

**LrhA als Regulator der Flagellen,
Motilität, Chemotaxis und Typ 1 Fimbrien
in *Escherichia coli***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Daniela Lehnen
geb. in Cochem

Mainz, August 2002

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Funktion LrhA-homologer Proteine	2
2.2 Das <i>flhDC</i> -Operon von <i>E. coli</i> : Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgene	5
2.3 Typ 1 Fimbrien von <i>E. coli</i>	6
3 Material und Methoden	8
3.1 Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	8
3.2 Medien und Zucht	10
3.3 Molekulargenetische Methoden	13
3.4 Biochemische Methoden	24
3.5 Sonstige Methoden	26
4 Ergebnisse	29
4.1 Identifizierung LrhA-regulierter Gene durch DNA-Microarray-Analyse	29
4.2 Regulation der Flagellen- und Chemotaxisgene durch LrhA	37
4.3 Regulation der Fimbriengene des Typs 1 durch LrhA	50
4.4 DNA-Macroarray-Analyse virulenter Gene aus dem uropathogenen Stamm <i>E. coli</i> 536	57
4.5 Autoregulation der <i>lrhA</i> -Expression	60
4.6 Suche nach dem Effektor für LrhA	63
5 Diskussion	66
5.1 LrhA-regulierte Gene	66
5.2 Rolle von LrhA bei der Kontrolle der Motilität, Chemotaxis und Flagellensynthese	66
5.3 Rolle von LrhA bei der Kontrolle der Typ 1 Fimbrien-Synthese	69
5.4 Autoregulation von <i>lrhA</i>	72
5.5 DNA-Bindestelle von LrhA	72
5.6 Einfluss von LrhA auf Virulenzfaktoren	75

5.7	Kontrolle und Bedeutung der Funktion von LrhA	75
5.8	Einfluss von LrhA auf die Biofilmbildung	76
5.9	Beteiligung von LrhA am Quorum Sensing?	77
6	Veröffentlichungen	81
7	Literatur	82

1 Zusammenfassung

Das *lrhA*-Gen von *E. coli* kodiert für einen Transkriptionsregulator der LysR-Familie. In *Erwinia* sind Genregulatoren (HexA und PecT) mit großer Sequenzähnlichkeit (64 und 61 % Identität) zu LrhA zu finden. HexA und PecT aus den pflanzenpathogenen *Erwinia*-Stämmen regulieren die Expression von Virulenzfaktoren. Die Funktion von LrhA war ungeklärt und sollte mit Hilfe von Genomanalysen untersucht werden. Dazu wurde die Gesamt-mRNA aus einem *E. coli* Wildtyp und einer isogenen *lrhA*-Mutante verglichen. In der *lrhA*-Mutante war der mRNA-Gehalt vieler Gene um den Faktor 3 bis 80 erhöht. Diese Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gene der ersten Gruppe kodieren für Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgene, die der zweiten Gruppe für Fimbrien des Typs 1. Die veränderten mRNA-Gehalte der *lrhA*-Mutante wurden in Expressionsmessungen mit dem Reportergen *lacZ* bestätigt.

Als Regulator der LysR-Familie sollte LrhA an die Promotoren seiner Zielgene binden. Die DNA-Bindung wurde in Gelretentionsexperimenten mit ausgewählten Genen getestet. LrhA war in der Lage an den Promotor von *flhDC* zu binden, aber nicht an die Promotoren der übrigen Gene für Motilität und Chemotaxis. Die Gene für Flagellen, Motilität und Chemotaxis sind einer hierarchischen Regulation unterworfen. An oberster Stelle steht der Regulator FlhD₂C₂, der von *flhDC* kodiert wird und die Expression der übrigen Gene kontrolliert. Es scheint, dass die Regulation durch LrhA über den übergeordneten Regulator FlhD₂C₂ läuft.

LrhA war außerdem in der Lage an die Promotoren der Gene für Typ 1 Fimbrien *fimA* (Hauptuntereinheit der Fimbrien) und *fimE* (negativer Regulator von *fimA*) zu binden. Typ 1 Fimbrien stellen in *E. coli* Virulenzfaktoren dar. Neben diesen sind in uropathogenen *E. coli*-Stämmen weitere Pathogenitätsfaktoren bekannt. Eine Regulation dieser weiteren Virulenzfaktoren von LrhA wurde durch Vergleich der mRNA-Menge in Wildtyp und *lrhA*-Mutante in DNA-Pathoarrays, die 475 Virulenzgene enthielten, ausgeschlossen.

LrhA ist damit ein wichtiger Transkriptionsregulator, der die Expression der Gene für Flagellen, Motilität, Chemotaxis und Typ 1 Fimbrien reguliert. *FlhDC*, *fimA* und *fimE* stellen dabei direkte Zielgene von LrhA dar, während die anderen Gene indirekt reguliert werden.

Neben diesen Zielgenen wurde die Bindung von LrhA an den eigenen Promotor und eine positive Autoregulation nachgewiesen. Mit DNaseI-Footprintexperimenten ließen sich die Bindestellen von LrhA an den Promotoren von *flhDC* und *lrhA* identifizieren.

2 Einleitung

2.1 Funktion LrhA-homologer Proteine

Der LysR-ähnliche Genregulator LrhA (LysR-homologue A) von *Escherichia coli* wird von dem Gen *lrhA* kodiert. Es ist stromauf des *nuoA-N* Locus (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase) bei Minute 51 auf dem Chromosom von *E. coli* lokalisiert (Bongaerts et al., 1995). LysR-ähnliche Regulatoren haben einen charakteristischen Aufbau, der auch bei LrhA zu finden ist. Die DNA-Bindedomäne im N-terminalen Bereich enthält ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Im mittleren Bereich des Proteins befindet sich eine Region, die Cofaktoren erkennt und bindet. Die Funktion der dritten Domäne nahe des C-Terminus ist noch nicht völlig geklärt, wahrscheinlich dient sie aber ebenfalls der DNA-Bindung oder Cofaktor-Erkennung (Abb. 1). Die DNA-Bindung erfolgt an einem schwach konservierten Konsensus mit palindromischer Sequenz (CTGA-N₇-TCAG).

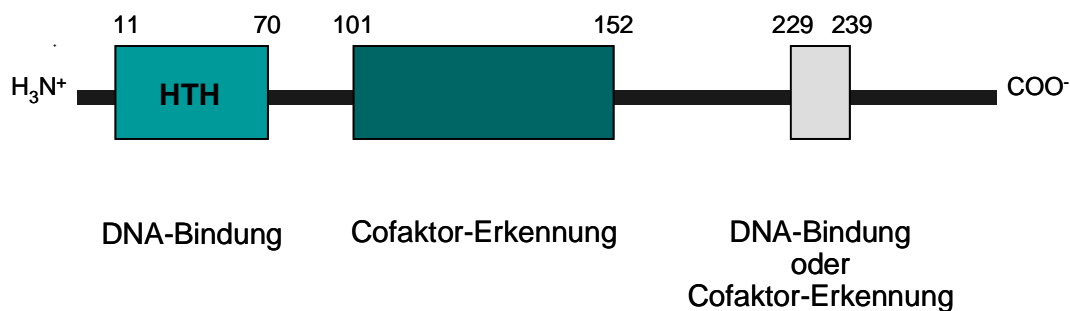


Abb. 1 Charakteristische Domänen von LrhA (Vorhersage aus der Aminosäuresequenz, Bongaerts et al., 1995). Die Domänen von LrhA sind durch Balken gekennzeichnet. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren an, die die jeweiligen Domänen begrenzen. Die DNA-Bindedomäne beinhaltet ein Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH).

Die Regulatoren der LysR-Familie kontrollieren unterschiedlichste Funktionen im Bakterienstoffwechsel, z.B. den Aminosäurehaushalt (GltC aus *Bacillus subtilis*), die CO_2 -Fixierung (CbbR aus *Ralstonia eutropha*) oder Stressreaktionen der Zelle (OxyR aus *Escherichia coli*). Die Strukturgene der LysR-Regulatoren liegen oft in umgekehrter Orientierung in unmittelbarer Nachbarschaft ihrer Zielgene. Die Expression dieser Strukturgene der LysR-Regulatoren unterliegt häufig einer positiven oder negativen Autoregulation durch die LysR-Regulatoren. Die Funktion der LysR-ähnlichen Proteine wird meist durch die Bindung eines Effektors oder Induktors beeinflusst. Diese Effektoren sind oft Intermediate aus den regulierten Stoffwechselwegen (Schell, 1993).

Das LrhA-Protein mit einer Länge von 312 Aminosäuren zeigt eine hohe Homologie zu den LysR-ähnlichen Regulatoren HexA aus *Erwinia carotovora* mit 64% Identität und PecT aus *Erwinia chrysanthemi* (61% Identität) (Tab. 1). HexA und PecT fungieren in diesen pflanzenpathogenen Organismen allgemein als Repressoren der Motilität und von Virulenzfaktoren, wie z.B. von Exoenzymen, die für lytische Reaktionen benötigt werden (Harris et al., 1998; Surgey et al., 1996). Die Sekretion pectinabbauender Enzyme, die zur Degradierung der pflanzlichen Zellwand vonnöten sind, ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. So ist PecT von *E. chrysanthemi* in der Lage, die Expression der Gene für Pectatlyasen zu reprimieren und hat einen Effekt auf die bakterielle Schleimbildung (Surgey et al., 1996).

In einer *hexA*-Mutante von *E. carotovora* ist die Expression von Flagellengenen (*fliA* und *fliC*) stark erhöht, was zu einer Hypermotilität des Organismus führt (Harris et al., 1998). HexA scheint mindestens drei regulatorische Systeme zu beeinflussen: die Expression der regulatorischen RNA *rsmB* (Homologes in *E. coli* ist *csrB*); die Synthese des Quorum Sensing-Pheromons OHL (N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton) und die Stabilität des für die stationäre Wachstumsphase typischen Sigmafaktors RpoS (Mukherjee et al., 2000).

Quorum Sensing-Pheromone dienen der intraspezifischen Zell-Kommunikation der Bakterien. Die ersten beiden regulatorischen Systeme hängen voneinander ab, da HexA die Transkription von *rsmB* negativ reguliert. *RsmB* wiederum ist ein positiver Regulator der OHL-Synthese, und OHL ist ein positiver Regulator der Synthese von Exoenzymen. Der erhöhte RpoS-Spiegel in einer *hexA*-Mutante scheint auf einen anderen regulatorischen Weg zurückzuführen sein, der das Protein SprE und die ClpX- und ClpP-Proteasen beinhaltet (Mukherjee et al., 2000). Der Response-Regulator SprE (stationary-phase regulator) ist Teil eines Zwei-Komponentensystems und reguliert die Stabilität von RpoS. Dies geschieht über die Kontrolle der RpoS-Degradierung durch ClpX und ClpP (Pratt und Silhavy, 1996). RpoS reguliert (in *E. carotovora*) neben anderen wichtigen Funktionen die Produktion extrazellulärer Enzyme und die Virulenz (Mukherjee et al., 1998). In *E. coli* wird die Stabilität oder Konzentration des Sigmafaktors RpoS durch LrhA beeinflusst. Dies geschieht ebenfalls über SprE (in *E. coli* RssB) und die Proteasen ClpXP (Gibson und Silhavy, 1999).

LrhA zeigt außerdem Ähnlichkeit (27% Identität) zu dem Transkriptionsregulator CbbR aus *Ralstonia eutropha* und *Xanthobacter flavus* (Tab. 1). CbbR kontrolliert die Expression des *cbb*-Operons, welches für die Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus kodiert. In Abwesenheit von Kohlenstoffquellen und in Anwesenheit von Methanol, Formiat oder H₂ werden die *cbb*-Gene verstärkt exprimiert. In *R. eutropha* reagiert CbbR auf die Anwesenheit des Effektors

Phosphoenolpyruvat (Grzeszik et al., 2000) und bei *X. flavus* stellte sich NADPH als regulatorisches Signal heraus (Van Keulen et al., 1998).

Tabelle 1 Ähnlichkeiten zwischen LrhA und nahen Verwandten der LysR-Familie. Sequenzvergleiche wurden mit dem CLUSTAL-Programm durchgeführt.

Regulator	Bakterium	Funktion	% Identität mit LrhA	Effektor
HexA	<i>Erwinia carotovora</i>	Motilität Synthese von Exoenzymen Virulenz	64	unbekannt
PecT	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Motilität Synthese von Exoenzymen Pectinabbau Virulenz	61	unbekannt
CbbR	<i>Ralstonia eutropha</i>	CO ₂ -Fixierung	27	Phosphoenolpyruvat
CbbR	<i>Xanthobacter flavus</i>	CO ₂ -Fixierung	27	NADPH

Die Beteiligung an der Stabilität des RpoS-Proteins ist die bisher einzige identifizierte Rolle von LrhA. Ein klarer Phänotyp einer *E. coli* *lrhA*-Mutante ließ sich bisher jedoch nicht ermitteln. Es zeigte sich lediglich ein Wachstumsdefizit bei Zucht auf Acetat (Zoske, 1994). Vergleicht man die Funktion der LrhA-homologen Proteine HexA und PecT mit der von LrhA, so scheint es, dass die Hauptfunktion von LrhA noch nicht identifiziert wurde. Deshalb wurden in einer Expressionsanalyse des Gesamtgenoms (Wendisch et al., 2001) die Zielgene des Regulators LrhA mit Hilfe von DNA-Microarrayexperimenten ausfindig gemacht. Hierbei konnten Änderungen des relativen mRNA-Spiegels durch paarweisen Vergleich eines *E. coli* Wildtyp-Stammes und einer isogenen *lrhA*-Mutante bestimmt werden. Diese Studien zeigten, dass LrhA der Transkriptionsregulator von zwei großen Gengruppen ist. Zum einen handelt es sich um flagellen- und chemotaxispezifische Gene und zum anderen um die Gene, die für Fimbrien des Typs 1 kodieren.

2.2 Das *flhDC*-Operon von *E. coli*: Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgene

Die erste Gruppe LrhA-regulierter Gene ist mit den Genen des *flhDC*-Regulons identisch (Abb. 2). Dieses Regulon kodiert für eine Vielzahl an strukturellen, biosynthetischen und regulatorischen Genen für Flagellen, Motilität und Chemotaxis. Es besteht aus 14 Operonen, die in hierarchischer Weise reguliert und in drei Klassen eingeteilt werden (Macnab, 1996).

An oberster Stelle steht der übergeordnete Regulator FlhD₂C₂, der auch als positiver Haupt-Regulator bezeichnet wird. FlhD₂C₂ wird vom *flhDC*-Operon kodiert, welches in der obersten Hierarchiestufe steht (Klasse I). FlhD₂C₂ reguliert die Expression der Gene der Klasse II. Zur Klasse II zählen *fliA* und Gene, die für strukturelle Komponenten des Basalkörpers und des Hakens der Flagellen kodieren. *FliA* kodiert für FliA, den flagellenspezifischen Sigmafaktor (σ^F), welcher hauptsächlich die Expression der in der Hierarchie nachfolgenden Gene der Klasse III veranlasst. Zu diesen Genen zählen z.B. *fliC* (Flagellin), Chemotaxisgene (z.B. *cheAB*), Gene für Chemosensoren (*trg*, *tar* und *air*) und Gene für die Motorrotation (*motAB*). Die Expression aller Gene dieser Kaskade hängt damit direkt oder indirekt von dem Heterotetramer FlhD₂C₂ ab (Abb. 2).

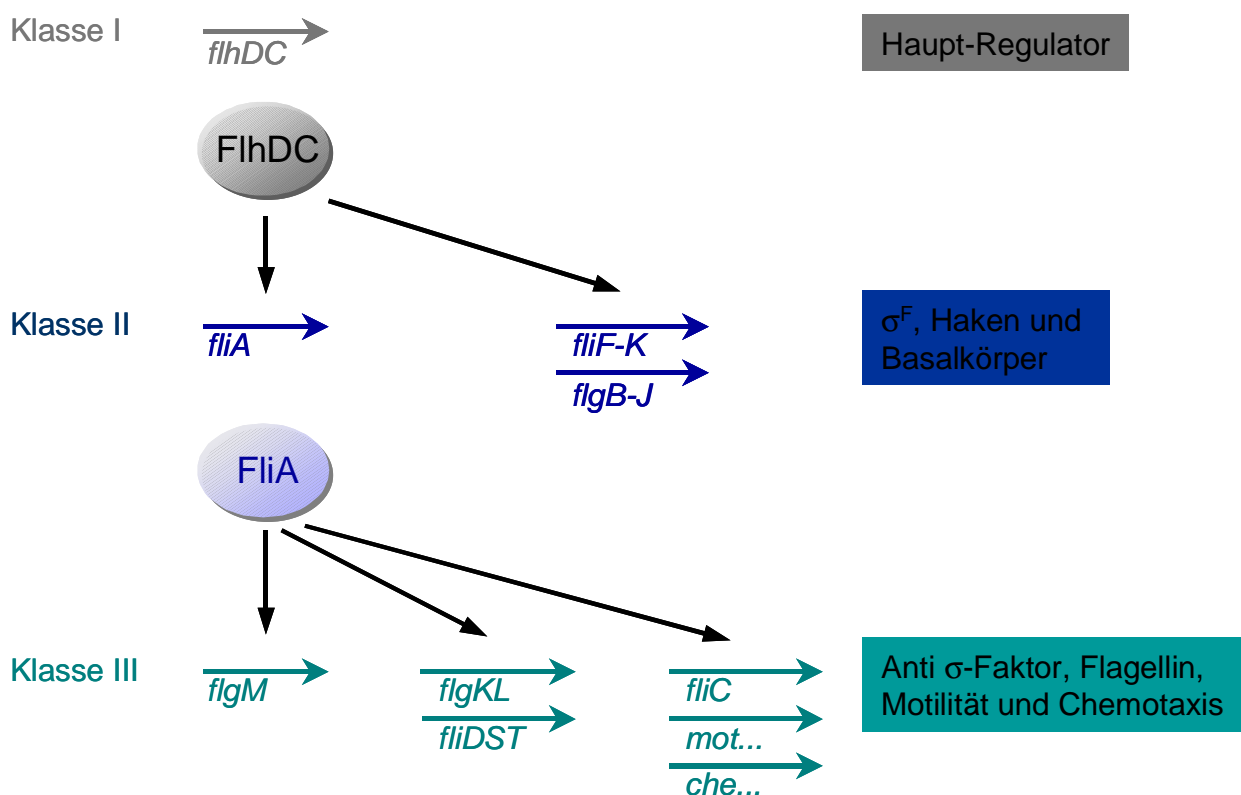


Abb. 2 Hierarchie der transkriptionellen Regulation der Flagellensynthese in *E. coli* und Einteilung in drei Klassen. Vereinfachte Darstellung nach Macnab, 1996.

2.3 Typ 1 Fimbrien von *E. coli*

Typ1-Fimbrien sind filamentöse Zellanhänge von *E. coli*, die das Anheften der Zellen an mannosehaltigen Rezeptoren eukaryontischer Zellen ermöglichen. Sie sind in vielen gram-negativen Bakterien zu finden und spielen eine Rolle bei der gewöhnlichen Wechselwirkung zwischen Wirt und Bakterium. Bei *E. coli* sind die Gene der Typ1 Pili in einem *fim*-Gencluster auf dem Chromosom lokalisiert. Die Fimbrien bestehen aus der Hauptuntereinheit FimA und einigen kleineren Untereinheiten, wie z.B. dem Adhäsin FimH. FimH ist an der Spitze der Fimbrien zu finden und vermittelt die Erkennung mannosehaltiger Rezeptoren (Connell et al., 1996). Die Transkription von *fimA* wird durch einen „phasenvariablen“ Mechanismus reguliert (Low et al., 1996). Der *fimA*-Promotor enthält ein invertierbares DNA-Element. Die Orientierung dieses Elementes bestimmt, ob *fimA* transkribiert wird (Phase-ON) oder nicht (Phase-OFF) (Abb. 3).

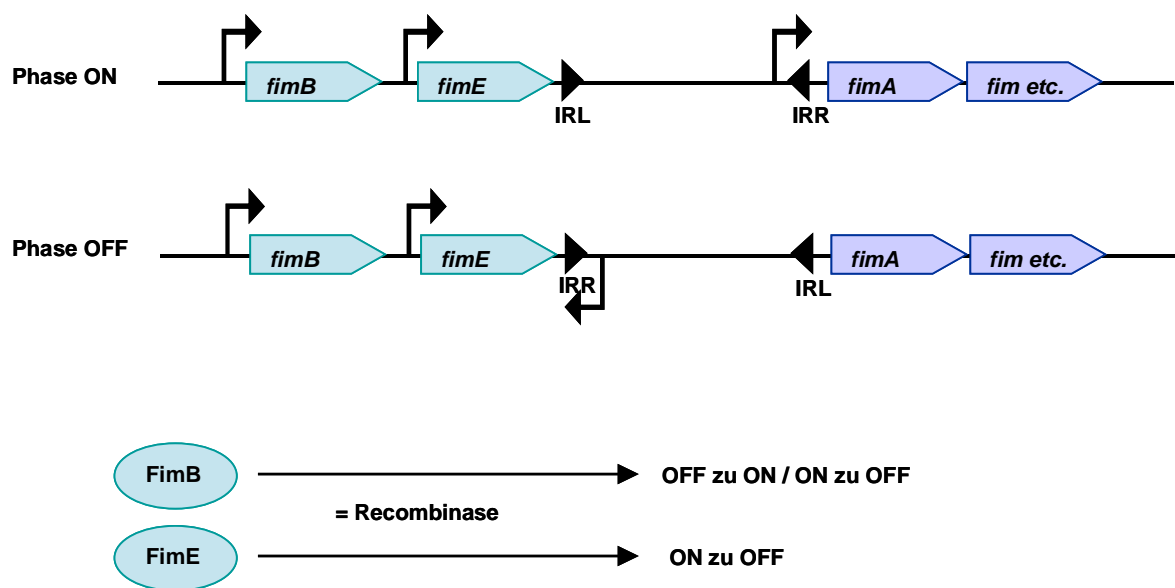


Abb. 3 Phasenvariation des *fimA*-Promotors. Die Resolvasen FimB und FimE bewirken über die invertierbaren DNA-Sequenzen IRL und IRR eine ortsspezifische Rekombination und Inversion des *fimA*-Promotors. Nach Rekombination (Phase-OFF) besitzt der Promotor von *fimA* die „falsche“ Orientierung, *fimA* wird nicht transkribiert.

Diese ungewöhnliche Form der Transkriptions-Kontrolle der Bakterien ist nur für wenige Gene bekannt, z.B. bei der Expression von Fimbrien- und Flagellengenen in Enterobakterien.

Die Inversion des Elements wird durch zwei Resolvasen angetrieben, die durch ortsspezifische Rekombination die Inversion des Promotorbereiches vor *fimA* bewirken. FimB führt die Inversion in beiden Richtungen durch, während FimE nur für die Inversion in eine Richtung verantwortlich ist und ausschließlich den Phase-OFF-Zustand herstellt. Diese Phasenvariation wird auch als *fim*-Switch bezeichnet. Ein ähnlicher Prozess ist für die Flagellen von *Salmonella* bekannt, die zwischen der Synthese von zwei Flagellentypen mit unterschiedlichen antigenen Eigenschaften umschalten können (Lengeler et al., 1999).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Tabelle 2 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Phagen.

Stämme	Genotyp	Referenz
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 flhD530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy et al., 1984
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ['] <i>hsdS gal1</i> DE3	Studier und Moffat, 1986
JM105	<i>thi strA endA sbcB15 hsdR4 (lac-proAB)</i> F'(traD36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q $\lambda\alpha\chi Z\Delta M15$)	Yanisch-Perron et al., 1985
CP992	Δ <i>lac</i> λ SS10(<i>flhDC</i> ⁻ <i>lacZ</i>) <i>amp</i> ^R	Shin und Park, 1995
MG1655	Wildtyp <i>E. coli</i> K-12	Jensen, 1993
LJ10	MG1655, aber Δ (<i>lacA-lacZ</i>) 515(:: <i>cat</i>) <i>lacIp</i> -4000(<i>lacIQ</i>)	K. Jahreis, Osnabrück
IMW334	LJ10, aber λ (Φ (<i>trg</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW353	LJ10, aber λ (Φ (<i>flgB</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW356	LJ10, aber λ (Φ (<i>fliC</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW331	LJ 10, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R	P1(IMW41) x LJ10
IMW335	LJ 10, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R λ (Φ (<i>trg</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW336	LJ 10, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R λ (Φ (<i>fliC</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW354	LJ 10, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R λ (Φ (<i>flgB</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
LJ10a	LJ10 mit pMW198	Diese Arbeit
IMW331a	LJ 10, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R mit pMW198	Diese Arbeit
IMW355	CP992, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R	P1(IMW41) x CP992
IMW325	MG1655, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R	P1(IMW41) x MG1655
IMW41	MC4100, aber <i>lrhA</i> :: <i>spc</i> ^R	Bongaerts et al., 1995
IMW326	MC4100, aber λ (Φ (<i>lrhA</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb)	Diese Arbeit
IMW326a	MC4100, aber λ (Φ (<i>lrhA</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb) mit pME6010	Diese Arbeit
IMW326b	MC4100, aber λ (Φ (<i>lrhA</i> ⁻ <i>lacZ</i>)hyb) mit pMW213 (<i>lrhA</i> ⁺)	Diese Arbeit

IMW327	MC4100, aber <i>lrhA::spc^R</i> $\lambda(\Phi(lrhA' - lacZ)hyb)$	Diese Arbeit
IMW339	LJ 10, aber $\lambda(\Phi(fimA' - lacZ)hyb)$	Diese Arbeit
IMW340	LJ 10, aber <i>lrhA::spc^R</i> $\lambda(\Phi(fimA' - lacZ)hyb)$	Diese Arbeit
IMW337	LJ 10, aber $\lambda(\Phi(fimE' - lacZ)hyb)$	Diese Arbeit
IMW338	LJ 10, aber <i>lrhA::spc^R</i> $\lambda(\Phi(fimE' - lacZ)hyb)$	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> 536	uropathogener <i>E. coli</i> -Stamm, klinisches Isolat	Dobrindt, Würzburg
IMW330	<i>E. coli</i> 536, aber <i>lrhA::kan^R</i>	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SY327 λ pir	<i>E. coli</i> -Stamm für Klonierungen mit pCVD442	Dobrindt, Würzburg
<i>E. coli</i> SM10 λ pir	<i>E. coli</i> -Stamm für Mobilisierung von pCVD442	Dobrindt, Würzburg
AAEC185	Typ 1 Fimbrien negativer <i>E. coli</i> -Stamm (<i>fim</i>)	Dobrindt, Würzburg

Plasmide

pMW196	Derivat von pJL28 mit <i>trg</i> Promotor (nt -458 bis +20)	Diese Arbeit
pMW197	Derivat von pJL30 mit <i>fliC</i> Promotor (nt -656 bis +101)	Diese Arbeit
pMW198	Derivat von pJL28 mit <i>fliA</i> Promotor (nt -501 bis +15)	Diese Arbeit
pMW211	Derivat von pJL29 mit <i>flgB</i> Promotor (nt -223 bis +249)	Diese Arbeit
pME6010	Klonierungsvektor, pVS1 Shuttlevektor, <i>tet^R</i>	Heeb et al., 2000
pMW213	pME6010, aber <i>lrhA</i> und Promotor (-359 bis Ende von <i>lrhA</i>)	Diese Arbeit
pJL28	p(<i>lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionvektor	E. Bremer, Marburg
pJL29	p(<i>lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionvektor	E. Bremer, Marburg
pJL30	p(<i>lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionvektor	E. Bremer, Marburg
pMW212	Derivat von pKS mit <i>flhD</i> Promotor (nt -733 bis +33)	Diese Arbeit
pMW132	pET28a, aber mit komplettem <i>lrhA</i> Gen zur LrhA-Expression	Diese Arbeit
pMW179	Derivat von pJL29 mit <i>lrhA</i> Promotor (nt -964 bis +30)	Diese Arbeit

pMW226	Derivat von pKS mit <i>lrhA</i> Promotor (nt -964 bis +30)	Diese Arbeit
pMW193	Derivat von pJL28 mit <i>fimE</i> Promotor (nt -463 bis +79)	Diese Arbeit
pCB5	Derivat von pJL30 mit <i>fimA</i> Promotor (nt -400 bis +22)	Diese Arbeit
pMW194	Derivat von pJL30 mit <i>fimA</i> Promotor (nt -532 bis +22)	Diese Arbeit
pCVD442	Suizidvektor zur Inaktivierung von Genen	Dobrindt, Würzburg
pMW192	pCVD442, aber <i>lrhA::kan^R</i>	Diese Arbeit

Phagen

P1 _{kc}		Miller, 1992
λRZ5	λ <i>'bla, 'lacZ, lacY⁺</i>	Ostrow et al., 1986

3.2 Medien und Zucht

Die Zucht der Zellen für aerobe Wachstumsversuche wurde in Erlenmeyerkolben mit Schikanen in M9-Medium durchgeführt, wobei das Kulturvolumen maximal 10% des Gefäßvolumens entsprach. Die Hauptkulturen wurden mit 1% Vorkultur angeimpft, die eventuell nötige Antibiotika enthielten. Für aerobe Zuchten wurden die Vor- und Hauptkulturen geschüttelt (180 Upm). Bei Bedarf wurde dem Medium Antibiotikum zugesetzt. Bei Zugabe von zwei Antibiotika wurde die Konzentration halbiert. Für aerobe Zuchten wurden die Substrate zu einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben. Für genetische Arbeiten und Vorkulturen wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet und bei 37°C und 180 Upm (innova 4000) geschüttelt.

