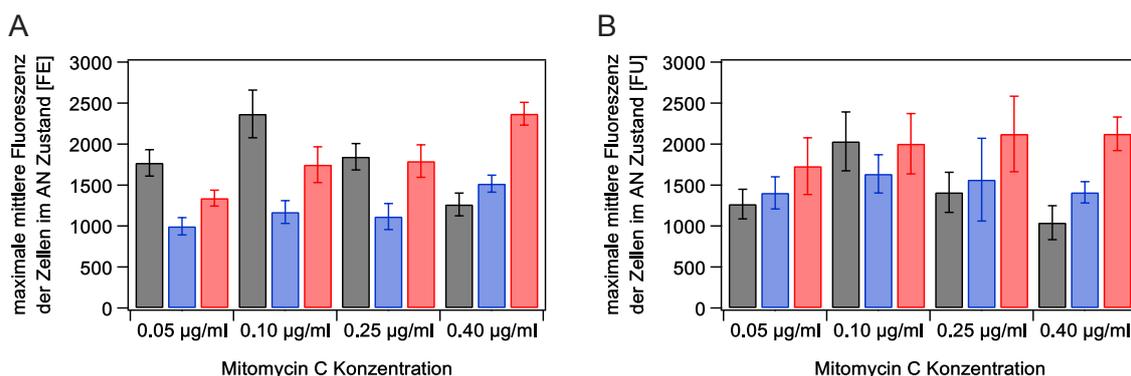


Abbildung 4.12.: Vergleich der mittleren Intensitäten aller Zellen im „AN“ Zustand für die Expression von *cea* (YFP) und *cel* (CFP): Die mittlere Fluoreszenz der Zellen im „AN“ Zustand wird für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen, zum Einen für YFP (Teil A) und zum Anderen für CFP (Teil B), gezeigt. In rot sind die mittleren Fluoreszenzwerte von EMO3-S, in blau von EMO4S und in schwarz von EMO5S dargestellt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung des Mittelwertes.

Für den Vergleich der Anteile der Zellen die in der CFP Fluoreszenz den Schwellwert überwinden (siehe Abbildung 4.11 Teil B) zeigt sich das gleiche Verhalten. Eine Ausnahme stellt hier die geringste eingesetzte Mitomycin C Konzentration von 0,05 µg/ml dar. Hier sind die Anteile nahezu gleich. Betrachtet man zusätzlich noch die Differenz aus den Anteilen von EMO3-S und EMO4-S zeigt sich mit Ausnahme des Wertes für CFP bei 0,05 µg/ml Mitomycin C ein zu höheren Mitomycin C Konzentrationen hin verschobenes Ansteigen des Prozentsatz der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden. Es zeigt sich für EMO3-S ein Anstieg des Prozentsatzes von $50 \pm 5\%$ bei 0,05 µg/ml Mitomycin C hin zu $80 \pm 5\%$ bei 0,25 µg/ml Mitomycin C. Bei dieser Konzentration erreicht der Prozentsatz der Zellen im „AN“ für den Stamm EMO3-S sein Maximum und bleibt bei Erhöhung der Konzentration des Stressors dann im Fehler gleich. Für den Stamm EMO4-S ist bis zur Konzentration von 0,25 µg/ml Mitomycin C kein Anstieg zu beobachten, für eine Stressorkonzentration von 0,40 µg/ml steigt hingegen dieser Anteil von $50 \pm 8\%$ auf $70 \pm 5\%$ an. In Übereinstimmung mit der stärkeren Bindung von LexA an das veränderte Colicin E2 Operon, ist also ein höherer Stress (hervorgerufen durch eine höhere Mitomycin C Konzentration) nötig um einen ähnlichen Anstieg im Anteil der Zellen im „AN“ Zustand zu erreichen.

4. Ergebnisse

In den mittleren Intensitäten der Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden (siehe Abbildung 4.12) zeigt sich das gleiche Verhalten, das in den Anteilen der Zellen im „AN“ Zustand beobachtet werden kann. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass auf Grund der stärkeren Bindung von LexA an die SOS Box des Plasmides, es dazu kommen könnte, dass in Zellen die sich im „AN“ Zustand befinden weniger mRNA gebildet wird. Somit würde im Anschluß auch weniger Protein translatiert, was zu einer geringeren Endintensität der einzelnen Zellen und somit auch zu einem geringen Mittelwert der Endintensitäten führen könnte. Die Diskrepanz zwischen den Mittelwerten der Endintensitäten der beiden Stämme nimmt mit steigender Mitomycin C Konzentration in YFP von 326 FE nach 715 FE und im CFP von 344 FE nach 853 FE zu. Dies zeigt sich in Abbildung 4.12 da sowohl für YFP als auch für CFP ein Anstieg der mittleren Fluoreszenz für den Stamm EMO3-S (rot) zu erkennen ist, der hingegen bei EMO4-S schwächer ausgeprägt in YFP bzw. in CFP nicht vorhanden ist.

Die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Es zeigt sich im Mittel, über die Mitomycin C Konzentrationen 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml und 0.40 µg/ml für den Stamm EMO4-S, eine zeitliche Verzögerung von 75 ± 18 min die im Fehler der gemittelten zeitlichen Verzögerung von EMO3-S entspricht. Da die Mutation des Plasmides pMO4 (siehe Kapitel 3.1 und Abbildung 3.3) nur die LexA Bindestelle betrifft, stellt dies einen Hinweis dar, dass die zeitliche Verzögerung von der transkriptionellen Regulation nur wenig beeinflusst wird.

Betrachtet man die Histogramme der Anschaltzeiten für die Expression von *cea* (t_{ON} YFP) und *cel* (t_{ON} CFP) im Mittel über die Mitomycin C Konzentrationen 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml und 0.40 µg/ml, so zeigt eine Signifikanzanalyse, bei der ein zwei Proben T-Test durchgeführt wurde, dass sich die Histogramme für die Anschaltzeiten von YFP zwischen den beiden Stämmen EMO3-S und EMO4-S signifikant unterscheiden. Die Verteilungen der Anschaltzeiten in CFP unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander. Die Veränderung der Bindestelle in EMO4-S wirkt sich also auf die Expression beider Proteine in ähnlicher Art und Weise aus, dies spiegelt auch die zeitliche Verzögerung wieder, die mit Ausnahme der geringsten Mitomycin C Konzentration im Fehler mit der zeitlichen Verzögerung von EMO3-S über-

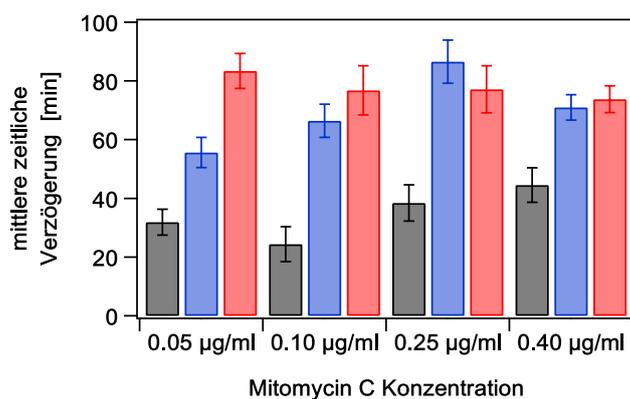


Abbildung 4.13.: Vergleich der zeitlichen Verzögerungen zwischen der Expression von *cea* und *cel* für die verschiedenen Stämme EMO3-S, EMO4-S und EMO5-S: Im Vergleich ist die zeitliche Verzögerung, der Mittelwert der jeweiligen Histogramme der zeitlichen Verzögerung der einzelnen Zellen (siehe Abbildungen C.2, C.3 und C.4), für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen gezeigt. Die mittlere zeitliche Verzögerung des Stammes EMO3-S ist in rot, die des Stammes EMO4-S in blau und die des Stammes EMO5-S in schwarz dargestellt, der eingetragene Fehlerbalken stellt den Standardfehler der Mittelwertbildung dar.

einstimmt. Für diese Betrachtung wurden die Ergebnisse für die Mitomycin C Konzentration 0.05 µg/ml außer Acht gelassen, da hier über alle untersuchten Stämme hinweg, oft Ergebnisse mit hohen Varianzen beobachtet wurden. Dies kann aus Tagesschwankungen, in der Aktivität des Stressors Mitomycin C, hervorgerufen zum Beispiel durch die Lagerung [127], die bei dieser geringen Konzentration besonders stark zum Tragen kommen würden, erklärt werden.

Durch die Verbesserung der Bindestelle im Plasmid pMO4 konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstärke von LexA einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation hat. Kamensek *et al.*[89] beschreiben in ihrer Arbeit einen weiteren Faktor, das Protein AsnC, das ebenfalls im Bereich der SOS Box bindet und einen zusätzlichen Einfluss auf die Bindung ausübt. Dieser sollte allerdings für pMO4 auf Grund der durchgeführten Veränderung im Plasmid nur eine untergeordnete Rolle spielen. In den Experimenten zeigte sich der erwartete Zusammenhang: durch die stärkere Bindung von LexA an die SOS Box des Plasmides pMO4 wird im Schnitt in weniger Zellen das System aktiviert. Außerdem zeigt sich, wenn das System aktiv ist, produziert es im Vergleich zum Stamm EMO3-S weniger Toxin und Lysis Protein.

4. Ergebnisse

Im Mittel ist auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* jedoch kein Einfluss erkennbar, was für eine rein transkriptionelle Regulation durch LexA in Kombination mit AnsC [89] spricht. Es konnte gezeigt werden, dass eine stärkere Bindung von LexA nicht nur mit einer geringeren Zahl von Zellen die das Toxin exprimieren und freisetzen, sondern auch mit einer geringeren Effektivität auf Grund geringer Produktionsmengen (Intensitäten von YFP und CFP) einhergeht. Für das biologische System ist es somit sinnvoll einen Mittelweg aus starker Bindung, damit es nur bei Gefahr zur Expression des Toxins und zum Tod durch Zellyse kommt und einer schwächeren Bindung die nötig ist für eine gesteigerte Effektivität durch eine erhöhte Anzahl von Produzenten, zu finden. Daher ist im Plasmid pColE2-P9 nicht die für *E.coli* optimale Bindesequenz realisiert, sondern eine Sequenz die für das Bakterium zum bestmöglichen Erfolg führt. Insgesamt zeigen sich in den Experimenten nur geringe Veränderungen. Dies lässt darauf schließen, dass die auf die Konsensussequenz nach Lewis *et al.* [83] bezogen relativ schlechte Bindestelle des Originalsystems (siehe Kapitel 3.1) ausreicht, um das Operon in der exponentiellen Phase total zu reprimieren. In dieser Arbeit wird die Konsensussequenz der LexA regulierten Gene in *E. coli* verwendet. Gillor *et al.* [38] zeigen in ihrer Arbeit, dass viele Colicine bezogen auf die Konsensus Sequenz der Colicine sehr geringe HI Werte, also eine sehr hohe Übereinstimmung mit der, in der Arbeit von Gillor *et al.* [38] verwendeten, Konsensus Sequenz aufweisen. Dies deutet auf eine enge Verwandtschaft der einzelnen Colicine hin. Somit könnte die Regulation durch LexA und einen weiteren Spieler wie z.B. AsnC für die DNA degenerierenden [89] bzw. IscR für die Poren bildenden Colicine [128], ein globales Phänomen sein. Anzumerken bleibt, dass das Konzept der HI Werte stark von der verwendeten Menge und Art an Bindesequenzen zur Berechnung der Konsensussequenz abhängt und nur die Bindung von LexA beschreibt. Daher stellt sich die Frage, ob dieses Konzept für das Zusammenspiel zweier Regulatoren im Rahmen der transkriptionellen Regulation von Colicinen anwendbar ist.

Die Mutation in pMO5, die das in den meisten bekannten LexA Bindestellen konservierte erste CTG Motiv [83, 85] zu CCC verändert (siehe Kapitel 3.1), sollte damit zu einer schwächeren Bindung von LexA an die SOS Box führen. Der Vergleich der prozentualen Anteile der Zellen im „AN“ Zustand zeigt für YFP einen zu EMO4-S ähnlichen, geringern Anteil an

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

Zellen im „AN“ Zustand als bei EMO3-S (siehe Teil A Abbildung 4.11). Das gleiche Bild zeigt sich für die CFP Fluoreszenz, wobei hier zusätzlich noch kein Einfluss der Mitomycin C Konzentration auf den Anteil an Zellen im „AN“ Zustand zu erkennen ist (siehe Teil B Abbildung 4.11). Die Ergebnisse der Experimente deuten auf eine stärkere Bindung des LexA an die mutierte Bindungsstelle hin. Dieses würde im Gegensatz zur Voraussage der Bindestärke mit Hilfe der HI Werte stehen. Betrachtet man die mittleren Intensitäten der Zellen im „AN“ Zustand, zeigt sich für die YFP Fluoreszenz (*cea* Expression) ein sehr uneinheitliches Bild, das für geringe Mitomycin C Konzentrationen eine wesentlich höhere maximale mittlere Fluoreszenz als für den Stamm EMO3-S liefert. Bei höheren Konzentrationen zeigt sich ein umgekehrtes Bild (siehe Teil A Abbildung 4.12). Ein ähnlicher Verlauf ist auch für die mittleren Intensitäten der CFP Fluoreszenz (*cel* Expression) der Zellen im „AN“ Zustand zu erkennen (siehe Abbildung 4.12 Teil B). Insgesamt zeigt sich hier eine geringere mittlere Fluoreszenz als für den Stamm EMO3-S, wenn man den Wert für 0.10 µg/ml Mitomycin C außer Acht lässt. Die relativ hohe Expression von YFP deutet hier auf einen Einfluss auf die LexA Bindung hin, der außer für die höchste gemessene Konzentration von 0.40 µg/ml, den durch die HI Werte vorgegebenen Effekt zeigt. Die relativ starken Abweichungen in der Expression von CFP hingegen deuten auf einen Einfluss auf die post-transkriptionelle Regulation hin, der wenn nur die LexA Bindestelle verändert wird, nicht auftreten sollte. Betrachtet man die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* zeigt sich eine wesentliche Reduktion der Verzögerung im Vergleich zwischen EMO3-S und EMO5-S, von im Mittel über alle Mitomycin C Konzentrationen 75 ± 6 min bei EMO3-S zu 35 ± 19 min für EMO5-S (siehe Abbildung 4.13).

Diese Reduktion wird durch eine Verschiebung der Histogramme für die Anschaltzeitpunkte der jeweiligen Expression (*cea* oder *cel*) hervorgerufen (siehe Abbildung 4.14 und 4.15). Es zeigt sich eine Verschiebung der Histogramme für das Anschalten sowohl von *cea* (YFP) als auch von *cel* (CFP) im Stamm EMO5-S. Untersucht man diese Veränderungen mit Hilfe eines zwei Proben T-Tests auf ihre Signifikanz hin (Tabelle E.5), so zeigt sich im Mittel über die Mitomycin C Konzentrationen 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml und 0.40 µg/ml ein signifikanter Unterschied in den Anschaltzeitpunkten der Expression von *cea* (YFP). Im Gegensatz dazu sind

4. Ergebnisse

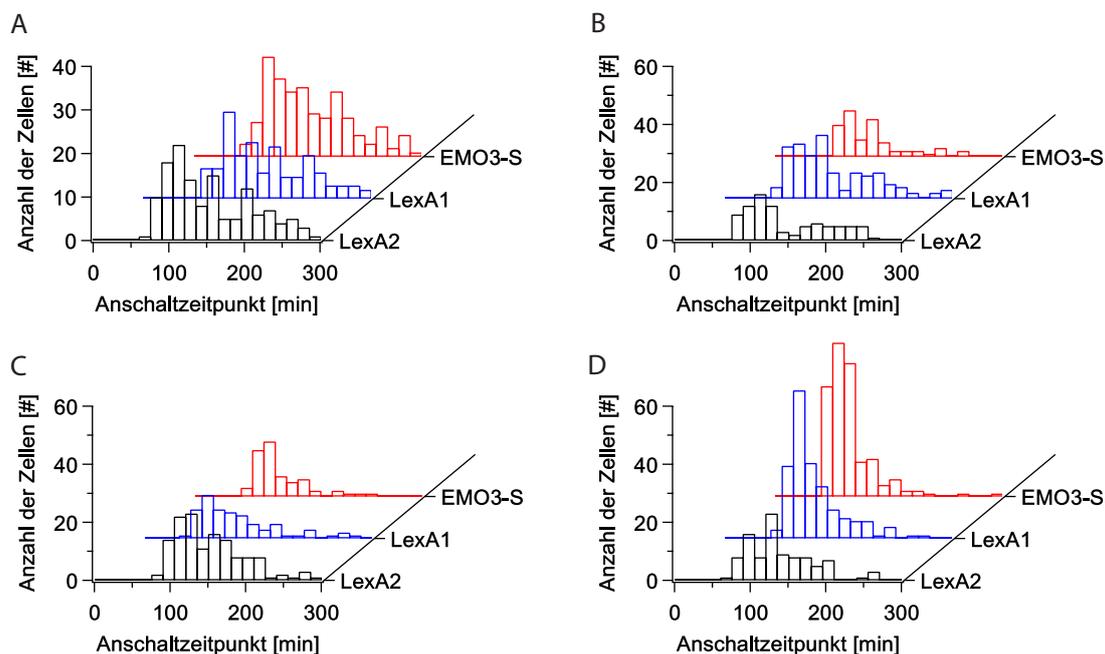


Abbildung 4.14.: Histogramme der Anschaltzeitpunkte für die Expression von *cea* (YFP): Für EMO3-S (rot), EMO4-S (LexA1, blau) und EMO5-S (LexA2, schwarz) sind die Histogramme für die Zeitpunkte des Anschaltens der Expression von YFP gezeigt. Teil A: 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C; Teil B: 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C; Teil C: 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C; Teil D: 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C.

die Veränderungen in den Anschaltzeitpunkten der Expression von *cel* (CFP) im Mittel nicht signifikant. Für die Analyse wurde, auf Grund ihrer Fehleranfälligkeit durch Tagesschwankungen in der Menge und/oder Aktivität des Mitomycin C, die geringste Konzentration von 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ außer Acht gelassen. Die Verkürzung der zeitlichen Verzögerung lässt sich demnach durch eine Verschiebung der Anschaltzeiten für YFP zu späteren Zeitpunkten bei nahezu gleich bleibender Verteilung der Anschaltzeitpunkte für CFP erklären. Die Bindung von LexA an das in der Mutante EMO5-S eingesetzte Plasmid pMO5 sollte nach dem Konzept der HI Werte [83] schlechter sein als zum pMO3 Plasmid des Stammes EMO3-S. Die Ergebnisse deuten aber auf Grund der Verschiebung der Anschaltzeitpunkte der YFP Expression zu späteren Zeitpunkten auf eine Erhöhung der Bindewahrscheinlichkeit von LexA an das Plasmid pMO5 im Vergleich zum Plasmid pMO3 hin. Das unerwartete Verhalten könnte durch den Einfluss weiterer Regulationsmechanismen auf die transkriptionelle Regulation des Colicin E2 Operons erklärt werden. Kamensek *et al.* [89] zeigen einen Einfluss von AsnC auf die

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

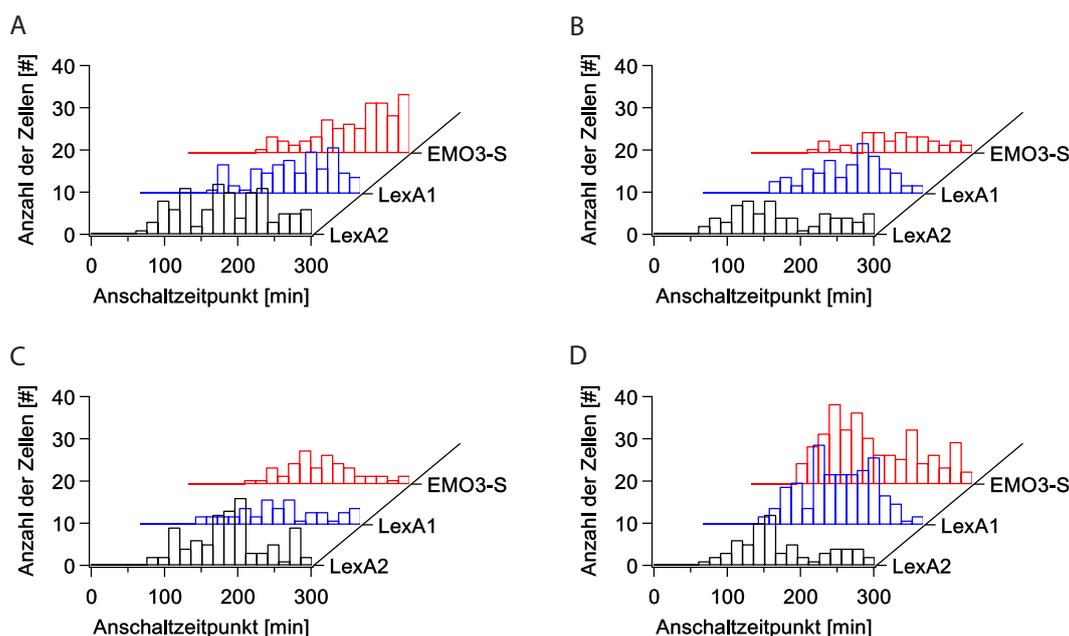


Abbildung 4.15.: Histogramme der Anschaltzeitpunkte für die Expression von *cel* (CFP): Für EMO3-S (rot), EMO4-S (LexA1, blau) und EMO5-S (LexA2, schwarz) sind die Histogramme für die Zeitpunkte des Anschaltens der Expression von CFP gezeigt. Teil A: 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C; Teil B: 0.10 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C; Teil C: 0.25 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C; Teil D: 0.40 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C.

Regulation des Colicin E2 Operons, wobei die *AsnC* Bindestelle mit den Bindestellen für LexA überlappt. Für die dem Colicin E2 sehr ähnliche Promotorregion des Colicin E8 [89] wurde gezeigt, dass es im Bereich der LexA Bindestellen zu einem Komplex aus zwei LexA Dimeren und zwei *AsnC* Oktameren, kommt der auf effektive Art und Weise die Transkription verhindert [89]. Sollte für das Colicin E2 ein ähnlicher Komplex gebildet werden, könnte es hier zu einer Veränderung der Charakteristik dieser Regulation gekommen sein, die die beabsichtigte Änderung durch die Mutation der LexA Bindestelle im Plasmid pMO5 überkompensieren könnte. Dieser Effekt könnte aber nicht erklären, warum sich die Verteilung der Anschaltzeitpunkte der *cel* Expression nicht verändert im Vergleich zum Stamm EMO3-S. Neben der transkriptionellen Regulation spielt die post-transkriptionelle Regulation, für die Produktion und Abgabe des Toxins, eine wichtige Rolle. Deren Einfluss auf die Translation des Lysisgens wird im folgenden Kapitel mit Hilfe verschiedener Mutationen der Bindestelle des *CsrA* auf dem Reporterplasmid untersucht.