3.2.1 Medien

LB-Medium (Sambrook et al., 1989):	10 g/l Pepton (Gibco, Nr.140) 5 g/l Hefeextrakt (Gibco) 5 g/l NaCl
LB-Agar:	LB-Medium mit 15 g/l Agar
M9-Medium (Miller, 1992):	6 g/l Na ₂ HPO ₄ 3 g/l KH ₂ PO ₄ 0,5 g/l NaCl 1 g/l NH ₄ Cl 10 ml/l CaCl ₂ , 10 mM 1 ml/l MgSO ₄ , 1 M 10 ml/l säurehydrolysiertes Casein 10 % 5 ml/l L-Tryptophan, 1 %
Antibiotikazusätze (Endkonzentration):	100 µg/ml Ampicillin 50 µg/ml Kanamycinsulfat 50 µg/ml Spectinomycin 15 µg/ml Tetracyclin
MOPS-Medium (Neidhardt et al., 1974):	
Stammlösung (10 x konzentriert):	Metallsalzlösung:
10 ml/l FeSO ₄ , 10 mM	3 x 10 ⁻⁶ M Na ₂ MoO ₄
50 ml/l NH ₄ Cl, 1,9 M	4 x 10 ⁻⁴ M H ₃ BO ₃
10 ml/l K ₂ SO ₄ , 0,276 M	3 x 10 ⁻⁵ M CoCl ₂
10 ml/l CaCl ₂ , 0,5 mM	8 x 10 ⁻⁵ M MnCl ₂
10 ml/l MgSO ₄ , 0,528 M	1 x 10 ⁻⁵ M ZnSO ₄
100 ml/l NaCl, 5 M	
400 ml/l MOPS, 1 M	
40 ml/l Tricine, 1 M	
10 ml/l Metallsalzlösung	

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert, anschließend wurde die Stammlösung angesetzt. Ein Liter MOPS-Medium enthält 100 ml Stammlösung und 10 ml K_2HPO_4 (0,123 M). Es wurde mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

MOPS-Agar: MOPS-Medium mit 15 g/l Agar

P1_{kc} – Phagenvermehrung

R-Agar: 10 g/l Bacto Trypton (Difco)
1 g/l Hefeextrakt (Gibco)
8 g/l NaCl
1 g/l Glucose
12 g/l Agar (Difco)

R-top-Agar: R-Agar, aber 6,5 g/l Agar (Difco)
10 ml/l $MgSO_4$, 1 M
10 ml/l $CaCl_2$, 0,5 M
nach dem Autoklavieren zugesetzt

λ -Phagenvermehrung

TB-Medium: 10 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140)
5 g/l NaCl

TB-Agar: TB-Medium mit 10 g/l Agar

TB-top-Agar: TB-Medium mit 6,5 g/l Agar

YM-Medium: TB-Medium
20 ml/l Maltose, 10%
10 ml/l Hefeextrakt (Gibco), 1%

LB-Amp-Citrat-X-Gal-Agarplatten: LB-Medium
25 μ g/ml Ampicillin

20 mM Na₃-Citrat

20 µg/ml X-Gal

15 g/l Agar

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 Standardmethoden

Restriktionsverdauung und Ligationen wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme und die Ligase wurden von den Firmen MBI Fermentas bezogen. Genomische DNA wurde mit Nucleospin C+T (Macherey & Nagel) isoliert. Plasmid-DNA wurde mit Plasmidisolierungs-Kit (Qiagen) gewonnen.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Gelextraktionskit (Qiagen) eingesetzt. Für die Herstellung kompetenter Zellen und Transformation wurde die Elektroporation nach Pfeifer (1993) angewendet.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden je 20 pMol Primer, 200 µM dNTP-Mix (ROTH), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl PCR-Puffer (20x konzentriert, Biozym), ca. 0,1- 1µg DNA (oder eine Kolonie eines Wildtyp *E. coli*-Stammes) und 1U Tfl-Polymerase (Biozym) pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte im Techne Progene-PCR-Gerät.

Die Reaktion umfasste folgende Zyklen:

- | | |
|---|---------|
| 1) 40°C 2' | 1 x |
| 2) 95°C 3' ; 51 - 60°C 40'' ; 72°C 1 - 5' , | 1 x |
| 3) 94°C 30'' ; 51 - 60°C 40'' ; 72°C 1 - 5' , | 25-30 x |
| 4) 94°C 30'' ; 51 - 60°C 40'' ; 72°C 1 - 5' | 1 x |

Die Annealing-Temperatur wurde 2 - 5°C niedriger als der Schmelzpunkt (T_m-Wert) der Primer gewählt. Durch die Zugabe der Polymerase nach den ersten zwei Minuten der Denaturierung bei 95°C wurde die Reaktion gestartet. Die Überprüfung der Amplifizierung erfolgte auf 1%igen Agarosegelen und die Reinigung der Ansätze wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) erreicht. Eingesetzte Primer sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3 Bei der PCR verwendete Primer.

Primer	Sequenz 5'-3'-Richtung	T _m [°C]
trgEcoRI	CAGGAGTGTGAATTCCAGAATC	58,4
trgHindIII	GCAAAAAACCTAAGCTTTGTGAGG	59,3
fliCEcoRI	CGCCTTGTTGAATTCTGAGTTTAC	59,3
fliCHindIII	GTTAATACGCAAGCTTGAAGACAG	59,3
fliASalI	GTTACCAACGTCGACAACAC	57,3
fliAHindIII	CATTAAAGCTTCAGCGGTATAG	56,5
flgBEcoRI	GTTGTGGAATTCCGATGTGAG	57,9
flgBHindIII	GGTATTGAAGCTTTGCGGTAG	57,9
lrhAHindIII	CGAGGTCAAGCTTAATTATCGG	58,4
lrhABglII	GGACCACAGATCTCATAACAGA	58,4
lrhA3	GTCTCAGGAATTCTCTATCGTCCG	62,7
lrhA4	GCCAGTAAGTGATAACATATGATAAGTGC	62,4
lrhA6	GGACCACAGATCTCATAACAG	57,9
flhDHindIII	GATGTCATAAAGCTTTTTTCAGCAA	58,1
yecG	GCGATAGATACCGCTTTTGC	57,3
fimAHindIII	CGACAGAACAAAGCTTGCCAGAG	62,4
fimABamHI	GTTTTGCCGGATCCTGGGAAA	62,1
fimA2BamHI	CATAGAGGAAAGGATCCCGGAC	62,1
fimEHindIII	AAGACAATAAGCTTTGGCTCCCG	60,6
fimEBamHI	AGATAGTTGGGATCCCAGGGAT	60,3

3.3.3 Konstruktion der *lacZ*-Reporterfusionen

Zur Konstruktion von *lacZ*-Reporterfusionen wurde der Promotorbereich des zu untersuchenden Gens durch PCR amplifiziert und im Leserahmen in ein Proteinfusionsplasmid kloniert. Der Promotor von *trg* wurde mit den Primern *trgEcoRI* und *trgHindIII* (-452 bis +20) amplifiziert. Das 478 bp lange PCR Produkt wurde über die eingeführten *EcoRI* und *HindIII* Schnittstellen in pJL28 kloniert. Das resultierende Plasmid pMW196 enthielt die gesamte intergenische Region von *trg* (Abb. 4).

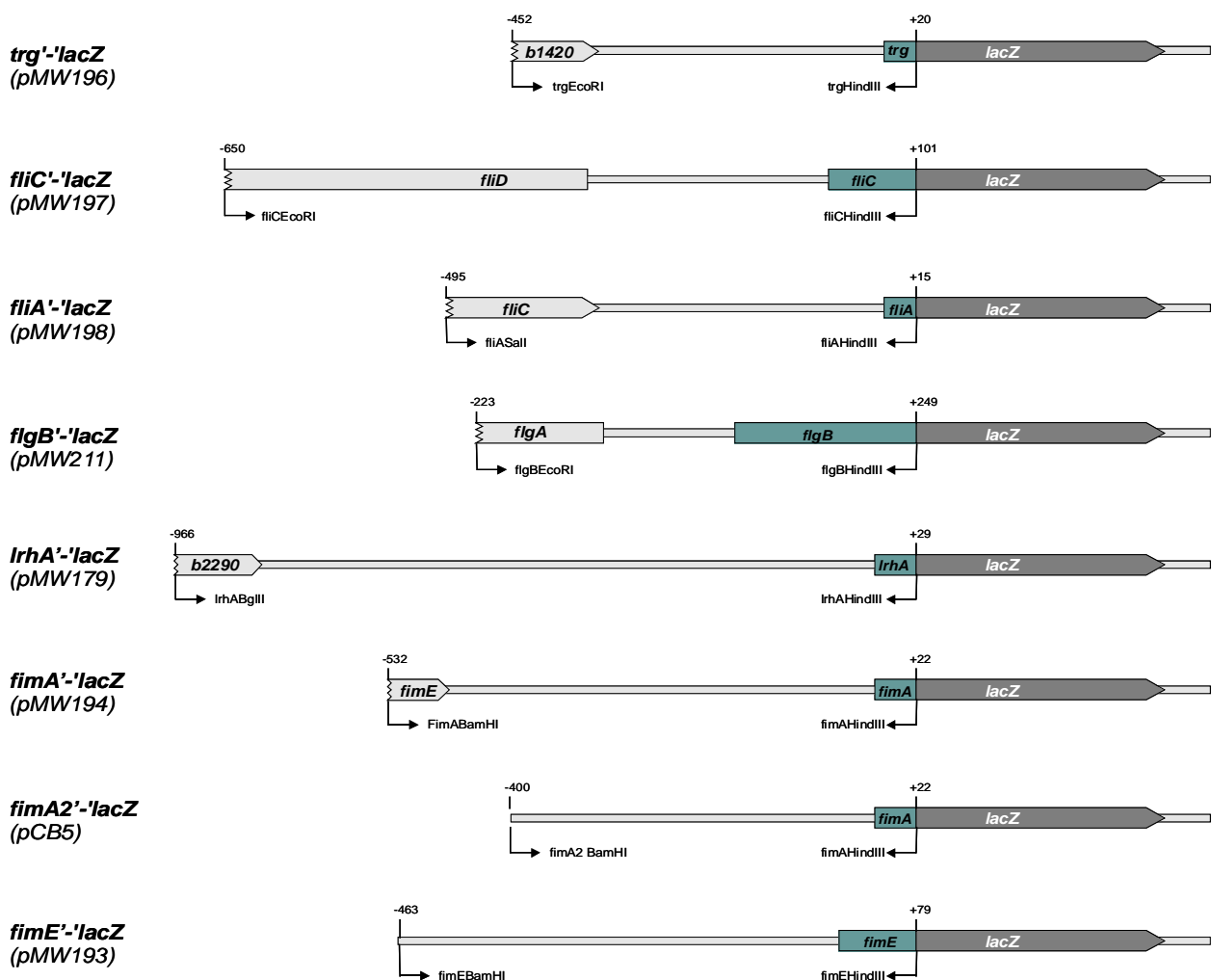


Abb. 4 Konstruktion der *lacZ*-Protein-Fusionen von *trg*, *fliC*, *fliA*, *flgB*, *lrhA*, *fimA*, *fimA2* und *fimE*. Die Fusionen wurden mit den Genfusions-Vektoren pJL28, pJL29 und pJL30 hergestellt, die so ausgewählt wurden, dass *lacZ* im Leseraster fusioniert wurde.

Die *fliC*'-*lacZ* (-650 bis +101) (Plasmid pMW197), *fliA*'-*lacZ* (-495 bis +15) (Plasmid pMW198), *flgB*'-*lacZ* (-223 bis +249) (Plasmid pMW211), *lrhA*'-*lacZ* (-966 bis +29) (Plasmid pMW179), *fimA*'-*lacZ* (-532 bis +22) (Plasmid pMW194), *fimA2*'-*lacZ* (-400 bis +22) (Plasmid pCB5) und *fimE*'-*lacZ* (-463 bis +79) (Plasmid pMW193) Fusionen wurden in der gleichen Weise konstruiert. Dazu wurden die Primer *fliCEcoRI*, *fliCHindIII*, *fliASalI*, *fliAHindIII*, *flgBEcoRI*, *flgBHindIII*, *lrhAHindIII*, *lrhABgIII*, *fimABamHI*, *fimAHindIII*, *fimA2BamHI*, *fimAHindIII*, *fimEBamHI* bzw. *fimEHindIII* verwendet. Die *lacZ*-Fusionen wurden aus diesen Plasmiden durch homologe Rekombination auf λ RZ5 übertragen. Mit den rekombinanten Phagenlysaten wurden *E. coli* MC4100 bzw. LJ10 Derivate lysogenisiert.

3.3.4 Konstruktionen der Plasmide pMW132 und pMW213

Zur Überexpression und Reinigung von LrhA wurde ein 957 bp Fragment, welches den kodierenden Bereich des *lrhA*-Gens enthielt, mittels PCR mit den Primern *lrhA3* und *lrhA4* amplifiziert. Nach der Restriktion wurde das Fragment in den Überexpressionsvektor pET28a (Novagen) kloniert. Das daraus entstandene Plasmid pMW132 kodiert für LrhA mit einem His₆-Tag und einem Linker mit einer Thrombin-Schnittstelle, die nahe des N-Terminus von LrhA lokalisiert ist. Die N-terminale Aminosäuresequenz von LrhA sieht dann folgendermaßen aus: GSSHHHHHSSGLVPRGSHMISANRPII. Der Histidin-Tag ist kursiv und die Thrombinschnittstelle fett gedruckt. Die ursprüngliche N-terminale Aminosäuresequenz von LrhA ist unterstrichen.

Für Komplementationsversuche wurde das Plasmid pMW213 konstruiert. Es enthält die kodierende Region von LrhA und die Promotorregion bis zur Position -357. An der Position -230 fand ein Basenaustausch statt, was zu einem Austausch von Threonin zu Cystein in der Aminosäuresequenz führte. LrhA war aber noch voll funktionsfähig, d.h. das Protein konnte in Expressionsmessungen eine *lrhA*-Mutation komplementieren. Das Plasmid wurde mit den Primern *lrhA3* und *lrhA6* hergestellt, indem das amplifizierte Fragment in pME6010 nach Restriktion mit *EcoRI* und *BglII* kloniert wurde.

3.3.5 Konstruktion einer *lrhA*-Mutante des uropathogenen Stammes *E. coli* 536

Zur Klonierung des inaktivierten *lrhA*-Gens mit flankierenden Bereichen in den Suizidvektor pCVD442 wurde das *lrhA*-Gen durch PCR mit den Primern *lrhABgIII* und *lrhA3* amplifiziert. Die Replikation des Suizidplasmids pCVD442 hängt vom Pir-Protein ab. Nur in *pir* exprimierenden Stämmen (z.B. *E. coli* SY327 λ *pir* und *E. coli* Sm10 λ *pir*) kann sich dieses Plasmid mit dem Pir-abhängigen Replikationsursprung vervielfältigen. Außerdem enthält es

das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das für eine Laevansaccharase kodiert. Bei Wachstum auf Saccharose katalysiert dieses Enzym die Polymerisierung von Saccharose zu Laevan. Das Laevan gelangt in den periplasmatischen Raum von *E. coli* und kann nicht abgebaut werden. So kommt es zu einer toxischen Anreicherung.

Das amplifizierte *lrhA*-Fragment wurde nach Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI in pBluescriptKS kloniert (pKS:lrhA). Aus dem Vektor pUCKan wurde mit *Hinc*II und *Pvu*II die Kanamycinresistenzkassette ausgeschnitten und in die *Stu*I-Schnittstelle des *lrhA*-Gens eingefügt. Mit dem resultierenden Plasmid (plrhA) und pCVD442 wurde über die *Sal*I-Schnittstelle ein Hybridplasmid (pHyb) hergestellt. Aus diesem Plasmid wurden dann durch Deletion des *Sac*I-Fragmentes das *bla*-Gen und der Replikationsursprung von pKS eliminiert. Die ursprüngliche Ampicillinresistenz von pCVD442 blieb bestehen. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMW192 bezeichnet (Abb. 5). Nach Transformation in *E. coli* SY327 λ pir (eignet sich für Klonierungsarbeiten) und anschließend in *E. coli* Sm10 λ pir (eignet sich zur Konjugation) erfolgte die Konjugation der Stämme *E. coli* 536 (Rezipient, streptomycinresistent) und *E. coli* Sm10 λ pir (pMW192) (Donor). Durch Selektion auf Ampicillin (100 μ g/ml), Kanamycin (25 μ g/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) sollte man nur solche Klone erhalten, bei denen das gesamte Plasmid durch homologe Rekombination ins Chromosom integriert worden ist, da der Rezipient kein Pir-Protein exprimieren kann. Durch weitere Zucht ohne Selektionsdruck sollte es zum Verlust des integrierten Plasmids kommen. Die Selektion auf dieses erfolgreiche Doppelcrossover geschah auf 7% Saccharose, Kanamycin und Streptomycin. Klone, die so erhalten wurden und nicht mehr auf Ampicillin wachsen konnten, waren entweder wildtypische Revertanten oder Insertionsmutanten.

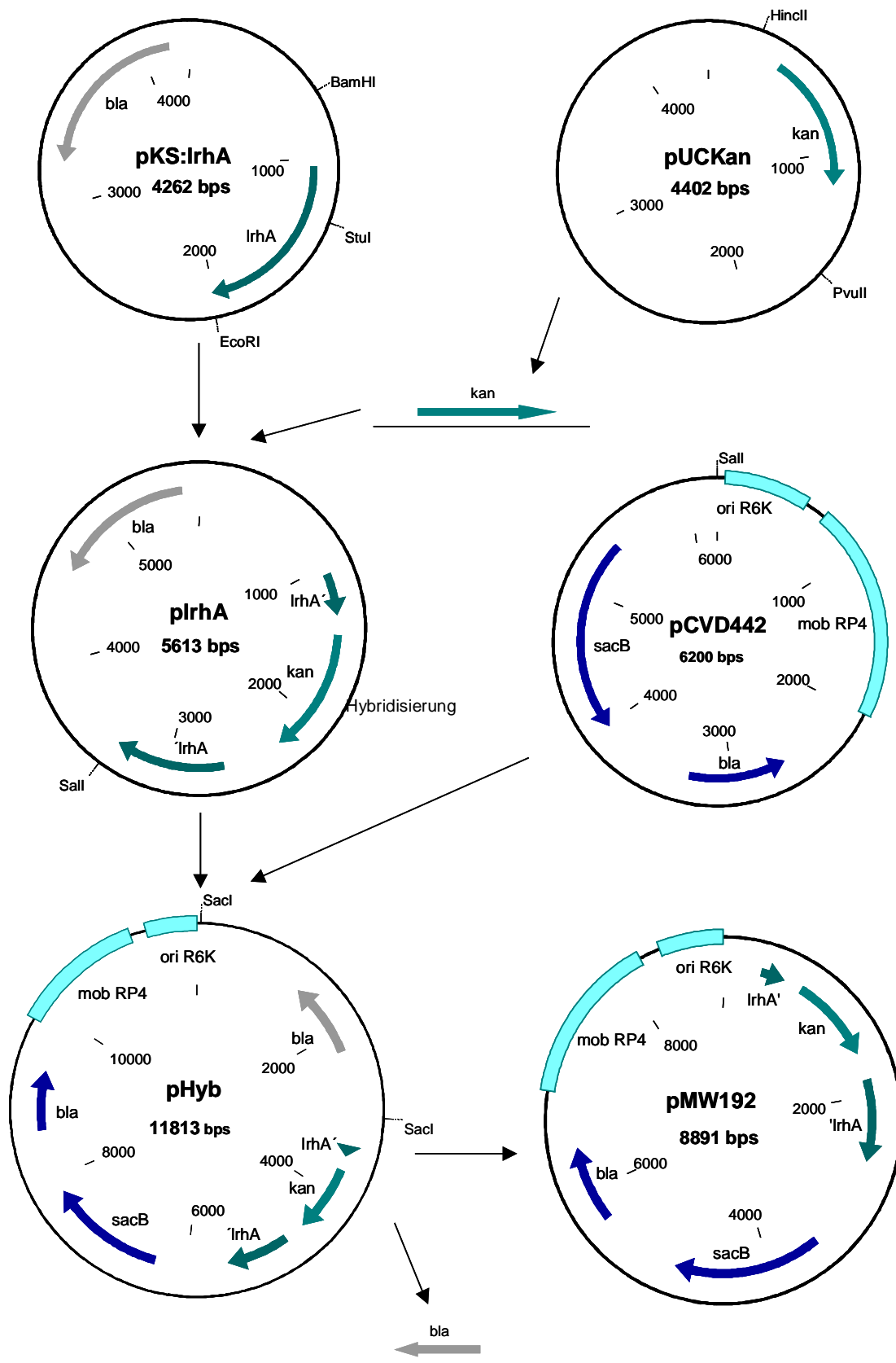


Abb. 5 Klonierungsschema des Plasmids pMW192. Ausgehend von pKS:lrhA, pUCKan und pCVD442 wurde das Plasmid pMW192 kloniert. Es enthält das durch die Kanamycin-Resistenz unterbrochene *lrhA*-Gen, das *sacB*-Gen, das Ampicillinresistenz-Gen *bla*, ein Mobilisationsfragment aus dem Plasmid RP4 und den Replikationsursprung des Plasmids R6K. Genaue Erläuterung im Text.

3.3.6 Stammkonstruktion mittels P1-Transduktion

Zur Herstellung eines transduzierenden Phagenlysates wurden 3 ml einer Übernachtskultur des Donorstammes in LB Medium mit dem gleichen Volumen MC-Puffer (10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂) versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit 0,1 ml P1_{kc}-Phagensuspension versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden anschließend in 3 ml R-Top-Agar auf R-Agarplatten ausplattiert und bis zum Eintritt der konfluenten Lyse bei 37°C inkubiert. Nach Überschichten der Platten mit 2 ml LB-Medium wurden die Platten 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde zusammen mit dem Top-Agar in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,5 ml Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 10000 x g, 4°C). Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und mit 50 µl/ml Chloroform versetzt. Der Titer solcher Phagenlysate betrug ca. 10⁹ pfu/ml (plaque forming units).

Zur Transduktion wurde eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes in LB-Medium mit gleichem Volumen MC-Puffer versetzt, 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation und Resuspension in 1 ml LB-Medium konzentriert. Zu 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde 0,1 ml Phagensuspension, ca. 10⁶ - 10⁸ Phagen, und 10 µl 0,1 M CaCl₂ gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml 0,1 M Na₃-Citrat und 0,5 ml LB Medium zugesetzt und die Zellen ca. 60 min bei 37°C geschüttelt. Zuletzt wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation eingeeengt und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch die erworbene Antibiotikaresistenz identifiziert. Zur Überprüfung des Genotyps wurde das inaktivierte Gen durch PCR amplifiziert und die Länge der amplifizierten DNA durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.3.7 Herstellung rekombinanter λ-RZ5 Lysate und Lysogenisierung von *E. coli* Stämmen

Zur Gewinnung rekombinanter λ-RZ5 Phagen mit *lacZ*-Fusionen wurde eine Übernachtskultur von MC4100 bzw. LJ10 mit dem entsprechenden Fusionsplasmid in YM-Medium mit λRZ5 infiziert. Dazu wurden je 0,1 ml Bakteriensuspension und 0,1 ml λRZ5 Suspension, ca. 10³ Phagen, in SM-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 3 ml TB-Top-Agar auf TB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert bis deutliche Plaques zu erkennen waren. Ein Plaque wurde mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, in 0,5 ml SM-Puffer

aufgenommen und mit 50 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und 2 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Zur Identifizierung rekombinanter Phagen wurde MC4100 mit diesem Phagenlysat infiziert und in 3 ml TB-Top-Agar mit 0,1 ml 10 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid) auf TB-Agarplatten ausplattiert und 5 bis 7 h bei 37°C inkubiert. Rekombinante Phagen bilden blaue Plaques. Blaue Plaques wurden isoliert und durch wiederholtes Ausplattieren und Isolieren von nicht rekombinanten Phagen getrennt. Von isolierten blauen Plaques wurden Plattenlysate hergestellt.

Die so gewonnenen homogenen Lysate wurden zur Konstruktion monolysogener Stämme verwendet. Dazu wurde eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes in YM-Medium mit den rekombinanten Phagen versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die infizierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Na₃-Citrat-X-Gal-Platten ausplattiert. Lysogene Stämme bilden blaue Kolonien, mehrfach Lysogene sind durch intensivere Blaufärbung zu erkennen. Durch Messung der β-Galaktosidase-Aktivität konnten monolysogene Stämme von mehrfach lysogenen Stämmen durch die geringere β -Galaktosidaseaktivität unterschieden werden.

3.3.8 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die Bakterien aerob in 35 ml M9-Medium mit 20 mM Glycerin gezogen. Bei einer OD_{578nm} von 0,3 - 0,45 wurde die Zellsuspension auf Eis (15 g, vorgekühlt auf -20°C) gegeben und durch Abzentrifugieren (3-5 min bei 6000 Upm) sofort geerntet. Die Zellen wurden danach mechanisch mit Zirkonia Glaskügelchen (ROTH) aufgeschlossen und die Gesamt-RNA wurde mit Qiagen RNeasy Minisäulen isoliert. Danach wurde die RNA mit 30 U RNase-freier DNaseI (Roche) behandelt und mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24/1,v/v) extrahiert. Die RNA wurde mit 0,1 Vol 3 M Na-Acetat (pH5,2) und 3 Vol Ethanol (99%) gefällt. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt ($A_{260}/A_{280} > 1,8$). Anschließend wurde die RNA revers transkribiert und fluoreszenzmarkiert (Wendisch et al., 2001). Dazu wurden 30 µg der RNA mit Random Hexamer Primern (Amersham Pharmacia, Freiburg), 0,1 mM Cy3- oder Cy5-dUTP, 50 mM Tris-HCl (pH8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dTTP, 0,5 mM dCTP und 400 U SuperscriptII Reverse Transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD) revers transkribiert. Nach zwei Stunden bei 42°C wurde die Reaktion mit 0,05 M NaOH gestoppt, für 10 min bei 65°C inkubiert und mit 0,05 M HCl neutralisiert. In Microcon-30 Mikrokonzentratoren (Amicon, Danvers, MA) wurde der

cDNA-Ansatz mit H₂O gemischt und zu einem Volumen von 15µl aufkonzentriert. Diese markierte cDNA wurde sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

3.3.9 DNA-Microarray-Analyse

Die Microarrays mit 4108 Genen des *E. coli*-Genoms (entspricht 96% des Genoms) wurden wie bei Zimmer et al. (2000) beschrieben mit Hilfe des Genosys ORFmer Primer Sets der Firma Sigma-Genosys hergestellt (Richmond et al., 1999). Dazu wurden von den 4108 Genen PCR-Produkte amplifiziert, die anschließend auf mit Polylysinen beschichtete Glasobjektträger punktförmig aufgebracht wurden (Abb. 6). Die fluoreszenzmarkierte cDNA der zu vergleichenden Stämme wurde gemischt und nach 2 min Hitzebehandlung bei 100°C auf die DNA-Microarrays in 3 x SSC, 25 mM HEPES, pH7, 0,25% SDS hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die DNA-Microarrays für 5 bis 16 h in 1 x SSC / 0,03% SDS und in 0,05 x SSC in einer feuchten Kammer gewaschen. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Axon Genepix 4000 Laserscanners detektiert. Zur Berechnung der Fluoreszenzintensitäten und des Hintergrundsignals wurde die GenePix Software benutzt. Das Scannen und die Normalisierung der Werte wurde nach Khodursky et al. (2000) durchgeführt. Die Berechnung der p-Werte basiert auf dem t-Test nach Arfin et al. (2000). In der Auswertung wurden nur solche Gene berücksichtigt, deren Fluoreszenz auf dem DNA-Chip ein dreifach stärkeres Signal als der Hintergrund lieferten.

3.3.10 DNA-Macroarray-Analyse: Pathoarray

Für die Pathoarrays mit 475 virulenzassoziierten Genen aus *E. coli* und *Shigella* wurde die DNA der jeweiligen Gene auf Nylonmembranen gespottet (Dobrindt, Universität Würzburg). Die aus uropathogenen *E. coli*-Stämmen (Wildtyp und *lrhA*-Mutante) isolierte mRNA wurde in cDNA überschrieben und dabei gleichzeitig mit [α -³³P]-dATP markiert. Der Ansatz mit 30 µg RNA und 4,8 µg Random Hexamer Primern wurde 10 min bei 60°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In die folgende Reaktion wurden 4 µl Reaktionspuffer, 4µl dCTP [5mM], 4µl dGTP [5mM], 4µl dTTP [5mM], 3µl dATP [5mM], 0,5 µl RNase Inhibitor (40U/µl), 2 µl Reverse Transkriptase (4U/µl, Omniscript Qiagen) und 1 µl (10 ng) *in vitro* Transkript von *act* (*C. albicans*) in einem Volumen von 40 µl eingesetzt. Nach Inkubation von 3-4 h bei 37°C wurde der Ansatz über G50 (Sephadex) Microspin-Säulen (Amersham Pharmacia) gereinigt und 10 min auf 90°C erhitzt. Danach erfolgte die Hybridisierung, das Waschen und das Prähybridisieren des Arrays nach dem Protokoll der PanoramaTM *E. coli* Gene Arrays der Firma Sigma-Genosys. Die Membranen wurden mit dem Variable Mode

Imager Typhoon 8600 von Molecular Dynamics eingescannt und mit der Software Expressionist GeneData ausgewertet.

3.3.11 Gelretentionsanalyse

Für die Gelretentionsanalysen wurde der *flhD*-Promotorbereich mit PCR und den Primern flhDHindIII und yecG vom Plasmid pMW212 amplifiziert. Das resultierende DNA-Fragment hatte eine Länge von 766 bp und wurde mit HindIII verdaut und mit [α - 33 P]-dATP an beiden Enden markiert. Der Markierungsansatz enthielt 0,1 pmol DNA Fragment, Klenow-Reaktionspuffer, 0,25 mM dNTP Mix (ohne markierte Nukleotide), 22 μ Ci [α - 33 P]-dATP, 5 U Klenow Enzym (Exo⁻ Fragment) und wurde für 25 min bei 30°C und 10 min bei 75°C inkubiert (MBI Fermentas). Die Fragmente für die Gelretardation der Promotoren von *fliC*, *fliA*, *trg*, *flgB*, *fimA* und *fimE* wurden ebenfalls durch PCR von einer Kolonie von MG1655 mit den Primern fliCEcoRI, fliCHindIII, fliASall, fliAHindIII, trgEcoRI, trgHindIII, flgBEcoRI, flgBHindIII, fimABamHI, fimAHindIII, fimEBamHI und fimEHindIII gewonnen und hatten eine Länge von 757 bp, 516 bp, 478 bp, 472 bp, 554 bp bzw. 542 bp. Das *lrhA*-Promotorfragment (676 bp) wurde mit PCR und den Primern lrhAHindIII und lrhABgIII vom Plasmid pMW179 amplifiziert und anschließend mit *EcoRI* und *HindIII* gedaut. Alle Fragmente wurden in der gleichen Weise wie bei *flhD* radioaktiv markiert. Die Gelretardationsexperimente wurden nach Drapal und Sawers (1995) durchgeführt. Die markierte DNA (5 nM) wurde zusammen mit gereinigtem LrhA-Protein 30 min bei Raumtemperatur in Bindepuffer (Endvolumen 20 μ l) inkubiert, bevor sie auf ein 5%iges (bzw. 6%iges) nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurde. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

LrhA-Bindepuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
 10% Glycerin
 2,5 mM EDTA
 50 mM KCl
 0,1 mM DTT
 4 mM Spermidin
 12,5 μ g Kalbsthymus DNA
 1 μ g BSA

1 x TBE: 90 mM Tris
 90 mM Borat
 2 mM EDTA

3.3.12 DNaseI-Footprint-Analyse

Das Plasmid pMW212 wurde durch Amplifizierung der Promotorregion von *flhD* mit den Primern flhDHindIII und *yecG* gewonnen. Nach Restriktion mit HindIII wurde das 766 bp lange DNA-Fragment in pBluescriptKS kloniert und enthielt somit den intergenischen Bereich zwischen *yecG* und *flhD*. Für den DNaseI-Footprint wurde durch Restriktion von pMW212 mit *EcoRI* und *KpnI* ein 818 bp Fragment erhalten. Für den Footprint am *lrhA*-Promotor wurde die *HindIII/ApaI lrhA*-Promotor-DNA von Plasmid pMW226 verwendet. Das Fragment hatte eine Länge von 1018 bp. Die Fragmente wurden am einem Ende mit [α - 33 P]-dATP radioaktiv markiert. Dies geschah für 25 min bei 30°C und 10 min bei 75°C. Der Ansatz enthielt 2 pmol DNA Fragment, 1 x Klenow-Reaktionspuffer (MBI Fermentas), 0,25 mM dNTP Mix , 44 μ Ci [α - 33 P]-dATP and 20 U Klenow Enzym (Exo⁻ Fragment). Der DNaseI Footprint wurde nach Drapal und Sawers (1995) durchgeführt. LrhA wurde mit markierter DNA (40 nM) für 30 min bei Raumtemperatur in Footprintpuffer (Endvolumen 50 μ l) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 μ l einer 10 mM MgCl₂- 5 mM CaCl₂-Lösung und von 2,5 ng (0,0075 Units) DNaseI. Die Reaktion wurde nach 30 Sekunden mit 90 μ l DNaseI-Stopplösung beendet. Die DNA-Fragmente wurden erst mit zweimaliger Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen LiCl und 2,5 Volumen Ethanol gefällt und in 5 μ l Ladepuffer (Sambrook et al., 1989) resuspendiert. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Sequenzgel (6%ig) 2 min bei 90°C denaturiert. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

Footprintpuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
 10% Glycerin
 2,5 mM EDTA
 50 mM KCl
 0,1 mM DTT
 4 mM Spermidin
 20 μ g BSA

DNaseI-Stopplösung: 20 mM EDTA
 200mM NaCl
 1% SDS
 250 µg/ml Hefe-tRNA

3.3.13 DNA Sequenzierung

Als Längenstandard für den DNaseI-Footprint wurde pBluescriptKS⁻-DNA zur Sequenzierung eingesetzt. Doppelsträngige DNA wurde nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) sequenziert. Dazu wurde das T7 Sequencing Kit (Pharmacia) verwendet. Als radioaktives Nukleotid wurde [$\alpha^{33}\text{P}$]-dATP eingesetzt. Alle übrigen DNA Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise, Mainz durchgeführt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Überexpression und Reinigung von His₆-LrhA

Die Zucht der Zellen zur Isolierung von LrhA erfolgte aerob in LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin. Die Induktion mit 1 mM IPTG wurde bei dem Überexpressionsplasmid pMW132 im Stamm BL21 DE3 bei einer OD₅₇₈ von 0,7 vorgenommen. Nach weiteren Wachstum von 2 h wurden die Zellen geerntet (OD₅₇₈ ~ 2). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Puffer I (50mM K-Phosphat pH 7.0, 20 mM Imidazol, 300 mM KCl, 5% Glycerin, 1mM Pefabloc [AppliChem]) resuspendiert. Nach Aufschluss in der French Press-Zelle und Zentrifugation bei 11000 Upm für 30 min wurde das Protein nach der Standard- Prozedur über eine Ni-NTA Agarosesäule (Qiagen) gereinigt. Die Elution von LrhA erfolgte mit Puffer I mit 500mM Imidazol. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Lagerung von gereinigtem LrhA erfolgte bei -80°C. Proteinkonzentrationsbestimmungen und SDS-Gelelektrophorese wurden nach Bradford und Laemmli durchgeführt (Bradford, 1976; Laemmli, 1970). Verschiedene Proben wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE (Trenngel 12,5%; Sammelgel 6,5%) bei 120 Volt aufgetrennt.

SDS-Laufpuffer: 5,44 g / 1 Tris
 25,92 g / 1 Glycin
 9 ml / 1 10% SDS

Probenpuffer:	10 g Saccharose	
	9 ml 10% SDS	
	7,9 ml Laufpuffer	
	4,5 ml Mercaptoethanol	
	2,5 ml 0,1% Bromphenolblau	
	1,7 ml H ₂ O	
Proteinstandard:	BSA	67 kD
	Carboanhydrase	30 kD
	Lysozym	14 kD

3.4.2 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die Zellen wurden mit 1% Inokulum angeimpft und bei 37°C aerob in 30 ml M9-Medium mit den jeweiligen Zusätzen gezüchtet. Die spezifische Aktivität wurde mit exponentiell wachsenden Zellen ($OD_{578} = 0,5$ bis $0,6$) gemessen und berechnet (Miller, 1992).

3.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei einer kalorimetrischen Titration werden die bei physikalischen und chemischen Vorgängen auftretenden Wärmeeffekte gemessen. Dazu wird ein Mikrokalorimeter verwendet. Dieses besteht im Wesentlichen aus zwei Zellen, der Referenzzelle und der Probenzelle. Beide Zellen sind von einem thermostatisierten, nach außen isolierten Mantel umgeben. Die Temperatur des Mantels wird konstant gehalten. Die Referenzzelle wird schwach geheizt. Auch die Probenzelle wird geheizt und mit Hilfe eines Rückkopplungsmechanismus' auf die gleiche Temperatur wie die Referenzzelle gebracht (Temperaturdifferenz $\Delta T = 0$). Die Probenzelle ist an eine Hamiltonspritze angeschlossen, über die kleine Aliquots des zu untersuchenden Liganden injiziert werden können (Titration). Läuft nun in der Probenzelle eine Reaktion ab (z.B. Bindung eines Liganden an ein Protein) und wird Wärme frei, so wird die Stromzufuhr für die Probenzelle gedrosselt (Ausgleich der Temperaturdifferenz). Wird bei der Reaktion Wärme aufgenommen, so muss der Heizstrom verstärkt werden, damit die Temperatur konstant bleibt. Aus der Veränderung der Stromstärke wird die Aufnahme bzw. Abgabe von Wärme pro Zeiteinheit ($\mu\text{cal/s}$) berechnet. Die eingesetzte LrhA-Probe (in Puffer I mit 500mM Imidazol, Punkt 3.4.1) hatte eine

Konzentration von 50 μM . Die Liganden wurden in einer Konzentration von 20 und 50 mM getestet. Die Proben wurden vorher vollständig entgast und auf die gleiche Temperatur gebracht.

3.5 Sonstige Methoden

3.5.1 Motilitätstests

Schwärmmagar-Platten (1% Trypton, 0,5% NaCl und 0,3% Difco Bacto Agar) (Tisa and Adler, 1995) wurden mit 15 μl Zellen angeimpft, die von der Kolonie mit Hilfe eines Zahnstochers in Chemotaxis-Puffer (10 mM K^+ -Phosphat pH 7.0, 0,1 M K^+ -EDTA und 0,1 mM L-Methionin) resuspendiert wurden. Diese wurden 4h bei 37°C inkubiert. Für die Chemotaxis-Tests wurden Minimal-Schwärmplatten verwendet, die 10 mM K^+ -Phosphat pH 7.0, 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM MgSO_4 , 0,3% Difco Bacto Agar und 20 $\mu\text{g/ml}$ von jeweils L-Threonin, L-Leucin, L-Histidin, L-Methionin und 1 $\mu\text{g/ml}$ Thiamin enthielten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C. Um auf Aspartat-Chemotaxis zu testen, wurden die Platten mit 100 μM Aspartat, 0,5% NaCl und 1 mM Glycerin supplementiert (Weerasuriya *et al.*, 1998). Bei Aerotaxis-Tests wurde dem Minimal-Agar 30 mM Succinat zugesetzt (Bibikov *et al.*, 2000).

3.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zellen wurden in LB-Vollmedium oder in M9-Medium mit 20 mM Glycerin gezüchtet. Ein Tropfen der Kultur wurde auf Kohlefolie aufgebracht und nach 1 min durch andrücken auf Filterpapier getrocknet. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Zellen durch Zugabe von 1% Uranylacetat für 1-2 min negativ kontrastiert. Die Proben wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.

3.5.3 Hefeagglutinationstest

Typ 1 Fimbrien können mit Hilfe der Hefeagglutination nachgewiesen werden. Hierzu wurden auf einem Objektträger 20 μl einer ÜN-Kultur der zu testenden *E. coli*-Stämme mit 20 μl einer Bäckerhefesuspension (10mg/ml) ohne und mit 2% Mannose gemischt. Nach kurzer Zeit konnte die Agglutination bewertet werden. Die $\text{OD}_{578\text{nm}}$ der verschiedenen Kulturen wurde ausgeglichen und verdünnt oder konzentriert in den Test eingesetzt (Dobrindt, 2002).

3.5.4 Bestimmung der Frequenz der Phasenvariation

Die Bestimmung der *fim*-Umschaltfrequenz wurde nach der Methode von Gally et al. (1993) durchgeführt. Phase-ON oder Phase-OFF Bakterien (mit *fimA*´-*lacZ*-Fusion) wurden anhand ihrer Farbe (blau oder weiß) auf MOPS-X-Gal-Agarplatten ausgewählt. Eine blaue Kolonie (Promotor-ON) wurde mit einem Skalpell von einer Agarplatte abgenommen und in MOPS-Medium verdünnt und auf MOPS-Minimal-Glucose-X-Gal-Platten ausplattiert und 24 h bei 42°C bebrütet. Bei dieser Temperatur vollzieht sich die Phasenvariation langsam, so dass man die Frequenz von Phase ON zu Phase OFF ermitteln kann. Anschließend wurde die Gesamtanzahl der Kolonien und das Verhältnis der Promotor-ON- zu Promotor-OFF-Kolonien ermittelt. Die Frequenz der Phasenvariation ließ sich mit folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Umschaltwahrscheinlichkeit pro Zelle und Generation} = 1 - \sqrt[n]{1 - x}$$

Dabei ist n = Zahl der Generationen und x = (Zahl der OFF-Kolonien) / (Zahl der gesamten Kolonien). Jeder Test wurde mit drei individuellen Kolonien durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die daraus berechneten Mittelwerte.

3.5.5 Test auf Lyse durch α -Hämolysin

Die zu testenden Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf eine Schafsblut-Agarplatte (Oxoid) übertragen und bei 37°C über Nacht bebrütet. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle (*E. coli* 536) und eine Negativkontrolle (MG1655) aufgetragen. Sofern die Bakterien das Toxin α -Hämolysin produzierten, wurde dies durch einen hellen Lysehof um die Bakterienkolonie sichtbar (Dobrindt, 2002).

3.5.6 Test auf Hämagglutination von humanen Erythrozyten

P-Fimbrien können mit Hilfe einer Hämagglutinationsreaktion von humanen Erythrozyten nachgewiesen werden. Hierzu wurden auf einem Objektträger 30 μ l defibriniertes Humanblut und zu testende *E. coli*-Bakterien vermischt. Diese wurden mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen. Nach einigen Minuten Inkubation auf Eis konnte die Verklumpungsreaktion bewertet werden (Dobrindt, 2002).

3.5.7 Test auf Hämagglutination von Rindererythrozyten

S-Fimbrien können eine Hämagglutination von Rindererythrozyten hervorrufen. Um dies zu überprüfen, wurden 30 μ l Rinderblutsuspension (defibriniert, elocin lab München) und *E. coli*-Zellen auf einem Objektträger gemischt. Die Zellen wurden vorher mit einem sterilen

Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen. Die Agglutination trat nach einigen Minuten Inkubation auf Eis ein (Dobrindt, 2002).

3.5.8 Test auf Biofilmbildung

Der Test basiert auf der Fähigkeit von Bakterien, auf abiotischen Oberflächen Biofilme zu bilden. Die Biofilmbildung wurde in Mikrotiterplatten aus Polystyrol (MicrowellTM Platten, Nalge Nunc International) analysiert. In diesen Platten wurden 200µl LB-Vollmedium mit den zu untersuchenden *E. coli*-Zellen aus einer Vorkultur inokuliert und 24 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zellwachstum wurden die Mikrotiterplatten gespült und mit 200µl Kristallviolettlösung (1%ig) gefärbt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit Aqua dest. gespült und auf einen angefärbten Biofilm überprüft (O`Toole und Kolter, 1998; Pratt und Kolter, 1998).

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung LrhA-regulierter Gene durch DNA-Microarray-Analyse

LrhA aus *Escherichia coli* weist starke Sequenzhomologien zu den LysR-ähnlichen Regulatoren HexA und PecT aus den pflanzenpathogenen *Erwinia*-Stämmen (64% bzw. 61% Identität) auf. In *Erwinia chrysanthemi* dient PecT als Repressor der Motilität und von Virulenzfaktoren (Surgey et al., 1996). HexA spielt eine Rolle bei der Regulation der regulatorischen RNA *rsmB*, des Sigmafaktors RpoS und des Quorum Sensing-Pheromons OHL. Des Weiteren ist die Motilität von *Erwinia carotovora* in einer *hexA*-Mutante beeinflusst (Harris et al., 1998).

Vergleichend dazu ist bekannt, dass LrhA, ebenfalls wie HexA, die Stabilität von RpoS beeinflussen kann (Gibson und Silhavy, 1999). Ein klarer Phänotyp einer *lrhA*-Mutation konnte jedoch bisher nicht ausgemacht werden. Die Rolle von LrhA in *E. coli* war somit nicht eindeutig geklärt. Um dem Transkriptionsregulator eine eindeutige Funktion zuzuordnen, wurden Expressionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarray-Experimenten durchgeführt. Mit Hilfe dieser DNA-Chips ist es möglich, die mRNA-Gehalte fast aller Gene von *E. coli* gleichzeitig zu messen. Durch Vergleich des mRNA-Expressionsmuster eines *E. coli* Wildtyp-Stammes und einer *lrhA*-Mutante sollten die Zielgene des Regulators LrhA ausfindig gemacht werden.

4.1.1 Methode der DNA-Microarray-Analyse

Nach Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin wurde die Gesamt-mRNA aus dem Wildtypstamm MG1655 und der zugehörigen *lrhA*-Mutante (IMW325) isoliert. Danach erfolgte die reverse Transkription der mRNA und Markierung mit grünen (Cy3) oder roten (Cy5) fluoreszenzmarkierten Nucleotiden. Diese markierten cDNA-Proben wurden simultan mit der DNA eines *E. coli*-Glas-Microarrays hybridisiert. Dieser Microarray-Chip enthielt die DNA von 4108 *E. coli*-Genen in Einzelpunkten, was 96% der Gene von *E. coli* entspricht. Nach der Hybridisierung wurde die grüne und rote Fluoreszenz bei 532nm bzw. 635nm gemessen und daraus die relative mRNA Menge bestimmt (Abb. 6). War die Expression eines Genes und damit die mRNA-Menge im Wildtyp und der *lrhA*-Mutante gleich stark, ergab sich wegen gleicher Intensität der grünen und roten Fluoreszenz ein gelber Farbpunkt.

Ein Beispiel eines solchen Experiments ist in Abb. 7 dargestellt. Hier wurde die mRNA des Wildtyps grün und die der *lrhA*-Mutante rot markiert. Eine starke grüne Fluoreszenz bedeutet eine starke Expression des betrachteten Gens im Wildtyp, d.h. in Anwesenheit von LrhA. Rote Fluoreszenz bedeutet dementsprechend eine Zunahme der mRNA, wenn LrhA fehlt, d.h.

Repression der Expression durch LrhA. Als Beispiel ist hier ein Punkt mit roter Fluoreszenz markiert. Dies bedeutet, dass die *lrhA*-Mutante mehr mRNA des entsprechenden Gens als der Wildtyp produzierte.

Herstellen des Microarrays

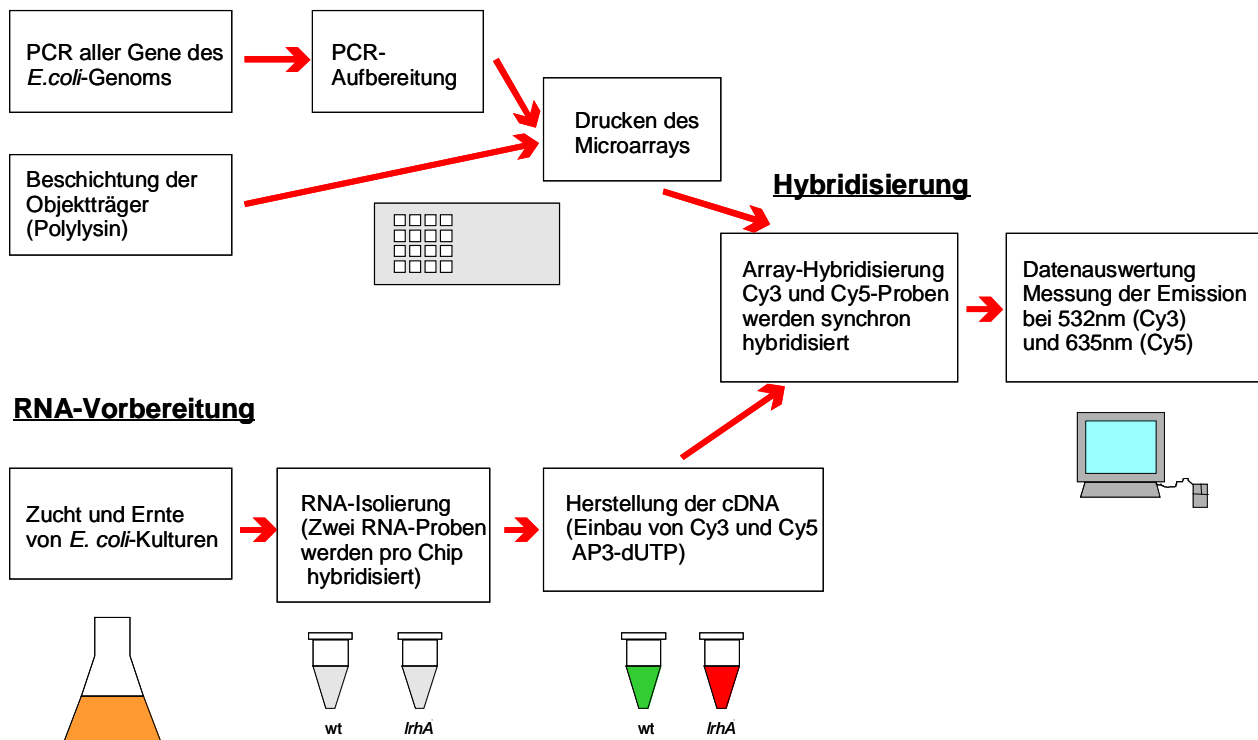
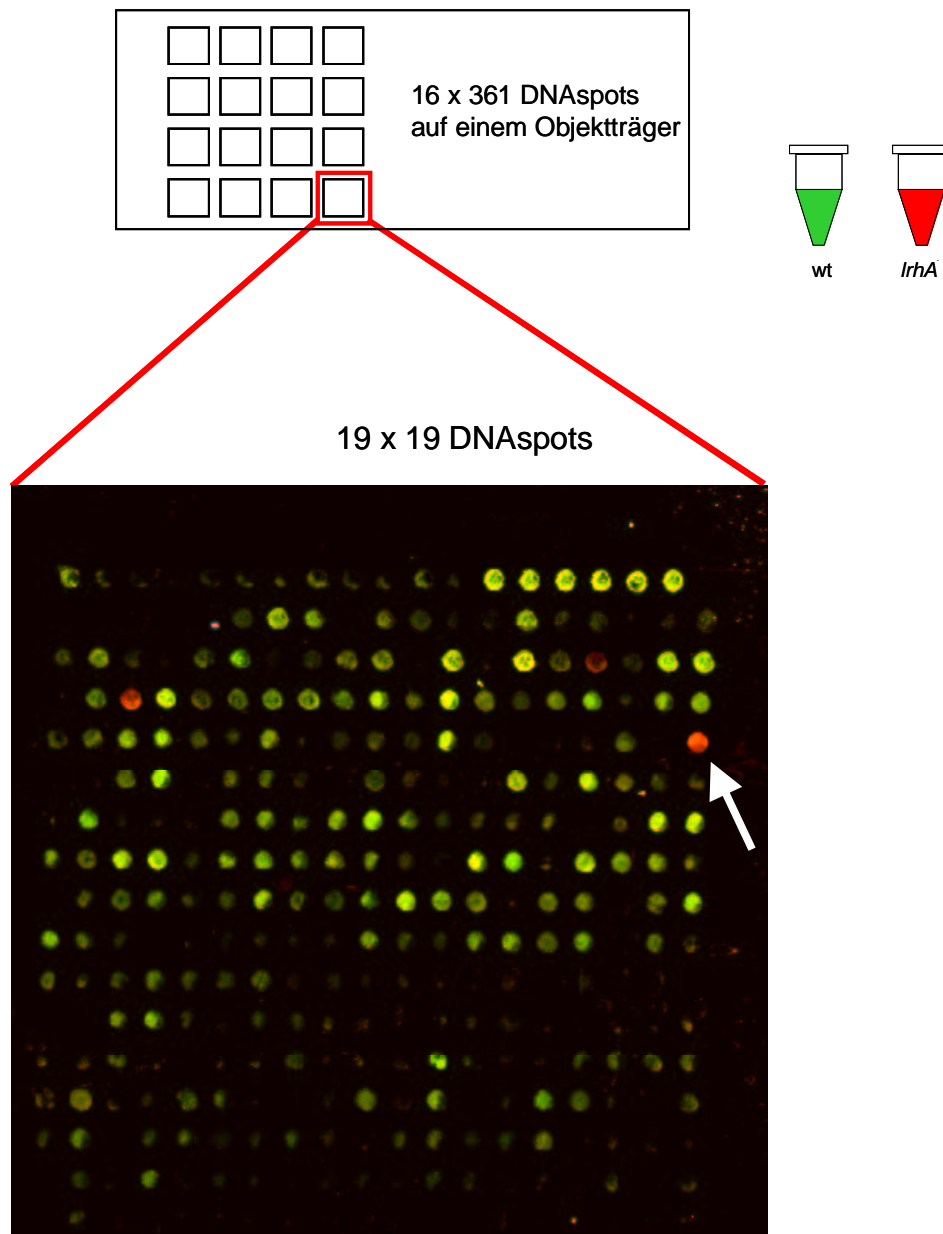


Abb. 6 Schematische Darstellung der DNA-Microarrayexperimente. Die Produktion der DNA-Chips wurde im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Experimente wurde eine große Anzahl von Genen identifiziert, die eine Veränderung des relativen mRNA-Spiegels aufwiesen. Meist handelte es sich dabei um einen Anstieg des mRNA-Spiegels in der *lrhA*-Mutante. Das bedeutet, dass LrhA ein Repressor ist. Die LrhA-regulierten Gene sind in den Tabellen 4 bis 7 zusammengefasst. Die Tabellen enthalten Gene, bei denen das Verhältnis der mRNA der *lrhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp mindestens um den Faktor 2 verändert war. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Tests bestätigt.