4.2.2. Dynamik der Toxinabgabe unter dem Einfluss von CsrA auf die post-transkriptionelle Regulation

In diesem Kapitel soll untersucht werden inwieweit die post-transkriptionelle Regulation den zeitlichen Versatz zwischen der Expression von *cea* und *cel* beeinflusst. Der Focus liegt hier auf dem Einfluss des mRNA bindenden Proteins CsrA das die Translation des *cel* Gens inhibiert (Kapitel 2.1 und 2.3).

Das Colicin E2 Operon weist im Bereich des Terminators T1 zwei Stellen auf, an denen eine Anbindung von CsrA (siehe Kapitel 2.1 und Abbildung 2.2) erfolgen kann. Dies kann zur Regulation der Translation durch die Hemmung der Anbindung von Ribosomen an die Ribosombindestelle (RBS) des *cel* Gens führen. Diese Regulation wurde von Yang *et al.* [47] für Colicin E7, ein dem Colicin E2 in den Bindestellen homologes Colicin, der Gruppe der DNasen [32] postuliert. Für das Colicin E7 konnte gezeigt werden, dass die Veränderung von CsrA zu einer Verschiebung der Zellyse um circa 30 min hin zu kürzeren Zeiten führt [47]. Dabei wurde eine Mutante (TR1-5MG1655 [119]) verwendet, bei der nach der fünfzigsten Aminosäure des *CsrA* Gens eine Kanamycin Resistenz integriert wurde. Eine Deletionsmutante für CsrA ist nach Timmermans *et al.* [91], da es sich bei CsrA um ein konditionell essentielles Protein handelt, nicht möglich. Daher wurde in vielen Arbeiten mit einer Mutation gemessen bei der nach der 50-ten Aminosäure von CsrA eine Resistenzkassette eingefügt wird [47, 69, 91, 129, 130]. Diese Veränderung in der Länge des CsrA führt, da die Aminosäuren 51-54 mit an der Bindung an die RNA beteiligt sind, zu einer stark reduzierten Fähigkeit an die mRNA zu binden [73, 91]. Ein weiterer Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass alle anderen Regulationen an denen das Protein CsrA beteiligt ist [16, 131] nicht beeinflusst werden und somit nur der Effekt den die post-transkriptionelle Regulation auf das Colicin E2 Operon hat, beobachtet werden kann. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen der Dynamiken im Colicin E2 Operon nicht die Menge oder das CsrA Protein an sich verändert, sondern die Bindestellen direkt im Colicin E2 Operon.

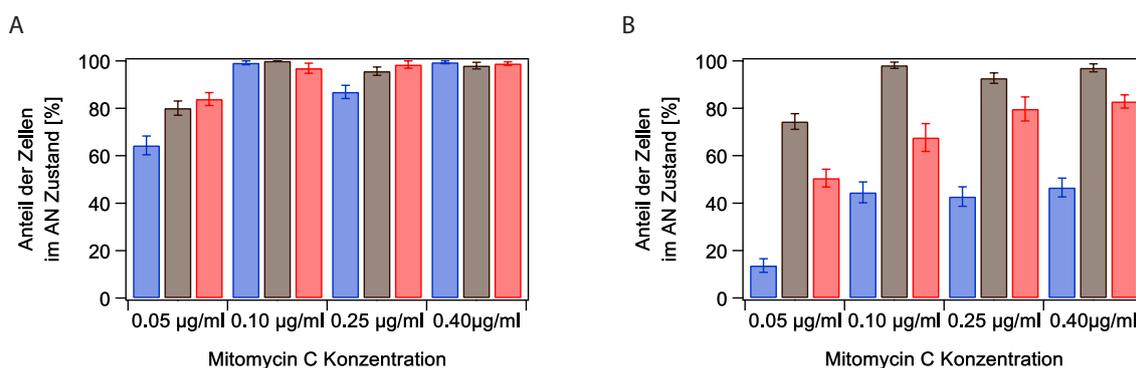


Abbildung 4.16.: Prozentualer Anteil der Zellen im „AN“ Zustand der Mutanten CsrA1, CsrA2 und EMO3-S im Vergleich für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen: Teil A: Anteile der Zellen die sich für die YFP (*cea*) Produktion im „AN“ Zustand befinden. In rot ist EMO3-S, in blau CsrA1 (verbesserte CsrA Bindestelle) und in schwarz CsrA2 (verschlechterte CsrA Bindestelle) dargestellt. Teil B: Anteile der Zellen die sich für die CFP (*cel*) Produktion im „AN“ Zustand befinden. EMO3-S in rot, CsrA1 in blau und CsrA2 in schwarz. Der gezeigte Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Mittelwertbildung dar.

Für die Untersuchung des Einflusses der post-transkriptionellen Regulation auf die Zellyse und die Dynamiken der Expression des Lysisgens im Colicin E2 Operon, wurden in der Masterarbeit von Alexandra Götz verschiedene Mutationen an den für die Bindung des CsrA maßgeblichen Stellen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1). Zum Einen wurde das CsrA Bindemotiv kurz vor dem Startcodon des Cel Proteins (siehe Abbildung 2.2) durch einen Austausch von 5'-GGAGTC-3' zu 5'-GGATGT-3' der Konsensus Sequenz für mRNA Bindestellen des CsrA Proteins angenähert [68]. Diese Veränderung in der Mutante CsrA1, sollte zu einer Verbesserung der Bindung des CsrA Proteins an die mRNA führen (siehe Kapitel 3.1). In einer zweiten Mutante wurden zum Anderen zwei Basen im Bereich des GGA Motivs von AC zu TT [40, 47] verändert (siehe Kapitel 3.1), was zu einer reduzierten Bindung von CsrA, auf Grund einer veränderten Sekundärstruktur der mRNA, führen sollte [40]. Im weiteren Verlauf wird diese Mutante als CsrA2 bezeichnet.

Betrachtet man die Anzahl der Zellen, die in den „AN“ Zustand wechseln, im Vergleich zwischen dem original Reporterplasmid pMO3 und den beiden Mutationen in der CsrA Bindung, so zeigt sich wie erwartet, dass für den transkriptionellen Anteil der Regulation (*yfp* Expression) nahezu keine Veränderungen erkennbar sind (siehe Abbildung 4.16 Teil A). Nur bei gerin-

4. Ergebnisse

gem Stress (0.05 µg/ml MitC) zeigt sich für die CsrA1 Mutante ein um 19% geringerer Anteil an Zellen die anschalten. Dies kann an einer größeren Varianz in den einzelnen Messungen liegen oder auch auf eine geringe Beeinflussung der Veränderung der CsrA Bindung im Bezug auf die transkriptionelle Regulation hindeuten. Für die Mutante CsrA2 ist im Vergleich zum Reporterplasmid pMO3 keine signifikante Veränderung in YFP erkennbar (siehe Abbildung 4.16). Der Prozentsatz der Zellen hingegen die das Lysisgen exprimieren (CFP Fluoreszenz) ist für beide Mutanten starken Veränderungen unterworfen. Die Mutante mit der stärkeren Bindestelle für CsrA (CsrA1) zeigt einen im Schnitt um 30% geringern Anteil an exprimierenden Zellen (siehe Abbildung 4.16). Das Plasmid mit der Mutation die zu einer schwächeren Bindung von CsrA führt (CsrA2) weist einen um bis zu 30% höheren Anteil an anschaltenden Zellen, im Vergleich zum Reporterplasmid pMO3, auf. Dieser Anteil ist bereits bei relativ geringem Stresslevel von 0.10 µg/ml Mitomycin C bei nahezu 100%. Somit schalten bereits bei geringem Stress alle Zellen die Expression des Lysisgens an. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit der post-transkriptionellen Regulation. Wäre diese nicht vorhanden oder stark beeinträchtigt (CsrA2), dann würden die meisten Zellen einer Population bereits zu einem sehr frühen und damit nicht sinnvollen Zeitpunkt lysieren. Dadurch würde nur eine geringe und damit auch weniger effektive Menge an Toxin freigesetzt werden. Dies deutet also darauf hin, dass die post-transkriptionelle Regulation notwendig ist, um Effektivität, im Sinne einer hohen Toxinmenge pro Zelle, zu erreichen. Betrachtet man die in Abbildung 4.17 dargestellten maximalen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Mutanten für die Expression von YFP (*cea* Expression) zeigt sich, im Durchschnitt über alle Konzentrationen, ein im Bereich des Fehlers gleiches Verhalten für den Stamm EMO3-S und die beiden CsrA Mutanten. Auftretende Abweichungen in diesem Verhalten können durch Veränderungen in der Aktivität des eingesetzten Stressors Mitomycin C erklärt werden. Die Konzentration des Stressors kann durch Fehler in der Präparation der Verdünnungsreihen, unterschiedliche Dauer der Lagerung [127] oder durch den Einsatz verschiedener Chargen und deren unterschiedlicher Aktivität variieren. Diese Variation wirkt sich auf Grund der Verwendung von geringen Konzentrationen (z.B. 0.05 µg/ml) auf den Stress aus, der auf die Bakterien ausgeübt wird. Daher kann es zwischen den einzelnen Messtagen zu Abweichungen kommen. Die Expression des *cel* Gens hingegen ist für alle Mitomycin C Konzentrationen signifikant unterschiedlich. Die maxima-

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

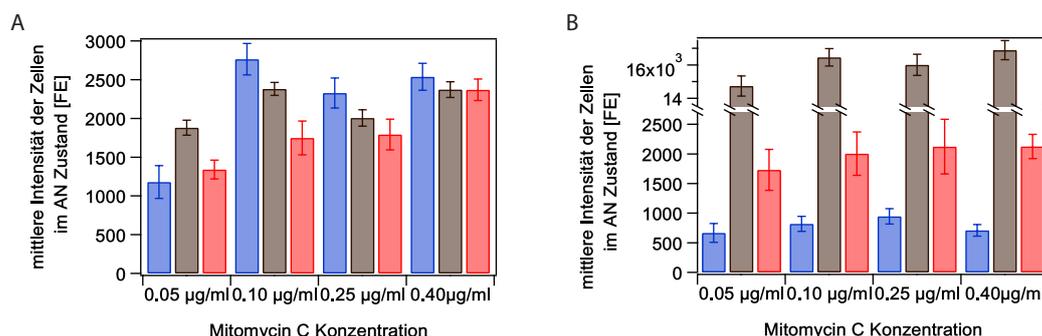


Abbildung 4.17.: Mittlere Intensität der Zellen im „AN“ Zustand im Vergleich zwischen CsrA1, CsrA2 und EMO3-S im Vergleich für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen: Teil A: Mittlere Intensitäten für die Expression von YFP (*cea*), EMO3-S in rot, CsrA1 in blau und CsrA2 in schwarz dargestellt. Teil B: Mittlere Intensitäten für die Expression von CFP (*cel*). Rot: EMO3-S; Blau: CsrA1; Schwarz: CsrA2; Die Y-Achse wurde wegen der besseren Darstellbarkeit der Unterschiede geteilt, der obere Abschnitt stellt den Bereich von 14000 - 17000 FE dar. Der eingezeichnete Fehlerbalken beschreibt die Standardabweichung der Mittelwertbildung.

len Fluoreszenzen der CsrA1 Mutante liegen im Mittel bei 900 FE, die FI_{max} , des Stammes der das Reporterplasmid pMO3 enthält, hingegen bei 1900 FE. Die Mutation bei der CsrA nur noch schlecht binden kann (CsrA2) führt zu einem extremen Anstieg in den Fluoreszenzwerten auf im Mittel 16800 FE. Die Daten zeigen, dass die Bindung von CsrA und somit die post-transkriptionelle Regulation, nicht nur die Anzahl der Zellen beeinflusst die das Lysisgen exprimieren, sondern auch die Stärke um das bis zu 8-fache (für CsrA2) verändern kann. Die Stärke der Veränderung die bei CsrA2 auftritt demonstriert die Wichtigkeit des CsrA Proteins für die Steuerung der Zellyse und damit für die Abgabe des Toxins.

Da die transkriptionelle Regulation und damit die Expression von *cea* (YFP) wie aus den Abbildungen 4.16 und 4.17 und den Histogrammen der Zeitpunkte des Anschaltens für YFP (siehe Abbildung 4.18) nahezu nicht verändert wird, entsteht die beobachtete Veränderung in der zeitlichen Verzögerung, zwischen der Expression von *cea* und *cel*, (siehe Abbildung 4.19) in erster Linie aus einer Veränderung in den Zeitpunkten des Anschaltens der Expression von *cel* (CFP).

4. Ergebnisse

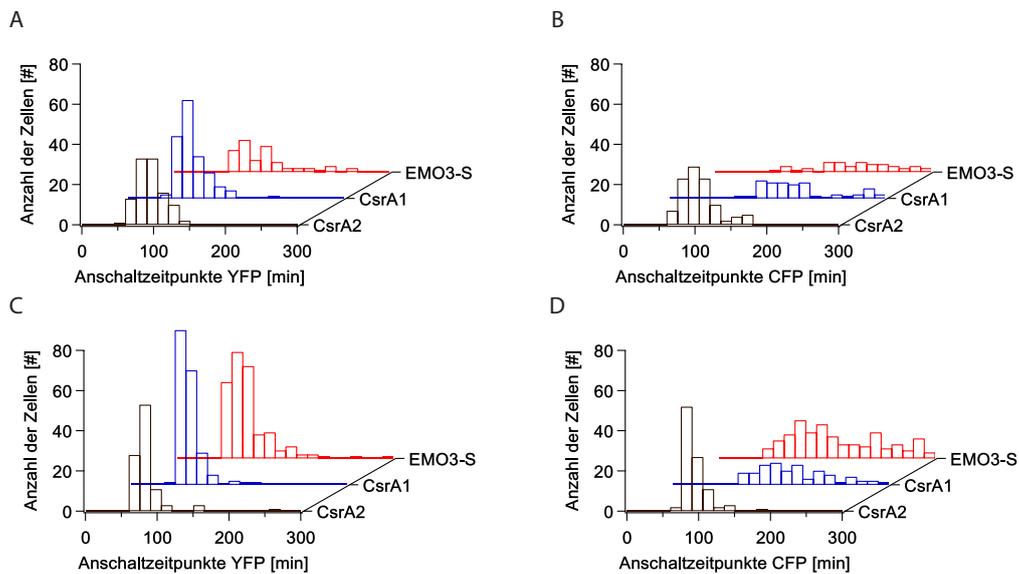


Abbildung 4.18.: Vergleich der Histogramme der Anschlagzeitpunkte t_{ON} für CsrA1, CsrA2 und EMO3-S: Teil A: Histogramme der Anschlagzeitpunkte t_{ON} der YFP Expression für eine Mitomycin C Konzentration von $0.10 \mu\text{g/ml}$, EMO3-S in rot, CsrA1 in blau und CsrA2 in schwarz dargestellt. Teil B: Histogramme der CFP Anschlagzeitpunkte für $0.10 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C, EMO3-S in rot, CsrA1 in blau und CsrA2 in schwarz. Teil C: Histogramme der Anschlagzeitpunkte der YFP Expression für $0.40 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C. Rot: EMO3-S; Blau: CsrA1; Schwarz: CsrA2; Teil D: Histogramme der Anschlagzeitpunkte der CFP Expression bei $0.40 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C.

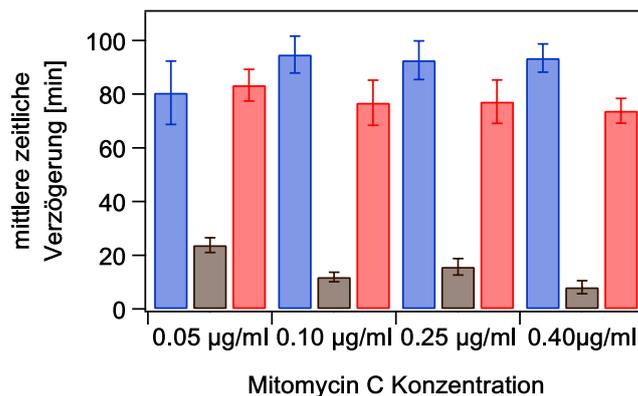


Abbildung 4.19.: Mittlere zeitliche Verzögerung von EMO3-S, CsrA1 und CsrA2 im Vergleich für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen: Die mittleren zeitlichen Verzögerungen sind für steigende Mitomycin C Konzentrationen in rot für EMO3-S, in blau für CsrA1 und in schwarz für CsrA2 dargestellt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwertbildung.

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

In Abbildung 4.19 zeigt sich, dass für die CsrA1 Mutante, bei einer Mitomycin C Konzentration von 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die zeitliche Verzögerung im Rahmen der Messunsicherheiten konstant bleibt. Mit steigenden Mitomycin C Konzentrationen ist eine Tendenz zu längeren Verzögerungen zu beobachten, es zeigt sich für drei der vier untersuchten Konzentrationen eine, im Vergleich zu EMO3-S leicht erhöhte, zeitliche Verzögerung von im Mittel 94 ± 6 min. Resultierend aus der Stärkung der Bindestelle für das CsrA an die mRNA, ist eine Verlängerung auch der erwartete Effekt. Dass der Effekt nur relativ klein ausfällt, lässt sich aus der nur kleinen Verbesserung, die innerhalb der schon relativ guten Bindestelle für das CsrA möglich war, erklären [68]. Die Mutation in CsrA2 erzeugt eine Veränderung der Sekundärstruktur [40, 47], ist damit Gegensatz zur Mutation in CsrA1 wesentlich signifikanter und beeinflusst durch die Reduktion der Bindestärke die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* sehr stark. Bei dieser schwachen Bindung von CsrA an die mRNA kommt es nahezu gleichzeitig zur Expression von *cea* und *cel*, was sich durch eine extreme Verkürzung der zeitlichen Verzögerung zwischen den beiden Genen auf im Mittel 12 ± 2 min zeigt. Diese Verkürzung ist für alle Mitomycin C Konzentrationen nahezu identisch, also weitestgehend unabhängig von der Konzentration des Stressors (siehe Abbildung 4.19). Die Ergebnisse zeigen die große Bedeutung der post-transkriptionellen Regulation für die Expression des Lysogens sowohl in der Stärke der Expression (siehe Abbildung 4.17 Teil B) als auch in der zeitlichen Verteilung des Beginns der Expression (siehe Abbildung 4.18 Teil B). Eine Verbesserung der Bindestelle führt, auf Grund der nativ bereits sehr starken Bindestelle [68], nur zu einer geringen Veränderung. Im Vergleich dazu, führt die Verschlechterung der Bindestelle zu einer großen Veränderung sowohl in der Verteilung der Startzeitpunkte der Expression, als auch in der Stärke der Expression des Lysogens, die um einen Faktor acht ansteigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Toxinabgabe vom globalen Regulator CsrA abhängt und daher durch Expression des Lysogens getriggert wird. Dadurch ist die Toxinabgabe mit dem Zustand der Zelle und auch, da es sich bei CsrA um einen Regulator des Kohlenstoffspeichersystems handelt [16], mit dem zur Verfügung stehenden Nahrungsangebot verknüpft. Durch die post-transkriptionelle Regulation über CsrA wird sicher gestellt, dass es nicht zur Bildung des Lysisproteins kommt, bevor eine effektive Menge an Toxin produziert wurde. Die starke Reduktion der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von

cea und *cel*, in der Mutante CsrA2 deuten darauf hin, dass der Unterschied in der zeitlichen Verzögerung, der zwischen den Stämmen EMO3-S und EMO3-C beobachtet wird, durch Veränderungen in der post-transkriptionellen Regulation über die Menge an verfügbaren CsrA Molekülen hervorgerufen wird.

Die Menge an verfügbarem CsrA wird unter anderem beeinflusst von den beiden sRNAs CsrB und CsrC. Daher beschäftigen sich das folgende Kapitel 4.2.3 mit den Veränderungen, die durch die beiden sRNAs hervorgerufen werden können.

4.2.3. Beeinflussung der post-transkriptionellen Regulation durch die sRNAs CsrB und CsrC

Wie im vorigen Kapitel beschrieben hat das mRNA-Bindeprotein CsrA einen starken Einfluss auf den zeitlichen Versatz zwischen der Expression des Toxins und des Lysisgens im Colicin E2 Operon. Die Menge an verfügbarem CsrA wird dabei unter anderem durch die zwei sRNAs CsrB und CsrC reguliert. Die sRNA CsrB besitzt 18 Bindemotive für CsrA [48] auf und kann somit im maximal 9 CsrA Dimere binden [48], CsrC hingegen bindet nur bis zu fünf Dimere CsrA [48]. Zur Untersuchung des Einflusses der beiden sRNAs auf die Regulation im Colicin E2 Operon wurden Deletionsmutanten für CsrB, CsrC und CsrB/C erstellt (vergleiche Kapitel 3.1). Nach Jackson *et. al* [132], zeigen Messungen einer Deletionsmutante der sRNA CsrB, für die Ausbildung von Biofilmen von *E.coli* Bakterien ähnliche Ergebnisse wie eine Überexpression von CsrA in der Zelle. Dieser vergleichbare Einfluss von fehlender sRNA und gesteigerter CsrA Menge, lässt sich auch für das Colicin E2 Operons vermuten. Daher wird um den Einfluss einer einzelnen sRNA zu untersuchen, der Stamm EMO3-S Δ CsrB (siehe Tabelle D.4) untersucht. Auf Grund der höheren Anzahl von Bindestellen im Vergleich zur sRNA CsrC, der Effekt größer sein als für eine Deletion von CsrC [48]. Dieser Bakterienstamm enthält ebenfalls das Reporterplasmid pMO3 und unterscheidet sich vom Stamm EMO3-S nur durch das Fehlen der genetischen Information für die sRNA CsrB. Betrachtet man die Anzahl

der Zellen die das Toxin exprimieren (*cea*, *yfp* Expression) zeigt sich für Deletionsmutante EMO3-S Δ CsrB eine Erhöhung des Prozentsatzes der Zellen auf 92% im Vergleich zu 84% Zellen im „AN“ Zustand für den Stamm EMO3-S, der das Reporterplasmid pMO3 enthält (siehe Teil A Abbildung 4.20). Für einen Bakterienstamm in dem zusätzlich noch die weitere sRNA CsrC deletiert ist (EMO3-S Δ CsrB/C, siehe Tabelle D.4) zeigt sich eine Erhöhung auf 98%. Diese Erhöhung kann nur bei geringen Stressor Konzentrationen (0.05 μ g/ml Mitomycin C) beobachtet werden, da bei höherem Stress, bei allen Stämmen bereits 100% der Zellen die Toxinproduktion im Laufe der Messzeit von fünf Stunden beginnen. Die Deletionen einer oder beider sRNAs sollte nur die post-transkriptionelle Regulation beeinflussen, da sowohl CsrB als auch CsrC viele CsrA Moleküle binden können [48], die transkriptionelle Regulation vermittelt durch LexA sollte hingegen unbeeinflusst bleiben. Allerdings könnte es durch die Abwesenheit einer oder beider sRNAs in der Zelle zu einer erhöhten Anzahl an freien CsrA Molekülen kommen, da bereits die Deletion einer sRNA mit einer Überexpression von CsrA gleichgesetzt werden kann [132]. Nach Gudapaty *et al.* [48] hat eine erhöhte Anzahl freier CsrA Moleküle einen Einfluss auf die Stressantwort und könnte deshalb die transkriptionelle des Colicin E2 Operons Regulation beeinflussen. Im Bereich der post-transkriptionellen Regulation (die CsrA regulierte Expression des *cel* Gens), sollte es durch das Fehlen konkurrierender Bindestellen (Deletion von CsrB oder CsrB/C) zu einer höheren Verfügbarkeit von CsrA Proteinen kommen und somit zu einem sinkenden Prozentsatz an Zellen, die das Lysisgen exprimieren.