4.1.2 Identifizierung *LrhA*-regulierter Gengruppen

Die von *LrhA* regulierten Gene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Gene, die für die Flagellensynthese und die Chemotaxis in *E. coli* zuständig sind (Tab. 4-6), und Gene, die für Fimbrien des Typs 1 kodieren (Tab. 7).

Die meisten Gene der ersten Gruppe sind in drei Clustern auf dem Chromosom von *E. coli* lokalisiert. Im ersten Cluster liegen Gene, die für Strukturkomponenten des Basalkörpers und des Hakens der Flagellen kodieren (*flg*-Gene). Zusätzlich ist hier das Gen des Anti-Sigmafaktors FlgM zu finden. Diese Gene liegen in der chromosomalen Region I gruppiert (Tab. 4). In der chromosomalen Region II findet man Gene, die für die Motorbewegung (*motA* und *motB*) und den Chemotaxis-Apparat (*che*-Gene) benötigt werden. In diese Gruppe

werden auch die Strukturgene für die Chemorezeptoren für Dipeptide, Aspartat, Galaktose/Ribose und Aerotaxis eingeordnet. Neben diesen Genen sind hier auch die Gene des Hauptregulators FlhD₂C₂ lokalisiert (Tab. 5). Ein weiterer Bereich, die chromosomale Region III, beherbergt die *fli*-Gene. Sie kodieren für Komponenten für die Filamentelongation der Flagellen, den Exportapparat für Flagellenproteine, einige Motorkomponenten und den flagellenspezifischen Sigmafaktor FliA (Tab. 6). Diese 52 in Tab. 4-6 zusammengefassten Gene stellen ein Regulon dar (*flhDC*-Operon), ihre Expression wird gemeinsam reguliert.

Tabelle 4 Gene mit erhöhtem mRNA-Spiegel in der *lrhA*-Mutante (Chromosomale Region I von kb 1129 bis 1139 bzw. von Minute 24,4 bis 24,6 auf dem Chromosom von *E. coli*). Die relative mRNA-Menge wurde aus dem Mittelwert von zwei oder drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Gezeigt sind Gene und Operone, deren relative mRNA-Menge um den Faktor ≥ 2 erhöht waren. Die Pfeile deuten die Operonorganisation an. Für jedes Operon ist die regulatorische Hierarchie des *flhDC*-Regulons angegeben (Klasse I bis III). Die statistische Absicherung der Werte erfolgte mit Hilfe des t-Tests (Mat. und Meth. 3.3.9). Die dabei ermittelten p-Werte waren < 0.05 , d.h. die Werte für ein Gen gehörten mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht zum Referenzdatensatz. ND = nicht bestimmbar.

Gene	Funktion	Relative mRNA-Menge in der <i>lrhA</i> -Mutante (-fach)
<i>flgN</i>	Unbekannt	ND
<i>flgM</i>	Anti-Sigmafaktor	4.0
<i>flgA</i> (Klasse II)	Zusammenlagerung des P-Rings	6.0
<i>flgB</i> (Klasse II)	Stab des Basalkörpers	10.8
<i>flgC</i>	Stab des Basalkörpers	10.3
<i>flgD</i>	Kappe des Hakens	14.5
<i>flgE</i>	Haken	12.4
<i>flgF</i>	Stab des Basalkörpers	8.2
<i>flgG</i>	Stab des Basalkörpers	ND
<i>flgH</i>	L-Ring des Basalkörpers	5.2
<i>flgI</i>	P-Ring des Basalkörpers	3.3
<i>flgJ</i>	Unbekannt	7.5
<i>flgK</i> (Klasse III)	Verbindung zw. Haken und Filament	15.4
<i>flgL</i>	Verbindung zw. Haken und Filament	9.9

Tabelle 5 Gene mit erhöhtem mRNA-Spiegel in der *lrhA*-Mutante in der chromosomalen Region II (von kb 1961 bis 1976 oder von Minute 42,3 bis 42,6) und die strukturellen Gene für Chemosensoren (*tsr*, *trg*, *aer* mit Positionen bei 4589 kb, 1491 kb bzw. 3217 kb auf dem Chromosom von *E. coli*). Die relative mRNA-Menge wurde mit Hilfe von DNA-Microarray-Analyse gewonnen. Experimentelle Details wie in Tabelle 4.

Gene	Funktion	Relative mRNA-Menge in der <i>lrhA</i> -Mutante (-fach)
<i>flhE</i>	↑ Strukturelles Element, Zellhülle	2.8
<i>flhA</i>	↑ Exportapparat	2.5
<i>flhB</i> (Klasse II)	↑ Unbekannt	4.7
<i>cheZ</i>	↑ CheY Phosphatase	6.4
<i>cheY</i>	↑ Switch Regulator (als CheY-P)	4.8
<i>cheB</i>	↑ Chemorezeptor Methylsterase	6.8
<i>cheR</i>	↑ Chemorezeptor Methyltransferase	7.0
<i>tap</i>	↑ Chemorezeptor für Dipeptide	16.4
<i>tar</i> (Klasse III)	↑ Chemorezeptor für Aspartat (Glutamat)	3.4
<i>cheW</i>	↑ Positiver Regulator von CheA	80.1
<i>cheA</i>	↑ CheY und CheB Kinase	11.5
<i>motB</i>	↑ Motorrotation	2.7
<i>motA</i> (Klasse III)	↑ Motorrotation	6.3
<i>flhC</i>	↑ Positiver Regulator der Flagellenoperone	2.4
<i>flhD</i> (Klasse I)	↑ Positiver Regulator der Flagellenoperone	3.3
<i>tsr</i>	↑ Chemorezeptor für Serin	1.0
<i>trg</i>	↑ Chemorezeptor für Galaktose und Ribose	5.3
<i>aer</i>	↑ Aerotaxissensor	6.0

Tabelle 6 Gene mit erhöhtem mRNA-Spiegel in der *lrhA*-Mutante (Chromosomale Region III von kb 1999 bis 2021 oder von Minute 43,1 bis 43,6 auf dem Chromosom von *E. coli*). Die relative mRNA-Menge wurde mit Hilfe von DNA-Microarray-Analyse gewonnen. Experimentelle Details wie in Tabelle 4.

Gene	Funktion	Relative mRNA-Menge in der <i>lrhA</i> -Mutante (-fach)
<i>fliZ</i>	Unbekannt	6.0
<i>fliA</i> (Klasse II)	↑ Sigmafaktor (FliA) für Expression der späten Flagellengene	10.1
<i>fliC</i> (Klasse III)	↑ Flagellin (Strukturprotein des Filaments); axiale Komponente	19.1
<i>fliD</i> (Klasse III)	↓ Filamentkappe	13.7
<i>fliS</i>	Filamentelongation	7.0
<i>fliT</i>	↓ Unbekannt	3.7
<i>fliE</i> (Klasse II)	↑ Komponente des Basalkörpers	7.3
<i>fliF</i> (Klasse II)	↓ MS-Ring des Basalkörpers; Platte für Motor/Switch	4.2
<i>fliG</i>	↓ Motor/Switch, an MS-Ring montiert; Komponente des Rotors	5.3
<i>fliH</i>	Exportapparat?	4.3
<i>fliI</i>	Exportapparat? F ₀ F ₁ ATPase homolog	4.5
<i>fliJ</i>	Unbekannt	6.1
<i>fliK</i>	↓ Kontrolle der Hakenlänge	7.4
<i>fliL</i> (Klasse II)	↓ Unbekannt	5.0
<i>fliM</i>	Motor/Switch; Ziel der CheY-P Bindung	3.3
<i>fliN</i>	Motor/Switch	ND
<i>fliO</i>	Unbekannt	5.3
<i>fliP</i>	Unbekannt	4.1
<i>fliQ</i>	↓ Unbekannt	4.4
<i>fliR</i> (Klasse II)	↓ Unbekannt	4.4

Eine weitere große Gruppe von LrhA-regulierten Genen umfasst die Fimbriengene. Diese Gene sind in einer Region um Minute 98 auf dem Chromosom von *E. coli* zu finden. Diese Gruppe beinhaltet die Gene für die Strukturuntereinheiten der Fimbrien des Typs 1 (*fimAICDFG*) und zwei Resolvasen, *fimE* und *fimB*. Bis auf *fimB* und *fimD*, über die anhand der mRNA-Analysen keine Aussage getroffen werden konnte, wurden alle Gene dieser Region durch LrhA reprimiert (Tab. 7).

Tabelle 7 Gene mit erhöhtem mRNA-Spiegel in der *lrhA*-Mutante des *fim*-Operons (von kb 4538 bis 4547 oder von Minute 97,8 bis 98 auf dem Chromosom von *E. coli*). Die relative mRNA-Menge wurde mit Hilfe von DNA-Microarray-Analyse gewonnen. Experimentelle Details wie in Tabelle 4.

Gene	Funktion	Relative mRNA-Menge in der <i>lrhA</i> -Mutante (-fach)	
<i>fimB</i>	↓ „Regulator“ für <i>fimA</i> ; Resolvase	ND	
<i>fimE</i>	↓ „Regulator“ für <i>fimA</i> ; Resolvase	6.9	
<i>fimA</i>	↓ Hauptuntereinheit der Fimbrien, Fimbrin	3.3	
<i>fimI</i>		Stukturelle Komponente, Oberflächenstruktur	7.3
<i>fimC</i>		Periplasmatisches Chaperon	4.1
<i>fimD</i>		Protein Außenmembran; Export & Zusammenlagerung der Typ 1 Fimbrien	ND
<i>fimF</i>		Strukturelle Komponente	1.6
<i>fimG</i>		Strukturelle Komponente	4.7
<i>fimH</i>		↓ Kleine Untereinheit der Fimbrien	2.8

Neben diesen großen Gruppen LrhA-regulierter Gene war ein weiteres Gen in seinem mRNA-Spiegel verändert (Faktor 2,4). Es handelt sich um *cadA*, das für einen pH-Regulator (CadA) kodiert.

Die meisten der LysR-ähnlichen Regulatoren liegen auf dem Chromosom in unmittelbarer Nachbarschaft ihrer Zielgene (Schell, 1993). Sollte dies auch bei LrhA der Fall sein, sollte die Expression der benachbarten Gene beeinflusst sein. Stromaufwärts von *lrhA* sind die Gene *pta*

4.2 Regulation der Flagellen- und Chemotaxisgene durch LrhA

4.2.1 Expression LrhA regulierter Gene der Motilität und Chemotaxis

Um die Rolle von LrhA bei der Expression der Gene für die Flagellensynthese und Chemotaxis genauer zu untersuchen und um die Microarray-Daten zu bestätigen, wurden verschiedene LrhA-regulierte Gene mit dem Reporter-gen *lacZ* fusioniert. Zur Herstellung einer *lacZ*-Proteinfusion wurde der Promotorbereich und der Anfang des kodierenden Bereiches des zu untersuchenden Gens im Leserahmen vor das promotorlose *lacZ*-Gen kloniert. Dadurch wird die Expression von *lacZ* unter die Kontrolle des jeweiligen Promotors gestellt. Die *lacZ*-Fusionen wurden durch den Phagen λ RZ5 in das Chromosom integriert, wodurch die Fusion in einer Kopie vorlag. Die Aktivität des Promotors kann dann anhand der Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt werden.

Die durch LrhA regulierten Gene sind in einem Regulon zusammengefasst. Dieses Regulon wird von FlhD₂C₂, dem Hauptregulator der Flagellen- und Chemotaxisgene, kontrolliert. Er steht an oberster Stelle einer Hierarchie, die in drei Stufen oder Klassen eingeteilt wird. Aus jeder dieser Klassen wurden repräsentative Gene ausgewählt, die mittels Expressionsstudien überprüft werden sollten. Dies waren die Gene *flhDC* (Klasse I), *fliA* und *flgB* (Klasse II) und *fliC* und *trg* (Klasse III). Die Gene *flhDC* und *fliA* kodieren für die transkriptionellen Regulatoren FlhD₂C₂ und FliA. Dabei wird FlhD₂C₂ als Haupt-Regulator des Flagellenoperons bezeichnet, FliA hingegen ist der flagellenspezifische Sigmafaktor σ^F , der vor allem die Expression der Gene der Klasse III steuert. *FlgB* kodiert für eine Untereinheit des Basalkörpers der Flagellen, *fliC* für Flagellin, die Hauptuntereinheit des Flagellenfilaments und *trg* für den Chemotaxis-Rezeptor für Ribose und Galaktose (Macnab, 1996).

Nach aerober Zucht mit Glycerin wurde die β -Galaktosidaseaktivität der verschiedenen chromosomalen *lacZ*-Fusionen gemessen (Tab. 8). Die Expression von *flhDC*'-*lacZ* war in der *lrhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 3,5 erhöht. Dieser Wert korrelierte gut mit den Ergebnissen aus den DNA-Microarrayexperimenten, denn hier lag der durch LrhA vermittelte Repressionsfaktor bei 3,3. Auch die Expression der Klasse II-Gene *fliA* und *flgB* waren in der Mutante erhöht. Hier ergaben sich Faktoren von 13 bzw. 8. Diese Werte stimmten ebenfalls mit den beobachteten Änderungen der mRNA-Menge aus den Microarray-Experimenten überein. Bei den Klasse III-Genen (*trg* und *fliC*) lag die Derepression sowohl für die Expression als auch für die mRNA-Gehalte in einer *lrhA*-Mutante sogar noch höher (Faktor >17). Mit Hilfe dieser Expressionsstudien ließ sich also die aus den DNA-Microarrayexperimenten ermittelte Rolle von LrhA als Repressor bestätigen. Es

liegt außerdem die Vermutung nahe, dass die Veränderungen im mRNA-Spiegel auf eine Regulation durch LrhA auf Transkriptionsebene zurückzuführen sind.

Tabelle 8 Expression von *lacZ*-Protein-Fusionen von Flagellen- oder Chemotaxisgenen im Wildtyp (*lrhA*⁺) und *lrhA*⁻ Hintergrund. Die Zucht der Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde aus drei oder mehr unabhängigen Experimenten ermittelt.

Fusion	Stamm	β -Galaktosidase Aktivität [MU]		Repression durch LrhA (-fach)
		Wt	<i>lrhA</i> ⁻	
<i>flhDC</i> '-' <i>lacZ</i>	CP992 / IMW355	88 ± 11	303 ± 9	3.5
<i>fliA</i> '-' <i>lacZ</i>	LJ10a / IMW331a	258 ± 6	3483 ± 142	13
<i>flgB</i> '-' <i>lacZ</i>	IMW353 / IMW354	38 ± 3	311 ± 20	8
<i>trg</i> '-' <i>lacZ</i>	IMW334 / IMW335	16 ± 1	270 ± 12	17
<i>fliC</i> '-' <i>lacZ</i>	IMW356 / IMW336	108 ± 25	5968 ± 252	55

Die Expression von *fliA*, *trg* und *fliC* wurde zusätzlich in einem *flhDC*-negativen Hintergrund analysiert (Tab. 9). Dies geschah in dem *E. coli*-Stamm MC4100, der kein *flhDC*-Gen trägt und somit den Regulator FlhD₂C₂ nicht ausbilden kann. Die *lacZ*-Fusionen lagen hierbei nicht im Chromosom, sondern auf einem Plasmid mit niedriger Kopienzahl vor, welches in den Stamm MC4100 und die entsprechende *lrhA*-Mutante (IMW41) transformiert wurde. Bei *fliA*'-'*lacZ* und *trg*'-'*lacZ* konnte nur eine sehr geringe Expression im Vergleich zu den *flhDC*-positiven *E. coli*-Stämmen ermittelt werden (1-3 MU). Die Inaktivierung von *lrhA* verursachte keine bedeutende Derepression. Die Expression von *fliC* vom low copy-Plasmid pMW197 im *flhDC*-negativen Hintergrund war mit der Expression von *fliC*'-'*lacZ* im *flhD*-positiven Hintergrund (in einfacher Kopienzahl) vergleichbar. Die durch LrhA verursachte Repression war nur sehr schwach (1,6 fach) und im Vergleich zu der starken Repression im

flhD-positiven Stamm eher unbedeutend. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass LrhA nur in Anwesenheit von FlhD₂C₂ einen Einfluss auf die Motilitäts- und Chemotaxisgene ausüben kann. LrhA scheint deshalb die untersuchten Gene nur über FlhD₂C₂ regulieren zu können. Die weiteren Untersuchungen wurden aus diesem Grund in *flhDC*-positiven *E. coli*-Stämmen durchgeführt.

Tabelle 9 Expression von *lacZ*-Protein-Fusionen von Flagellen- oder Chemotaxisgenen in *flhD* (MC4100) und *flhD lrhA* (IMW41) negativem Hintergrund. Die Zucht der Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde aus zwei oder mehr unabhängigen Experimenten ermittelt.

Fusion	Plasmid	β -Galaktosidase Aktivität (MU)	
		MC4100 (<i>flhD</i> ⁻)	IMW41(<i>flhD</i> ⁻ <i>lrhA</i> ⁻)
<i>fliA</i> '-' <i>lacZ</i>	pMW198	1 \pm 1	4 \pm 1
<i>trg</i> '-' <i>lacZ</i>	pMW196	3 \pm 2	3 \pm 2
<i>fliC</i> '-' <i>lacZ</i>	pMW197	112 \pm 29	182 \pm 43

4.2.2 Effekt der *lrhA*-Mutation auf Chemotaxis und Motilität

Die DNA-Chip- und Expressionsstudien ließen vermuten, dass LrhA das Schwimmverhalten und die Chemotaxis von *E. coli* beeinflusst. Um die allgemeine Motilität bzw. das Schwimmverhalten der verschiedenen *E. coli*-Stämme zu bestimmen, wurde Trypton-Schwärmagar eingesetzt. Schwärmagarplatten enthalten Agar in geringer Konzentration, dadurch ist den Zellen das Schwimmen im Agar möglich. Die durch den Chemorezeptor Air vermittelte Aerotaxis wurde mit Hilfe von Minimal-Schwärmagar getestet, der mit Succinat supplementiert wurde. Beim Wachstum mit Succinat als Kohlenstoffquelle wird viel Sauerstoff verbraucht und das Wachstum hängt vollständig von der Anwesenheit von

Sauerstoff ab, was zur Ausbildung eines Sauerstoffgradienten auf der Agarplatte führt.

Des Weiteren wurde die Chemotaxis auf Aspartat untersucht. Diese Chemotaxis ist auf den Rezeptor Tar zurückzuführen, dessen Expression von LrhA beeinflusst wird. Dazu wurde Minimal-Schwärmagar mit Aspartat verwendet. Aufgrund der während des Wachstums entstehenden Substratlimitierung entfernen sich die Zellen vom Auftragungsort. Auf Schwärmagarplatten ausgebrachte Zellen bilden chemotaktische Ringe von charakteristischem Durchmesser. Auf Trypton-Schwärmagar-, Aerotaxis- und Chemotaxisplatten zeigte die *lrhA*-Mutante (IMW325) ein hypermotiles Verhalten im Vergleich zum Wildtyp (MG1655). Die bei der *lrhA*-Mutante gebildeten Schwärmringe zeigten einen deutlich vergrößerten Durchmesser (Abb. 9). Um nun sicherzustellen, dass das veränderte Schwimmverhalten auf die *lrhA*-Mutation zurückzuführen ist, wurde die Mutante mit einem intakten *lrhA*-Gen komplementiert, welches auf einem low copy-Plasmid lag (pMW213). Es zeigte sich, dass die Motilität und die Aerotaxis in diesem Stamm sogar unter der des *E. coli*-Wildtyps lagen. Die Komplementation bei der Aspartat-Chemotaxis zeigte jedoch keine Wirkung. Der Kontrollvektor (pME6010) übte keinen Einfluss auf die Motilität der *lrhA*-Mutante aus. Es ließ sich also feststellen, dass die *lrhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp verbesserte allgemeine Motilität und chemotaktische und aerotaktische Fähigkeiten zeigte und dass diese Effekte in Anwesenheit eines *lrhA*-Expressionsplasmids zum Teil rückgängig gemacht werden konnten.

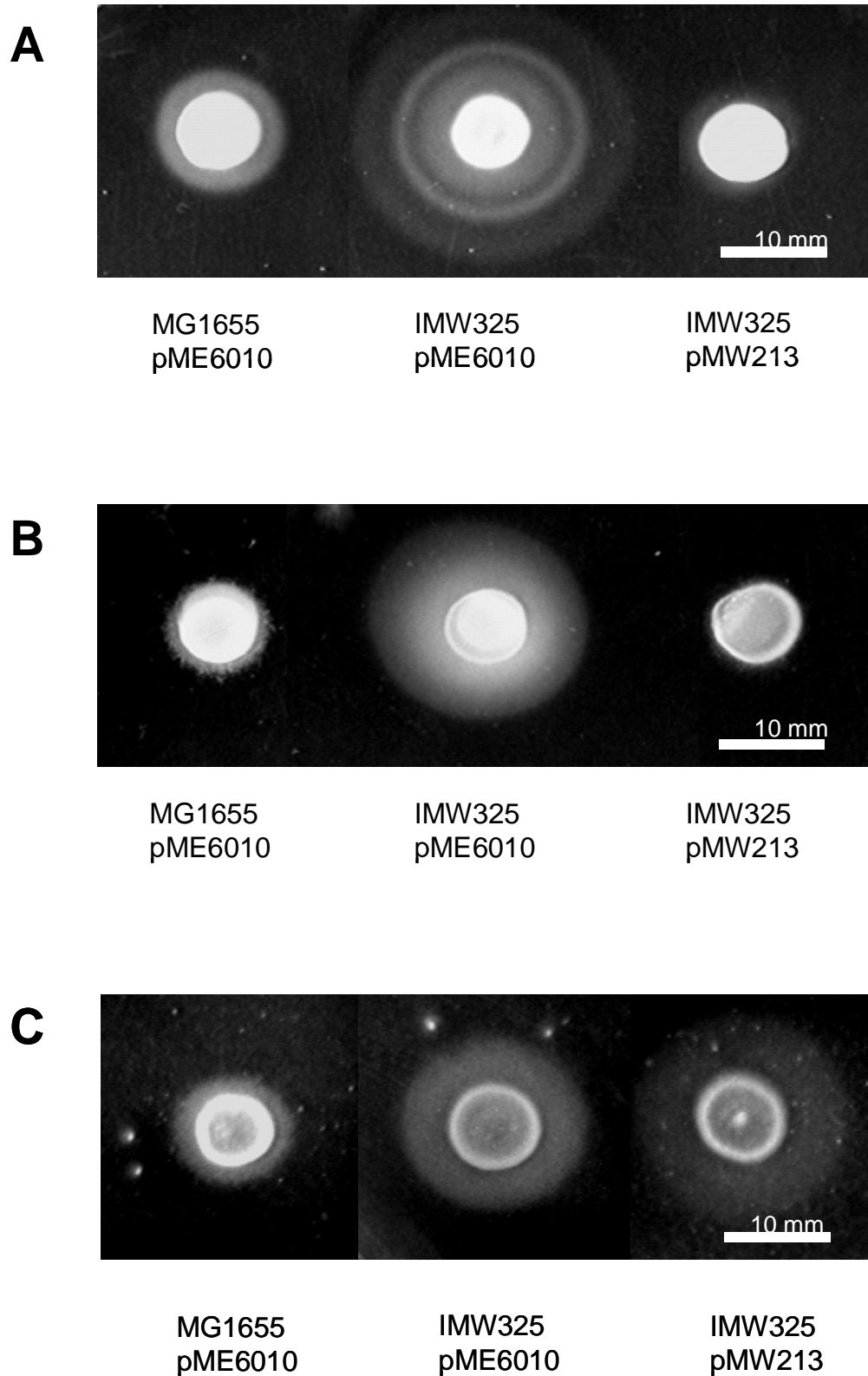


Abb. 9 **Motilität, Chemotaxis und Aerotaxis in *lrhA*⁺ und *lrhA*⁻ Stämmen von *E. coli*.** Je 15 μ l einer Suspension von *E. coli* Wildtyp MG1655, der *lrhA*-Mutante IMW325 und der komplementierten *lrhA*-Mutante IMW325 (pMW213) wurden auf Trypton-Schwärmagar (A), Aerotaxis-Minimal-Schwärmagar (MSA) mit Succinat (B) und Chemotaxis-MSA mit Aspartat (C) aufgetropft und 4-6 h bei 37°C (A) oder über Nacht bei 30°C (B und C) inkubiert. Der Wildtyp MG1655 und die *lrhA*-Mutante IMW325 enthielten das Kontrollplasmid pME6010.

4.2.3 Analyse der Flagellen durch Transmissionselektronenmikroskopie

Es stellte sich nun die Frage, wie die verbesserte Motilität der *lrhA*-Mutante phänotypisch zu erklären ist. Die Expressionsmessungen legten die Vermutung nahe, dass dies durch eine höhere Anzahl der Flagellen und/oder durch Verlängerung der Flagellen zustande kommen kann. Dies sollte mit Transmissionselektronenmikroskopie überprüft werden. Dazu wurden die Zellen eines *E. coli*-Wildtyps und einer *lrhA*-Mutante chemisch fixiert, auf Kohlefolie aufgebracht und anschließend mit Uranylacetat negativ kontrastiert.

Es konnte nur ein geringer Anteil der Zellen auf der Kohlefolie fixiert werden (ca. 25% der Gesamtzellen im Kulturmedium). *E. coli*-Zellen mit der *lrhA*-Mutation (IMW325) zeigten eine deutlich höhere Anzahl an Flagellen, als dies beim Wildtyp (MG1655) der Fall war (Abb. 10). Beim Auszählen von etwa 50 Zellen waren bei einer *lrhA*-Mutante im Durchschnitt etwa 3 mal mehr Flagellen zu finden als beim Wildtyp. Diese Angabe bezieht sich auf inserierte und abgefallene Flagellen. Um diese Daten statistisch abzusichern, müsste eine Wiederholung der Untersuchungen mit veränderten experimentellen Bedingungen erfolgen.

Beim Wildtyp waren sehr viel weniger Flagellen zu finden, obwohl er beweglich war. Man kann deshalb festhalten, dass die verstärkte Motilität einer *lrhA*-Mutante wohl auf die erhöhte Zahl der Flagellen zurückzuführen ist. Über die Länge der Flagellenfilamente in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen, die ebenfalls Einfluss auf die Motilität haben könnte, konnte keine Aussage getroffen werden.

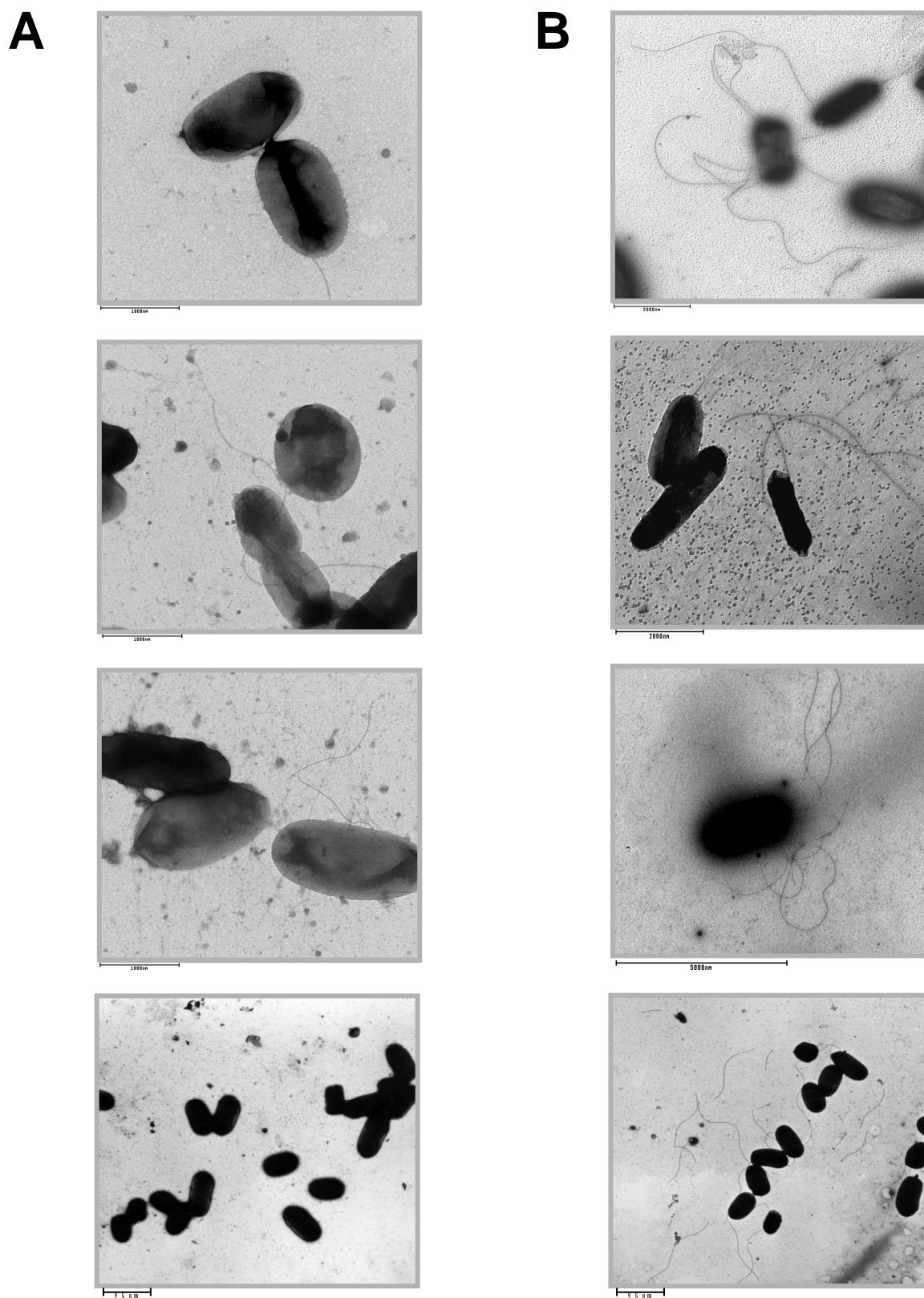


Abb. 10

Transmissionselektronenmikroskopie des *E. coli*-Wildtyps MG1655 (A) und der *lrhA*-Mutante IMW325 (B). Nach der Fixierung wurden die *E. coli*-Zellen mit Uranylacetat negativ kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.

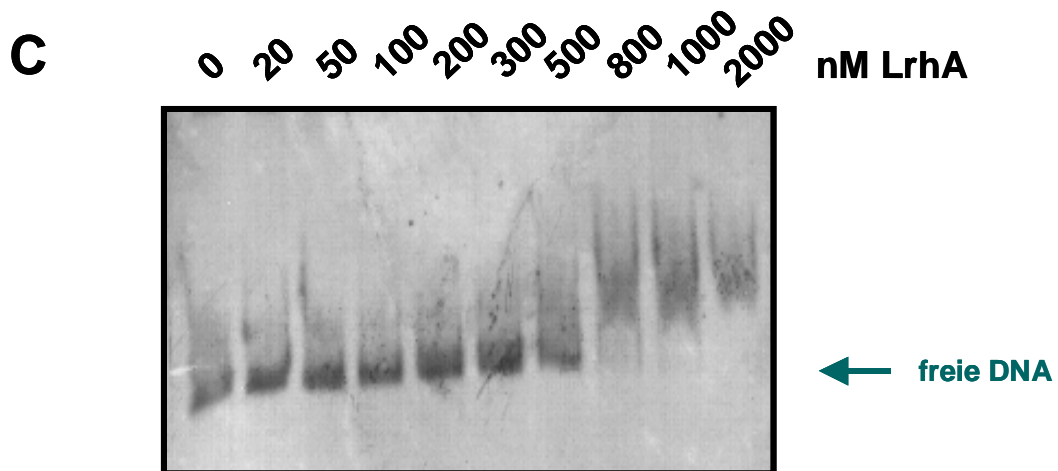
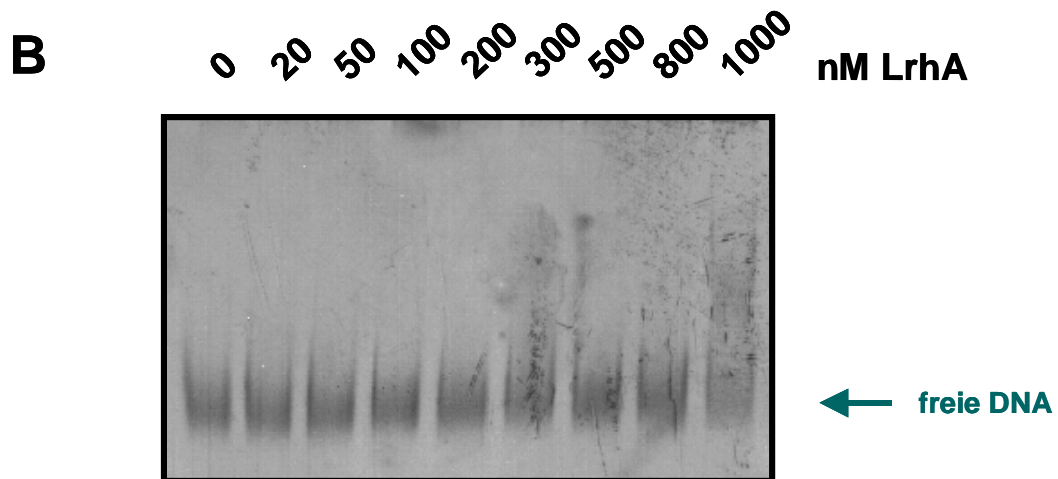
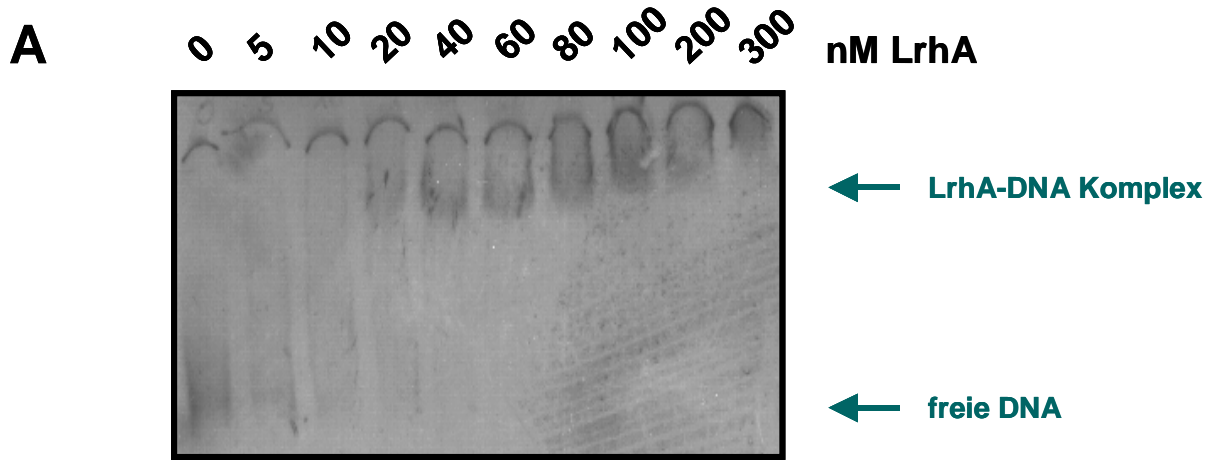
4.2.4 Bindung von isoliertem LrhA an die Promotoren der Gene des *flhDC*-Regulons

Wie bei den *lacZ*-Expressionsmessungen erwähnt, wirkt LrhA vermutlich als Transkriptionsregulator. Die Proteine der LysR-Familie, zu der auch LrhA gehört, binden an bestimmte Promotorbereiche ihrer Zielgene und regulieren deren Expression. Zur Kontrolle, ob LrhA in gleicher Weise wirkt, sollte die Bindung von LrhA an seine Zielgene untersucht werden. Dazu wurden Promotorfragmente des Klasse I-Gens *flhDC*, der Klasse II-Gene *fliA* und *flgB* und der Klasse III-Gene *fliC* und *trg*, die auch schon in den Expressionsstudien untersucht wurden, in Gelretentionsanalysen eingesetzt (Abb. 11). Radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit den entsprechenden Promotorregionen, wurden mit steigenden Konzentrationen an gereinigtem His₆-LrhA inkubiert und danach einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Die Lage der DNA-Banden wurde durch Autoradiographie detektiert.

Bei Bindungsexperimenten von LrhA mit Promotor-DNA von *flhDC* nahm die Intensität der Bande der freien Promotor-DNA mit steigenden Konzentrationen an LrhA ab und gleichzeitig tauchte eine Bande mit geringerer Mobilität auf, welche vermutlich einen LrhA-DNA-Komplex repräsentiert (Abb. 11A). Die freie DNA nahm schon in Anwesenheit von 5 nM LrhA deutlich ab, und bei 40-50 nM LrhA war nur noch die retardierte Bande (LrhA-DNA-Komplex) detektierbar. Für die Bindung von LrhA an den Promotor von *flhDC* konnte ein apparenter K_D -Wert von 20 nM festgelegt werden. Um die Spezifität der Bindung zu gewährleisten, wurde dabei ein 625-facher Überschuss an unspezifischer unmarkierter Kompetitor-DNA zum Gelretardationsansatz zugegeben. LrhA bindet also spezifisch an den Promotor von *flhDC* und reguliert vermutlich auf diese Weise die Transkription.

Die DNA Fragmente, die die kompletten Promotoren der Gene der Klasse II und III trugen (*fliA*, *flgB*, *trg* und *fliC*), wurden in gleicher Weise auf Bindung von LrhA getestet. Für keines dieser Gene konnte eine veränderte Mobilität der DNA im Polyacrylamidgel beobachtet werden, auch wenn LrhA in Konzentrationen bis zu 1000 nM eingesetzt wurde (Abb. 11B-E). LrhA bindet damit offensichtlich nicht an diese Promotoren.

Man kann die Promotoren der Zielgene von LrhA in zwei Gruppen einteilen, die erste Gruppe, bei der LrhA an den Promotor binden kann (*flhDC*-Gen) und die zweite Gruppe (*fliA*, *flgB*, *trg* und *fliC* und vermutlich andere Gene der Klasse II und III), bei der keine Bindung von LrhA nachzuweisen war. Von den Genen des *flhDC*-Operons stellt also nur *flhDC* ein direktes Zielgen von LrhA dar. Dies bestätigt die Ergebnisse der Expressionsstudien im *flhDC*-negativen *E. coli*-Stamm MC4100.



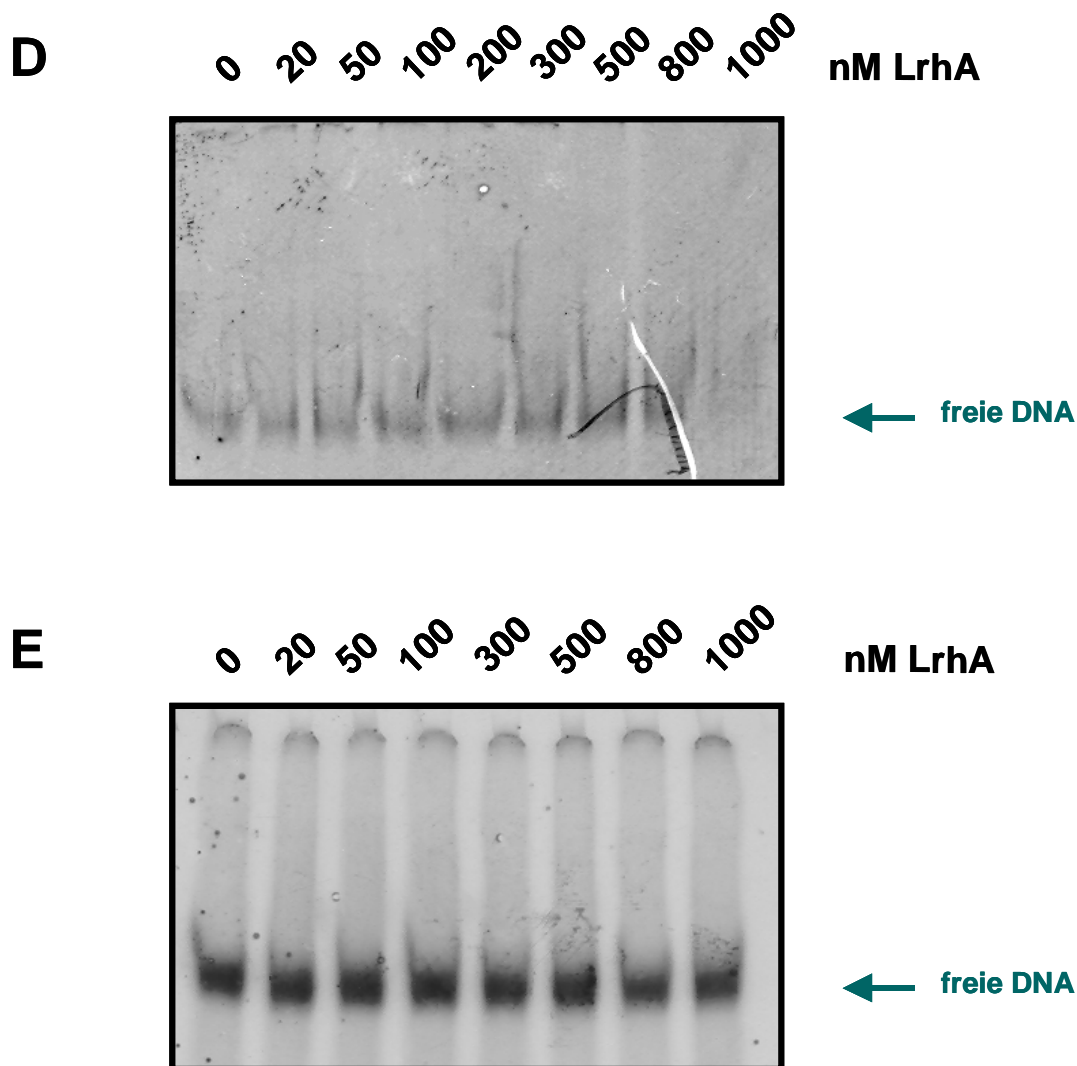
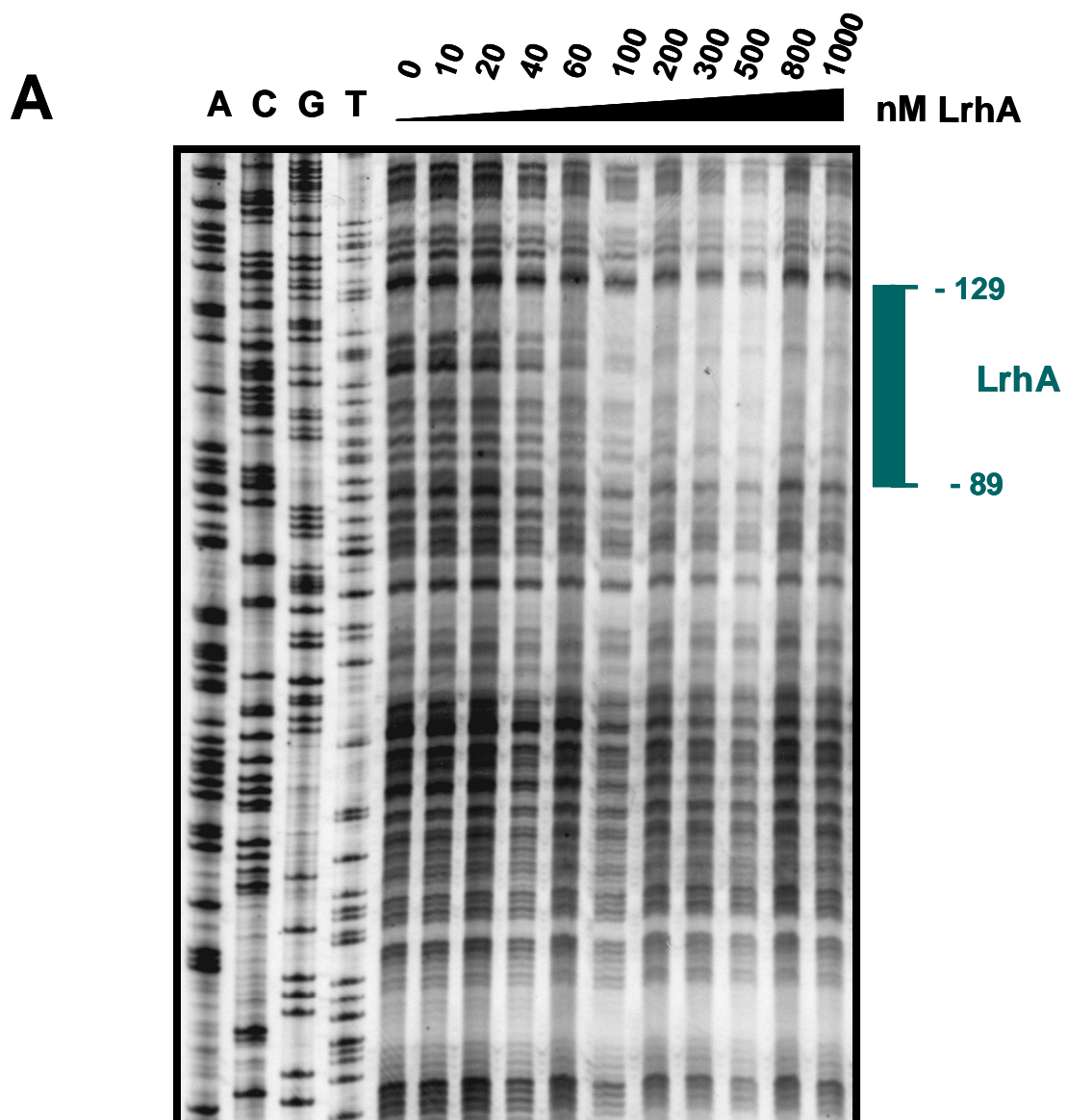


Abb. 11 Gelretardationsexperimente zur Bindung von LrhA an die Promotor-DNA von *flhD* (A), *trg* (B), *fliC* (C), *fliA* (D) und *flgB* (E). Radioaktiv markierte Promotor-DNA (5 nM pro Bahn) wurde in Anwesenheit von 625-fachem Überschuss an Kompetitor-DNA mit steigenden Konzentrationen an isoliertem His₆-LrhA inkubiert und einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die freie Promotor-DNA und der retardierte LrhA-DNA-Komplex sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.2.5 Untersuchung der LrhA-Bindestelle am *flhDC*-Promotor durch DNaseI-Footprint-Experimente

Zur genaueren Identifizierung der Bindestelle von LrhA am Promotor von *flhDC* wurden DNaseI-Footprintanalysen durchgeführt. Mit dieser Methode werden die Promotorbereiche bestimmt, an denen LrhA bindet und die DNA vor Verdau durch DNaseI schützt. Markierte *flhDC*-Promotor-DNA wurde mit steigenden Konzentrationen an gereinigtem His₆-LrhA

inkubiert und einem DNaseI-Verdau unterzogen. Die resultierenden Fragmente wurden in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Promotorfragment umfasste die komplette intergenische Region zwischen *flhD* und dem stromaufwärts liegenden Gen *yecG*. In Anwesenheit von LrhA konnte ein Bereich identifiziert werden, der vor DNaseI-Verdau geschützt ist. Dieser reichte von -89 bis -129 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Soutourina et al., 1999) von *flhDC* (Abb. 12). In diesem Bereich fehlten bei hoher LrhA-Konzentration die DNA-Banden, offensichtlich aufgrund eines Schutzes der DNA vor Verdau durch DNaseI. Der Schutz durch LrhA begann ab einer Konzentration von 100 nM Protein. Zusätzlich wurden einzelne Nucleotide außerhalb dieses Bereiches durch die Bindung von LrhA vor DNaseI-Verdau geschützt. Diese lagen an den Positionen +28 und +46 auf dem intergenischen Bereich vor *flhDC*. An der Position +52 trat bei Anwesenheit von LrhA eine DNaseI-hypersensitive Stelle auf (Abb. 12B). Somit konnte die Bindestelle von LrhA auf dem Promotor von *flhDC* eindeutig charakterisiert werden (Abb. 13).



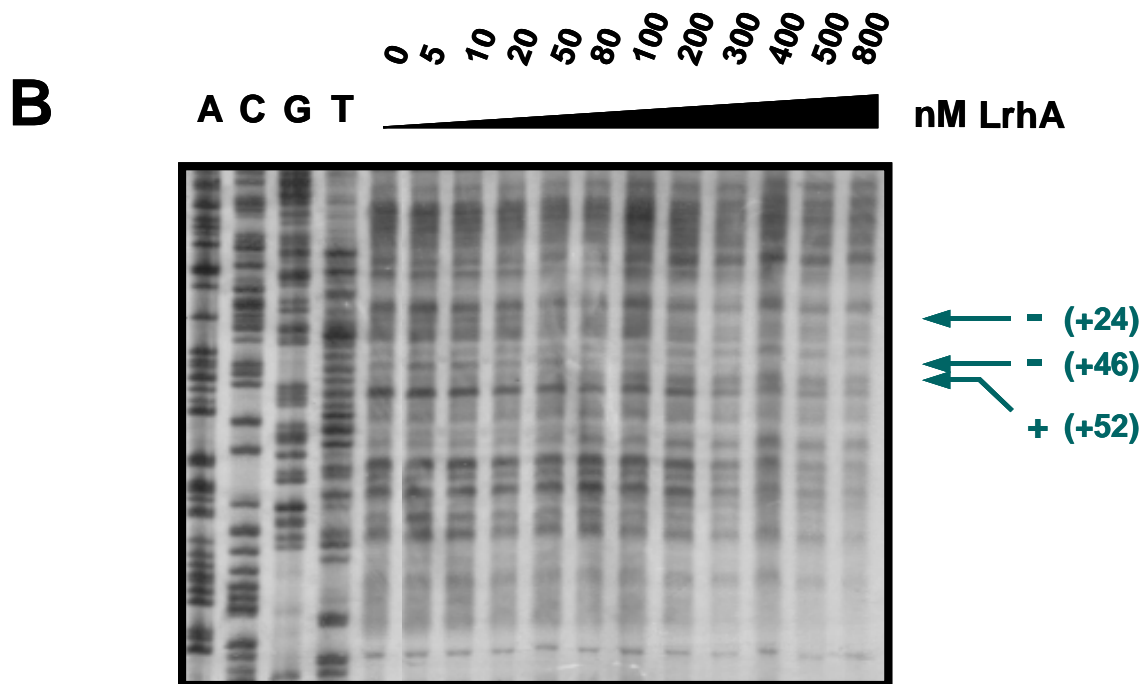


Abb. 12 DNaseI-Footprint: Bindung von LrhA am *flhD*-Promotor (A) und am 5'-Ende der transkribierten Region von *flhD* (B). Die DNA der kompletten Promotorregion wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert und mit steigenden Konzentrationen an His₆-LrhA inkubiert. Nach der Bindung wurde DNaseI zugegeben. Der vor DNaseI-Verdau geschützte Bereich ist mit einem Balken gekennzeichnet. Einzelne Nukleotide, die geschützt (-) oder hypersensitiv (+) werden, sind durch Pfeile hervorgehoben.

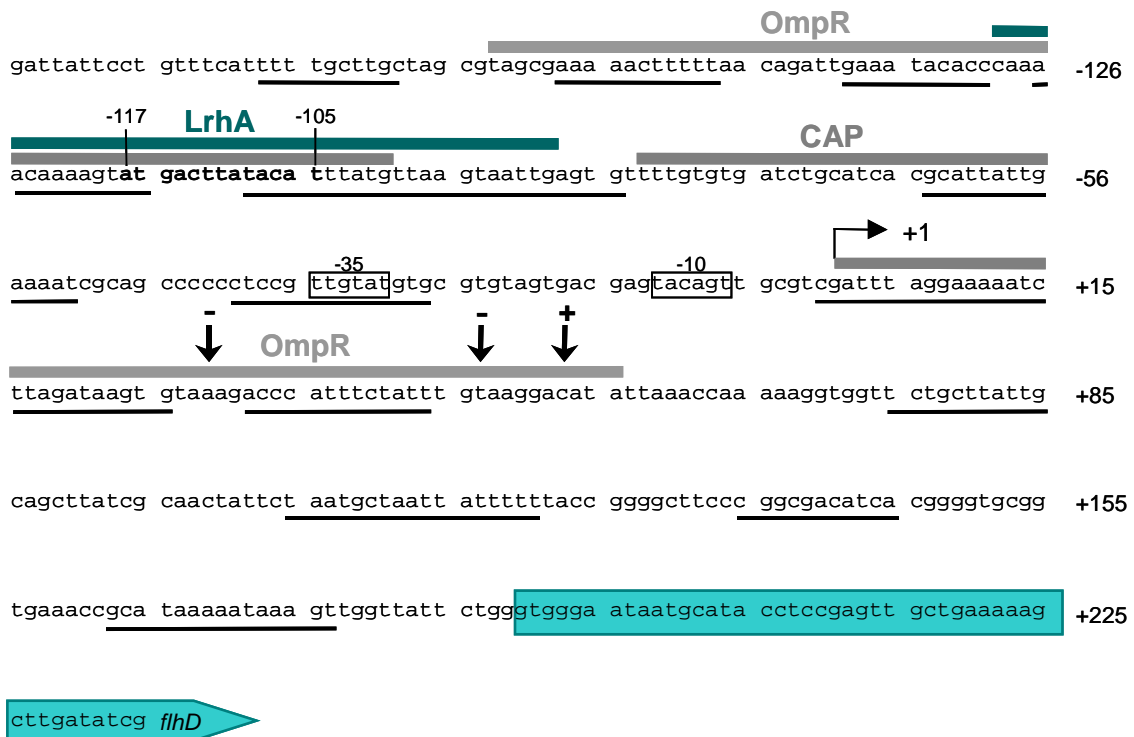


Abb. 13 Promotor-Region von *flhDC* mit regulatorischen Bindestellen und DNaseI geschützten oder hypersensitiven Stellen in Anwesenheit von LrhA. Das DNA-Fragment und die Nukleotide (↓), die geschützt (-) oder hypersensitiv (+) werden, sind eingezeichnet. Die Position der Bindestellen für das Catabolit Aktivator Protein (CAP), den Osmoregulator OmpR und das H-NS-Protein (schwarze Linien unterhalb der Sequenz) sind aus Shin und Park (1995) und Soutourina et al. (1999) entnommen. Die vermutliche LrhA-Erkennungssequenz ist fett gedruckt.