Der Prozentsatz der das Lysisgen exprimiert, zeigt das erwartete Verhalten nur für die höheren Stressorkonzentrationen der Deletionsmutante für CsrB (siehe Teil B blaue Balken in Abbildung 4.20). Werden beide sRNAs deletiert kommt es zum gegenteiligen Effekt und der Prozentsatz der Zellen im „AN“ Zustand ist für alle Stressor Konzentrationen höher als für im Stamm EMO3-S (Teil B schwarze Balken in Abbildung 4.20). Der Unterschied wird, beginnend bei 30 Prozentpunkten bei 0.05 μ g/ml Mitomycin C, zu hohem Stress hin kleiner und befindet sich bei der höchsten untersuchten Konzentration 0.40 μ g/ml Mitomycin C dann bereits im Bereich des Fehlers der Messungen, also unterhalb von circa 10%. Betrachtet man die maximalen mittleren Fluoreszenzen der Zellen im „AN“ Zustand, zeigt sich, dass für die

4. Ergebnisse

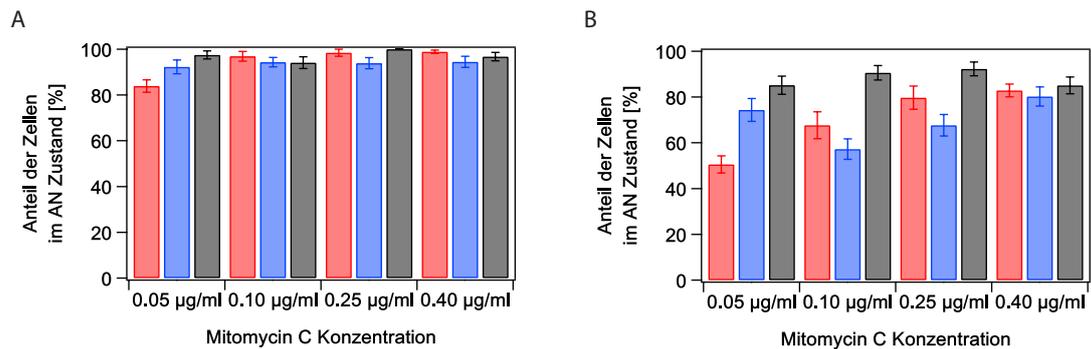


Abbildung 4.20.: Anteile der Zellen im ‘AN,’ Zustand im Vergleich zwischen EMO3-S, EMO3-SΔCsrB und EMO3-SΔCsrB/C bei unterschiedlichen Mitomycin C Konzentrationen: Teil A: Prozentuale Anteile der Zellen im ‘AN,’ Zustand für die Expression von YFP, EMO3-S in rot, EMO3-SΔCsrB in blau und EMO3-SΔCsrB/C in schwarz. Teil B: Prozentuale Anteile für die CFP Expression. Rot: EMO3-S; Blau: EMO3-SΔCsrB; Schwarz: EMO3-SΔCsrB/C. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung bei der Mittelwertbildung.

cea Expression (YFP Fluoreszenz), für die Deletion von CsrB nahezu kein Effekt erkennbar ist. Eine Ausnahme stellt der geringste Stresslevel (siehe Teil A Abbildung 4.21) dar, hier liegt der Wert der mittleren Fluoreszenz der Zellen im ‘AN’ Zustand beim 3-fachen Wert im Vergleich zu EMO3-S. Für die Deletion beider sRNAs, zeigt sich für alle Stressor Konzentrationen außer 0,40 µg/ml eine Erhöhung der maximalen mittleren Fluoreszenz, die vom 4-fachen bei der kleinsten Mitomycin C Konzentration, über das doppelte bei den beiden mittleren Konzentrationen, hin zum gleichen Wert bei der höchsten Konzentration abnimmt (siehe Teil A schwarze Balken Abbildung 4.21).

Betrachtet man die maximale mittlere Fluoreszenz der Expression des Lysisgens (*cel*) im Vergleich für die Stämme EMO3-S, EMO3-SΔCsrB und EMO3-SΔCsrB/C (siehe Teil B in Abbildung 4.21) so zeigt sich uneinheitliches Verhalten aus dem keine eindeutige Tendenz ablesbar ist. Betrachtet man die geringste Konzentration des Stressors so zeigen die beiden Deletionsmutanten im Vergleich zu EMO3-S den doppelten Wert, bei allen anderen Konzentrationen zeigt sich im Rahmen des Fehlers ein gleicher Wert mit Ausnahme von EMO3-SΔCsrB bei 0,40 µg/ml Mitomycin C. Hier liegt der Wert beim circa 1,5-fachen von EMO3-S. Die maximalen mittleren Fluoreszenzen deuten für den Stamm EMO3-SΔCsrB/C darauf hin, dass

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

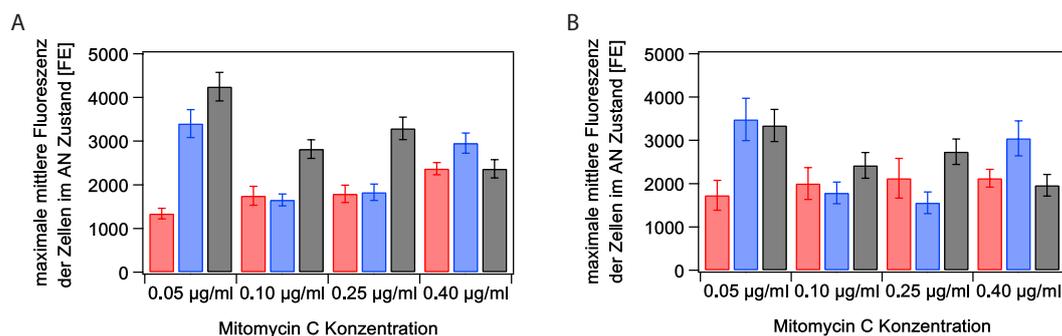


Abbildung 4.21.: Maximale mittlere Fluoreszenz der Zellen im „AN“ Zustand für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen im Vergleich zwischen EMO3-S, EMO3-SΔCsrB und EMO3-SΔCsrB/C: Teil A: Maximale mittlere Fluoreszenz für die YFP Expression. Rot: EMO3-S; Blau: EMO3-SΔCsrB; Schwarz: EMO3-SΔCsrB/C. Teil B: Maximale mittlere Fluoreszenz in CFP für EMO3-S (rot), EMO3-SΔCsrB (blau), EMO3-SΔCsrB/C (schwarz). Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung der Mittelwertbildung.

mit beginnender Expression des Operons diese stärker ist als im Stamm EMO3-S, was bedeuten würde das mehr Toxin produziert werden würde. Einhergehend mit einer im Schnitt ebenfalls erhöhten Expression des Lysigens könnte dies auch zu einer schnelleren Abgabe des Toxins führen. Für EMO3-SΔCsrB ist für die maximalen mittleren Fluoreszenzen (Abbildung 4.21) im Vergleich zum Stamm EMO3-S keine große Veränderung zu erkennen, was durch die gegenseitige Kompensation der deletierten sRNA CsrB und der weiteren sRNA CsrC erklärt werden könnte [50], das Fehlen einer sRNA wird dabei durch eine Überexpression der zweiten sRNA versucht auszugleichen.

Betrachtet man den Einfluss der Deletion der sRNAs auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression des *cea* und *cel* Gens, im Vergleich zwischen dem Stamm EMO3-S (rot), der Deletionsmutante CsrB (blau) und der Deletion von CsrB und CsrC (schwarz) in Abbildung 4.22, zeigt sich eine Reduktion der zeitlichen Verzögerung. Die Reduktion zeigt für die CsrB Mutante nur geringe Werte und liegt nur für die Stressor Konzentrationen 0,05 µg/ml und 0,40 µg/ml außerhalb des Fehlerbereiches. Die mittlere zeitliche Verzögerung der Deletion beider sRNAs beträgt 35 ± 14 min, gemittelt über alle Mitomycin C Konzentrationen (Abbildung 4.22 schwarze Balken) und ist für alle Mitomycin C Konzentrationen im Vergleich zum Stamm EMO3-S (im Mittel 75 ± 6 min) signifikant geringer. Die Ergebnisse aus den Abbil-

4. Ergebnisse

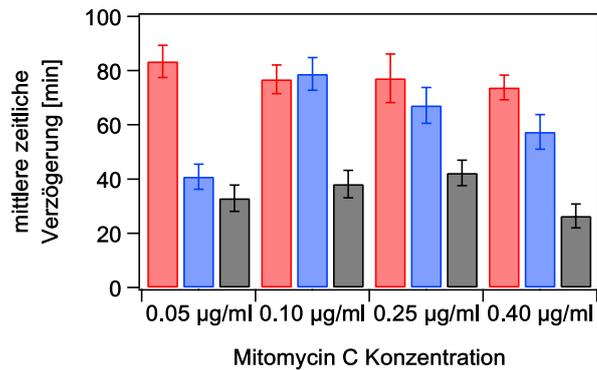


Abbildung 4.22.: Mittlere zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen im Vergleich der sRNA Mutanten: Die mittlere zeitliche Verzögerung wird für EMO3-S in rot, für EMO3-SΔCsrB in blau und für EMO3-SΔCsrB/C in schwarz dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwertbildung.

dungen 4.20, 4.21 und 4.22 zeigen alle für die Doppeldeletion von CsrB und CsrC eindeutigere Ergebnisse und größere Abweichungen im Vergleich zur Deletion der sRNA CsrB. Die geringeren Effekte der Deletion nur einer sRNA lassen sich mit der Kompensationswirkung der zweiten sRNA erklären [50]. Wird eine sRNA auf Grund der Deletion nicht mehr gebildet, wird von der Zelle das Fehlen der sRNA durch eine Überexpression der zweiten sRNA weitgehend ausgeglichen [50]. Die für die Doppelmutation beobachtete Verkürzung der zeitlichen Verzögerung kann verursacht werden durch ein im Mittel früheres Anschalten der Expression von *cel* oder durch eine Verzögerung, in der Expression von *cea*.

Die Verteilung der Anschaltzeitpunkte t_{ON} ist sowohl für die Expression von YFP als auch für die Expression von CFP, für die Stämme EMO3-SΔCsrB und EMO3-SΔCsrB/C, bereits bei geringen Mitomycin C Konzentrationen nicht mehr heterogen über fast die gesamte Messzeit verteilt, sondern wesentlich enger und zu kürzeren Zeiten hin verschoben (Abbildungen 4.23 und 4.24). Ein früheres Anschalten der Toxinexpression (YFP) deutet, da dieses hauptsächlich durch die SOS Antwort reguliert wird, auf eine Erhöhung des Stresslevels der Bakterien hin. Für die Deletion nur einer sRNA ist diese Verschiebung im Vergleich zur Deletion beider sRNAs nicht so stark ausgebildet. Diese Beobachtung erklärt aber noch nicht die Verkürzung der zeitlichen Verzögerung, die vor allem für den Stamm EMO3-SΔCsrB/C

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

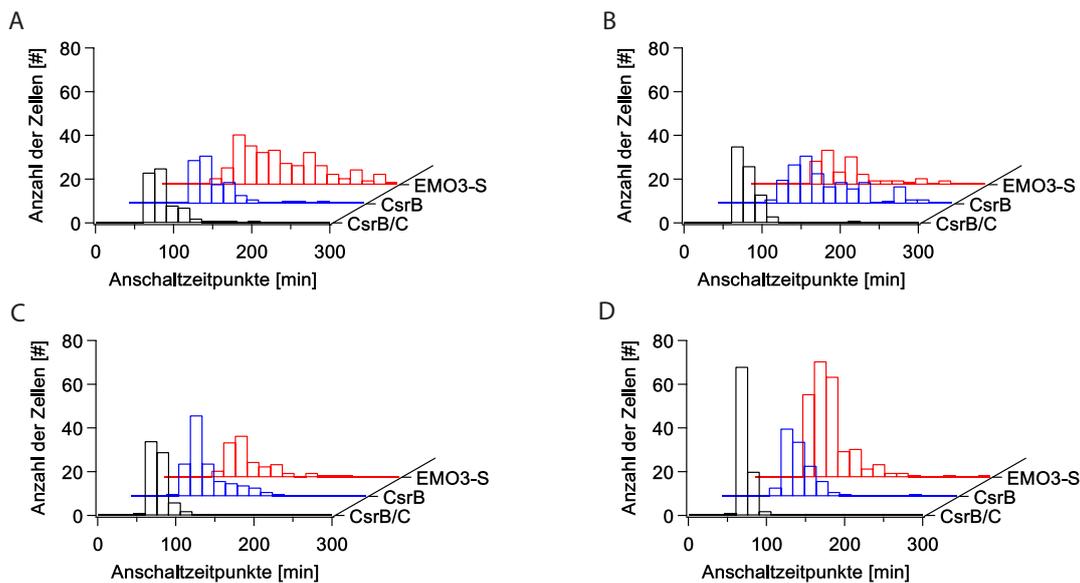


Abbildung 4.23.: Vergleich der Histogramme der Anschaltzeitpunkte t_{ON} der YFP Expression für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen im Vergleich von EMO3-S, EMO3-SΔCsrB und EMO3-SΔCsrB/C: Die Histogramme der Anschaltzeitpunkte t_{ON} sind für EMO3-S in rot, EMO3-SΔCsrB in blau (CsrB) und EMO3-SΔCsrB/C in schwarz (CsrB/C) dargestellt. Teil A zeigt die Histogramme für 0.05 µg/ml Mitomycin C, Teil B für 0.10 µg/ml, Teil C für 0.25 µg/ml und Teil D für 0.40 µg/ml.

sehr deutlich ist, da sie bei unverändertem Verhalten der Expression von *cel*, zu einer Verlängerung der zeitlichen Verzögerung führen würde. Betrachtet man die Abbildung 4.24 zeigt sich, dass die Verteilungen der Zeitpunkte des Anschaltens für die Expression von *cel* (CFP Fluoreszenz) vor allem für den Stamm EMO3-SΔCsrB/C, im Vergleich zu EMO3-S, für alle Stressor Konzentrationen, zu früheren Zeitpunkten hin verschoben und wesentlich schmaler sind. Daher resultiert die Verkürzung der zeitlichen Verzögerung letztendlich aus der Verschiebung der Verteilung der Anschaltzeitpunkte der Expression des Lysisgens (*cel*) hin zu früheren Zeitpunkten. Durch die gleichzeitige Verschiebung der Verteilung für YFP zu früheren Zeitpunkten, muss die Verschiebung der Anschaltzeitpunkte von CFP sehr stark sein um die Verschiebung von YFP zu kompensieren. Die Verschiebung beider Verteilungen deutet darauf hin, dass es sich dabei um einen gekoppelten transkriptionellen (YFP Verschiebung) und post-transkriptionellen Effekt handelt. Da die Verschiebung der Anschaltzeitpunkte der YFP Expression auf eine Erhöhung des Stresses der einzelnen Bakterie hin deutet, könnte ein Teil der Verschiebung der CFP Expression, durch die gleichartige Wirkung der transkrip-

4. Ergebnisse

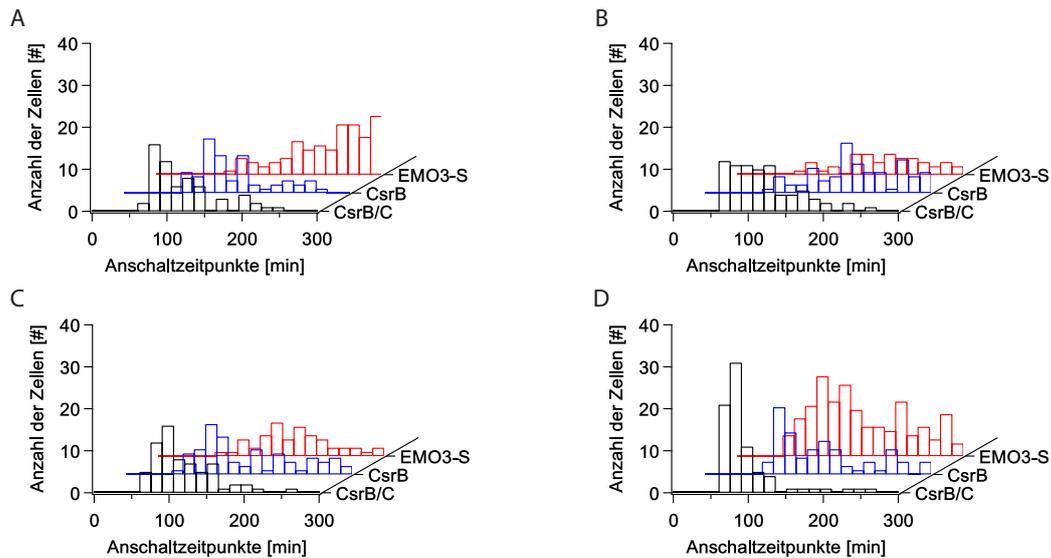


Abbildung 4.24.: Vergleich der Histogramme der Anschaltzeitpunkte t_{ON} der CFP Expression für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen im Vergleich von EMO3-S, EMO3-S Δ CsrB und EMO3-S Δ CsrB/C: Die Histogramme der Anschaltzeitpunkte t_{ON} sind für EMO3-S in rot, EMO3-S Δ CsrB in blau (CsrB) und EMO3-S Δ CsrB/C in schwarz (CsrB/C) dargestellt. Teil A zeigt die Histogramme für 0.05 μ g/ml Mitomycin C, Teil B für 0.10 μ g/ml, Teil C für 0.25 μ g/ml und Teil D für 0.40 μ g/ml.

tionellen Regulation auf die Expression beider Gene (analog zur Mutante EMO4-S), erklärt werden. Die Verschiebung der Anschaltzeitpunkte t_{ON} der *cel* Expression hin zu früheren Zeitpunkten lässt vermuten, dass es, anders als erwartet, eher zu einer Verarmung an verfügbarem CsrA kommt, als zu einer Vergrößerung der Menge an verfügbarem CsrA. Dafür können verschiedene Gründe vorliegen, zum Einen könnte es in der Zelle durch eine höhere Menge an freiem CsrA ein erhöhtes Stresslevel erzeugt werden [129], zum Anderen kann es durch die weiteren regulatorischen Eigenschaften des CsrA [16, 133] dazu kommen, dass sich die Zelle quasi in der stationären Phase befindet und dadurch für das Bakterium höherer Stress entsteht. Eine weiterer Erklärungsansatz lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass CsrA mindestens noch durch eine weitere sRNA (McaS [134]) beeinflusst wird. Hier könnte es für den Stamm EMO3-S Δ CsrB/C, wie auch bei der Δ CsrB Mutante vermutet, zu einer Überexpression kommen, die dann den Effekt der sRNA Deletionen unter Umständen sogar überkompensiert. Da es sich beim Csr Netzwerk um ein globales regulatorisches Netzwerk handelt [16, 18], mit z.B. dem weiteren Protein CsrD [22] oder dem regulatorischen Zweikomponen-

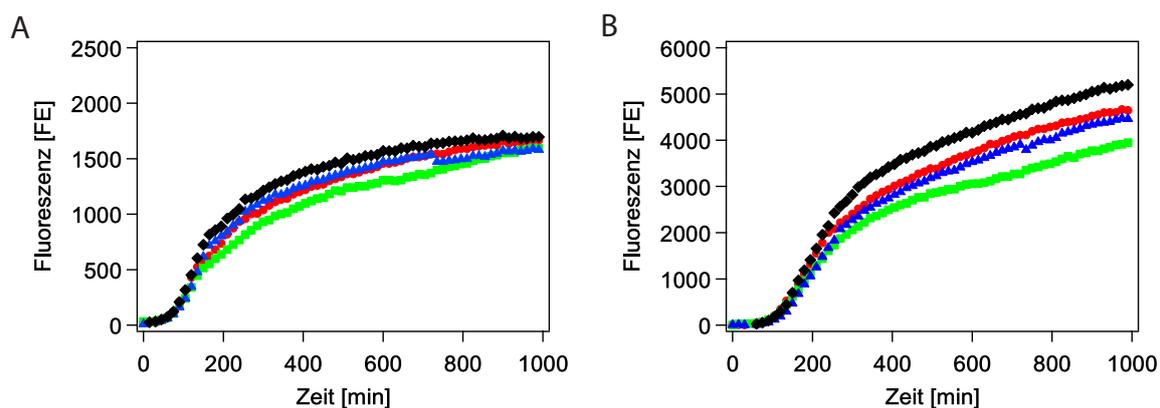


Abbildung 4.25.: Expression von YFP und CFP im Populationsmittel: Darstellung der Fluoreszenzwerte der Stämme EMO3-S (rote Kreise), EMO3-S Δ CsrB (grüne Quadrate), EMO3-S Δ CsrC (blaue Dreiecke) und EMO3-S Δ CsrB/C (schwarze Rauten) im zeitlichen Verlauf für eine Mitomycin C Konzentration von 0.25 μ g/ml. Teil A zeigt im Mittel über die gesamte Population die YFP Fluoreszenz, Teil B zeigt ebendies für die CFP Fluoreszenz.

tensystem BarA/UvrY [133], könnte es durch die Deletion von zwei regulatorischen sRNAs, entweder durch ihr Fehlen oder die dadurch hervorgerufene gesteigerte Anzahl an freien CsrA Molekülen, zu einem bis dato unbekanntem Einfluss auf weitere Teile des Netzwerkes kommen, der dann in der Folge zu einer Beeinflussung der Regulation des Colicin E2 Operons führen könnte.