4.3 Regulation der Fimbriengene des Typs 1 durch LrhA

4.3.1 Expression

Die Funktion von LrhA bei der Expression der Fimbriengene des Typs 1 sollte mit *lacZ*-Proteinfusionen untersucht werden. Dazu wurde das Gen *fimA* ausgewählt. *FimA* ist das erste Gen eines Operons, welches für die strukturellen Komponenten der Fimbrien kodiert. Für die Gene dieses Operons konnten im DNA-Arrayexperiment Repressionen durch LrhA um Faktoren bis zu 7,3 ermittelt werden (Tab. 4). Die *fimA*'-*lacZ*-Fusion unterliegt der Kontrolle von FimE und FimB, welche durch Phasenvariation den Promotor von *fimA* an- oder ausschalten (Low et al., 1996). Diese Phasenvariation erlaubt keine eindeutigen Messungen der *fimA*-Expression. Dies äußerte sich in sehr starken Schwankungen der β -Galaktosidaseaktivität, die eine Bestimmung des Effektes von LrhA unmöglich machten (nicht gezeigt).

Daraufhin wurde eine *fimA*'-*lacZ*-Fusion konstruiert, bei der keine Phasenvariation mehr stattfinden kann (*fimA2*'-*lacZ*). Dies wurde dadurch erreicht, dass die für die Phasenvariation des *fimA*-Operons notwendige invertierte Sequenz (IRL) stromab von *fimE* nicht in die Konstruktion der Fusion einbezogen wurde. Die anschließenden Messungen der β -Galaktosidaseaktivität in einem Wildtyp und einer *lrhA*-Mutante ergaben keine Abhängigkeit von LrhA (Tab. 10). Das bedeutet, dass eine *lrhA*-Mutation scheinbar keine Auswirkung auf die Expression von *fimA* hat. Um eine weitere Aussage über den Einfluss von LrhA auf die Expression von Typ 1 Fimbrien-Genen treffen zu können, wurde *fimE* herangezogen. FimE ist eine Resolvase, die die Expression von *fimA* negativ reguliert, indem sie das invertierbare Promotorelement vor *fimA* in die OFF-Position bringen kann. Bei Messungen einer *fimE*'-*lacZ*-Fusion mit IMW337 (Wildtyp) im Vergleich zu IMW338 (*lrhA*') wurde eine dreifache Aktivierung der Expression von *fimE* durch LrhA beobachtet (Tab. 10).

Bei den DNA-Chip-Analysen wurde für *fimE* jedoch eine Repression um den Faktor 6,9 bestimmt. Da aber FimE die Expression von *fimA* negativ reguliert (Umschaltung von ON auf OFF) und LrhA die Strukturgene der Fimbrien reprimiert (Ergebnisse aus den DNA-Chips), ergibt sich ein schlüssiges Bild (Abb. 14). Demnach reprimiert LrhA die Expression der Typ 1 Fimbrien indirekt über die Aktivierung der Expression von *fimE*.

Tabelle 10 Expression der translationalen *fimA2*'- und *fimE*'-*lacZ*-Fusion im *E. coli* Wildtyp (*lrhA*⁺) und *lrhA*⁻ Hintergrund. Die *fimA2*'-*lacZ*-Messungen erfolgten vom Plasmid pCB5 aus. Die Zucht der Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde aus drei oder mehr unabhängigen Experimenten ermittelt.

Fusion	Stamm	β -Galaktosidase-Aktivität [MU]		Repression durch LrhA (-fach)
		Wt	<i>lrhA</i> ⁻	
<i>fimA2</i> '- <i>lacZ</i>	LJ10 (pCB5) / IMW331 (pCB5)	9999 \pm 1609	10615 \pm 1947	1
<i>fimE</i> '- <i>lacZ</i>	IMW337 / IMW338	204 \pm 26	69 \pm 7	3

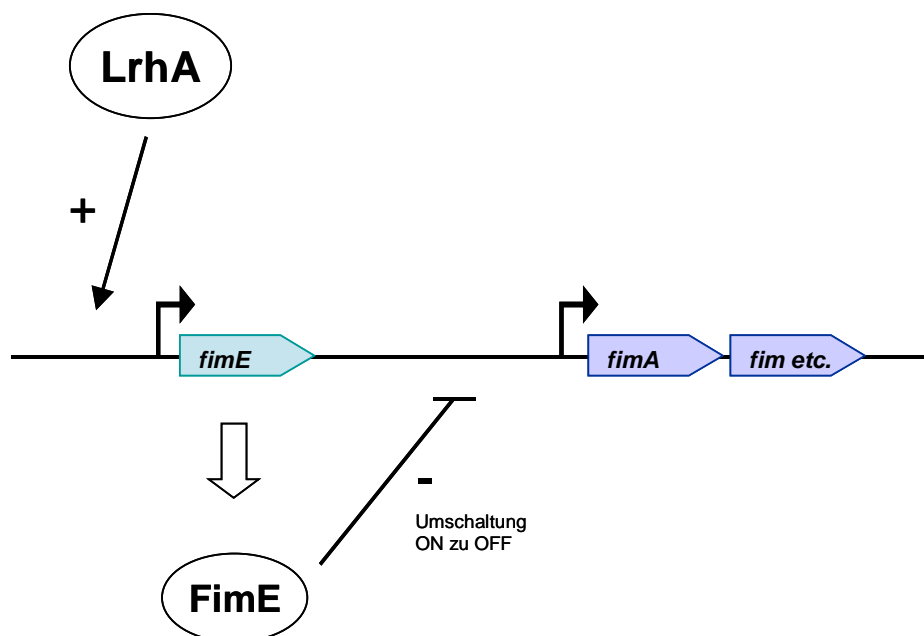


Abb. 14 Repression der Expression von *fimA* durch LrhA. LrhA aktiviert die Expression von *fimE* und fördert so das Ausschalten des *fimA*-Promotors durch Phasenvariation. Auf diese Weise reprimiert LrhA die Expression von *fimA* indirekt.

4.3.2 Hefeagglutination

Um die Ergebnisse, die mit Hilfe von *lacZ*-Expressionsstudien und Bindungsexperimenten gewonnenen wurden, *in vivo* zu verifizieren, wurde ein Hefe-Agglutinationstest durchgeführt. Fimbrien des Typs 1 sind in der Lage, an mannosehaltige Rezeptoren zu binden. Solche Rezeptoren kommen bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* vor. Bei Inkubation von *E. coli*-Zellen mit Hefezellen sollte es aufgrund dieser Strukturen zu einer Agglutination kommen (Dobrindt, 2002). Bakteriensuspensionen unterschiedlicher optischer Dichte wurden auf einem Glasobjektträger mit einer Hefesuspension gemischt. Beim Wildtyp wurde ab einer optischen Dichte von 2 eine Verklumpung der Zellen beobachtet (Tab. 11). Im Vergleich dazu kam es bei der *lrhA*-Mutante schon bei deutlich geringerer optischer Dichte (OD = 0,25) zu einer Agglutination. Als Kontrolle diente der Stamm AAEC185, der keine Typ 1 Fimbrien ausbilden kann. Folglich kam es zu keiner Anheftung an die Hefezellen. Zusatz freier Mannose im Überschuss (2%) hemmte die Agglutination auch bei der *lrhA*-Mutante vollständig. Man kann deshalb davon ausgehen, dass LrhA tatsächlich die Ausbildung von Typ 1 Fimbrien reprimiert.

Tabelle 11 Hefeagglutinationstest mit *Saccharomyces cerevisiae*. Bei verschiedenen optischen Dichten wurden Suspensionen der Stämme *E. coli* 536 (wt), IMW330 (*lrhA*⁻) und AAEC185 (*fim*⁻) mit Bäckerhefe auf einem Objektträger gemischt. Die anschließende Verklumpungsreaktion wurde mit - (keine Agglutination), +/- (Agglutination) und + (starke Agglutination) bewertet.

OD _{578nm}	Agglutination mit Bäckerhefe (10 mg/ml)		
	<i>E. coli</i> 536 (wt)	IMW330 (<i>lrhA</i> ⁻)	AAEC185 (<i>fim</i> ⁻)
0,25	-	+/-	-
0,5	-	+	-
1	-	+	-
2	+/-	+	-
4	+/-	+	-
5	+	+	-
10	+	+	-
5	-	-	-
+2% Mannose	-	-	-

4.3.3 Bindung von isoliertem LrhA an die Promotoren der *fim*-Gene

LrhA als Regulator der Transkription sollte in der Lage sein, an den Promotor von *fimE* und eventuell von *fimA* zu binden. Mit Hilfe von Gelretentionsanalysen sollte diese Frage wie bei den Bindungsstudien für die Flagellengene untersucht werden. Jeweils der gesamte intergenische Promotor-Bereich wurde in den Test eingesetzt (Abb. 15). Bei *fimE* war eine Bindung von LrhA an den Promotor zwischen 20 und 50 nM LrhA festzustellen, der K_D -Wert für die Bindung lag bei 50 nM.

LrhA war aber auch in der Lage an den Promotor von *fimA* zu binden. LrhA bildete mit der Promotor-DNA von *fimA* bei Konzentrationen von LrhA zwischen 50 und 100 nM einen Komplex mit einem K_D -Wert von 100 nM LrhA. Es scheint sich also auch hier um eine spezifische Bindung zu handeln.

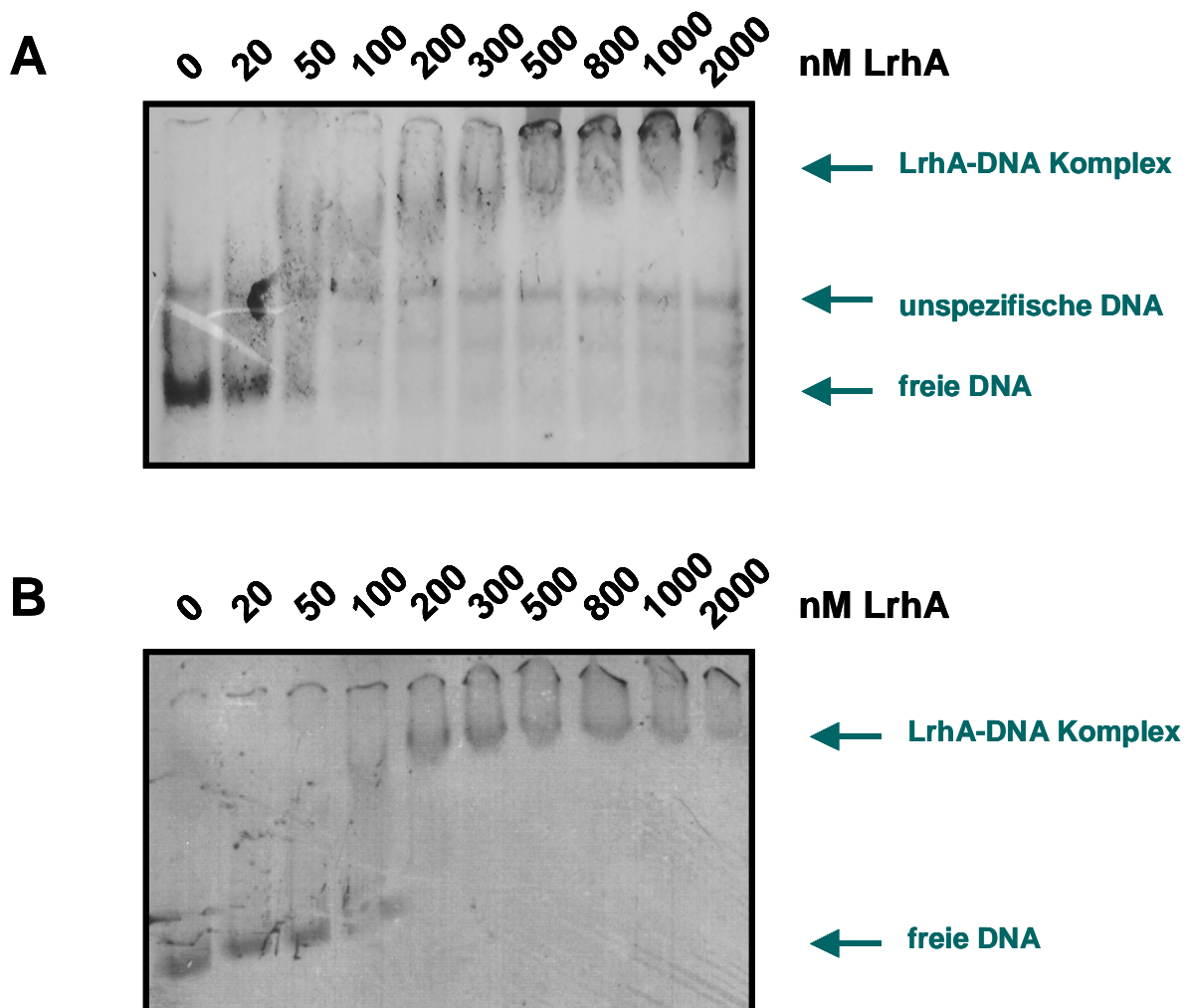


Abb. 15 Gelretardation der Promotor-DNA von *fimE* (A) und *fimA* (B) durch LrhA. Die DNA-Fragmente wurden mit steigenden Konzentrationen an His₆-LrhA inkubiert. Die Bedingungen sind die gleichen wie bei Abb. 11. Unspezifische DNA in A ist markiertes unspezifisches PCR-Fragment, welches nicht den Promotor von *fimE* enthält.

Neben *flhDC* konnten also zwei weitere direkte Zielgene von LrhA identifiziert werden, *fimE* und *fimA*. Die oben dargestellten Experimente (4.3.1) haben jedoch gezeigt, dass LrhA die Expression von *fimA* nur über die Phasenvariation und die Expression von *fimE* kontrolliert, da die *fimA2'::lacZ*-Fusion nicht mehr von LrhA abhängig ist (Abb. 14). Deshalb spielt die Bindung von LrhA an die DNA stromauf von *fimA* vermutlich keine Rolle bei der Expressionskontrolle von *fimA*, sondern hat eine andere Funktion.

4.3.4 Bestimmung der Frequenz der Phasenvariation

Wenn LrhA einen direkten Einfluss auf die Frequenz der Phasenvariation des *fimA*-Promotorelementes ausübt, sollte dies anhand der Umschaltfrequenz des Promotors nachweisbar sein. Das heißt, man kann in einer Kolonie die Häufigkeit des Umschaltens von Phase-ON- zum Phase-OFF-Zustand bestimmen (Gally et al., 1993). Dies wurde mit der umschaltbaren *fimA'::lacZ*-Fusion durchgeführt. Bakterien, die eine solche Fusion mit dem Promotor in richtiger Orientierung tragen, bilden auf MOPS-Minimal-Agar mit X-Gal blaue Kolonien aus. Weiße Kolonien entstehen, wenn der Promotor im OFF-Zustand vorliegt und *fimA* nicht exprimiert werden kann. Die Frequenz des Umschaltens von ON zu OFF in einem *lrhA*-negativen und *lrhA*-positiven Hintergrund sollte ermittelt werden. Mit Hilfe dieser sogenannten Switch-Frequenz kann man den Einfluss von LrhA auf die Phasenvariation untersuchen.

Das Wachstum eines einzelnen Bakteriums mit dem Promotor im ON-Zustand führt zu einer Kolonie, die hauptsächlich Zellen im ON-Zustand enthält. Eine solche Kolonie wurde in MOPS-Medium verdünnt und auf MOPS-Minimal-Agar mit X-Gal ausplattiert. Nach Inkubation bei 42°C wurden die Kolonien im ON- und OFF-Zustand (blau bzw. weiß) ausgezählt. Eine blaue Kolonie geht aus einer Zelle im ON-Zustand (aus der Ursprungskolonie) hervor. Umgekehrt verhält es sich für weiße Kolonien. Durch Berechnung der Generationszahl in der Ausgangskolonie und Bestimmung des Verhältnisses der Anzahl der OFF-Kolonien zur Anzahl der Gesamtkolonien wurde die Umschaltwahrscheinlichkeit berechnet. Diese Umschaltwahrscheinlichkeit pro Zelle und Generation wird als Switchfrequenz bezeichnet. Dieser Wert gibt an, wie häufig sich die Phasenvariation von ON zu OFF, ausgehend von einer einzelnen Zelle pro Generation, vollzieht.

Tabelle 12 **Switchfrequenz des *fimA*-Promotors.** Durch Ausplattieren eines *E. coli* Stammes mit *fimA*⁻-*lacZ*-Fusion auf X-Gal-haltigem Agar wurde die Switchfrequenz durch Auszählen der Zellen im ON- bzw. OFF-Zustand ermittelt. Untersucht wurden ein *E. coli* Wildtyp (IMW339) und eine *lrhA*-Mutante (IMW340).

Stamm (<i>fimA</i> ⁻ - <i>lacZ</i>)		Switchfrequenz ON zu OFF
IMW339	wt	9,49 x 10 ⁻²
IMW340	<i>lrhA</i> ⁻	5,17 x 10 ⁻⁴

Für die *lrhA*-Mutante ergaben sich Frequenzen von ON zu OFF, die um zwei Zehnerpotenzen höher lagen als beim Wildtyp (Tab. 12). Dies bedeutet, dass LrhA die Umschaltung des Promotors von ON zu OFF fördert und damit die Expression von *fimA* bzw. die Synthese der Fimbrien hemmt. Diese Befunde stehen im Einklang mit dem in Abb. 14 gezeigten Modell.

4.3.5 Biofilmbildung

Der Begriff Biofilm wird verwendet, um matrixumschlossene Bakterienpopulationen zu beschreiben, die aneinander und an Oberflächen adhären (Costerton et al., 1995). Biofilme können einige hundert µm tief werden und es ist schwierig, die Bakterien innerhalb des Biofilms mit Antibiotika anzugreifen. Biofilme können eine oder mehrere Spezies enthalten. *E. coli* ist neben vielen anderen Organismen ebenfalls in der Lage, Biofilme zu bilden.

Biofilmbildung beginnt mit dem Übergang des Bakteriums von Einzelzellwachstum zu einer gemeinschaftlichen Lebensweise, bei der sich die Mikroorganismen an biotische oder abiotische Oberflächen anheften. Um die Oberflächenabstoßung zu überwinden, müssen die Zellen beweglich sein. Dies geschieht mit Hilfe von Flagellen. Für die initiale Anheftung werden in *E. coli* Typ 1 Fimbrien benötigt. Diese Reaktion kann durch Zugabe von Mannose inhibiert werden. Für die weitere Ausdehnung des Biofilms sind wiederum Flagellen notwendig (Pratt und Kolter, 1998) (Abb. 16).

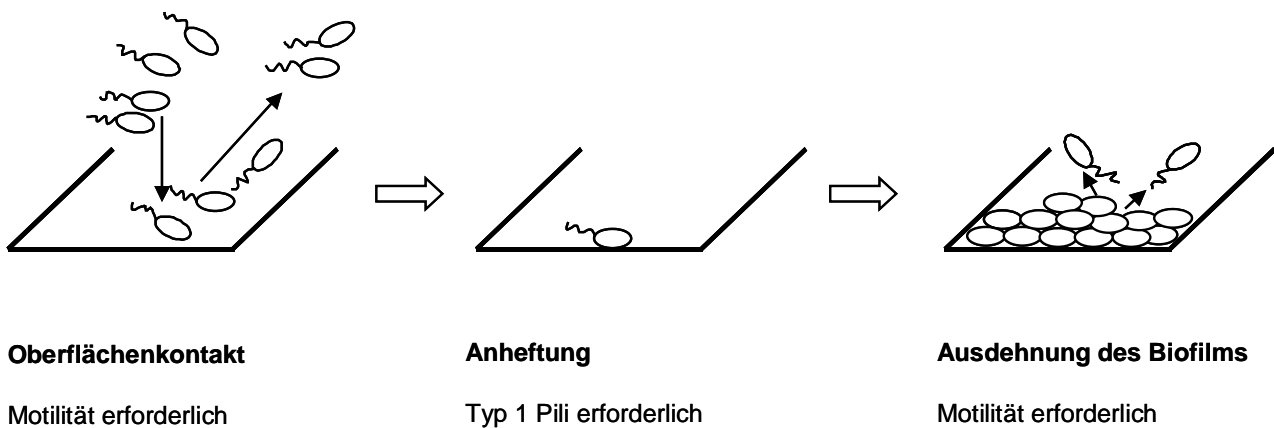


Abb. 16 Modell der Initiation der Biofilmbildung. Abbildung nach Pratt und Kolter, 1998.

Die Expression der für die Biofilmbildung wichtigen Gene (z.B. *flhDC*, *fliC*, *motAB*, *fimA*, *fimH*) steht unter der Kontrolle von LrhA. Somit sollte die Ausbildung eines Biofilms durch LrhA verändert werden können. Der Test auf Biofilmbildung wurde in Mikrotiterplatten aus Polystyrol durchgeführt. Getestet wurden ein *E. coli* Wildtyp (MG1655), eine *lrhA*-Mutante (IMW325), ein *lrhA*-Überexpressionsstamm (IMW325 pMW213) und ein *fim*-negativer Stamm (AAEC185). Nach 24 Stunden Wachstum bei Raumtemperatur in Vollmedium wurden die Zellen durch Zugabe von Kristallviolett angefärbt. Dieser Farbstoff färbte nur die Zellen, die Oberfläche der Mikrotiterplatten blieb ungefärbt. Beim Stamm AAEC185 war keine Färbung der Mikrotiterplatten festzustellen. Diesem Stamm fehlen die zur Biofilmbildung notwendigen *fim*-Gene. Folglich kam es zu keiner Ausbildung eines Biofilms. Der Wildtyp, die *lrhA*-Mutante und der *lrhA*-Überexpressionsstamm zeigten dagegen einen deutlichen Biofilm an der Polystyrol-Oberfläche. Die Intensität dieser Biofilme zeigte kaum Unterschiede im Vergleich der Stämme untereinander. Dies lag möglicherweise daran, dass Polystyrol eine stark hydrophile Oberfläche aufweist und eine starke Biofilmbildung auslöst. Die Experimente sollten mit dem stärker hydrophoben Material PVC (Polyvinylchlorid) wiederholt werden, das sich für Untersuchungen der Biofilmbildung von *E. coli* besser eignet (O'Toole und Kolter, 1998).

4.4 DNA-Microarray-Analyse virulenter Gene aus dem uropathogenen Stamm

E. coli 536

LrhA reguliert die Expression der Typ 1 Pili. Diese Fimbrien sind in *E. coli* K12-Stämmen zu finden und stellen als Adhäsine einen Virulenzfaktor dar. HexA ist in *Erwinia carotovora* ebenfalls an der Regulation von Virulenzfaktoren (in Form von Exoenzymen) beteiligt. Neben den Typ 1 Fimbrien kommen in uropathogenen *E. coli* Stämmen weitere Virulenzfaktoren wie Toxine, O-Antigene und weitere Adhäsine vor. Diese sind auf Pathogenitätsinseln lokalisiert (Hacker und Kaper, 2000). Die Ähnlichkeit mit HexA legt nahe, dass auch LrhA auf die Expression anderer Pathogenitätsfaktoren Einfluss nehmen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde eine *lrhA*-Mutante des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 konstruiert (IMW330). Diese Geninaktivierung erfolgte durch homologe Rekombination zwischen dem bakteriellen Chromosom und dem Suizidvektor pCVD442.

Die mRNA-Spiegel eines uropathogenen *E. coli* Stammes mit intaktem bzw. fehlendem *lrhA*-Gen wurden verglichen. Dies geschah ähnlich wie bei den DNA-Microarrayexperimenten mit fluoreszenzmarkierter DNA. Die DNA für Gene von Pathogenitätsfaktoren wurde auf Nylonmembranen gespottet und mit cDNA des Wildtyps und der *lrhA*-Mutante hybridisiert. Diese cDNA wurde zuvor von der aus *lrhA*-Wildtyp und -Mutante isolierten mRNA überschrieben und dabei mit [³³P]-dATP radioaktiv markiert. Der Unterschied zu den vorherigen DNA-Microarrayexperimenten liegt darin, dass die zwei unterschiedlichen Proben nicht gleichzeitig auf einen Chip, sondern auf zwei verschiedene Membranen hybridisiert wurden. Die Tests wurden in vier unabhängigen Vergleichsexperimenten durchgeführt. Eine Auswahl der untersuchten Gene ist in Tabelle 13 aufgelistet. Die Virulenzfaktoren lassen sich in mehrere Gruppen einteilen. Für die hier durchgeführten Experimente sind die wichtigsten die Adhäsine und Toxine. Adhäsine lassen sich in fimbrielle und nicht-fimbrielle Adhäsine gliedern. Zu den ersten zählen z.B. P- und S-Fimbrien, die meistens als Kohlenhydrat-Bindeproteine agieren. α -Hämolysin ist ein Toxin und greift die Zellmembran der Wirtszelle an. Es ist in der Lage, Poren zu bilden, was zu einem Anschwellen und zur Lyse der Zelle führt (Lengeler et al., 1999).

Insgesamt enthielt der Pathoarray 475 virulente Gene (für *E. coli* und *Shigella*). Die Expression keines dieser Gene wurde jedoch von LrhA reguliert. Im Vergleich von Wildtyp (*E. coli* 536) zu *lrhA*-Mutante (IMW330) tauchten keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Spiegel auf (Tab. 13).

Tabelle 13 Auflistung einiger im uropathogenen Stamm von *E. coli* untersuchten Virulenzgenen und deren relative mRNA-Menge in einem Wildtyp (*E. coli* 536) im Vergleich zu einer *lrhA*-Mutante (IMW330).
 — Adhäsine — Toxine — O-Antigene

Gen	Virulenzfaktor	Pathoarray Faktor Wt vs. <i>lrhA</i> ⁻
<i>pap/prs</i>	Pap Fimbrien (P-Fimbrien)	1.2
<i>sfa</i>	S-Fimbrien	0.8
<i>foc</i>	FIC-Fimbrien	0.9
<i>afa</i>	Afimbrielles Adhäsın	1.2
<i>nfa</i>	Nicht fimbrielles Adhäsın	1.0
<i>hly A</i>	α - Hämolyisin	1.1
<i>cnf1 bzw. 2</i>	Cytotoxic-necrotic-Faktor 1 bzw. 2	1.0
<i>kps</i>	Kapsel	1.1
<i>ure</i>	Urease	1.0

Lediglich einige Gene mit unbekannter Funktion zeigten eine Änderung der Expression, die jedoch stets gering war (Faktor 2 im Vergleich von Wildtyp zu Mutante). *LrhA* reguliert demnach unter den getesteten Bedingungen keinen der bekannten Virulenzfaktoren aus dem uropathogenen Stamm *E. coli* 536.

4.4.1 Phänotypische Tests der Virulenzfaktoren

Einige Virulenzfaktoren des uropathogenen Stammes *E. coli* 536 lassen sich mit phänotypischen Tests nachweisen. Mit diesen Tests wurden für *E. coli* 536 und die *lrhA*-Mutante IMW330 die Synthese und Aktivität dieser Virulenzfaktoren überprüft.

Lyse durch α -Hämolysin

Porenformende Toxine können die Lyse von roten Blutzellen hervorrufen und werden deshalb als Hämolysine bezeichnet (Lengeler et al, 1999). Der Test auf α -Hämolysin, das durch das Gen *hlyA* kodiert wird, wurde auf Schafsblutagar durchgeführt. Die *lrhA*-Mutante IMW330 und *E. coli* 536 wurden auf diesen Agarplatten ausgestrichen und inkubiert. Bei beiden Ansätzen fand eine Lyse der Blutzellen statt. Dies drückte sich als heller Lysehof um die Kolonien aus. Man konnte keinen Unterschied hinsichtlich der Lyse feststellen. Als Negativkontrolle wurde der *E. coli* K12-Stamm MG1655 verwendet, der keine Lyse der Erythrozyten auslöste. Die Expression von *hlyA* wird somit nicht von LrhA beeinflusst.

Hämagglutination von humanen Erythrozyten

P-Fimbrien (*pap*) sind α -Gal- β -1,4-Gal-bindende Adhärenzfaktoren (Hacker und Kaper, 2000). Sie können über eine Hämagglutinationsreaktion nachgewiesen werden. Um eine Abhängigkeit von LrhA zu überprüfen, wurden uropathogene *E. coli*-Zellen und defibriniertes Humanblut auf einem Objektträger gemischt. Nach Inkubation auf Eis konnte man eine Agglutination von Blutzellen beobachten. Die Hämagglutination bei *E. coli* 536 (Wt) und IMW330 (*lrhA*⁻) zeigte keinen Unterschied hinsichtlich der Verklumpungszeit und -stärke.

Hämagglutination von Rindererythrozyten

Mit der Hämagglutination der Rindererythrozyten lassen sich sogenannte S-Fimbrien nachweisen, die vom Gen *sfa* kodiert werden. Sie vermitteln die Adhärenz an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Wirtszellen (Hacker und Kaper, 2000). Diese Rezeptoren sind bei Erythrozyten von Rindern vorhanden. Defibriniertes Rinderblut wurde mit Zellen von *E. coli* 536 (wt) und IMW330 (*lrhA*⁻) auf einem Glasobjektträger auf Eis inkubiert. Nach einigen Minuten trat eine Verklumpungsreaktion bei beiden *E. coli*-Typen ein. Die Agglutination erfolgte in der gleichen Stärke und Geschwindigkeit, so dass man davon ausgehen konnte, dass die S-Fimbrienbildung unabhängig von LrhA ist.

Diese für die Virulenzfaktoren spezifischen phänotypischen Tests bestätigten die DNA-Microarray-Experimente, in denen die mRNA-Spiegel untersucht wurden (Tab. 14). LrhA hat somit lediglich eine Funktion bei der Kontrolle der Typ 1 Fimbrienadhäsine, die auch in K12-Stämmen zu finden sind. Andere Adhäsine und Pathogenitätsfaktoren aus dem uropathogenen Stamm *E. coli* 536 blieben unbeeinflusst von LrhA.

Tabelle 14 Zusammenfassung der phänotypischen Tests auf Abhängigkeit der Gene *pap/prs*, *hlyA* und *sfa* von LrhA.

Gen	Virulenzfaktor	Phänotypischer Test	Abhängigkeit von LrhA
<i>hlyA</i>	α -Hämolysin	Lyse von Schafserythrozyten (heller Lysehof auf Agarplatten)	kein Effekt
<i>pap/prs</i>	P-Fimbrien	Hämagglutinationsreaktion von humanen Erythrozyten	kein Effekt
<i>sfa</i>	S-Fimbrien	Hämagglutinationsreaktion von Rindererythrozyten	kein Effekt

4.5 Autoregulation der *lrhA*-Expression

Da die meisten der LysR-ähnlichen Regulatoren ihre eigene Transkription aktivieren oder reprimieren können, stellte sich die Frage, ob LrhA ebenfalls der Autoregulation unterworfen ist. Deshalb wurde die Expression von *lrhA* in An- und Abwesenheit von LrhA untersucht. Dies geschah durch Messungen der β -Galaktosidaseaktivität einer *lrhA*⁻-*lacZ*-Proteinfusion in einem *lrhA* positiven und negativen Hintergrund (Tab. 15). Die Expression von *lrhA*⁻-*lacZ* im Wildtyp Hintergrund war sehr gering (16 MU) und sank weiter um den Faktor 2 in einem *lrhA*⁻ Hintergrund (9 MU). Um die Konzentration an LrhA in der Zelle zu erhöhen, wurde ein Plasmid eingeführt, das das komplette *lrhA*-Gen trägt (pMW213). In diesem Stamm war die *lrhA*⁻-*lacZ*-Expression im Vergleich zur *lrhA*-Mutante um den Faktor 7,4 erhöht (67 MU). Dies bedeutet, dass LrhA die Expression seines Strukturgenes positiv autoreguliert.

Tabelle 15 Expression der *lrhA*'-*lacZ*-Proteinfusion im *lrhA* Wildtyp (IMW326a), *lrhA*⁻ Hintergrund (IMW327) und im *lrhA*-Überproduktionsstamm (IMW326b). Die Zucht der Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde aus drei oder mehr unabhängigen Experimenten ermittelt. ^a Wildtyp in Bezug auf *lrhA*; ^b LrhA Überproduktionsstamm

Fusion	Stamm Wildtyp / <i>lrhA</i> ⁻	β -Galaktosidase Aktivität [MU]		
		Wt	<i>lrhA</i> ⁻	Aktivierung durch LrhA (-fach)
<i>lrhA</i> '- <i>lacZ</i>	IMW326a ^a / IMW327	16 \pm 5	9 \pm 3	1.8
<i>lrhA</i> '- <i>lacZ</i>	IMW326b ^b / IMW327	67 \pm 10	9 \pm 3	7.4

Da es sich bei *lrhA* um ein weiteres LrhA-reguliertes Zielgen handelt, wurde auch hier die Bindung von LrhA in einem Gelretardationsexperiment untersucht (Abb. 17A). Der Einsatz von LrhA führte zu einer starken Retardierung der *lrhA*-Promotor-DNA. Bereits bei einer Konzentration von 10 nM LrhA trat ein Protein-DNA-Komplex auf. Der apparente K_D -Wert lag bei 20 nM LrhA, was darauf schließen lässt, dass LrhA mit hoher Affinität an den eigenen Promotor bindet.

Zur Charakterisierung der Bindestelle von LrhA wurde ein DNaseI-Footprint in gleicher Weise wie bei dem *flhDC*-Promotor durchgeführt. Nach Markierung eines 1018 bp langen Promotorfragmentes von *lrhA*, Inkubation mit gereinigtem Protein und gelelektrophoretischer Auftrennung trat in der Region von -194 bis -226 bp relativ zum Translationsstart von *lrhA* ein Bereich auf, der deutlich durch LrhA vor DNaseI-Verdau geschützt war (Abb. 17B). Außerdem befanden sich innerhalb dieser Bindestelle und bei Nucleotid -180 hypersensitive Stellen, die in Anwesenheit von LrhA eine erhöhte Sensitivität gegen DNaseI aufwiesen.

Das *lrhA*-Gen unterliegt also der positiven Transkriptionsregulation durch LrhA und stellt neben *flhDC* ein weiteres direktes Zielgen von LrhA dar.

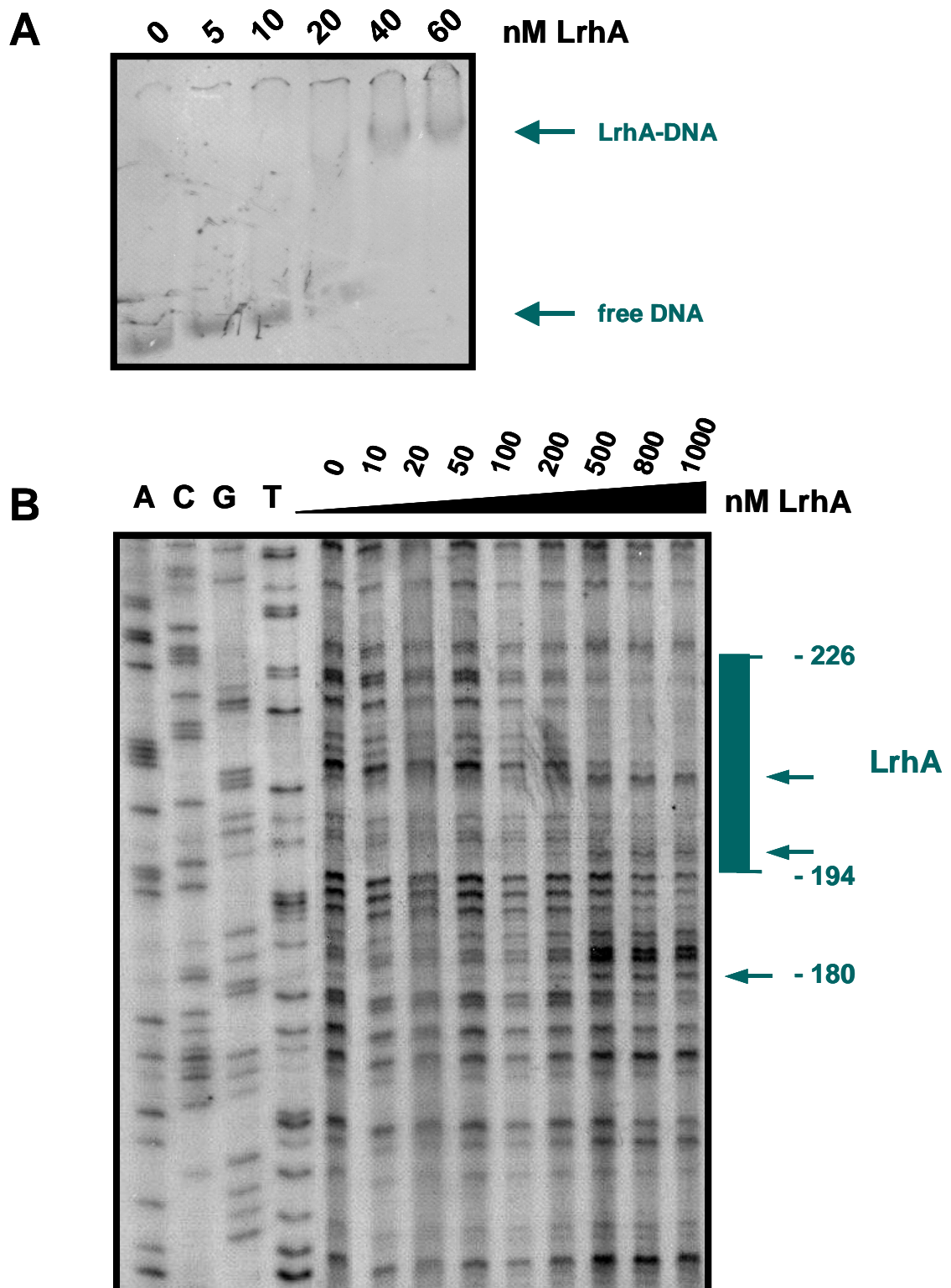


Abb. 17

Retardierung der *lrhA*-Promotor-DNA durch LrhA (A) und DNaseI-Footprint: Bindung von LrhA am *lrhA*-Promotor (B). Für die Gelretardation wurde das *lrhA*-Promotor-Fragment mit steigenden Konzentrationen an His₆-LrhA inkubiert. Die Bedingungen sind die gleichen wie bei Abb. 11. DNaseI Footprint wie bei Abb. 12 beschrieben durchgeführt. Der farbige Balken zeigt die durch LrhA geschützte Bindestelle. Die Pfeile deuten auf hypersensitive Nukleotide hin. Die Nummerierung bezieht sich auf den Translationsstartpunkt von *lrhA*.

4.6 Suche nach dem Effektor für LrhA

LysR-ähnliche Regulatoren sind in der Lage Effektoren zu binden. In den meisten Fällen scheinen diese Effektoren die Struktur des Protein-DNA-Komplexes und damit die Fähigkeit des Proteins, an die DNA zu binden, zu ändern. Dies drückt sich durch Veränderungen der DNaseI-Sensitivität oder der Mobilität des Komplexes im Polyacrylamidgel aus. In der Regel stellen diese Effektoren Zwischenprodukte aus den regulierten Stoffwechselwegen dar, d.h., die Bindung eines (Stoffwechsel-) Signals beeinflusst die Fähigkeit der Regulatoren, ihre Zielgene zu reprimieren oder zu aktivieren (Schell, 1993).

Es stellt sich damit die Frage, welche Metabolite oder Signale von LrhA erkannt werden bzw. welche Effektoren die Funktion von LrhA steuern. Der einzige Hinweis auf eine mögliche Rolle von LrhA bei der Regulation des Stoffwechsels war ein Wachstumsdefizit einer *lrhA*-Mutante auf Acetat. Dies könnte bedeuten, dass der Effektor von LrhA ein Intermediat des Acetatstoffwechsels ist.

Hier wurde jedoch gezeigt, dass die wichtigste Funktion von LrhA eine Repression der Fimbrien-, Flagellen- und Chemotaxisgene ist. Damit stellt sich die Frage, welche Bedingungen und welches Signal diese Regulation auslösen. Das *flhDC*-Regulon wird vielseitig reguliert. Zum Beispiel haben pH-Wert, Osmolarität, Glucose (bzw. cAMP/CRP), hohe Konzentrationen an Acetyl-Phosphat und hohe Temperaturen Einfluss auf die Flagellenausbildung (Soutourina et al., 1999; Wei et al., 2001; Prüß und Wolfe, 1994; Shin und Park, 1995; Shi et al., 1993). Die Expression der Typ 1 Pili wird durch anaerobes Wachstum, exponentielle Wachstumsphase und hohe Temperaturen begünstigt (Dove et al., 1997; Dorman und Bhriain, 1992; Gally et al., 1993). Für manche dieser Regulationen ist noch kein Regulator bekannt (z.B. pH-Wert, Temperatur und Anaerobiose). Vielleicht besteht ein Zusammenhang zwischen LrhA als Regulator und diesen regulatorischen Bedingungen. Die Effektoren der LrhA-homologen Regulatoren HexA und PecT sind bisher ebenfalls unbekannt. Bei PecT wird vermutet, dass ein solches Signal aus dem Pectinabbau kommen könnte, einem der Stoffwechselwege, der von PecT reguliert wird.

Die nächsten näheren Verwandten von LrhA sind die Regulatoren CbbR aus *Xanthobacter flavus* und *Ralstonia eutropha*. Der Effektor von CbbR aus *Ralstonia eutropha* ist Phosphoenolpyruvat. Deshalb wurden Phosphoenolpyruvat (PEP) und Metabolite, die dem PEP im Stoffwechsel nahe stehen, als Effektoren von LrhA getestet. Dazu wurde überprüft, ob die Effektoren die Mobilität der LrhA-DNA-Komplexe in der Gelretardation verändern, oder ob durch isotherme Kalorimetrie eine Bindung des Effektors an LrhA nachzuweisen ist.

Bei Bindung eines Effektors an LrhA ist eine veränderte Mobilität des DNA-LrhA-Komplexes mit *flhDC*-Promotor-DNA im Polyacrylamidgel zu erwarten. In Analogie zum LysR-Protein CbbR, dessen Effektor sich als Phosphoenolpyruvat erwies, wurden Phosphoenolpyruvat und Pyruvat eingesetzt. Des Weiteren wurden Acetyl-Phosphat, Acetyl-CoenzymA und CoenzymA getestet. Diese stehen in Verbindung mit dem Acetatstoffwechsel und könnten als Intermediärprodukte den Effektor für LrhA darstellen. Keine dieser Substanzen verursachte jedoch eine Änderung des LrhA-DNA-Komplexes im Vergleich zu der Mobilität des Komplexes ohne Testsubstanz (nicht gezeigt). Keiner der eingesetzten Metabolite hatte eine Auswirkung auf die Bindung von LrhA an die Promotor-DNA von *flhDC*.

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) wird dazu genutzt, um die Energetik biochemischer Reaktionen oder Wechselwirkungen (z.B. Bindung eines Liganden an ein Protein) zu messen. Jede chemische Reaktion ist mit der Aufnahme oder Abgabe von Wärme (freie Enthalpie ΔH der Reaktion) verbunden. Die Wärmeabgabe bzw. -aufnahme während einer Reaktion wird als Temperaturänderung gemessen. Bei kontinuierlicher Titration eines Reaktionspartners wird die Temperaturänderung als Thermogramm aufgezeichnet, aus dem man die Affinitätskonstante des Liganden und die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes ermitteln kann. Die Methode der ITC wurde angewendet, um die Bindung von Acetyl-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) an LrhA zu überprüfen. Dazu wurden die Substanzen in gewissen Zeitabständen in eine LrhA-Probe injiziert. Bei der Titration mit Acetyl-Phosphat wurde keine Änderung in der Temperatur festgestellt. Diese Testsubstanz bindet also nicht an LrhA und stellt somit keinen Effektor dar. Bei der Injektion von PEP wurde eine exotherme Reaktion beobachtet. Die im Versuch eingesetzte Konzentration an PEP sollte eigentlich zu einer Abnahme der Wärmeänderungen führen, da das Protein nach mehreren Injektionen mit PEP gesättigt sein sollte. Dies war bei LrhA nicht der Fall. Aufgrund dieser untypischen Messergebnisse, mit denen sich keine Affinität oder Stöchiometrie berechnen ließ, konnte die Wärmeänderung nicht eindeutig auf die Bindung von PEP an LrhA zurückgeführt werden.

Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die mit Hilfe der Gelretardationsexperimente und der Isothermen Titrationskalorimetrie getesteten Substanzen als Effektoren von LrhA dienen. Die Expression vieler Genregulatoren unterliegt der Kontrolle durch die Wachstumsphase. Dies ist auch für LrhA denkbar, da LrhA einen Einfluss auf den wachstumsphasenabhängigen Sigmafaktor RpoS ausübt (Gibson und Silhavy, 1999). Um dies zu überprüfen, wurde die

Expression von *lrhA* in einer *lrhA*-Mutante (IMW333) und einem Wildtyp (IMW332) während des Wachstums in M9-Minimalmedium mit Glycerin beobachtet. Die Mutante zeigte aufgrund der positiven Autoregulation weniger β -Galaktosidaseaktivität, d.h. eine schwächere Expression von *lrhA* als der Wildtyp (Abb. 18).

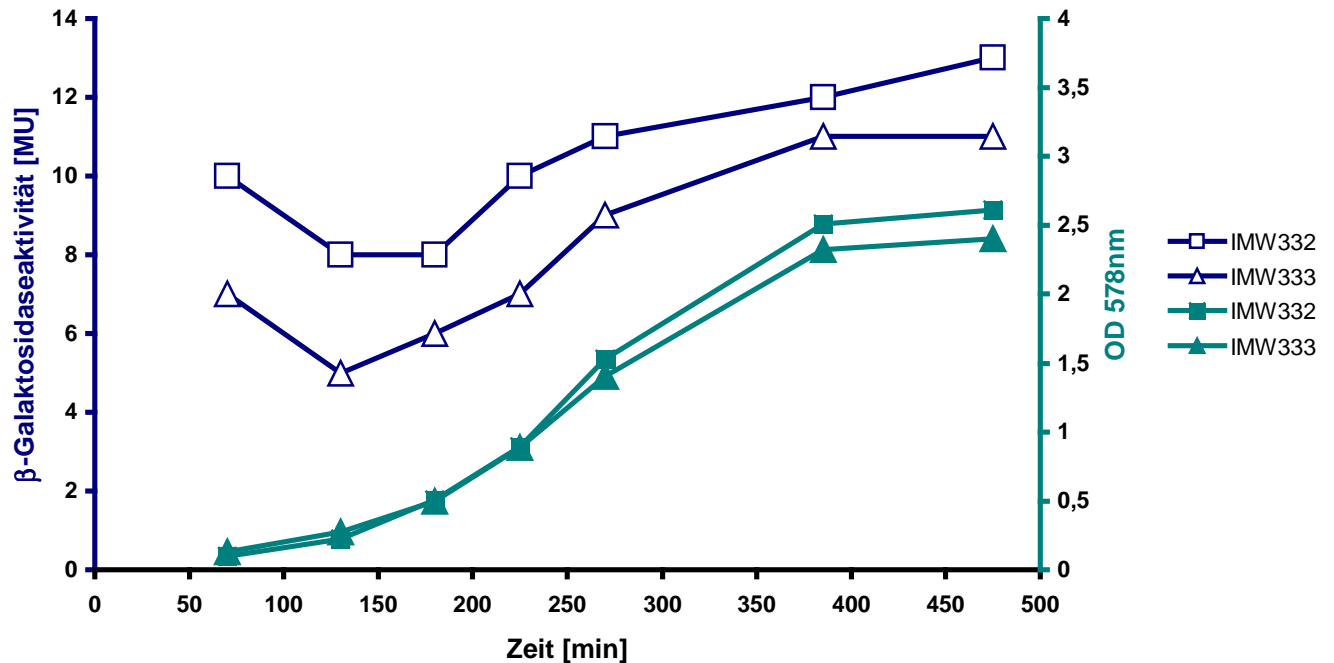


Abb. 18 Expression der *lrhA'*-*lacZ*-Fusion in Abhängigkeit der Wachstumsphase im Wildtyp (IMW332) und einer *lrhA*-Mutante (IMW333). Die Zucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin. IMW332 (■); IMW333 (▲)

Beim Wildtyp und der *lrhA*-Mutante wurde keine signifikante Änderung der Expression von *lrhA* über die Wachstumsphase festgestellt. Sollte LrhA die Wachstumsphase als Signal wahrnehmen, müsste aufgrund der Autoregulation von LrhA ein deutlicher Unterschied in der *lrhA*-Expression zwischen Wildtyp und der Mutante zu sehen sein. Dies war aber nicht der Fall. Man kann deshalb annehmen, dass LrhA nicht wachstumsphasenabhängig reguliert wird.

5 Diskussion

5.1 LrhA-regulierte Gene

Mit Hilfe der DNA-Genomanalysen, *lacZ*-Expressionsstudien und phänotypischen Tests konnten die Zielgene von LrhA identifiziert werden. LrhA hat somit Einfluss auf die Motilität, Chemotaxis, Flagellen- und Fimbriensynthese, und seine eigene Expression. Aus diesen von LrhA regulierten Bereichen stellen die Gene *flhDC*, *fimA*, *fimE* und *lrhA* direkte Ziele von LrhA dar. Dies konnte durch die DNA-Bindungsstudien gezeigt werden. Die Bindung war spezifisch und erfolgte bereits bei einer sehr niedrigen Konzentration an LrhA. Damit ist LrhA ein globaler Transkriptionsregulator.

5.2 Rolle von LrhA bei der Kontrolle der Motilität, Chemotaxis und Flagellensynthese

Hauptregulator der Motilitäts- und Chemotaxisgene ist FlhD₂C₂. Die von FlhD₂C₂ regulierten Gene (Bartlett et al., 1988; Liu et al., 1994; Prüß et al., 2001) sind im Wesentlichen die gleichen, die auch von LrhA reguliert werden (Tab. 4-6). Die *fim*-Gene werden dagegen nicht von FlhD₂C₂ reguliert. FlhD₂C₂ reguliert andererseits weitere Gene, die von LrhA unbeeinflusst sind. Dies sind Gene des Zucker- und anaeroben Elektronentransportes. FlhD₂C₂ ist der übergeordnete Regulator einer dreistufigen Hierarchie zur Kontrolle der Expression der Flagellen-, Motilitäts- und Chemotaxisgene in *E. coli* (Macnab, 1996; Chilcott und Hughes, 2000; Kalir et al., 2001). An oberster Stelle der Hierarchie stehen die *flhDC*-Gene, die für FlhD₂C₂ kodieren (Klasse I). FlhD₂C₂ erkennt die Promotoren der Gene der zweiten Stufe (Klasse II) und reguliert deren Expression (Liu und Matsumura, 1994). Die Gene dieser Klasse kodieren für die Proteine des Basalkörpers und des Hakens der Flagellen und für den Sigmafaktor FliA. Dieser wird für die Transkription einiger der Klasse II-Gene und aller Gene der Klasse III benötigt. Die Gene der dritten Stufe werden für die Zusammenlagerung des Flagellenfilaments, für die Motoraktivität und für die Chemotaxis gebraucht. Des Weiteren liegt hier der Anti-Sigmafaktor FlgM kodiert. FlgM akkumuliert nach der Vervollständigung der Flagelle und inhibiert die Aktivität von FliA (Hughes et al., 1993).

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge beeinflusst LrhA die Expression von *flhDC* und kontrolliert diese Hierarchie somit an oberster Stelle (Abb. 19). In Übereinstimmung damit stehen auch die *lacZ*-Expressionsstudien in einem *flhDC* negativen Hintergrund: hier wurden die Gene des FlhD₂C₂-Operons nicht mehr durch LrhA reguliert.

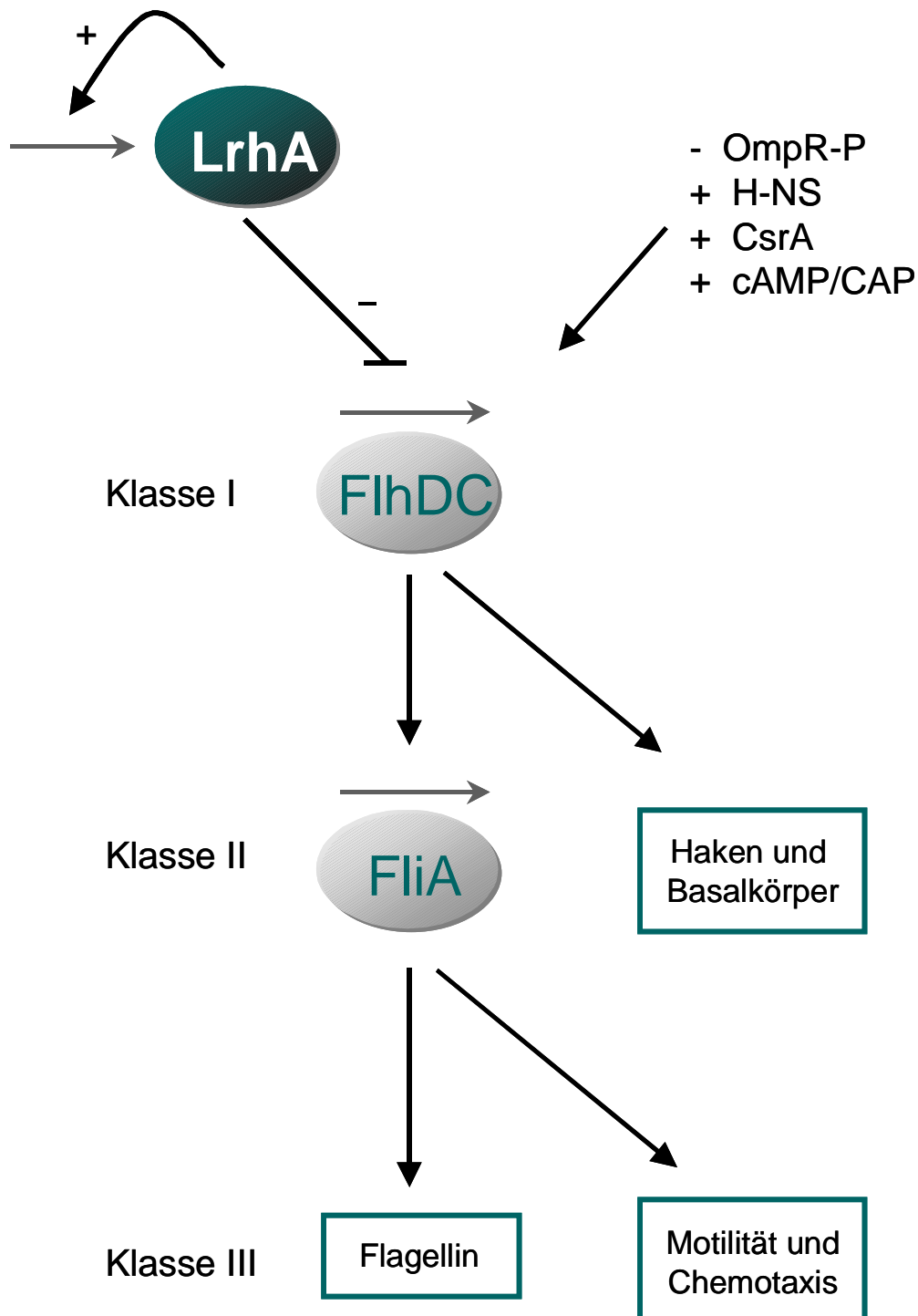


Abb. 19 Kontrolle der Synthese und der Konzentration des übergeordneten Regulators $FlhD_2C_2$ der Flagellensynthese in *E. coli* durch LrhA und andere Regulatoren. Gezeigt sind Regulatoren, die die *flhDC*-Expression durch Kontrolle der *flhDC*-Transkription (LrhA, OmpR-P, H-NS, cAMP/CAP) oder der mRNA-Stabilität und Translation (CsrA) positiv (+) oder negativ (-) beeinflussen. Zusätzlich ist die Autoregulation von *lrhA* gezeigt.