Im nativen Csr System von *E.coli* treten Veränderungen in den sRNA Mengen erst mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase auf [48, 50, 135]. Da mit der Einzelzellfluoreszenzmikroskopie die stationäre Phase am Ende der Messung nach fünf Stunden noch nicht erreicht ist, wurden für verschiedene Deletionsmutanten (EMO3-S Δ CsrB, EMO3-S Δ CsrC, EMO3-S Δ CsrB/C) sowie das Grundsystem (EMO3-S), Langzeitmessungen im Platerader durchgeführt. Im Folgenden ist eine Messung exemplarisch für eine Stressor Konzentration von 0.25 μ g/ml gezeigt (Abbildung 4.25), andere Konzentrationen zeigen qualitativ das gleiche Verhalten. Im Vergleich zwischen EMO3-S und den verschiedenen Deletionsmutanten zeigt sich in der späten stationären Phase für die EMO3-S Δ CsrB sowie die EMO3-S Δ CsrC Mutante eine Reduktion der Fluoreszenz für CFP, was einer Verringerung der Expression des *cel* Gens entspricht (siehe Teil B in Abbildung 4.25).

4. Ergebnisse

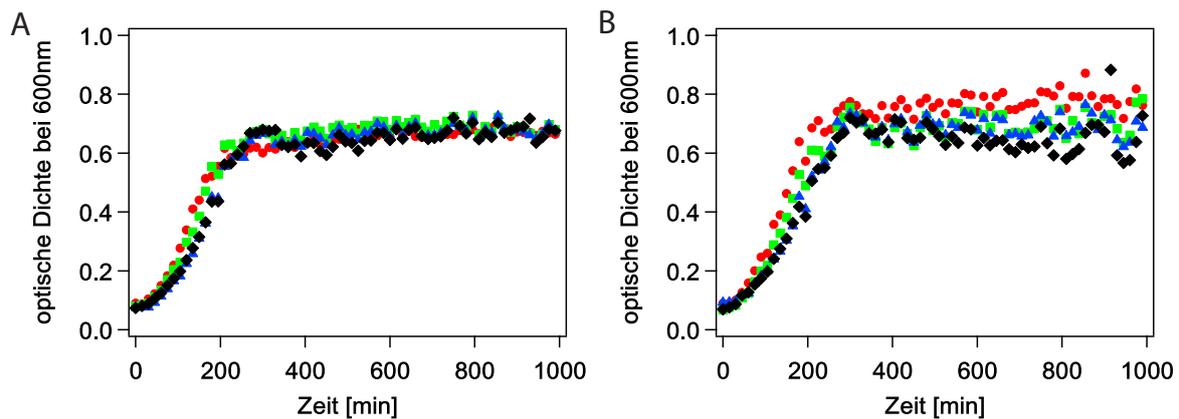


Abbildung 4.26.: Vergleich des Wachstums von EMO3-S (rote Kreise), EMO3SΔCsrB (grüne Quadrate), EMO3-SΔCsrC (blaue Dreiecke) und EMO3-SΔCsrB/C (schwarze Rauten): Teil A zeigt das Wachstum der einzelnen Stämme im zeitlichen Verlauf bei einer Mitomycin C Konzentration von 0.05 µg/ml. Teil B beschreibt das Wachstum bei 0.25 µg/ml Mitomycin C.

Diese ist im Vergleich dazu in der *cea* (YFP) Expression nicht zu beobachten (siehe Teil A in Abbildung 4.25). Zudem kann ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen in der Fluoreszenz aus verändertem Wachstum der einzelnen Stämme resultieren, da dies unabhängig vom Stamm nahezu identisch ist (siehe Abbildung 4.26). Die Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Einzelzellanalyse und zeigen für die Einzeldelationen das erwartete Verhalten, durch die Deletion einer sRNA kommt es zu einer Erhöhung der CFP Fluoreszenz und damit einer moderaten Überexpression von CsrA [132] die zu einer Erhöhung der Menge an freiem CsrA führt. Die dadurch hervorgerufene Reduktion der Expression des Lysigens ist für den Stamm EMO3-SΔCsrB, auf Grund der höheren Anzahl an CsrA Bindemotiven [49, 50], stärker ausgeprägt als für die Deletion der sRNA CsrC.

Wie bereits in der Einzelzellanalyse festgestellt, zeigt der Stamm EMO3-SΔCsrB/C auch auf dem Populationslevel eine erhöhte Expression des *cel* Gens (siehe Teil B in Abbildung 4.25). Daher zeigt sich im Vergleich der Deletionsmutanten untereinander, dass die Deletion nur einer sRNA einen sehr geringen Effekt in der erwarteten Richtung zeigt, wohingegen die Deletion beider sRNAs zu einem stärkeren Effekt, der entgegen der Erwartung zu einer Erhöhung des Expressionslevels und zur zeitlichen Verschiebung hin zu kürzeren Zeiten des Expressionsstarts des *cel* Gens führt. Daher wird wahrscheinlich durch diese Deletionen ein

weiterer Effekt ausgelöst, der in der Zelle entweder zu erhöhtem Stress oder zu einer Veränderung im Csr System führt, die möglicherweise eine Reduktion, der für die Regulation der Expression des Colicin E2 Operons zur Verfügung stehenden Menge an CsrA zur Folge haben könnte. Durch die Deletion der beiden sRNAs könnten, da es sich beim Csr System um ein globales post-transkriptionelles Regulationssystem handelt [136], auch weitere Teile des Regulationssystems beeinflusst werden und darüber dann in einem zweiten Schritt die beobachteten Veränderungen in der Expression des Colicin E2 Operons ausgelöst werden. Im Vergleich zeigt sich für die Deletion einer sRNA ein wesentlich kleinerer Effekt als für die Veränderung der Bindestelle des CsrA Proteins. Dies deutet darauf hin, dass die sRNAs eine Art Feinabstimmung der Regulation im Hinblick auf die Colicin E2 Expression und den zeitlichen Versatz zwischen der Expression von *cea* und *cel* übernehmen.

4.2.4. Zeitliche Verzögerung der Expression des Lysisgens

Eine zentrale Frage die sich aus den Ergebnissen aus Kapitel 4.2 ergibt, ist die Frage nach dem Grund für die gleichzeitige Expression von *cea* und *cel* im Stamm EMO3-C, wenngleich es im Stamm EMO3-S zu einer mittleren Verzögerung von 75 ± 6 min kommt. In den vorigen Kapiteln 4.2.2 und 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression des Toxin Gens und des Lysis Gens im Stamm EMO3-S direkt durch das Protein CsrA und die verfügbare Menge dieses Proteins reguliert ist. Weiterhin unklar ist allerdings warum im Stamm EMO3-C keine zeitliche Verzögerung vorliegt. Hier stellt sich die Frage nach den Unterschieden zwischen den beiden Stämmen und danach ob, einer dieser Unterschiede der Grund für dieses veränderte Verhalten sein könnte. Chromosomal sind beide Stämme genetisch identisch, sie unterscheiden sich nur im Plasmid pColE2-P9 das EMO3-C im Gegensatz zu EMO3-S besitzt. Da bis dato nur Teile der kompletten Sequenz des Plasmides pColE2-P9 bekannt sind wurde dieses Plasmid mit Hilfe der Primer in Tabelle D.1 vollständig sequenziert. Ein Vergleich der bereits bekannten Anteile (Genbank M29885 und D30054) mit der ermittelten Sequenz ergibt eine vollkommene Übereinstimmung. Die

4. Ergebnisse

komplette Sequenz des 6757 bp umfassenden Plasmides pColE2-P9 ist in der Plasmidkarte in Abbildung 3.6 im Kapitel 3.2 dargestellt. Durch das Vorhandensein des Plasmides pColE2-P9, kann in EMO3-C das Lysisprotein und das Toxin gebildet werden. Dies ist im Stamm EMO3-S der nur das Reporterplasmid enthält, in dem Lysisgen mit CFP und das Toxingen mit YFP ersetzt ist, nicht möglich. Daher könnte es in EMO3-C zu einem Effekt der Autoinduktion durch das Toxin kommen [115, 116]. In unserem Fall kann das aber nicht der Grund der Veränderungen sein, da sich dann ein ähnlicher Effekt für die Expression von *cea* und *cel* zeigen sollte. Die Selbstinduktion wirkt sich nur, durch die Schädigung der eigenen DNA durch das Toxin [115, 116], auf die Bindung der LexA Proteine an die SOS Box auf den Plasmiden aus. Da dies sowohl die Expression von *cea* als auch die Expression von *cel* in ähnlicher Art beeinflusst, kann es dadurch nicht zu einer Reduktion der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* in EMO3-C kommen.

Vergleicht man die Histogramme für die Anschlagzeitpunkte der Expression von *cea* und *cel* in den beiden Stämmen EMO3-C und EMO3-S, so zeigt sich, dass vor allem die Anschlagzeitpunkte der Expression des Lysisgens (*cel*) zu früheren Zeitpunkten hin verschoben sind (Abbildung 4.10). Da die Expression des Lysisgens post-transkriptionell reguliert ist (siehe Kapitel 4.2.2 und Kapitel 4.2.3) liegt der Grund der veränderten Expression aller Voraussicht nach in der Veränderung eines oder mehrerer Elemente der post-transkriptionellen Regulation. Die zentrale Rolle spielt hierbei CsrA. Da in beiden Stämmen identische Bindestellen für CsrA vorliegen, sollte der Unterschied nicht in der Bindung von CsrA an das jeweilige Plasmid liegen. Sterzenbach *et al.* [137] zeigten in ihrer Arbeit, am Beispiel von Stücken nicht codierender mRNA des Gens für *FimA* aus *Salmonella typhimurium*, dass die Menge an verfügbarem freien CsrA durch weitere CsrA Bindepartner reguliert werden kann. Dies könnte in ähnlicher Art und Weise auch in unserem System zum tragen kommen. Die Menge an verfügbarem CsrA hängt in den Stämmen EMO3-C und EMO3-S von verschiedenen Faktoren ab. Der Stamm EMO3-S bindet im Vergleich zum Stamm EMO3-C durch das fehlende pColE2-P9 Plasmid (Anzahl der Kopien pro Zelle ungefähr 10-20 [32]) weniger CsrA Dimere. Diese Zahl kann aber auf Grund der viel größeren Zahl an CsrA Dimeren pro Bakterienzelle [48] nicht ausreichen, um das Verschwinden der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expres-

4.2. Zeitlicher Versatz zwischen Expression von *cea* und *cel*

<i>genetisches Element</i>	<i>Position auf Plasmid pColE3-CA38</i>	<i>Position auf Plasmid pColE2-P9</i>	<i>Homologie zwischen den Plasmiden</i>
rep	3073-3792	3344-4256	97%
ssi	4084-4159	4376-4451	100%
mob	4182-4456	4475-4750	98%
tra	4636-6757, 1-98	4929-7118, 1-30	97%
IncA	2943-3057	3214-3328	100%
ori	3966-3997	4257-4289	94%

Tabelle 4.1.: Homologietabelle für verschiedene genetische Elemente des Plasmides pColE2-P9 im Vergleich zu pColE3-CA38: Dargestellt ist die Homologie verschiedener genetischer Elemente zwischen dem Plasmid pColE3-CA38 wie es in Morales *et al.* [99] untersucht wurde und dem nun vollständig sequenzierten Plasmid pColE2-P9. Die Bezeichnungen bereits bekannter Elemente (Genbank M29885 und D30054) wurden übernommen. Zur Bestimmung der Homologie zwischen den jeweiligen Elementen wurden die Homologien zwischen den Sequenzen mit Hilfe des BLAST Algorithmus [138] ermittelt. Auf beiden Plasmiden sind die genetischen Informationen für ein Protein zur Vervielfältigung (*rep*), den Start der Synthese des diskontinuierlichen DNA Stranges (*ssi*), dem Replikationsstart (*ori*), einem für den konjugalen Transfer nötigen Protein (*tra*), einem zur Mobilisierung nötigen Protein (*mob*), sowie regulatorischen sRNA IncA (diese reguliert die Menge an Rep Protein post-transkriptionell [139]), vorhanden.

sion von *cea* und *cel* zu erklären. Auf Grund dessen wurden die bisher unbekannt Teile des pColE2-P9 Plasmides (siehe Kapitel 3.2) auf mögliche weitere die Menge des verfügbaren CsrA regulierende Elemente hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass das pColE2-P9 Plasmid neben dem Colicin E2 Operon noch weitere offene Leseraster enthält (siehe Kapitel 3.2 und Tabelle 4.1).

Die in der Gesamtsequenz des Plasmides pColE2-P9 auftretenden genetischen Elemente könnten somit einen Grund für das Auftreten der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* im Stamm EMO3-S darstellen, da dieser Stamm, auf Grund des Fehlens des Plasmides pColE2-P9, diese Elemente im Gegensatz zum Stamm EMO3-C nicht enthält. Vergleicht man die offenen Leseraster des Plasmides pColE2-P9 mit der Sequenz der Leseraster auf dem Plasmid pColE3-CA38 (Genbank KM287568) lassen sich, auf Grund hoher

4. Ergebnisse

Homologien, die genetische Elemente als ein Mobilisierungselement (*mob*) und eine Region, die ein Protein des konjugalen Transfers kodiert (*tra*) identifizieren. Des Weiteren können ein spezifisches, für die Replikation essentielles [139] Protein (*rep*) und die regulatorischen Sequenzen *ssi* (Synthesestart des diskontinuierlichen Stranges), *ori* (Replikationsstart), und *IncA* (sRNA, die die Menge des Rep Proteins reguliert [139]) ermittelt werden. Alle diese Elemente werden entweder für eine spezielle Art der Plasmidreplikation ("rolling circle replication", [140]) oder den konjugalen Transfer [99] von DNA zwischen Bakterien verwendet. Für alle diese Elemente ist kein regulatorischer Effekt, der die Menge an CsrA verändern könnte, bekannt. Auf dem Plasmid pColE2-P9 konnten keine weiteren Gene mehr identifiziert werden. Daher können die Gene auf dem Plasmid auch nicht direkt für das Verschwinden der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* im Stamm EMO3-C verantwortlich sein. Einige der Gene auf dem Plasmid sind nach Morales *et al.* [99] für die autonome Replikation des Plasmides verantwortlich. Bei der "rolling circle replication", (RCR) kommt es erst an einer für den Beginn der Doppelstrangsynthese charakteristischen Stelle (*ori* in Abbildung 3.6) zur Ausbildung eines Knicks in der DNA, an den das Rep Protein bindet und dadurch zum Strangbruch [141] führt. Danach wird der kontinuierliche Strang der dsDNA neu synthetisiert. Am Ende dieses Prozesses erhält man ein Plasmid mit dsDNA und einem ssDNA Ring mit der Sequenz des kontinuierlichen Stranges [140, 141]. Als nächster Schritt kann, ausgehend von der *ssi* Sequenz (siehe Abbildung 3.6 und Tabelle 4.1), mit der Synthese des diskontinuierlichen Stranges begonnen werden [141]. Wegen Asymmetrien im Replikationsstart und der gesamten Replikation, zwischen dem ersten Teil des RCR Prozesses, der Bildung der ssDNA und dem zweiten Teil, der Ergänzung der ssDNA zur dsDNA, kann es für das Plasmid pColE3-CA38 nach Morales *et al.* [99] zur Anreicherung von ssDNA im Bakterium kommen. Die Sequenzen der beteiligten Gene für das Protein Rep, den *ssi* und dem *ori* weisen zwischen den Plasmiden pColE2-P9 und pColE3-CA38 eine Homologie von mindestens 94% auf (siehe Tabelle 4.1). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass auch für das Plasmid pColE2-P9, ssDNA aus dem RCR Prozess in der Zelle angereichert wird.

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die Untersuchung der Dynamiken der Expression des Toxins (*cea*) und des Lysisgens (*cel*) stellt eine der zentralen Fragen dieser Arbeit dar. Aus diesen Dynamiken ergaben sich weitere Fragen nach der Beeinflussbarkeit der Anschaltzeitpunkte, der Intensitäten und des zeitlichen Versatzes zwischen der Produktion des Toxins und des Lysisproteins, hin zu einer programmierten Abgabe einer hohen Toxinmenge zu einem vorgegebenen Zeitpunkt. Mit diesem Wissen lässt sich die Frage nach der Art und Weise wie ein Toxinproduzent im Vergleich zu einem Bakterium das kein Toxin produziert, einen Vorteil erreichen kann auf zwei verschiedene Weisen beantworten. Zum Einen kann der Vorteil durch eine Arbeitsteilung innerhalb der Bakterienpopulation, die sich durch eine heterogene Expression des Colicin E2 Operons auszeichnet, erreicht werden. Zum Anderen wäre es möglich, durch Effektivität in der Abgabe des Toxins, die durch einen zeitlichen Versatz der Expression von Toxin (*cea*) und Lysisgen (*cel*) hervorgerufen wird, einen Vorteil zu erlangen.

Um diese zentrale Frage zu beantworten wurden in dieser Arbeit die Expressionsdynamiken der Gene für das Toxin (*cea*) und das Lysisprotein (*cel*) des Colicin E2 Operons untersucht. Die Gene *cea* und *cel* dieses Operons zeigen unter verschiedenen hohen externen Stresslevels verschiedene Antwortmuster. Ohne äußeren Stress zeigt sich phänotypische Heterogenität bei der nur einige wenige Zellen, in der stationären Wachstumsphase, das Colicin E2 Operon aktivieren. Liegt hingegen geringer äußerer Stress über die ganze Messzeit hinweg vor, schalten alle Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten, die unregelmäßig über die Messzeit verteilt

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

sind, in den „AN“ Zustand. Dieses Verhalten wird als zeitlich heterogen verteiltes Anschalten bezeichnet [33, 77]. Eine Erhöhung des äußeren Stresses führt zu einer Veränderung des Antwortverhaltens des Systems. Zwar wechseln weiterhin nahezu alle Zellen im Lauf der Messung in den „AN“ Zustand, dies erfolgt aber wesentlich weniger heterogen und zu früheren Zeitpunkten. Somit zeigt das Colicin E2 Operon eine synchronisierte Antwort, bei hohem externen Stress. Die Bakterien sichern durch dieses sehr effektive Verhalten das Überleben der eigenen Spezies. Bei geringem Stress wird die eigene Spezies wenig bedroht und kontinuierlich nur von einer geringen Anzahl Bakterien versucht die Bedrohung abzuwenden. Steigt der Stress für die Bakterien, verändert sich die Strategie, es wird von nahezu allen Bakterien das Toxin produziert um sicher zu stellen, dass wenigstens ein Bakterium der eigenen Art den Stress überlebt und dann eine neue Population gründen kann. Das zeitlich heterogen verteilte Anschalten bei mittleren Stresslevels stellt für die Population ein adäquates Mittel dar, um mit einem Vorteil im Vergleich zu den Konkurrenten, aus der Stresssituation hervorzugehen. Bei sinkendem Stresslevel sind immer noch viele Bakterien der eigenen Spezies vorhanden, um dadurch im weiteren zeitlichen Verlauf den Wettbewerb um Nährstoffe und Lebensraum zu gewinnen. Bleibt der Stresslevel hingegen erhalten, können über lange Zeit hinweg Bakterien beginnen das Toxin zu bilden und freizusetzen und erlangen damit einen Wettbewerbsvorteil. Liegt hoher externer Stress vor, wechselt das Antwortverhalten der Bakterien und es zeigt sich eine Synchronisation in der Expression des Colicin E2 Operons, die einhergeht mit einer Verkürzung der Zeitspanne bis zum Einsetzen der Expression des Colicin E2 Operons. Dieses Verhalten sichert das Überleben der eigenen Spezies und verschafft der Population einen Vorteil gegenüber Bakterien die kein Toxin produzieren können.

Um die Fragestellung zu untersuchen, wie die Zelle die effektive Abgabe des Toxins reguliert, wurden zunächst die Stämme EMO3-C und EMO3-S auf den zeitlichen Versatz zwischen der Expression des Toxin Gens (*cea*) und der Expression des Lysisgens (*cel*) hin untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied, im Stamm EMO3-C konnte kein zeitlicher Versatz gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde im Stamm EMO3-S ein zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* von im Mittel 75 ± 6 min bestimmt. Dies warf die Frage auf, wie dieser zeitliche Versatz reguliert wird und warum er im Stamm EMO3-C

unterdrückt ist. Daher wurden in dieser Arbeit Regulationsmechanismen auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene untersucht, die die Expression des Colicin E2 Operons beeinflussen.

Durch Untersuchung verschiedener Mutanten konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Regulation die Expression beider Gene beeinflusst. Der zeitliche Versatz des Stammes EMO4-S zeigt im Rahmen des Fehlers keine Veränderung zum Stamm EMO3-S. Der Stamm EMO5-S, dessen Plasmid LexA schlechter binden sollte als das Plasmid in EMO3-S, zeigt hingegen eine Verkürzung der zeitlichen Verzögerung, hervorgerufen durch eine Verschiebung der Anschaltzeitpunkte der Expression von *cea*. Der Effekt der Veränderungen der LexA Bindestelle lässt sich nicht eindeutig voraussagen, da im Bereich dieser Bindestelle sich eine weitere Bindestelle für das regulatorische Protein AnsC befindet, die ebenfalls zur transkriptionellen Regulation beiträgt [89], was das unerwartete Verhalten des Stammes EMO5-S erklären könnte. Generell zeigte sich für den Stamm EMO4-S ein geringer Einfluss der transkriptionellen Regulation auf den zeitlichen Versatz zwischen der Expression des Toxingens (*cea*) und des Lysisgens (*cel*). Die post-transkriptionelle Regulation wird in erster Linie über die Menge an freiem CsrA, das durch Bindung an die mRNA die Translation des Lysisgens hemmt, gesteuert. Durch Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der sRNAs CsrB und CsrC auf die post-transkriptionelle Regulation klein ist, im Vergleich zum Einfluss des CsrA. Die Doppeldeletion der beiden sRNAs führt, entgegen der Erwartung, zu einer Verkürzung der zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* und damit zu einer früheren Abgabe des Colicins. Dies würde sich durch einen bis dato unbekanntem Effekt der Doppeldeletion auf das globale regulatorische Csr Netzwerk erklären lassen, der dann in einem zweiten Schritt zu einer Beeinflussung der Regulation des Colicin E2 Operons führt.

Die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* kann durch Veränderungen in der Bindestelle des CsrA im Bereich der SD Sequenz des *cel* Gens gezielt beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Bindewahrscheinlichkeit (CsrA1) führt zu einer längeren Zeitverzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* auf im Mittel 94 ± 6 min, auf Grund

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

der von Natur aus hohen Bindewahrscheinlichkeit für CsrA, ist die Erhöhung mit circa 15% relativ gering. Wird die Bindewahrscheinlichkeit von CsrA verringert (CsrA2), so wird die Regulation nahezu außer Kraft gesetzt und die zeitliche Verzögerung liegt nur bei 12 ± 2 min. Der Stamm EMO3-C, der zusätzlich zum Reporterplasmid pMO3 noch das natürliche Plasmid pColE2-P9 enthält, zeigt im Bezug auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel* ein Verhalten, das der Mutation mit verschlechterter Bindewahrscheinlichkeit des CsrA ähnelt. Dies stellt ein Indiz dafür dar, dass die nicht auftretende zeitliche Verzögerung im Stamm EMO3-C in Zusammenhang steht mit einer im Vergleich zu EMO3-S reduzierten Verfügbarkeit von freiem CsrA. In einem Vergleich der Histogramme für das Anschalten von *cea* und *cel* in den Stämmen EMO3-S und EMO3-C zeigt sich, dass die Veränderung der zeitlichen Verzögerung auf eine Veränderung der Verschiebung der Anschaltzeitpunkte von *cel* zurückgeführt werden kann. Dies stellt ein weiteres Indiz für den Einfluss der post-transkriptionellen Regulation und damit des mRNA Bindeproteins CsrA dar. Ein weiterer Einfluss der sRNAs CsrB und CsrC kann ausgeschlossen werden, da diese in den Stämmen EMO3-C und EMO3-S gleichermaßen vorhanden sind. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Grund für die Abwesenheit des zeitlichen Versatzes im Stamm EMO3-C in der Anwesenheit des Plasmides pColE2-P9 und dessen Einfluss auf die post-transkriptionelle Regulation zu suchen ist. Da sich die Stämme EMO3-C und EMO3-S nur im Plasmid pColE2-P9 unterscheiden, wurde dieses komplett sequenziert um einen Einfluss genetischer Elemente auf dem Plasmid auf die Menge an freiem CsrA auszuschließen. Die Zahl der Plasmide pro Zelle und die Anzahl der dadurch zusätzlich gebildeten mRNA Moleküle ist zu gering, um den beobachteten Effekt zu erklären. Durch die spezielle Art der Replikation des pColE2-P9 Plasmides könnte es allerdings, wie für das sich in gleicher Art und Weise replizierte Plasmid pColE3-CA38 gezeigt [99], auch im Fall des pColE2-P9 Plasmides zur Bildung und Anreicherung von ssDNA kommen.

Mit Hilfe des Nachweises von sich anreichernder ssDNA im Stamm EMO3-C wäre dies, unter der Voraussetzung das eine Bindung von CsrA an ssDNA möglich ist, eine Erklärung für eine Reduktion der Menge an verfügbarem CsrA. Dadurch könnte erklärt werden wie es im Stamm EMO3-C zur Verhinderung einer zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression des Toxins

und des Lysisgens kommen kann. Die angereicherte Menge an ssDNA würde dabei durch eine Bindung von CsrA an die ssDNA die Menge an freiem CsrA verringern und damit zu einer früheren Translation des Lysisgens führen. Vorbehaltlich der Nachweise der gebildeten und accumulierten ssDNA und der Bindung von CsrA an die ssDNA, könnte der im Stamm EMO3-C nicht vorhandene, dem Regulationsystem aber inhärente zeitliche Versatz erklärt werden.

Für alle Experimente dieser Arbeit, lag der äußere Stress für die Bakterien, hervorgerufen durch das eingesetzte Mitomycin C, immer über die gesamte Messzeit hinweg vor. Mit Hilfe von Experimenten in denen der Stress für die Bakterien nur für kurze Intervalle (zum Beispiel 10 min, 15 min oder 30 min) vorliegt, könnten weitere interessante Fragen analysiert werden. So zum Beispiel die Frage nach der kürzesten Zeitspanne, die Stress andauern muss, um von einem Bakterium wahrgenommen werden zu können und dadurch die Expression des Colicin E2 Operons zu induzieren. Oder die Frage nach einem Erinnerungseffekt, in ähnlicher Art und Weise wie für *Caulobacter crescentus* [142] dargestellt. Interessant wäre hier zum Beispiel die Frage, ob nach der Feststellung, dass der Stress 20 min wirken muss um eine Antwort auszulösen, dann von zweimal 10 min Stress mit einer Zeitverzögerung dazwischen, die gleiche Antwort ausgelöst wird? Des Weiteren könnte untersucht werden ob die Länge der Zeit zwischen den Stress Pulsen eine Rolle spielt und ob es möglich ist das dabei gefundene Verhalten in die vorläufige Theorie der Regulation des Colicin E2 Operons mit einzubinden. Insgesamt würde dies einen Hinweis darauf darstellen, dass sich das Bakterium an Stress „erinnern“ kann und dadurch bei erneuter Gefahr schneller reagieren könnte woraus sich ein Wettbewerbsvorteil für die eigene Spezies ergeben würde.

Neben diesen noch offenen Fragestellungen, konnten die Fragen nach der Dynamik der Expression des Toxins (*cea*) und des Lysisgens (*cel*), sowie der Einfluss verschiedener regulatorischer Elemente auf die zeitliche Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel*, mit dem mRNA-Bindeprotein CsrA als hauptverantwortlichem regulatorischem Element der post-transkriptionellen Regulation, beantwortet werden. Dazu wurden diese Dynamiken mit Hilfe von Einzelzellfluoreszenzmikroskopie Zeitserien untersucht. Des Weiteren konnte in

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Menge an abgegebenem Toxin rein durch die Expression des Lysisgens gesteuert wird [33]. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass ein Zusammenspiel zwischen heterogener Expression der Gene und dem Auftreten eines zeitlichen Versatzes zwischen der Expression von des Toxin- und des Lysisgens die Grundlage für den Vorteil, den Toxinproduzenten im Vergleich zu Bakterien die kein Toxin produzieren können erreichen, darstellt.

A. Medien

Substanz	Konzentration[g/l]
Trypthon	10
Hefeextrakt	5
Natriumchlorid (NaCl)	10

Tabelle A.1.: Zusammensetzung von LB Medium nach Luria Miller (Carl Roth): Nach Herstellerangabe wurde 25 g/l beschrieben, eingesetzt und mit ddH₂O aufgefüllt. Das Medium hat einen pH-Wert von 7.0 ± 0.2. Wurde es zur Herstellung von Platten eingesetzt wird 1.5% Kobe Agar (Carl Roth) zugegeben.

Substanz	Konzentration	Konzentration der Stocklösungen
FeSO ₄ x7H ₂ O	5 mg/l	278.02 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l	N/A
KH ₂ PO ₄	13.6 g/l	N/A
MgSO ₄ x7H ₂ O	1 µmol	1 mol
Thiamin	1 µg/ml	1 mg/ml
Casein	0.2%	10%
Glycerol	0.5 %	100 %

Tabelle A.2.: Zusammensetzung des M63 Mediums: Für das Medium wurde 0.5% Glycerol als Kohlenstoffquelle verwendet, die weiteren Substanzen wurden wie in Elbing *et al.* [143] eingesetzt. Nach der Zugabe von KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄ und FeSO₄x7H₂O wird das Medium mit KOH auf einen pH Wert von 7.00 eingestellt und im Anschluss autoklaviert. Die weiteren Zutaten werden erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Wird das Medium zu Herstellung von Platten eingesetzt, wird vor dem Autoklavieren 1.5% Kobe Agar (Carl Roth) zugegeben.

B. Expression von *cel* im Stamm EMO3-C

Darstellung der zu den Abbildungen 4.4, 4.6, 4.7 für Daten zur Expression des Toxin Gens (*cea*) in Kapitel 4.1 äquivalenten Daten für die Expression des Lsysisgens (*cel*).

B. Expression von *cel* im Stamm EMO3-C

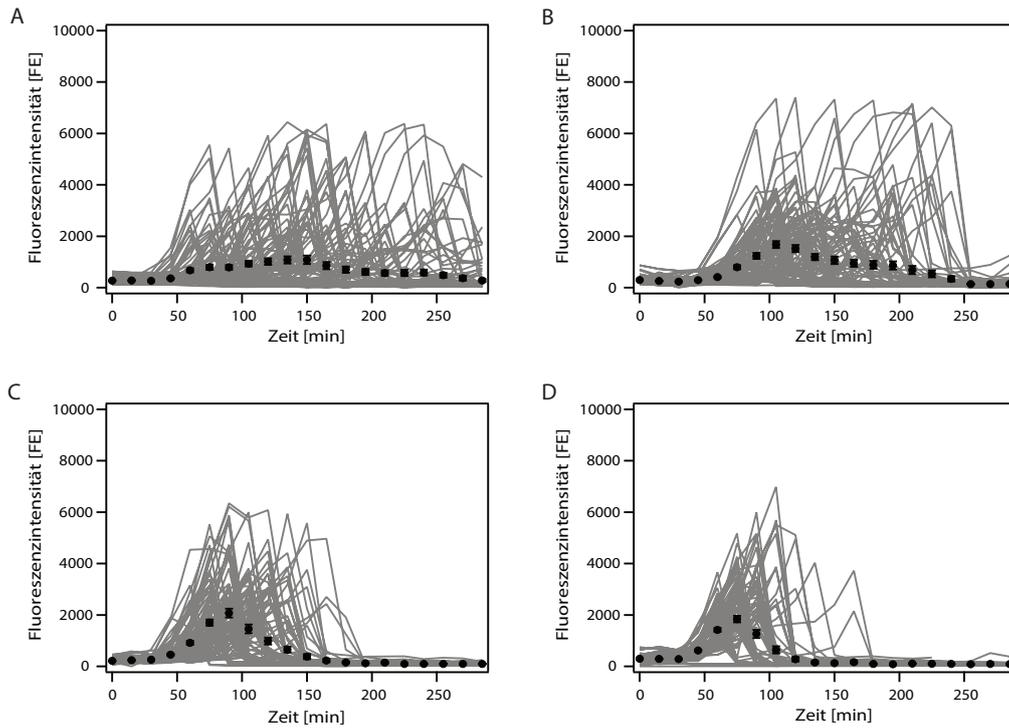


Abbildung B.1.: Expression von *cel* induziert mit verschiedenen Mitomycin C Konzentrationen: Die Teile A-D zeigen die Fluoreszenzintensitäten einzelner Bakterien (graue Linien) für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen 0.05 µg/ml, 0.10 µg/ml, 0.25 µg/ml und 0.40 µg/ml in ihrem zeitlichen Verlauf. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten ist zu jedem Zeitpunkte als schwarzer Kreis (der eingezeichnete Fehler ist der Standardfehler aus der Mittelwertberechnung) dargestellt. Es ist ein Übergang von einer zeitlich heterogenen Stressantwort bei geringen Mitomycin C Konzentrationen (A,B) hin zu einer zeitlich synchronisierten Antwort bei hohen Konzentrationen (C,D) zu beobachten. Die äquivalenten Daten für die Expression von *cea* (YFP Fluoreszenz) sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

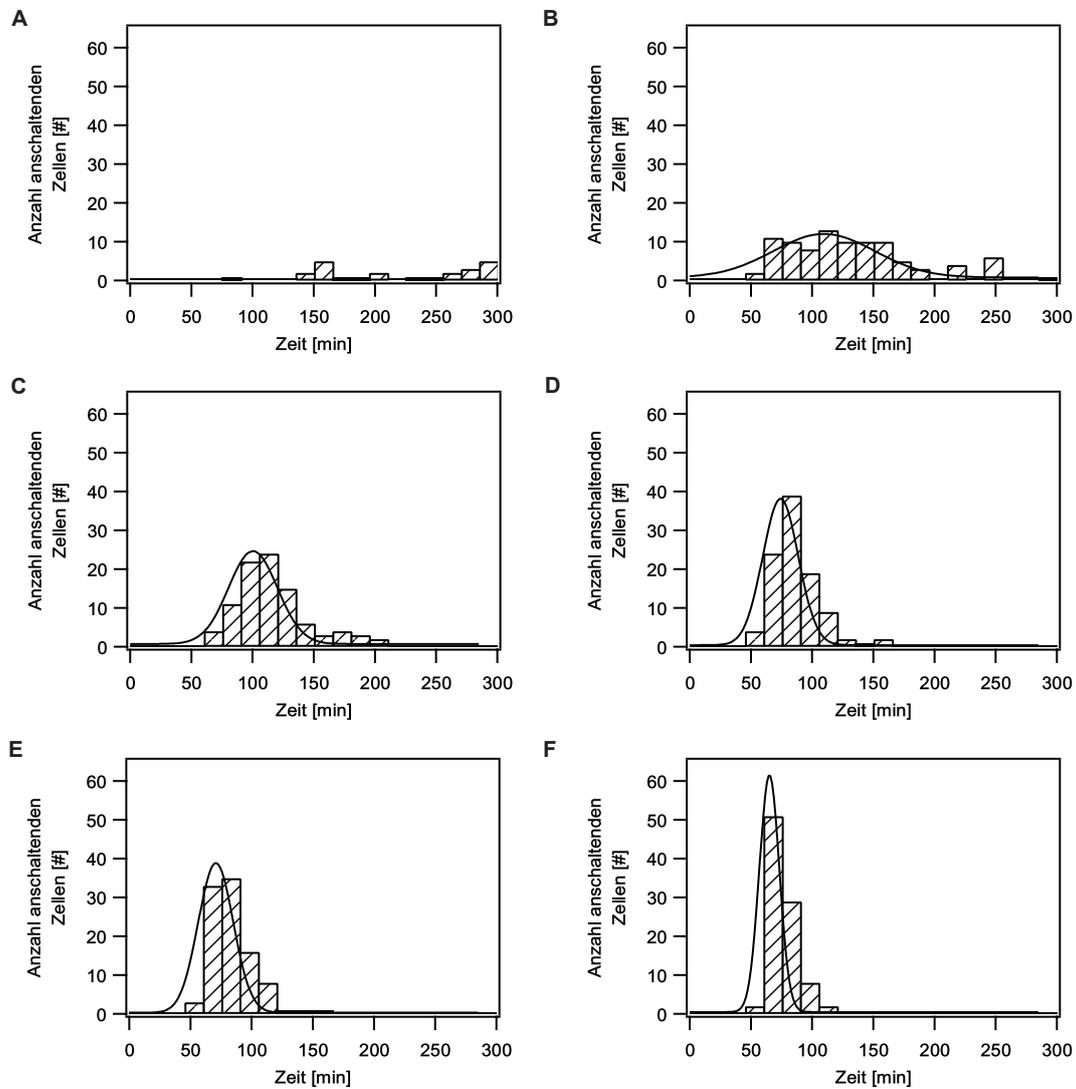


Abbildung B.2.: Bestimmung des Anschlagzeitfensters für die Expression von *cel* in Abhängigkeit von der verwendeten Mitomycin C Konzentration: Die Histogramme zum Anschalten von Zellen für jeden Zeitpunkt sind in den Teilen A-F für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen (A: 0.00 µg/ml, B:0.05 µg/ml, C:0.10 µg/ml, D:0.25 µg/ml,E:0.40 µg/ml, F:0.70 µg/ml) dargestellt.

B. Expression von *cel* im Stamm EMO3-C

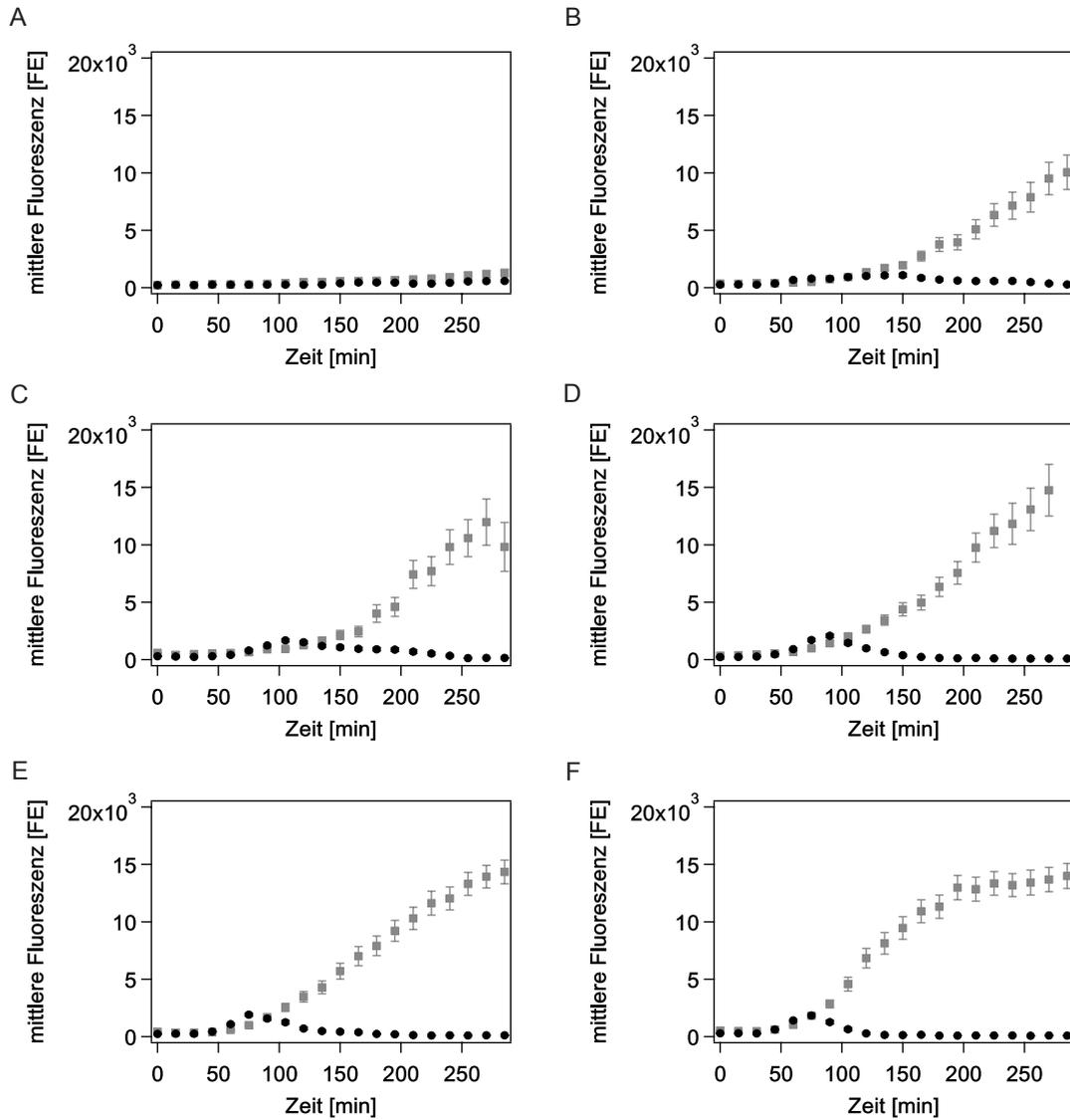


Abbildung B.3.: Mittlere CFP Fluoreszenz im Verlauf der Zeit: Darstellung der mittleren CFP Fluoreszenz stellvertretend für die Expression von *cel* im zeitlichen Verlauf. Es werden die beiden Stämme EMO3-C (enthält pMO3 und pCOE2-P9), dargestellt mit schwarzen Kreisen und EMO3-S (enthält nur pMO3) der durch graue Quadrate repräsentiert wird, verglichen. Die Teile A - F stellen unterschiedliche Stressor (Mitomycin C) Konzentrationen dar (A: 0.00 µg/ml, B:0.05 µg/ml, C:0.10 µg/ml, D:0.25 µg/ml,E:0.40 µg/ml, F:0.70 µg/ml).

C. Tabellen und Histogramme zur zeitlichen Verzögerung zwischen der Expression von *cea* und *cel*

Mitomycin C [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Zeitliche Verzögerung [min]	Standardfehler der Mittelwertbildung [min]
0.00	1.07	5.70
0.05	8.83	2.94
0.10	-0.16	2.22
0.25	7.34	1.50
0.40	4.61	2.91
0.70	5.09	0.78

Tabelle C.1.: Tabelle der mittleren zeitlichen Verzögerung im Stamm EMO3-C: Werte der mittleren zeitlichen Verzögerung für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen und deren Standardabweichung.

C. Zeitliche Verzögerung zwischen cea und cel

Mitomycin C [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Zeitliche Verzögerung [min]	Standardfehler der Mittelwertbildung [min]
0.00	14.13	NAN
0.05	83.36	5.92
0.10	76.8	8.39
0.25	77.18	8.04
0.40	73.79	4.58
0.70	65.00	7.00

Tabelle C.2.: Tabelle der mittleren zeitlichen Verzögerung im Stamm EMO3-S: Werte der mittleren zeitlichen Verzögerung für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen und deren Standardabweichung.

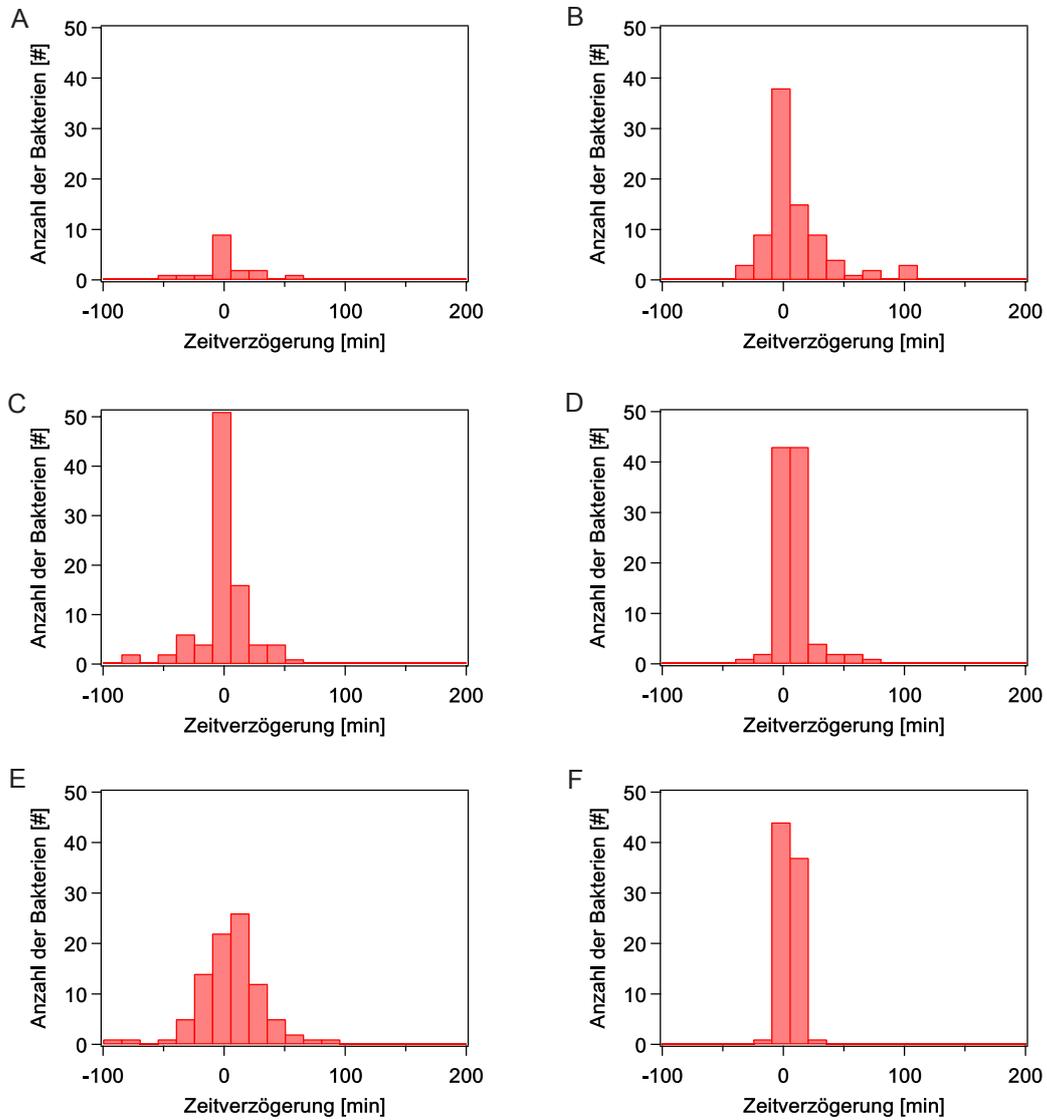


Abbildung C.1.: Histogramme der zeitlichen Verzögerung im Stamm EMO3-C: Es sind die Histogramme der zeitlichen Verzögerungen zwischen der Expression von *cea* und *cel* für verschiedene Mitomycin C Konzentrationen dargestellt: A 0.00 µg/ml; B 0.05 µg/ml; C 0.10 µg/ml; D 0.25 µg/ml; E 0.40 µg/ml sowie F 0.70 µg/ml.

C. Zeitliche Verzögerung zwischen *cea* und *cel*

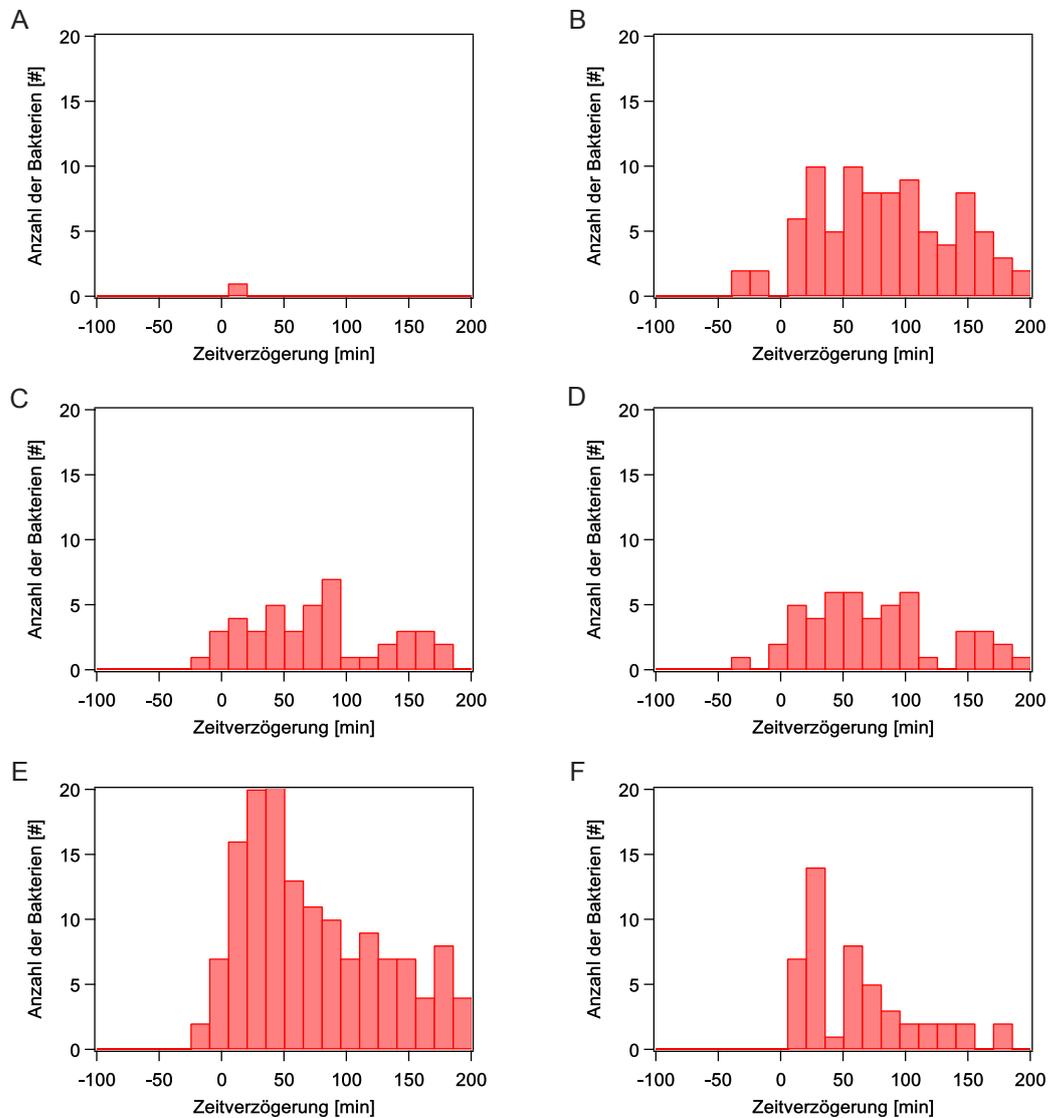


Abbildung C.2.: Histogramme der zeitlichen Verzögerung im Stamm EMO3-S: Es sind die Histogramme der zeitlichen Verzögerungen zwischen der Expression von *cea* und *cel* für verschiedene Konzentrationen an Mitomycin C dargestellt: A 0.00 µg/ml; B 0.05 µg/ml; C 0.10 µg/ml; D 0.25 µg/ml; E 0.40 µg/ml sowie F 0.70 µg/ml.

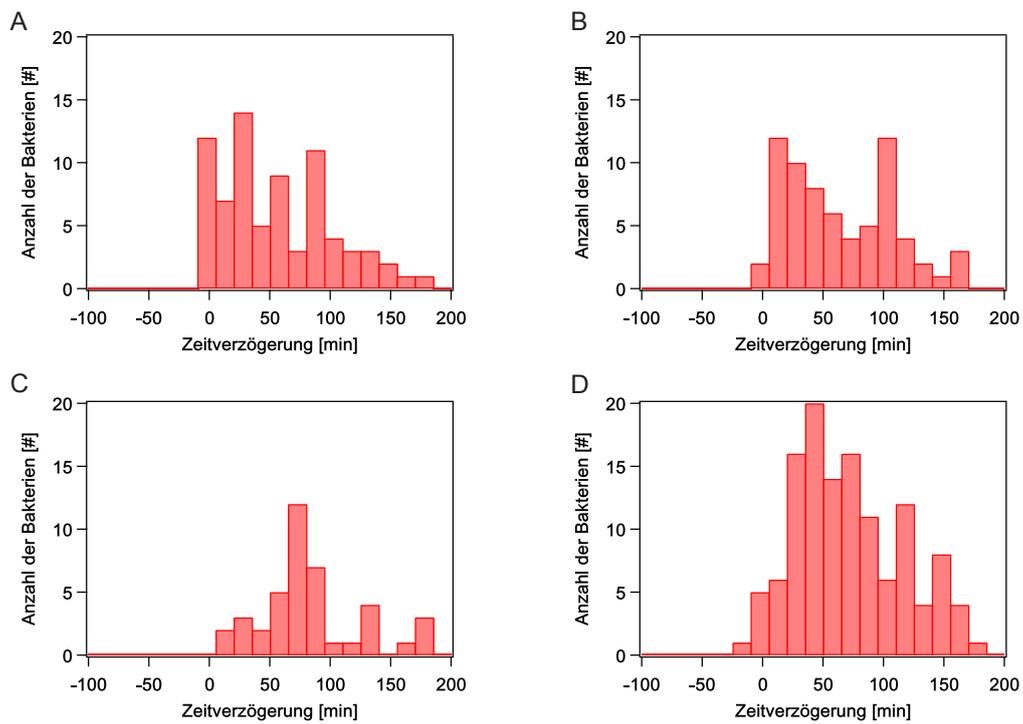


Abbildung C.3.: Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO4-S: Es sind die Histogramme der zeitlichen Verzögerungen zwischen der Expression von *cea* und *cel* für verschiedene Konzentrationen an Mitomycin C dargestellt: A 0.00 µg/ml; B 0.05 µg/ml; C 0.10 µg/ml; D 0.25 µg/ml sowie E 0.40 µg/ml.

C. Zeitliche Verzögerung zwischen *cea* und *cel*

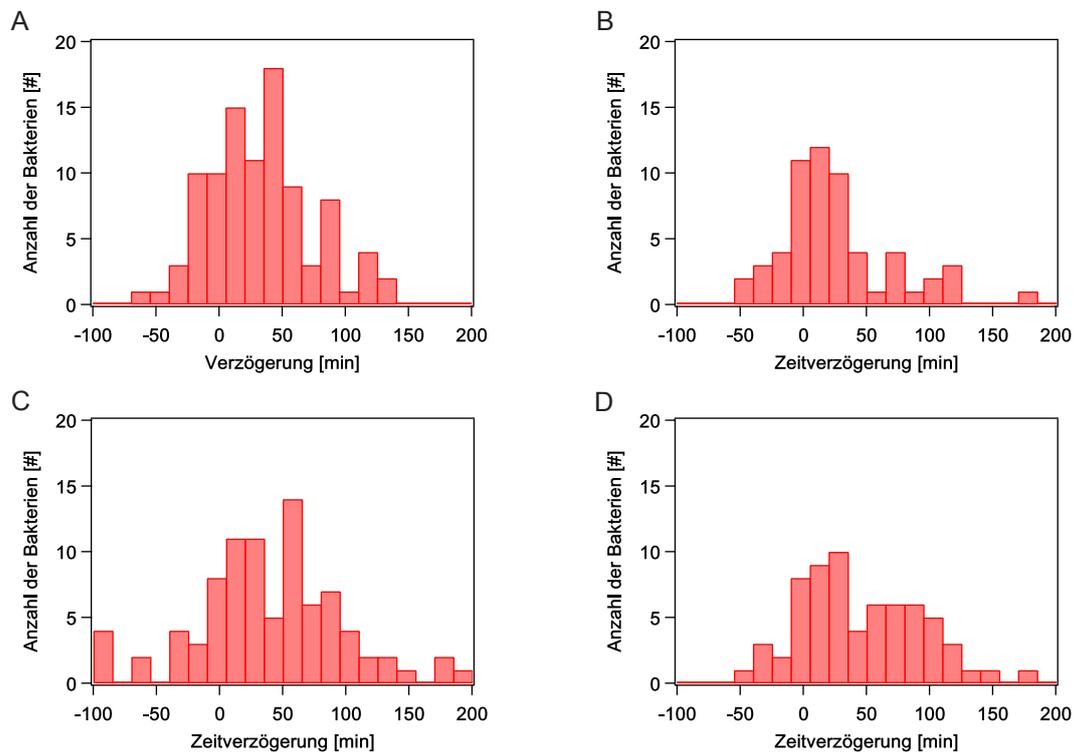


Abbildung C.4.: Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO5-S: Es sind die Histogramme der zeitlichen Verzögerungen zwischen der Expression von *cea* und *cel* für verschiedene Konzentrationen an Mitomycin C dargestellt: 0.00 µg/ml; B 0.05 µg/ml; C 0.10 µg/ml; D 0.25 µg/ml sowie E 0.40 µg/ml.

D. Listen der verwendeten Plasmide, Primer und Stämme

Name	Sequenz	Richtung
EcolE2-A1	ACCGTATCTCCGTCATCAAC	s
EcolE2-A2	CTTCCTGTGAGAACTGC	s
EcolE2-A3	GTAGCGAGCGAATGAG	s
EcolE2-A4	CATGATTGCCGATGTGG	s
EcolE2-A5	GTGGAATACGTGGATTGC	s
EcolE2-A6	GGAGAAGCTATAAACCATG	s
EcolE2-A7	CTCTGTTTCGCATGGTCAG	a
EcolE2-A8	CACGTTTCGATGTCGTTTC	a
EcolE2-A9	GAATACATTCTCACACGCTC	a
EcolE2-A10	CGTTGTTGTTGCCTGTG	a

Tabelle D.1.: Tabelle der verwendeten Primer zur Sequenzierung des gesamten pColE2-P9 Plasmides: Dargestellt sind die Sequenzen in 5'→3' Richtung und die Leserichtung der Primer im Bezug auf das Colicin E2 Operon, sense (s) in die gleiche Richtung und antisense (a) in die entgegengesetzte Richtung.

D. Listen der verwendeten Plasmide, Primer und Stämme

Name	Beschreibung	Referenz
pColE2-P9	natürlich vorkommendes Plasmid aus <i>Shigella sonnei</i>	[51, 144]
pEX-K-Colicin	kommerzieller Klonierungsvektor mit Colicin E2 Operon ohne das Toxingen (<i>cea</i>) und einzelnen veränderten Basen zur Klonierung	[33]
pBad24-GFP	Plasmid mit Ampicillin Resistenz, ColE1 Ori und Arabinose induzierbarer Expression von GFP	[77]
pKES258	mVenus	unveröffentlicht (AG Schnetz)
pKEHB1	mCerulean (A206K)	unveröffentlicht (AG Schnetz)
pMO1	Ligation eines ClaI-HindIII Fragmentes von pEX-K-Colicin mit dem Rückrat des Plasmides pBad24-GFP	[33]
pMO2	Ligation von pMO1 mit einem mVenus PCR Fragment (Schnittstellen EcoRI und SacI) von pKES258	[33]
pMO3	Austausch des <i>cel</i> Gens gegen ein mCerulean PCR Fragment (Schnittstellen BamHI und AgeI) des Plasmides pKEHB1	[33]
pMO4	Veränderung der SOS Box (LexA Bindestelle) des Vektors pMO3 hin zu schwächerer Bindung	diese Arbeit
pMO5	Veränderung der LexA Bindestelle des Vektors pMO3 hin zu stärkerer Bindung	diese Arbeit
pMO6	Veränderung der CsrA Bindestelle des Vektors pMO3 hin zu stärkerer Bindung	diese Arbeit
pMO7	Veränderung der CsrA Bindestelle des Vektors pMO3 hin zu schwächerer Bindung	diese Arbeit
pMO3 Δ LexA	Deletion der gesamten SOS Box (Bindestelle für LexA) im Vektor pMO3	diese Arbeit

Tabelle D.2.: Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit Beschreibungen und Referenzen

Name	Sequenz
pMO2 sense	5' ATGCGA AATTC ATGAGCAAGGGCGA 3'
pMO2 antisense	5' TAGCGAGCT CCTT ACTTGTACAGCTCG 3'
pMO3 sense	5' ATTA ACCGGT ATGGTCAGCAAGGGCG 3'
pMO3 antisense	5' ATGCG GATCCTT ACTTGTACAGCTCG 3'
pMO4 sense	5' GACGGGTACTTTTTGTACTGTACATAAA ACCAGTGG 3'
pMO4 antisense	5' CCACTGGTTTTATGTACAGTACAAA AGTACCCGTC 3'
pMO5 sense	5' GACGGGTACTTTTTGATCCCTACATAAA ACCAGTGG 3'
pMO5 antisense	5' CCACTGGTTTTATGTAGGGATCAAAA AGTACCCGTC 3'
pMO6 sense	5' GGCATTCTTTCACATTAAGGAGTCGTTATG 3'
pMO6 antisense	5' CATAACGACTCCTTAATGTGAAAGAATGCC 3'
pMO7 sense	5' GCATTCTTTCACAACAAGGATGTGTTATGAAAAAATA ACCGG 3'
pMO7 antisense	5' CCGGTTATTTTTTTCATAACACATCCTTGTTGTGAAAGAATGC 3'
CsrB sense	5' GTGGTCATAAAGCAACCTCAATAAGAAAACTGCCGCGAAGGA- TAGCAGGAATTAACCCTCACTAAAGGGCG 3'
CsrB antisense	5' TTGTCTGTAAGCGCCTTGTAAGACTTCGCGAAAAAGACGATTC- TATCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCTC 3'
CsrC sense	5' ACTGATGGCGGTTGATTGTTTGTTTAAAGCAAAGGCGTAAAG- TAGCACCCAATTAACCCTCACTAAAGGGCG 3'
CsrC antisense	5' GCCGTTTTATTCAGTATAGATTTGCGGGCGGAATCTAACAGAAAG- CAAGCATAATACGACTCACTATAGGGCTC 3'

Tabelle D.3.: Tabelle der verwendeten Primer: Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen werden innerhalb der Sequenzen im Fettdruck dargestellt.

D. Listen der verwendeten Plasmide, Primer und Stämme

Name	Chromosomaler Genotyp	Plasmide	Resistenz	Referenz
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hs-dR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	keines	Tetracycline	[145]
BZB1011	<i>gyrA</i>	keines	keine	[79]
BZB1011-E2C	<i>gyrA</i>	pColE2-P9	keine	[79]
EMO3-C	<i>gyrA</i>	pColE2-P9, pMO3	Ampicillin	[33]
EMO3-S	<i>gyrA</i>	pMO3	Ampicillin	diese Arbeit
EMO4	<i>gyrA</i>	pMO4	Ampicillin	diese Arbeit
EMO5	<i>gyrA</i>	pMO5	Ampicillin	diese Arbeit
CsrA1	<i>gyrA</i>	pMO6	Ampicillin	diese Arbeit
CsrA2	<i>gyrA</i>	pMO7	Ampicillin	diese Arbeit
ΔCsrB EMO3-S	<i>gyrA, ΔCsrB</i>	pMO3	Ampicillin	diese Arbeit
ΔCsrC EMO3-S	<i>gyrA, ΔCsrC</i>	pMO3	Ampicillin	diese Arbeit
ΔCsrBΔCsrC EMO3-S	<i>gyrA, ΔCsrB, ΔCsrC</i>	pMO3	Ampicillin	diese Arbeit

Tabelle D.4.: Tabelle der verwendeten Stämme: Beschreibung mit den jeweiligen genetischen Veränderungen und eingesetzten Plasmiden sowie den verwendeten Antibiotikaresistenzen.

E. Fitparameter und Tabellen

Gen	Startwert [%]	Maximum [%]	Wendepunkt [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Rate
Toxinproduktion	5.59 ± 14.2	65.98 ± 17.6	0.13 ± 0.04	0.036 ± 0.045
Lysisgenproduktion	5.82 ± 9.42	61.33 ± 12	0.15 ± 0.04	0.039 ± 0.027

Tabelle E.1.: Tabelle der Fitparameter zu den sigmoidalen Fits aus Abbildung 4.2

E. Fitparameter und Tabellen

Protein	Mitomycin C Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	maximale mittlere Fluoreszenz [FE]
<i>cea</i>	0.0	2905 ± 1805
<i>cea</i>	0.05	5089 ± 1448
<i>cea</i>	0.10	5186 ± 1604
<i>cea</i>	0.25	5138 ± 1454
<i>cea</i>	0.40	4794 ± 1543
<i>cea</i>	0.70	4592 ± 1590
<i>cel</i>	0.0	2533 ± 1474
<i>cel</i>	0.05	3455 ± 1490
<i>cel</i>	0.10	3444 ± 1575
<i>cel</i>	0.25	3135 ± 1275
<i>cel</i>	0.40	3173 ± 1485
<i>cel</i>	0.70	2933 ± 1258

Tabelle E.2.: Tabelle der maximalen mittleren Fluoreszenzintensitäten für EMO3-C: Die maximalen mittleren Intensitäten der induzierten Bakterien sind in Abhängigkeit von der eingesetzten Mitomycin C Konzentration dargestellt.

MitC [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	x_0 [min]	w [1/min]	A [#]	y_0 [#]
0.05	101.2 ± 4.32	51.52 ± 7.63	12.70 ± 1.43	0.44 ± 0.81
0.10	91.73 ± 2.28	27.99 ± 3.5	20.28 ± 2.08	1.30 ± 0.70
0.25	69.71 ± 0.77	18.97 ± 1.17	43.80 ± 2.69	0.08 ± 0.67
0.40	67.06 ± 0.50	15.80 ± 0.95	45.24 ± 2.07	0.43 ± 0.43

Tabelle E.3.: Tabelle der Fitparameter zu den Gauß-Fits $y = y_0 + A \cdot \exp\left\{-\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^2\right\}$ aus Abbildung 4.6

MitC [$\mu\text{g/ml}$]	x_0 [min]	w [1/min]	A [#]	y_0 [#]
0.05	109.8 ± 5.79	58.64 ± 11.0	11.23 ± 1.55	0.77 ± 1.02
0.10	100.35 ± 0.96	28.17 ± 1.47	23.91 ± 1.03	0.72 ± 0.35
0.25	74.21 ± 0.68	20.58 ± 0.92	37.74 ± 1.43	0.41 ± 0.39
0.40	70.73 ± 0.88	20.2 ± 1.31	38.60 ± 2.09	0.29 ± 0.56

Tabelle E.4.: Tabelle der Fitparameter zu den Gauß-Fits $y = y_0 + A \cdot \exp\left\{-\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^2\right\}$ aus Abbildung B.2

Paarung	Fluoreszenzprotein	signifikant unterschiedlich	P-Wert
EMO3-S EMO4-S	YFP	ja	$1.06 \cdot 10^{-10}$
EMO3-S EMO4-S	CFP	ja	$2.4 \cdot 10^{-3}$
EMO3-S EMO5-S	YFP	ja	$1.11 \cdot 10^{-31}$
EMO3-S EMO5-S	CFP	nein	0.2365

Tabelle E.5.: Signifikanz der Unterschiede der Histogramme der Anschlagzeitpunkte t_{ON} für YFP und CFP: Darstellung der mit Matlab (Version 2013b) durchgeführten zwei Proben T-Tests für verschiedene Stamm Paarungen. Neben dem Ergebnis ist jeweils auch die Grenze, der so genannte P-Wert dargestellt.

F. Liste der verwendeten Abkürzungen

Tabelle der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen:

Tabelle F.1.: Tabelle der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen:

ORF	=	open reading frame
FP	=	Fluoreszenzprotein
MitC	=	Mitomycin C
YFP	=	yellow fluorescent protein
CFP	=	cyan fluorescent protein
FE	=	Fluoreszenzeinheit
SD	=	Shine Dalgarno Sequenz
RCR	=	rolling circle replication
PCR	=	polymerase chain reaction
ssDNA	=	single stranded DNA
dsDNA	=	double stranded DNA

Abbildungsverzeichnis

1.1. Darstellung des zentralen Dogmas der Mikrobiologie	6
2.1. Schema der strukturellen Elemente eines Operons	12
2.2. Das Colicin E2 Operon mit Regulationselementen	13
2.3. Einfache Regulationselemente	17
2.4. Vergleich der CsrA Bindestellen	22
2.5. Die Elemente der post-transkriptionellen Regulation	23
2.6. Eigenschaften des Schwellwertes der langen mRNA	26
2.7. Dynamische Stressantwort des Systems	29
2.8. Zeitlicher Versatz in der Theorie	31
3.1. Plasmidkarte des Vektors pMO3	34
3.2. Vergleich des original Colicin E2 Operons mit dem Reprterplasmid pMO3 . .	35
3.3. Veränderungen der LexA Bindestelle	38
3.4. Deletion der LexA Bindestelle	39
3.5. Sekundärstruktur der mRNA und Veräderungen in der Sequenz	41
3.6. Plasmidkarte des Vektors pColE2-P9	44
3.7. Struktur des Antibiotikums Mitomycin C	46
3.8. Wachstum in Abhängigkeit von der Mitomycin C Konzentration	48
3.9. Einfluss von Mitomycin C auf die Zelllänge	49
3.10. Darstellung der Auswertung der Zeitserien	51
3.11. Bestimmung des Schwellwertes für den „AN“ Zustand	53

4.1. Bilderserie mit Beispielbildern für Hellfeld, YFP und CFP	60
4.2. Verlauf der Anteile der Zellen im „AN,, Zustand	63
4.3. Vergleich von <i>cea</i> und <i>cel</i> Expression ohne Stress	63
4.4. Expression von <i>cea</i> unter verschiedenen Stresslevels	65
4.5. Größe des Zeitfensters in Abhängigkeit vom Stresslevel	66
4.6. Anschaltzeitfenster in Abhängigkeit von der eingesetzten MitC Konzentration	68
4.7. Expression von <i>cea</i> im Vergleich von EMO3-C und EMO3-S	71
4.8. Bestimmung der Zeitverzögerung	77
4.9. Zeitverzögerung im Stamm EMO3-S	78
4.10. Vergleich der Histogramme des Anschaltens für EMO3-S und EMO3-C	80
4.11. Vergleich der prozentualen Anteile der Zellen im „AN“ Zustand	82
4.12. Vergleich der mittleren Intensitäten aller Zellen im „AN“ Zustand	83
4.13. Vergleich der zeitlichen Verzögerungen zwischen EMO3-S, EMO4-S und EMO5-S	85
4.14. Vergleich der Histogramme für die Anschaltzeitpunkte t_{ON} der YFP Fluoreszenz der LexA Mutanten	88
4.15. Vergleich der Histogramme für die Anschaltzeitpunkte t_{ON} der CFP Fluoreszenz der LexA Mutanten	89
4.16. Anteil der Zellen im „AN“ Zustand der CsrA Mutationen	91
4.17. Mittlere Intensität der Zellen im „AN“ Zustand für die CsrA Mutationen	93
4.18. Vergleich der Histogramme der Anschaltzeiten t_{ON} für die CsrA Mutationen	94
4.19. Mittlere zeitliche Verzögerungen der CsrA Mutationen	94
4.20. Prozentuale Anteile der Zellen im „AN,, Zustand im Vergleich der sRNA Mutationen	98
4.21. Maximale mittlere Fluoreszenz der Zellen im „AN“ Zustand für die sRNA Mutanten	99
4.22. Mittlere zeitliche Verzögerung der sRNA Mutanten im Vergleich zu EMO3-S	100
4.23. Vergleich der Histogramme für die Anschaltzeitpunkte t_{ON} in YFP der sRNA Mutanten	101

4.24. Vergleich der Histogramme für die Anschlagzeitpunkte t_{ON} in CFP der sRNA Mutanten	102
4.25. Langzeitmessung der Fluoreszenzen der sRNA Mutanten	103
4.26. Wachstumsvergleich der sRNA Mutanten	104
B.1. Expression von <i>cel</i> unter verschiedenen Stresslevels	118
B.2. Anschlagzeitfenster in Abhängigkeit von der eingesetzten MitC Konzentration	119
B.3. Expression von <i>cel</i> im Vergleich von EMO3-C und EMO3-S	120
C.1. Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO3-C	123
C.2. Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO3-S	124
C.3. Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO4-S	125
C.4. Histogramme der zeitlichen Verzögerung im EMO5-S	126

Tabellenverzeichnis

3.1. Konsensus Sequenz für die LexA Bindung an DNA nach Lewis	37
4.1. Homologietabelle für verschiedene genetische Elemente des Plasmides pColE2-P9 im Vergleich zu pColE3-CA38	107
A.1. Zusammensetzung von LB Medium nach Luria Miller (Carl Roth)	115
A.2. Zusammensetzung des M63 Mediums	115
C.1. Tabelle der mittleren zeitlichen Verzögerung EMO3-C	121
C.2. Tabelle der mittleren zeitlichen Verzögerung EMO3-S	122
D.1. Tabelle der verwendeten Primer zur Sequenzierung des gesamten pColE2-P9 Plasmides	127
D.2. Tabelle der verwendeten Vektoren	128
D.3. Tabelle der verwendeten Primer	129
D.4. Tabelle der verwendeten Stämme	130
E.1. Tabelle der Fitparameter zu den sigmoidalen Fits aus Abbildung 4.2	131
E.2. Tabelle der maximalen mittleren Fluoreszenzintensitäten für EMO3-C	132
E.3. Tabelle der Fitparameter zu den Gauß-Fits aus Abbildung 4.6	132
E.4. Tabelle der Fitparameter zu den Gauß-Fits aus Abbildung B.2	133
E.5. Signifikanz der Unterschiede in t_{ON}	133
F.1. Tabelle der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen:	135

Literaturverzeichnis

- [1] CRICK, Francis: Central Dogma of Molecular Biology. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5258, S. 561–563
- [2] KOONIN, E. V. ; GORBALENYA, A. E. ; CHUMAKOV, K. M.: Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. In: *FEBS Letters* 252 (1989), Nr. 1-2, S. 42–46
- [3] SCOLNICK, E. ; RANDS, E. ; AARONSON, S. A. ; TODARO, G. J.: RNA-Dependent DNA Polymerase Activity in Five RNA Viruses: Divalent Cation Requirements. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 67 (1970), Nr. 4, S. 1789–1796
- [4] BRETSCHER, Mark S.: Direct Translation of a Circular Messenger DNA. In: *Nature* 220 (1968), Nr. 5172, S. 1088–1091
- [5] SIMMONS, Lyle A. ; FOTI, James J. ; COHEN, Susan E. ; WALKER, Graham C.: The SOS Regulatory Network. In: *EcoSal Plus* 2008 (2008)
- [6] LOPEZ-MAURY, Luis ; MARGUERAT, Samuel ; BAHLER, Jurg: Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. In: *Nature Reviews Genetics* 9 (2008), Nr. 8, S. 583–593
- [7] LITTLE, John W. ; MOUNT, David W.: The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. In: *Cell* 29 (1982), Nr. 1, S. 11–22
- [8] BROWNING, Douglas F. ; BUSBY, Stephen J. W.: The regulation of bacterial transcription initiation. In: *Nature Reviews Microbiology* 2 (2004), Nr. 1, S. 57–65

- [9] DICKSON, RC ; ABELSON, J ; BARNES, WM ; REZNIKOFF, WS: Genetic regulation: the Lac control region. In: *Science* 187 (1975), Nr. 4171, S. 27–35
- [10] MALAN, T. P. ; KOLB, Annie ; BUC, Henri ; MCCLURE, William R.: Mechanism of CRP-cAMP activation of lac operon transcription initiation activation of the P1 promoter. In: *Journal of Molecular Biology* 180 (1984), Nr. 4, S. 881–909
- [11] BUSBY, Steve ; EBRIGHT, Richard H.: Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). In: *Journal of Molecular Biology* 293 (1999), Nr. 2, S. 199–213
- [12] REZNIKOFF, W. S.: Catabolite gene activator protein activation of lac transcription. In: *Journal of Bacteriology* 174 (1992), Nr. 3, S. 655–658
- [13] BUTALA, M. ; ZGUR-BERTOK, D. ; BUSBY, S. J. W.: The bacterial LexA transcriptional repressor. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (2009), Nr. 1, S. 82–93
- [14] ESCOLAR, Lucia ; PEREZ-MARTIN, Jose ; LORENZO, Victor de: Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. In: *Journal of Bacteriology* 181 (1999), Nr. 20, S. 6223–6229
- [15] MUSTARD, Julie A. ; LITTLE, John W.: Analysis of *Escherichia coli* RecA Interactions with LexA, λ CI, and UmuD by Site-Directed Mutagenesis of recA. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 6, S. 1659–1670
- [16] ROMEO, Tony ; VAKULSKAS, Christopher A. ; BABITZKE, Paul: Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. In: *Environmental Microbiology* 15 (2013), Nr. 2, S. 313–324
- [17] HOLMQVIST, Erik ; VOGEL, Joerg: A small RNA serving both the Hfq and CsrA regulons. In: *Genes and Development* 27 (2013), Nr. 10, S. 1073–1078
- [18] TIMMERMANS, J. ; VAN MELDEREN, L.: Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (2010), Nr. 17, S. 2897–908

- [19] WEI, Bangdong L. ; BRUN-ZINKERNAGEL, Anne-Marie ; SIMECKA, Jerry W. ; PRUESS, Birgit M. ; BABITZKE, Paul ; ROMEO, Tony: Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 40 (2001), Nr. 1, S. 245–256
- [20] STORZ, Gisela ; VOGEL, Joerg ; WASSARMAN, Karen M.: Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. In: *Molecular Cell* 43 (2011), Nr. 6, S. 880–891
- [21] WATERS, Lauren S. ; STORZ, Gisela: Regulatory RNAs in Bacteria. In: *Cell* 136 (2009), Nr. 4, S. 615–628
- [22] SUZUKI, Kazushi ; BABITZKE, Paul ; KUSHNER, Sidney R. ; ROMEO, Tony: Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. In: *Genes and Development* 20 (2006), Nr. 18, S. 2605–2617
- [23] PREVOST, Karine ; DESNOYERS, Guillaume ; JACQUES, Jean-Francois ; LAVOIE, Francois ; MASSE, Eric: Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. In: *Genes and Development* 25 (2011), Nr. 4, S. 385–396
- [24] BUTALA, Matej ; KLOSE, Daniel ; HODNIK, Vesna ; REMS, Ana ; PODLESEK, Zdravko ; KLARE, Johann P. ; ANDERLUH, Gregor ; BUSBY, Stephen J. W. ; STEINHOFF, Heinz-Juergen ; ZGUR-BERTOK, Darja: Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. In: *Nucleic Acids Research* 39 (2011), Nr. 15, S. 6546–6557
- [25] QIAN, Hong ; BEARD, Daniel A.: Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium. In: *Biophysical Chemistry* 114 (2005), Nr. 2, S. 213–220
- [26] FRIEDMAN, Nir ; VARDI, Shuki ; RONEN, Michal ; ALON, Uri ; STAVANS, Joel: Precise Temporal Modulation in the Response of the SOS DNA Repair Network in Individual Bacteria. In: *PLoS Biology* 3 (2005), Nr. 7, S. e238

- [27] JOERGER, R. D.: Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. In: *Poultry Science* 82 (2003), Nr. 4, S. 640–7
- [28] YANG, Shih-Chun ; LIN, Chih-Hung ; SUNG, Calvin T. ; FANG, Jia-You: Antibacterial Activities of Bacteriocins: Application in Foods and Pharmaceuticals. In: *Frontiers in Microbiology* 5 (2014)
- [29] COTTER, Paul D. ; ROSS, R. P. ; HILL, Colin: Bacteriocins a viable alternative to antibiotics? In: *Nature Reviews Microbiology* 11 (2013), Nr. 2, S. 95–105
- [30] VENTOLA, C. L.: The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. In: *Pharmacy and Therapeutics* 40 (2015), Nr. 4, S. 277–283
- [31] ALANIS, Alfonso J.: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? In: *Archives of Medical Research* 36 (2005), Nr. 6, S. 697–705
- [32] CASCALES, Eric ; BUCHANAN, Susan K. ; DUCHE, Denis ; KLEANTHOS, Colin ; LLOUBES, Roland ; POSTLE, Kathleen ; RILEY, Margaret ; SLATIN, Stephen ; CA-VARD, Daniele: Colicin Biology. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (2007), Nr. 1, S. 158–229
- [33] MADER, Andreas ; BRONK, Benedikt von ; EWALD, Benedikt ; KESEL, Sara ; SCHNETZ, Karin ; FREY, Erwin ; OPITZ, Madeleine: Amount of Colicin Release in *Escherichia coli* is Regulated by Lysis Gene Expression of the Colicin E2 Operon. In: *PLoS ONE* 10 (2015), Nr. 3, S. e0119124
- [34] CURSINO, Luciana ; SMARDA, Jan ; CHARTONE SOUZA, Edmar ; NASCIMENTO, Andrea M.: Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. In: *Brazilian Journal of Microbiology* 33 (2002), S. 185–195
- [35] JACOB, F. ; PERRIN, D. ; SANCHEZ, C. ; MONOD, J.: Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator. In: *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 250 (1960), S. 1727–9

- [36] JACOB, F. ; MONOD, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 3 (1961), S. 318–56
- [37] COLE, Stewart T. ; SAINT-JOANIS, Brigitte ; PUGSLEY, Anthony P.: Molecular characterisation of the colicin E2 operon and identification of its products. In: *Molecular and General Genetics MGG* 198 (1985), Nr. 3, S. 465–472
- [38] GILLOR, Osnat ; VRIEZEN, Jan A. C. ; RILEY, Margaret A.: The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. In: *Microbiology* 154 (2008), Nr. 6, S. 1783–1792
- [39] LAU, P. C. ; ROWSOME, R. W. ; ZUKER, M. ; VISENTIN, L. P.: Comparative nucleotide sequences encoding the immunity proteins and the carboxyl-terminal peptides of colicins E2 and E3. In: *Nucleic Acids Research* 12 (1984), Nr. 22, S. 8733–8745
- [40] HOL, Felix ; VOGES, Mathias ; DEKKER, Cees ; KEYMER, Juan: Nutrient-responsive regulation determines biodiversity in a colicin-mediated bacterial community. In: *BMC Biology* 12 (2014), Nr. 1, S. 68
- [41] OPPENHEIM, Daniel S. ; YANOFSKY, Charles: Translational coupling during expression of the Tryptophan operon of *Escherichia coli*. In: *Genetics* 95 (1980), Nr. 4, S. 785–795
- [42] SCHUMPERLI, D. ; MCKENNEY, K. ; SOBIESKI, D. A. ; ROSENBERG, M.: Translational coupling at an intercistronic boundary of the *Escherichia coli* galactose operon. In: *Cell* 30 (1982), Nr. 3, S. 865–71
- [43] LU, F. M. ; CHAK, K. F.: Two overlapping SOS-boxes in ColE operons are responsible for the viability of cells harboring the Col plasmid. In: *Molecular and General Genetics MGG* 251 (1996), Nr. 4, S. 407–411
- [44] FORNELOS, Nadine ; BROWNING, Douglas F. ; BUTALA, Matej: The Use and Abuse of LexA by Mobile Genetic Elements. In: *Trends in Microbiology* 24 (2016), Nr. 5, S. 391–401

- [45] LITTLE, J. W.: LexA cleavage and other self-processing reactions. In: *Journal of Bacteriology* 175 (1993), Nr. 16, S. 4943–4950
- [46] WALKER, G C.: Inducible DNA Repair Systems. In: *Annual Review of Biochemistry* 54 (1985), Nr. 1, S. 425–457
- [47] YANG, Tsung-Yeh ; SUNG, Yun-Min ; LEI, Guang-Sheng ; ROMEO, Tony ; CHAK, Kin-Fu: Posttranscriptional repression of the *cel* gene of the ColE7 operon by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Research* (2010)
- [48] GUDAPATY, Seshagirirao ; SUZUKI, Kazushi ; WANG, Xin ; BABITZKE, Paul ; ROMEO, Tony: Regulatory Interactions of Csr Components: the RNA Binding Protein CsrA Activates *csrB* Transcription in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 183 (2001), Nr. 20, S. 6017–6027
- [49] LIU, Mu Y. ; GUI, Gaojun ; WEI, Bangdong ; PRESTON, James F. ; OAKFORD, Lawrence ; YUEKSEL, Uemit ; GIEDROC, David P. ; ROMEO, Tony: The RNA Molecule CsrB Binds to the Global Regulatory Protein CsrA and Antagonizes Its Activity in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 28, S. 17502–17510
- [50] WEILBACHER, Thomas ; SUZUKI, Kazushi ; DUBEY, Ashok K. ; WANG, Xin ; GUDAPATY, Seshigirao ; MOROZOV, Igor ; BAKER, Carol S. ; GEORGELLIS, Dimitris ; BABITZKE, Paul ; ROMEO, Tony: A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 48 (2003), Nr. 3, S. 657–670
- [51] OZEKI, H. ; STOCKER, B. A. D. ; DE MARGERIE, Helene: Production of Colicine by Single Bacteria. In: *Nature* 184 (1959), Nr. 4683, S. 337–339
- [52] HARDY, K. G. ; MEYNELL, G. G.: Induction of Colicin Factor E2-P9 by Mitomycin C. In: *Journal of Bacteriology* 112 (1972), Nr. 2, S. 1007–1009
- [53] TYLER, Jenny ; SHERRATT, David J.: Synthesis of E colicins in *Escherichia coli*. In: *Molecular and General Genetics MGG* 140 (1975), Nr. 4, S. 349–353

-
- [54] LEE, David J. ; MINCHIN, Stephen D. ; BUSBY, Stephen J.: Activating Transcription in Bacteria. In: *Annual Review of Microbiology* 66 (2012), Nr. 1, S. 125–152
- [55] ROJO, Fernando: Repression of Transcription Initiation in Bacteria. In: *Journal of Bacteriology* 181 (1999), Nr. 10, S. 2987–2991
- [56] MICHEL, Benedicte: After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. In: *PLoS Biology* 3 (2005), Nr. 7, S. e255
- [57] KAMENSEK, S. ; PODLESEK, Z. ; GILLOR, O. ; ZGUR-BERTOK, D.: Genes regulated by the *Escherichia coli* SOS repressor LexA exhibit heterogeneous expression. In: *BMC Microbiol* 10 (2010), S. 283
- [58] ERILL, Ivan ; ESCRIBANO, Marcos ; CAMPOY, Susana ; BARBE, Jordi: In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. In: *Bioinformatics* 19 (2003), Nr. 17, S. 2225–2236
- [59] ALON, Uri: Network motifs: theory and experimental approaches. In: *Nature Reviews Genetics* 8 (2007), Nr. 6, S. 450–461
- [60] SILVA-ROCHA, R. ; LORENZO, V. de: Noise and robustness in prokaryotic regulatory networks. In: *Annual Review of Microbiology* 64 (2010), S. 257–75
- [61] CAMAS, Francisco M. ; BLAZQUEZ, Jesus ; POYATOS, Juan F.: Autogenous and non-autogenous control of response in a genetic network. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 34, S. 12718–12723
- [62] MARTINEZ-ANTONIO, Agustino ; JANGA, Sarath C. ; THIEFFRY, Denis: Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. In: *Journal of Molecular Biology* 381 (2008), Nr. 1, S. 238–247
- [63] KAERN, Mads ; ELSTON, Timothy C. ; BLAKE, William J. ; COLLINS, James J.: Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. In: *Nature Reviews Genetics* 6 (2005), Nr. 6, S. 451–464

- [64] ELOWITZ, Michael B. ; LEVINE, Arnold J. ; SIGGIA, Eric D. ; SWAIN, Peter S.: Stochastic Gene Expression in a Single Cell. In: *Science* 297 (2002), Nr. 5584, S. 1183–1186
- [65] MARTINEZ, Luary C. ; VADYVALOO, Viveka: Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (2014), S. 38
- [66] VAN ASSCHE, Elke ; VAN PUYVELDE, Sandra ; VANDERLEYDEN, Jos ; STEENACKERS, Hans P.: RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. In: *Frontiers in Microbiology* 6 (2015), S. 141
- [67] BEYER, D ; SKRIPKIN, E ; WADZACK, J ; NIERHAUS, K H.: How the ribosome moves along the mRNA during protein synthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 48, S. 30713–30717
- [68] DUBEY, Ashok K. ; BAKER, Carol S. ; ROMEO, Tony ; BABITZKE, Paul: RNA sequence and secondary structure participate in high affinity CsrA RNA interaction. In: *RNA* 11 (2005), Nr. 10, S. 1579–1587
- [69] BAKER, Carol S. ; EOERY, Lel A. ; YAKHNIN, Helen ; MERCANTE, Jeffrey ; ROMEO, Tony ; BABITZKE, Paul: CsrA Inhibits Translation Initiation of *Escherichia coli* hfq by Binding to a Single Site Overlapping the Shine-Dalgarno Sequence. In: *Journal of Bacteriology* 189 (2007), Nr. 15, S. 5472–5481
- [70] IRIE, Yasuhiko ; STARKEY, Melissa ; EDWARDS, Adrienne N. ; WOZNIAK, Daniel J. ; ROMEO, Tony ; PARSEK, Matthew R.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. In: *Molecular Microbiology* 78 (2010), Nr. 1, S. 158–172
- [71] EISEN, Jonathan A. ; HANAWALT, Philip C.: A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. In: *Mutation Research/DNA Repair* 435 (1999), Nr. 3, S. 171–213

- [72] VAKULSKAS, Christopher A. ; POTTS, Anastasia H. ; BABITZKE, Paul ; AHMER, Brian M. M. ; ROMEO, Tony: Regulation of Bacterial Virulence by Csr (Rsm) Systems. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79 (2015), Nr. 2, S. 193–224
- [73] MERCANTE, Jeffrey ; EDWARDS, Adrienne N. ; DUBEY, Ashok K. ; BABITZKE, Paul ; ROMEO, Tony: Molecular Geometry of CsrA (RsmA) Binding to RNA and Its Implications for Regulated Expression. In: *Journal of Molecular Biology* 392 (2009), Nr. 2, S. 511–528
- [74] THATTAI, Mukund ; OUDENAARDEN, Alexander van: Intrinsic noise in gene regulatory networks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), Nr. 15, S. 8614–8619
- [75] ELF, Johan ; EHRENBERG, Mans: Fast Evaluation of Fluctuations in Biochemical Networks With the Linear Noise Approximation. In: *Genome Research* 13 (2003), Nr. 11, S. 2475–2484
- [76] SHIMONI, Yishai ; ALTUVIA, Shoshy ; MARGALIT, Hanah ; BIHAM, Ofer: Stochastic Analysis of the SOS Response in *Escherichia coli*. In: *PLoS ONE* 4 (2009), Nr. 5, S. e5363
- [77] MEGERLE, Judith A. ; FRITZ, Georg ; GERLAND, Ulrich ; JUNG, Kirsten ; RÄDLER, Joachim O.: Timing and Dynamics of Single Cell Gene Expression in the Arabinose Utilization System. In: *Biophysical Journal* 95 (2008), Nr. 4, S. 2103–2115
- [78] KREMERS, Gert-Jan ; GOEDHART, Joachim ; MUNSTER, Erik B. ; GADELLA, Theodor W. J.: Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius. In: *Biochemistry* 45 (2006), Nr. 21, S. 6570–6580
- [79] KERR, Benjamin ; RILEY, Margaret A. ; FELDMAN, Marcus W. ; BOHANNAN, Brendan J. M.: Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6894, S. 171–174

- [80] LIN-CHAO, Sue ; CHEN, Wen-Tsuan ; WONG, Ten-Tsao: High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. In: *Molecular Microbiology* 6 (1992), Nr. 22, S. 3385–3393
- [81] CRONAN, John E.: A family of arabinose-inducible *Escherichia coli* expression vectors having pBR322 copy control. In: *Plasmid* 55 (2006), Nr. 2, S. 152–157
- [82] BARTOSIK, Aneta A. ; GLABSKI, Krzysztof ; KULINSKA, Anna ; LEWICKA, Ewa ; GODZISZEWSKA, Jolanta ; MARKOWSKA, Aleksandra ; JAGURA-BURDZY, Grazyna: Convenient broad-host-range unstable vectors for studying stabilization cassettes in diverse bacteria. In: *BMC Microbiology* 16 (2016), Nr. 1, S. 1–15
- [83] LEWIS, L. K. ; HARLOW, Greg R. ; GREGG-JOLLY, Leslie A. ; MOUNT, David W.: Identification of High Affinity Binding Sites for LexA which Define New DNA Damage-inducible Genes in *Escherichia coli*. In: *Journal of Molecular Biology* 241 (1994), Nr. 4, S. 507–523
- [84] MRAK, Peter ; PODLESEK, Zdravko ; PUTTEN, JP M. ; ZGUR-BERTOK, Darja: Heterogeneity in expression of the *Escherichia coli* colicin K activity gene cka is controlled by the SOS system and stochastic factors. In: *Molecular Genetics and Genomics* 277 (2007), Nr. 4, S. 391–401
- [85] HENESTROSA, Antonio R. d. ; OGI, Tomoo ; AOYAGI, Sayura ; CHAFIN, David ; HAYES, Jeffrey J. ; OHMORI, Haruo ; WOODGATE, Roger: Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 35 (2000), Nr. 6, S. 1560–1572
- [86] WERTMAN, K. F. ; MOUNT, D. W.: Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 163 (1985), Nr. 1, S. 376–384
- [87] WALTER, Beata M. ; CARTMAN, Stephen T. ; MINTON, Nigel P. ; BUTALA, Matej ; RUPNIK, Maja: The SOS Response Master Regulator LexA Is Associated with

- Sporulation, Motility and Biofilm Formation in *Clostridium difficile*. In: *PLoS ONE* 10 (2015), Nr. 12, S. e0144763
- [88] WADE, Joseph T. ; REPPAS, Nikos B. ; CHURCH, George M. ; STRUHL, Kevin: Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. In: *Genes and Development* 19 (2005), Nr. 21, S. 2619–2630
- [89] KAMENSEK, Simona ; BROWNING, Douglas F. ; PODLESEK, Zdravko ; BUSBY, Stephen J. W. ; ZGUR-BERTOK, Darja ; BUTALA, Matej: Silencing of DNase Colicin E8 Gene Expression by a Complex Nucleoprotein Assembly Ensures Timely Colicin Induction. In: *PLoS Genetics* 11 (2015), Nr. 6
- [90] KÖLLING, R ; LOTHER, H: AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 164 (1985), Nr. 1, S. 310–315
- [91] TIMMERMANS, Johan ; VAN MELDEREN, Laurence: Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 191 (2009), Nr. 5, S. 1722–1724
- [92] ZUKER, Michael: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic Acids Research* 31 (2003), Nr. 13, S. 3406–3415
- [93] BAKER, Carol S. ; MOROZOV, Igor ; SUZUKI, Kazushi ; ROMEO, Tony ; BABITZKE, Paul: CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 44 (2002), Nr. 6, S. 1599–1610
- [94] ZHANG, Youming ; BUCHHOLZ, Frank ; MUYRERS, Joep P. P. ; STEWART, A. F.: A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. In: *Nat Genet* 20 (1998), Nr. 2, S. 123–128
- [95] DATSENKO, K. A. ; WANNER, B. L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 12, S. 6640–5

- [96] YASUEDA, Hisashi ; HORII, Toshihiro ; ITOH, Tateo: Structural and functional organization of ColE2 and ColE3 replicons. In: *Molecular and General Genetics MGG* 215 (1989), Nr. 2, S. 209–216
- [97] TAKECHI, S. ; YASUEDA, H. ; ITOH, T.: Control of ColE2 plasmid replication: regulation of rep expression by a plasmid-coded antisense RNA. In: *Molecular and General Genetics MGG* 244 (1994), Nr. 1, S. 49–56
- [98] SUSWAM, Esther A. ; LI, Yan Y. ; MAHTANI, Harry ; KING, Peter H.: Novel DNA-binding properties of the RNA-binding protein TIAR. In: *Nucleic Acids Research* 33 (2005), Nr. 14, S. 4507–4518
- [99] MORALES, Magali ; ATTAI, Hedieh ; TROY, Kimberly ; BERMUDEZ, David: Accumulation of single-stranded DNA in *Escherichia coli* carrying the colicin plasmid pColE3-CA38. In: *Plasmid* 77 (2015), Nr. 0, S. 7–16
- [100] EDELSTEIN, Arthur ; AMODAJ, Nenad ; HOOVER, Karl ; VALE, Ron ; STUURMAN, Nico: Computer Control of Microscopes Using μ Manager. In: *Current Protocols in Molecular Biology* (2001)
- [101] TOMASZ, Maria: Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). In: *Chemistry and Biology* 2 (1995), Nr. 9, S. 575–579
- [102] VOLLMER, A. C. ; BELKIN, S. ; SMULSKI, D. R. ; VAN DYK, T. K. ; LAROSSA, R. A.: Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'*::lux, *uvrA'*::lux, or *alkA'*::lux reporter plasmids. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), Nr. 7, S. 2566–2571
- [103] KELLER, Kimberly L. ; OVERBECK-CARRICK, Terri L. ; BECK, Doris J.: Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. In: *Mutation Research/DNA Repair* 486 (2001), Nr. 1, S. 21–29

- [104] ARAUJO, A. Caldeira d. ; FAVRE, A.: Near ultraviolet DNA damage induces the SOS responses in *Escherichia coli*. In: *The EMBO Journal* 5 (1986), Nr. 1, S. 175–179
- [105] SUZUKI, Hiromi ; PANGBORN, Jack ; KILGORE, Wendell W.: Filamentous Cells of *Escherichia coli* Formed in the Presence of Mitomycin. In: *Journal of Bacteriology* 93 (1967), Nr. 2, S. 683–688
- [106] SUZUKI, Hiromi ; KILGORE, Wendell W.: Effects of Mitomycin C on Macromolecular Synthesis in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 93 (1967), Nr. 2, S. 675–682
- [107] HEBISCH, Elke ; KNEBEL, Johannes ; LANDSBERG, Janek ; FREY, Erwin ; LEISNER, Madeleine: High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related *Escherichia coli* Strains. In: *PLoS ONE* 8 (2013), Nr. 10, S. e75991
- [108] YU, Ji ; XIAO, Jie ; REN, Xiaojia ; LAO, Kaiqin ; XIE, X. S.: Probing Gene Expression in Live Cells, One Protein Molecule at a Time. In: *Science* 311 (2006), Nr. 5767, S. 1600–1603
- [109] MARKWARDT, Michele L. ; KREMERS, Gert-Jan ; KRAFT, Catherine A. ; RAY, Krishanu ; CRANFILL, Paula J. C. ; WILSON, Korey A. ; DAY, Richard N. ; WACHTER, Rebekka M. ; DAVIDSON, Michael W. ; RIZZO, Mark A.: An Improved Cerulean Fluorescent Protein with Enhanced Brightness and Reduced Reversible Photoswitching. In: *PLoS ONE* 6 (2011), Nr. 3, S. e17896
- [110] YOUSSEF, Simon ; GUDE, Sebastian ; RADLER, Joachim O.: Automated tracking in live-cell time-lapse movies. In: *Integrative Biology* 3 (2011), Nr. 11, S. 1095–1101
- [111] AJO-FRANKLIN, Caroline M. ; DRUBIN, David A. ; ESKIN, Julian A. ; GEE, Elaine P. S. ; LANDGRAF, Dirk ; PHILLIPS, Ira ; SILVER, Pamela A.: Rational design of memory in eukaryotic cells. In: *Genes and Development* 21 (2007), Nr. 18, S. 2271–2276
- [112] MULEC, Janez ; PODLESEK, Zdravko ; MRAK, Peter ; KOPITAR, Andreja ; IHAN, Alojz ; ZGUR-BERTOK, Darja: A cka-gfp Transcriptional Fusion Reveals that the

- Colicin K Activity Gene Is Induced in Only 3 Percent of the Population. In: *Journal of Bacteriology* 185 (2003), Nr. 2, S. 654–659
- [113] HARDY, K. G. ; HARWOOD, C. R. ; MEYNELL, G. G.: Expression of colicin factor E2-P9. In: *Molecular and General Genetics MGG* 131 (1974), Nr. 4, S. 313–331
- [114] PUGSLEY, A. P. ; ROSENBUSCH, J. P.: Release of colicin E2 from *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 147 (1981), Nr. 1, S. 186–192
- [115] GHAZARYAN, Lusine ; SOARES, M. I. ; GILLOR, Osnat: Auto-regulation of DNA degrading bacteriocins: molecular and ecological aspects. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 105 (2014), Nr. 5, S. 823–834
- [116] PUGSLEY, AnthonyP: Autoinduced synthesis of colicin E2. In: *Molecular and General Genetics MGG* 190 (1983), Nr. 3, S. 379–383
- [117] ACKERMANN, Martin: A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. In: *Nature Reviews Microbiology* 13 (2015), S. 497–508
- [118] OZBUDAK, Ertugrul M. ; THATTAI, Mukund ; LIM, Han N. ; SHRAIMAN, Boris I. ; OUDENAARDEN, Alexander: Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6976, S. 737–740
- [119] ROMEO, T ; GONG, M ; LIU, M Y. ; BRUN ZINKERNAGEL, A M.: Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. In: *Journal of Bacteriology* 175 (1993), Nr. 15, S. 4744–4755
- [120] WEI, Yan ; VOLLMER, Amy C. ; LAROSSA, Robert A.: In Vivo Titration of Mitomycin C Action by Four *Escherichia coli* Genomic Regions on Multicopy Plasmids. In: *Journal of Bacteriology* 183 (2001), Nr. 7, S. 2259–2264
- [121] YAKHNIN, Helen ; YAKHNIN, Alexander V. ; BAKER, Carol S. ; SINEVA, Elena ; BEREZIN, Igor ; ROMEO, Tony ; BABITZKE, Paul: Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five

- promoters by Sigma70 and SigmaS, and indirect transcriptional activation by CsrA. In: *Molecular Microbiology* 81 (2011), Nr. 3, S. 689–704
- [122] MEY, Alexandra R. ; BUTZ, Heidi A. ; PAYNE, Shelley M.: *Vibrio cholerae* CsrA Regulates ToxR Levels in Response to Amino Acids and Is Essential for Virulence. In: *mBio* 6 (2015), Nr. 4
- [123] JONAS, Kristina ; EDWARDS, Adrienne N. ; SIMM, Roger ; ROMEO, Tony ; RÖMLING, Ute ; MELEFORS, Oejar: The RNA binding protein CsrA controls c-di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. In: *Molecular microbiology* 70 (2008), Nr. 1, S. 236–257
- [124] WENG, Mao-wen ; ZHENG, Yi ; JASTI, Vijay P. ; CHAMPEIL, Elise ; TOMASZ, Maria ; WANG, Yinsheng ; BASU, Ashis K. ; TANG, Moon-shong: Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. In: *Nucleic Acids Research* (2010)
- [125] DAVIDOV, Yaakov ; ROZEN, Rachel ; SMULSKI, Dana R. ; VAN DYK, Tina K. ; VOLLMER, Amy C. ; ELSEMORE, David A. ; LAROSSA, Robert A. ; BELKIN, Shimshon: Improved bacterial SOS promoter lux fusions for genotoxicity detection. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 466 (2000), Nr. 1, S. 97–107
- [126] NIKAIDO, Hiroshi: Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps. In: *Clinical Infectious Diseases* 27 (1998), Nr. Supplement 1, S. S32–S41
- [127] GEORGOPOULOS, M. ; VASS, C. ; VATANPARAST, Z. ; WOLFSBERGER, A. ; GEORGOPOULOS, A.: Activity Of Dissolved Mitomycin C After Different Methods Of Long-term Storage. In: *Journal of Glaucoma* 11 (2002), Nr. 1, S. 17–20
- [128] BUTALA, M. ; SONJAK, S. ; KAMENSEK, S. ; HODOSCEK, M. ; BROWNING, D. F. ; ZGUR-BERTOK, D. ; BUSBY, S. J.: Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis. In: *Molecular Microbiology* 86 (2012), Nr. 1, S. 129–39

- [129] WEI, Bangdong ; SHIN, Soan ; LAPORTE, David ; WOLFE, Alan J. ; ROMEO, Tony: Global Regulatory Mutations in *csrA* and *rpoS* Cause Severe Central Carbon Stress in *Escherichia coli* in the Presence of Acetate. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 6, S. 1632–1640
- [130] CHANG, Hao-Wei ; YANG, Tsung-Yeh ; LEI, Guang-Sheng ; CHAK, Kin-Fu: A Novel Endogenous Induction of *COE7* Expression in a *csrA* Mutant of *Escherichia coli*. In: *Current Microbiology* 66 (2013), Nr. 4, S. 392–397
- [131] ESQUERRE, Thomas ; BOUVIER, Marie ; TURLAN, Catherine ; CARPOUSIS, Agamemnon J. ; GIRBAL, Laurence ; COCAIGN-BOUSQUET, Muriel: The Csr system regulates genome-wide mRNA stability and transcription and thus gene expression in *Escherichia coli*. In: *Scientific Reports* 6 (2016), S. 25057
- [132] JACKSON, D. W. ; SUZUKI, K. ; OAKFORD, L. ; SIMECKA, J. W. ; HART, M. E. ; ROMEO, T.: Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 184 (2002), Nr. 1, S. 290–301
- [133] CAMACHO, Martha I. ; ALVAREZ, Adrian F. ; GONZALEZ CHAVEZ, Ricardo ; ROMEO, Tony ; MERINO, Enrique ; GEORGELLIS, Dimitris: Effects of the Global Regulator CsrA on the BarA/UvrY Two-Component Signaling System. In: *Journal of Bacteriology* 197 (2015), Nr. 5, S. 983–991
- [134] JOERGENSEN, Mikkel G. ; THOMASON, Maureen K. ; HAVELUND, Johannes ; VALENTIN-HANSEN, Poul ; STORZ, Gisela: Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. In: *Genes and Development* 27 (2013), Nr. 10, S. 1132–1145
- [135] BABITZKE, Paul ; ROMEO, Tony: CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. In: *Current Opinion in Microbiology* 10 (2007), Nr. 2, S. 156–163
- [136] NOGUEIRA, T. ; SPRINGER, M.: Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. In: *Current Opinion in Microbiology* 3 (2000), Nr. 2, S. 154–8

- [137] STERZENBACH, Torsten ; NGUYEN, Kim T. ; NUCCIO, Sean P. ; WINTER, Maria G. ; VAKULSKAS, Christopher A. ; CLEGG, Steven ; ROMEO, Tony ; BAEUMLER, Andreas J.: A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella typhimurium*. In: *The EMBO Journal* 32 (2013), Nr. 21, S. 2872–2883
- [138] ALTSCHUL, S. F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E. W. ; LIPMAN, D. J.: Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215 (1990), Nr. 3, S. 403–10
- [139] HIRAGA, S. ; SUGIYAMA, T. ; ITOH, T.: Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. In: *Journal of Bacteriology* 176 (1994), Nr. 23, S. 7233–7243
- [140] SOLAR, Gloria del ; MOSCOSO, Miriam ; ESPINOSA, Manuel: Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. In: *Molecular Microbiology* 8 (1993), Nr. 5, S. 789–796
- [141] KHAN, Saleem A.: Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. In: *Plasmid* 53 (2005), Nr. 2, S. 126–136
- [142] MATHIS, Roland ; ACKERMANN, Martin: Response of single bacterial cells to stress gives rise to complex history dependence at the population level. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (2016), Nr. 15, S. 4224–4229
- [143] ELBING, Karen ; BRENT, Roger: Media Preparation and Bacteriological Tools. In: *Current Protocols in Molecular Biology* (2001)
- [144] PUGSLEY, ANTHONY P. ; GOLDZAHN, NICOLAS ; BARKER, RUTH M.: Colicin E2 Production and Release by *Escherichia coli* K12 and Other Enterobacteriaceae. In: *Microbiology* 131 (1985), Nr. 10, S. 2673–2686
- [145] BULLOCK, W. O. ; FERNANDEZ, J. M. ; SHORT, J. M.: XL1-blue A high efficiency Plasmid transforming RecA *Escherichia coli* strain with a betagalactosidase selection. In: *Biotechniques* 5 (1987), Nr. 4, S. 376

Publikationsliste

Alexandra Götz, Matthias Lechner, Andreas Mader, Benedikt von Bronk, Erwin Frey and Madeleine Opitz

Interplay of ssDNA and CsrA time release of the bacteriocin Colicin E2.

Manuscript in preparation.

Mader A., von Bronk B., Ewald B., Kesel S., Schnetz K., Frey E., Opitz M. (2015)

Amount of Colicin Release in *Escherichia coli* is regulated by Lysis Gene Expression of the Colicin E2 Operon.

PLoS ONE 10(3): e0119124. doi:10.1371/journal.pone.0119124

Kesel S., Mader A., Seeberger P. H., Lieleg O., Opitz M. (2014)

Carbohydrate Coating Reduces Adhesion of Biofilm-Forming *Bacillus subtilis* to Gold Surfaces.

Applied and Environmental Microbiology 07/2014; 80(19). DOI:10.1128/AEM.01600-14

Kesel S., Moormann F., Gümperlein I., Mader A., Morikawa M., Lieleg O., Opitz M. (2014)

Draft Genome Sequence of the Biofilm-Producing *Bacillus subtilis* Strain B-1, Isolated from an Oil Field.

Genome Announcements 12/2014; 2(6). DOI:10.1128/genomeA.01163-14

Kirchner S. R., Nedev S., Carretero-Palacios S., Mader A., Opitz M., Lohmüller T., Feldmann J. (2014)

Direct optical monitoring of flow generated by bacterial flagellar rotation.

Applied Physics Letters 104, 093701

Kesel S., Mader A., Hölfer C., Mascher Th., Leisner M. (2013)

Immediate and heterogeneous response of the LiaFSR two-component system of *Bacillus subtilis* to the peptide antibiotic bacitracin.

PLoS ONE 8(1): e53457. doi:10.1371/journal.pone.0053457

Mader A., Gruber K., Castelli R., Hermann B., Seeberger P.H., Raedler J., Leisner M. (2012)

Discrimination of *Escherichia coli* strains using Glycan Cantilever Array Sensors.

Nano Letters 12, 420-423

Gruber K., Horlacher T., Castelli R., Mader A., Seeberger P. H., Hermann B. A. (2011)

Cantilever Array Sensors Detect Specific Carbohydrate Protein Interactions with Picomolar Sensitivity.

ACS Nano 5 (5), pp 3670-3678.

Mader A., Waltner C., Giersch J. (2009)

Physikworkshops für Jugendliche an den Beispielen Raketentechnik und Elektronik - Eine Kooperation des physikalischen Praktikums mit der Physikdidaktik.

Nordmeier, V., Oberländer, A.(Hrsg.): Didaktik der Physik, Bochum 2009. Berlin: Lehmanns Media

Danksagung

Der Spaß fängt erst dann an, wenn man die Regeln kennt. Im Universum aber sind wir momentan noch dabei, die Spielanleitung zu lesen.

Richard Feynman

Ich bedanke mich bei allen die mich im Laufe der Promotionszeit unterstützt und mir dabei geholfen haben, einen Teil der Regeln zu verstehen, insbesondere bei

Prof. Dr. J.O. Rädler, für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl meine Doktorarbeit anzufertigen, seine fortwährende Unterstützung und das produktive Arbeitsumfeld, das er uns an seinem Lehrstuhl zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Madeleine Opitz, für die hervorragende Betreuung, für die Hilfe in allen Lebenslagen, das offene Ohr das Du immer für mich hattest und hast und dafür dass Du immer einen Vorschlag zur Lösung des Problems parat hast.

Prof. Dr. E. Frey, Prof. Dr. K. Schnetz, Dr. T. Lohmüller, für die gute Zusammenarbeit in den Kooperationen.

der **Arbeitsgruppe Opitz**, ohne Euch wäre die Zeit am Lehrstuhl nur halb so schön gewesen.

Danksagung

meinen **Bachelorstudenten (Sophia, Steven, Eda und Samira), Masterstudenten (Benedikt und Benedikt, Alexandra) und Diplomstudenten (Tino)**, die ich betreuen durfte und dabei so viel gelernt habe.

meinen **Kollegen**, für eine wunderschöne Zeit am Lehrstuhl, mit vielen einmaligen Erlebnissen, hier besonders **Sara** (störet unsere Kreise nicht), dem **Kellerbüro** (mit allen seinen derzeitigen und ehemaligen „Insassen“), **Tobias, Judith, Peter, Matthias, Christoph, Sonja**, und vielen weiteren.

Gerlinde, für die Einblicke ins Klonieren, bei **Charlott, Susi, Max, Margarete** und **Andrea**, dafür das sie als Helfer in allen Labor und Bürofragen den Lehrstuhl am laufen halten und immer ein offenes Ohr für Probleme haben.

meinen eifrigen **Korrekturlesern**, denn man sieht die Fehler selber einfach nicht.

Es ist schön die Menschen am Lehrstuhl kennen gelernt zu haben und ich hoffe mit vielen einen Teil meines weiteren Lebenswegs zu gehen. Außerdem möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und meinen Freunden einen Dank aussprechen, die mich immer unterstützten auf meinem Lebensweg. Insbesondere möchte ich dabei meiner Frau danken, die geduldig immer wieder meine Launen ertrug, wenn das Experiment mal wieder anderer Meinung war als der Experimentator und meinem kleinen Kilian, der mit seinem Lachen mir so oft zeigte und zeigt was wichtig ist im Leben und das manch ein Problem nicht so schwer wiegt, wie es am Anfang scheint.