Außerdem nehmen die Faktoren der Regulation von LrhA mit abnehmender Hierarchie zu. So sind die Repressionsfaktoren auf der ersten Ebene (*flhDC*) niedrig (ungefähr 3), bei Klasse II etwas höher (z.B. *flgB*, *fliA* mit Faktor 8 bzw. 13) und sind am höchsten bei Klasse III-Genen (z.B. *fliC* mit Faktor 55) (Tabelle 8). Der Effekt von LrhA auf die Expression dieser Gene wird also mit abnehmender Hierarchie verstärkt. Der Einfluss auf die Expression der Gene des FlhD₂C₂-Regulons wird somit nur durch die Expressionskontrolle des *flhDC*-Operons durch LrhA bewirkt. Alle anderen Gene des FlhD₂C₂-Operons werden nur indirekt durch LrhA reguliert. Deshalb bindet LrhA auch nur an den Promotor von *flhDC*, nicht aber an die Promotoren der Gene der Klasse II oder III.

Die Motilität und Chemotaxis in *E. coli* wird durch eine Vielzahl an Umweltbedingungen und globalen Regulatoren gesteuert. Angriffspunkt für diese Umweltsignale ist fast immer der Hauptregulator FlhD₂C₂. Dies bedeutet, dass FlhD₂C₂ bei der Regulation der Chemotaxis und der Motilität die zentrale Rolle spielt. Faktoren, die für die vollständige Expression von *flhDC* und somit der Motilität nötig sind, schließen zyklisches AMP und das cAMP-Rezeptor-Protein (CAP) (Kutsukake, 1997; Soutourina et al., 1999), das Csr-Protein (carbon storage regulator) (Wei et al., 2001), das Nucleoid-strukturierende Protein H-NS (Bertin et al., 1994; Ko und Park, 2000), die Hitzeschockproteine DnaK, DnaJ und GrpE (Shi et al., 1992), die Regulatoren Pss und Psd der Phosphatidylethanolamin-Synthese (Shi et al., 1993) und anorganisches Phosphat (Rashid et al., 2000) ein. Im Gegensatz dazu wird die *flhDC*-Expression durch hohe Konzentrationen an Acetylphosphat inhibiert (Prüß und Wolfe, 1994). Hohe Osmolarität, die über die phosphorylierte Form von OmpR (Shin und Park, 1995) vermittelt wird, hemmt ebenfalls die Motilität über *flhDC*. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist LrhA ein weiterer bedeutender Regulator in diesem regulatorischen Netzwerk und steuert ebenfalls die Expression von *flhDC*.

Durch Motilitäts- und Chemotaxisversuche wurde die wichtige Rolle von LrhA *in vivo* bestätigt. Die *lrhA*-Mutanten von *E. coli* wiesen ein deutlich verbessertes Schwimmverhalten als der *lrhA*-Wildtyp auf. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten ebenfalls eine Zunahme der Begeißelung in *lrhA*-Mutanten, auch wenn bei diesen Versuchen nur relativ wenige Flagellen zu beobachten waren. Möglicherweise war die Präparation der *E. coli*-Zellen zu unempfindlich, so dass die Mehrzahl der Flagellen vom Zellkörper abfielen. So lässt sich das unterschiedliche Schwimmverhalten wohl vor allem auf eine vermehrte Anzahl von Flagellen in einer *lrhA*-Mutante zurückführen. Um genaueres über die morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und *lrhA*-Mutante sagen zu können, sollten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht werden. Bei dieser Methode (Turner et al.,

2000) werden die Zellen und die Flagellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Man kann anschließend die Anzahl und Länge der fluoreszenzmarkierten Flagellen im Fluoreszenzmikroskop betrachten. Weiterhin ist es möglich, Aussagen über die Flagellenbewegung und Schwimgeschwindigkeit der Bakterien zu treffen. Eine weitere Methode zur Quantifizierung der Flagellen wäre die Markierung mit Antikörpern.

Wie bereits erwähnt, zeigen LrhA und der Regulator FlhD₂C₂ unterschiedliche Zielgene. Bei DNA-Microarrayexperimenten mit einer *flhDC*-Mutante tauchten FlhD₂C₂-regulierte Gene auf, die aber nicht von LrhA beeinflusst waren. Dies waren Gene aus dem Zuckertransport oder Elektronentransport, z.B. *mglABC* (Galaktose-Transport) oder *dmsABC* (DMSO-Reduktase) (Prüß et al., 2001). Da LrhA die Expression von *flhDC* reguliert, sollten diese Gene auch als Zielgene von LrhA zu finden sein. Die fehlende Regulation dieser Gene durch LrhA, lässt sich nicht leicht erklären. *LacZ*-Expressionsmessungen zeigten aber, dass sich die Regulation dieser Gene von der üblichen Regulation durch FlhD₂C₂ unterscheidet und nur von FlhD abhängt. Dieser Unterschied wurde mit den DNA-Microarrayexperimenten mit der *flhDC*-Mutante nicht deutlich (Prüß et al., 2001). Wegen dieser Diskrepanz sollte der Einfluss von LrhA und FlhD₂C₂ auf die Expression der Gene des Zucker- und des anaeroben Elektronentransportes noch genauer überprüft werden.

5.3 Rolle von LrhA bei der Kontrolle der Typ 1 Fimbrien- Synthese

Neben den Flagellen kann LrhA die Synthese einer weiteren wichtigen Komponente der Zelloberfläche regulieren, die Typ 1 Fimbrien. *In vivo* wurde durch Hefeagglutination nachgewiesen, dass LrhA die Fimbriengene reprimiert. Die *lrhA*-Mutante verursachte eine verstärkte Agglutination, die durch Zugabe von Mannose wieder aufgehoben werden konnte. Da die Fimbrien des Typs 1 an mannosehaltige Strukturen binden, war dies ein eindeutiger Beweis, dass die Verklumpungsreaktion wirklich auf Typ 1 Fimbrien zurückzuführen ist. Die Expression der Fimbrien wird über den Mechanismus der Phasenvariation reguliert. Die Phasenvariation wird über die Inversion einer 314 bp DNA-Sequenz reguliert, die den Promotor von *fimA* enthält.

FimA kodiert für die Hauptuntereinheit der Fimbrien, das Fimbrin. Zwei zu *fimA* benachbarte Gene, *fimB* und *fimE*, kodieren für Proteine, die Sequenzähnlichkeiten mit Rekombinasen, wie z.B. der λ -spezifischen Integrase, zeigen (Abb. 20). FimE kann durch Bindung an die DNA die Inversion des DNA-Fragmentes von ON- in die OFF-Orientierung fördern, das heißt, dass der Promotor von *fimA* nicht mehr abgelesen werden kann. FimB hingegen fördert

die Rekombination in beide Richtungen, kann also An- und Ausschalten des Promotors gleichzeitig bewerkstelligen.

Die Expression der Typ 1 Fimbrien wird von mindestens vier globalen Regulatoren kontrolliert, IHF (Integration Host Factor), H-NS, RpoS und Lrp (Leucine responsive regulatory protein).

Das IHF-Protein ist für viele Prozesse der DNA notwendig, für die eine Sekundärstruktur oder DNA-Schleifen ausgebildet werden müssen. Dies gilt besonders auch für Rekombinationsprozesse, die die Grundlage der Inversion des *fimA*-Promotors darstellen. Die Rekombination vor *fimA* umfasst ähnliche Prozesse wie bei der Integration und Excision des Phagen λ , bei denen IHF entscheidend beteiligt ist. Das histonähnliche Protein H-NS scheint die *fimA*-Phasenvariation zu reprimieren. Dagegen stimuliert die Bindung von Lrp an drei spezifische Stellen des Promotors die Inversion des *fim*-Promotorelementes in beiden Richtungen (Low et al., 1996; Dove et al., 1997) (Abb. 20).

Die Expression von *fimA* wird durch die Wachstumsphase reguliert. In der exponentiellen Phase kommt es zu einem starken Anstieg der Expression und in der stationären Wachstumsphase wird die Expression von *fimA* reprimiert. Diese Repression wird indirekt durch den alternativen Sigmafaktor RpoS erreicht, der vermutlich einen unbekanntem Repressor aktiviert (Dove et al., 1997). Ein niedriger pH-Wert und hohe Osmolarität haben ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation der Fimbriengene. Bei diesen Umweltbedingungen wird das Umschalten des Promotors von ON nach OFF gefördert (Schwan et al., 2002).

Die mit Hilfe der *lacZ*-Messungen ermittelten Werte für die Expression von *fimA* im Wildtyp und in der *lrhA*-Mutante waren teilweise widersprüchlich zu den Ergebnissen der DNA-Microarrayanalyse. Wegen der hohen Umschaltfrequenz des *fimA*-Promotors ließ sich die *fimA*-Expression nicht eindeutig ermitteln. Bei Zucht einer Kultur kann es innerhalb einer Population sehr schnell zum An- und Ausschalten des Promotors kommen. Dadurch lassen sich keine aussagekräftigen Ergebnisse ermitteln.

Die Expression von *fimE* wird durch LrhA positiv beeinflusst, was im Gegensatz zu den ermittelten mRNA-Spiegel im DNA-Microarray stand. Betrachtet man aber die Tests zur Hefeagglutination und zur Switchfrequenz von *fimA*, kommt man zu dem Ergebnis, dass LrhA die Expression der Fimbrien reprimiert. In dieses Bild passt auch die Aktivierung von *fimE*, da FimE die Expression von *fimA* wegen der Rekombination und Einstellung des Phase-OFF-Zustandes negativ beeinflusst. Dies führt dann zur Hemmung der Fimbrienausbildung (Abb. 20).

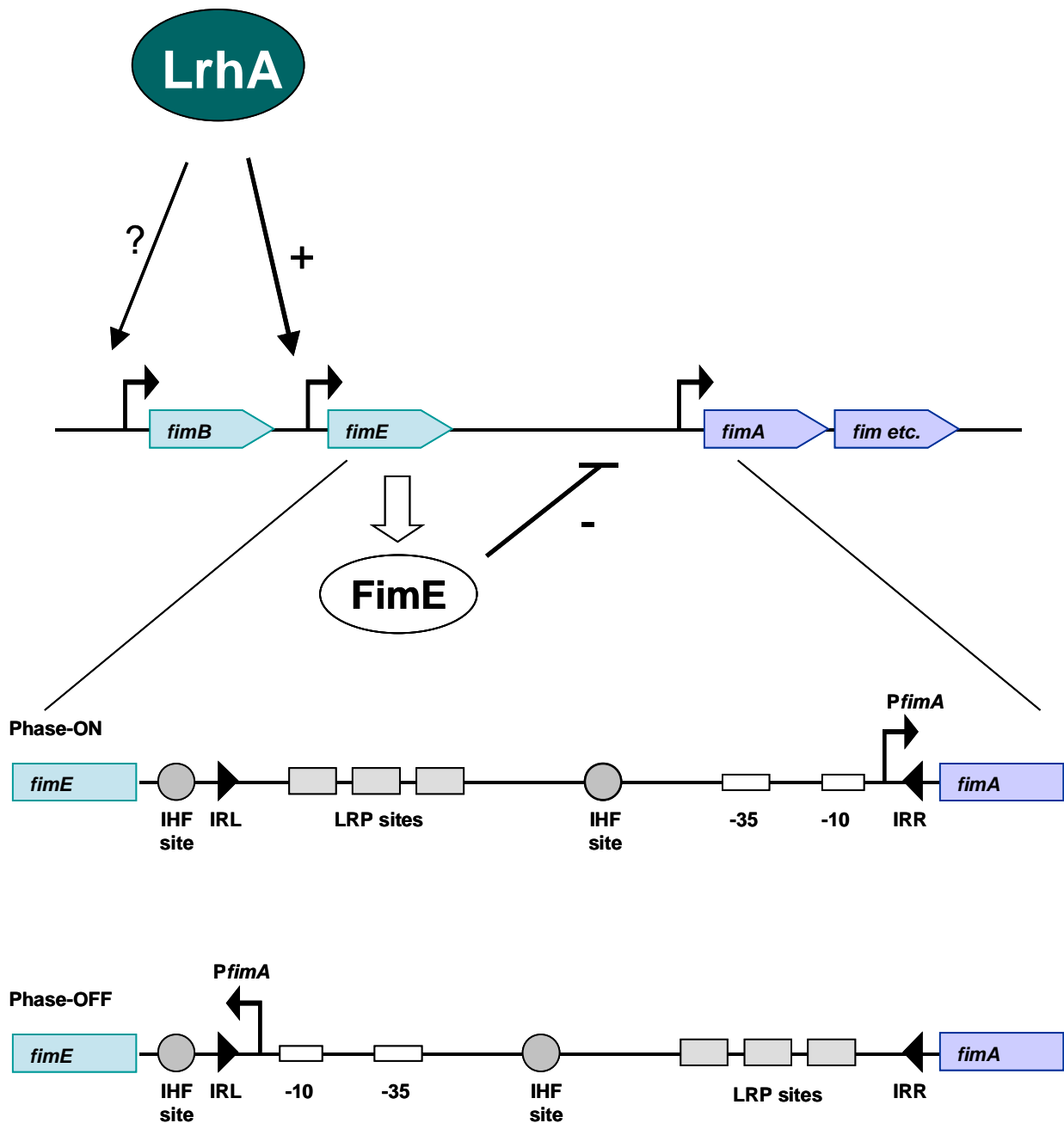


Abb. 20 *fim*-Operon mit Bindestellen für IHF und Lrp am Promotorbereich von *fimA*. Gezeigt ist der Einfluss auf die Promotoren der Gene des *fim*-Operons: + Aktivierung; - Hemmung. Liegt das invertierbare DNA-Element vor *fimA* im Phase ON Zustand vor, kann der Promotor abgelesen werden. Bei Phase OFF liegt der Promotor in umgekehrter Orientierung.

Die regulatorische Funktion von LrhA bestätigte sich auch durch die DNA-Bindungsexperimente. Die Gene *fimE* und *fimA* scheinen direkt durch LrhA kontrolliert zu werden, da LrhA in der Lage war an die jeweiligen Promotoren zu binden. Bei den Messungen der *fimA2'::lacZ*-Fusion, bei der der Promotorbereich nicht mehr invertierbar ist, zeigte sich keine Abhängigkeit von LrhA. Da aber LrhA an den Promotor binden kann, ist es möglich, dass die Bindung von LrhA eine andere Funktion hat und nicht direkt die Expression von *fimA* kontrolliert. So könnte LrhA das Umschalten des invertierbaren Promotorelementes direkt beeinflussen. Eine ähnliche Rolle wird auch für den Regulator Lrp angenommen. Durch die Bindung von Lrp am Promotor von *fimA* wird die Switchfrequenz entscheidend beeinflusst (Roesch und Blomfield, 1998).

5.4 Autoregulation von *lrhA*

Die Expression von *lrhA* ist der positiven Autoregulation unterworfen. LrhA aktiviert somit die Expression des eigenen Strukturgens. Dies zeigte sich deutlich durch die Messungen der *lrhA'::lacZ*-Fusion in einem Wildtyp, einer *lrhA*-Mutante und einem *lrhA*-Überexpressionsstamm (Tab. 15). Für die meisten Regulatoren der LysR-Familie ist eine negative Autoregulation bekannt. So reprimieren die Regulatoren der CO₂-Fixierung (CbbR) oder der Glutamat-Synthese (GltC) ihre eigene Expression. Die LrhA-ähnlichen Proteine HexA und PecT dagegen führen wie LrhA eine positive Autoregulation durch. Diese Regulation wurde *in vitro* durch die Fähigkeit von LrhA, an den eigenen Promotor zu binden, bestätigt. Auch hier lag, wie bei Bindung an den Promotorbereich von *flhDC*, die Konzentration zur halbmaximalen Bindung sehr niedrig. Dies deutet auf eine spezifische Bindung hin.

Durch die positive Autoregulation aktiviert LrhA seine eigene Transkription. Dies hat eine Verstärkung der Regulation durch LrhA zur Folge. Es ist denkbar, dass LrhA ein spezifisches Signalmolekül erkennt und darauf seine eigene Expression stimuliert. Die Folge wäre eine schnellere Übertragung des Signals und damit eine schnellere und effektivere Anpassung an die neue Umwelt- oder Stoffwechselsituation.

5.5 DNA-Bindestelle von LrhA

LysR-ähnliche Regulatoren binden im Allgemeinen direkt an die Promotorregion des regulierten Gens. Für die LysR-ähnlichen Regulatoren kann eine gemeinsame, schwach

konservierte Konsensus-Sequenz angegeben werden: 5'-CTGA-N₇-TCAG-3' (zu 100% konservierte Nukleotide sind unterstrichen) (Schell, 1993). Diese Sequenz ist meistens palindromisch. Die Guaninreste, die den konservierten Nukleotiden benachbart sind, sind wahrscheinlich direkt in die Bindung des Regulators involviert. Durch die Identifizierung der LrhA-Bindestelle an den Promotoren von *flhDC* und *lrhA* sind Sequenzen erkennbar, die einen solchen Konsensus darstellen könnten. Bei *flhDC* lautet die Sequenz 5'-ATGACTTATACAT-3' und bei *lrhA* 5'-ATAGATATGCGAT-3'. Sie zeigen eine schwache Übereinstimmung mit dem LysR-Konsensus, und die gemeinsame Sequenz lässt sich als AT-N₉-AT zusammenfassen. Bindestellen mit so geringer Ähnlichkeit zu dem allgemeinen Konsensus lassen sich auch bei den Regulatoren OxyR (Regulator des oxidativen Stresses), CysB (Regulator der Cysteinbiosynthese) und NahR (Regulator der Naphtalenbiosynthese) finden (Schell, 1993). Die Konsensussequenz ist sicher vorläufig, da sie nur aus zwei Sequenzen abgeleitet ist. Um den LrhA-Konsensus sicherer zu bestimmen, sollten auch die entsprechenden Sequenzen vor *fimA* und *fimE* mit Hilfe von DNaseI-Footprint genauer charakterisiert werden.

Die Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie binden im Allgemeinen an eine Region des Promotors, die ihre Konsensussequenz („Erkennungsstelle“) enthält. Diese Region liegt meistens in einem Bereich von -55 bis -75 vor dem Transkriptionsstart des regulierten Gens. Die Bindungsstelle von LrhA am Promotor von *flhDC* liegt jedoch im Bereich -89 bis -129. Durch Bindung eines Effektors an den LysR-homologen Regulator kommt es in vielen Fällen zu einer Erweiterung der Bindestelle. Der Regulator besetzt dann auf dem Promotor zusätzlich eine Aktivierungsstelle, die meist bei -35 bis -50 liegt. Es sind aber auch einige Regulatoren bekannt, die diese Bindestelle ohne Effektor besetzen (z.B. OxyR). Die Bindung des Regulators verursacht oft die Verbiegung der DNA, die zu einer verbesserten Protein-Protein-Wechselwirkung oder einer erhöhten Affinität der RNA-Polymerase führt. Diese veränderte DNA-Struktur kann an der Einführung von DNaseI-hypersensitiven Stellen erkannt werden.

Die zusätzliche Besetzung der Aktivierungsstelle durch LrhA konnte bisher weder am Promotor von *flhDC*, noch von *lrhA* beobachtet werden, was wohl auf das Fehlen eines Effektors zurückzuführen ist. Bei beiden Promotoren waren DNaseI-hypersensitive Nukleotide zu finden, die außerhalb der Bindestelle von LrhA lagen. Aussagen über die relative Lage des LrhA-Konsensus zum Transkriptionsstart von *lrhA* können nicht gemacht werden, da dieser unbekannt ist. Bezüglich der Lage des Promotors, der aus der Sequenz abgeleitet ist, würde die Bindestelle von LrhA bei -141 bis -173 liegen.

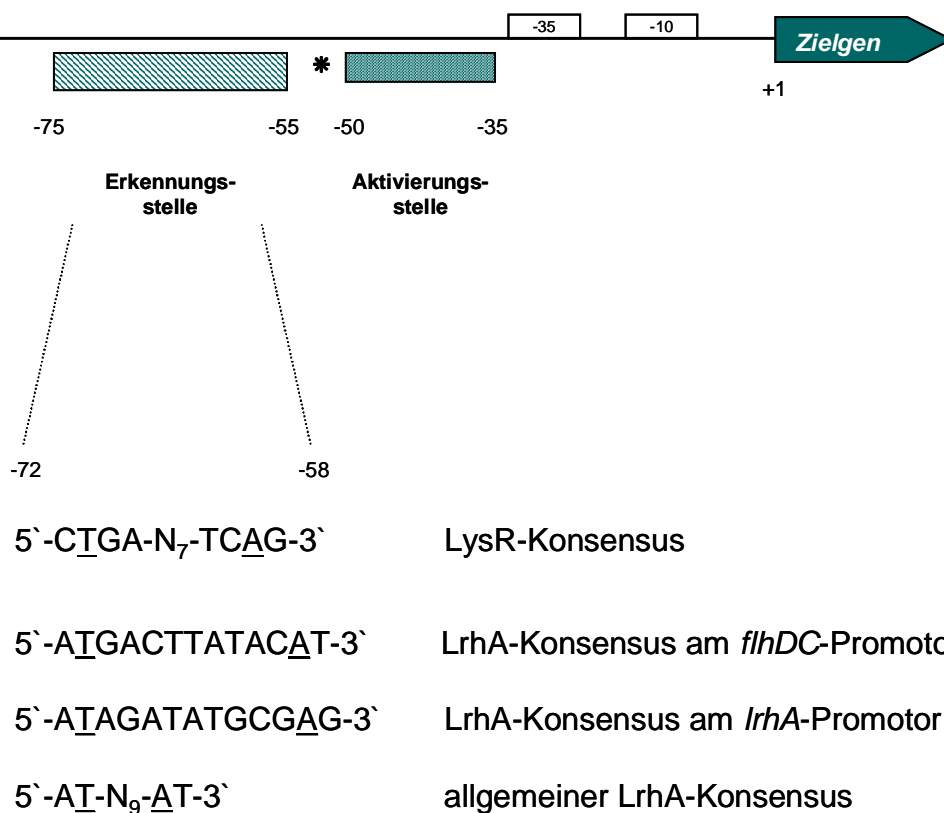


Abb. 21 Typische Binderegionen (Erkennungs- und Aktivierungsbereich) für einen LysR-ähnlichen Regulator am Promotorbereich des Zielgens. Die Konsensussequenz für LysR-ähnliche Proteine und im Vergleich dazu die Sequenzen für LrhA sind im unteren Teil der Abbildung gezeigt. Zu 100% konservierte Nukleotide sind unterstrichen. +1 markiert den Transkriptionsstart, -10 und -35 -Region sind in Boxen eingezeichnet, der Stern kennzeichnet eine mögliche durch Proteinbindung eingeführte hypersensitive Stelle (*).

Der *flhDC* Promotor enthält mehrere Bindestellen für regulatorische Proteine (Abb. 13). Diese beinhalten eine CAP-Bindestelle (Catabolit Aktivator Protein) zentriert um die Position -71,5, zwei OmpR-Bindestellen (Osmoregulation) an den Positionen -100 bis -163 und +1 bis +66 und multiple Bindestellen für das H-NS Protein von Position -178 bis in die kodierende Region von *flhDC* (Shin und Park, 1995; Soutourina et al., 1999). Die LrhA-Bindestelle an Position -89 bis -129 überlappt teilweise die weiter stromaufwärts liegende OmpR-Bindestelle. Die hypersensitiven Nukleotide liegen hingegen in der zweiten OmpR-Stelle, die weiter stromab zu finden ist.

5.6 Einfluss von LrhA auf Virulenzfaktoren

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von LrhA zu HexA und PecT aus den *Erwinia*-Stämmen war anzunehmen, dass LrhA an der Regulation weiterer Virulenzfaktoren neben den Typ 1 Fimbrien beteiligt ist. HexA und PecT regulieren die Expression von Motilitäts- und Virulenzgenen, sowie die Produktion von Exoproteinen, die ebenfalls als Virulenzfaktoren anzusehen sind. An der Regulation weiterer Virulenzfaktoren ist LrhA jedoch nicht beteiligt. Dies wurde aus der Untersuchung von Virulenzgenen in DNA-Microarrays und den phänotypischen Tests einiger ausgesuchter Pathogenitätsgene (*sfa*, *pap* und *hlyA*) ersichtlich. Keiner der bekannten Pathogenitätsfaktoren zeigte in der *lrhA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp veränderte mRNA-Spiegel. Lediglich einige Gene, deren Funktionen bisher unbekannt sind, schienen durch LrhA in geringem Maße beeinflusst zu werden. Des Weiteren waren Komponenten der Eisenaufnahmesysteme von LrhA abhängig. In den Macroarrayanalysen waren die mRNA-Gehalte der Gene *fec* und *fep* im Wildtyp im Vergleich zur *lrhA*-Mutante um Faktoren von 2-3 höher. Ähnliches wurde bereits mit den DNA-Microarrays für die gleichen Gene von *E. coli* beobachtet. Dies sollte in weiteren Untersuchungen, z.B. *lacZ*-Expressionsmessungen oder Messung der Eisenaufnahme mit Hilfe von Siderophoragar (Schwyn und Neilands, 1987) überprüft werden.

Im Allgemeinen kann man davon ausgehen, dass LrhA keine Bedeutung bei der Regulation der Virulenzfaktoren hat, die für den uropathogenen Stamm *E. coli* 536 spezifisch sind. LrhA scheint nur *E. coli* K12-spezifische Pathogenitätsfaktoren zu kontrollieren. Dies beinhaltet die Typ 1 Fimbrien und eventuell die Systeme zur Eisenaufnahme.

5.7 Kontrolle und Bedeutung der Funktion von LrhA

LysR-homologe Regulatoren aktivieren normalerweise die Transkription ihrer Zielpromotoren. Dazu ist meist ein kleines Signalmolekül, ein Koinduktor nötig, der mit dem regulierten Stoffwechsel in Verbindung steht. Ausnahmen sind die Regulatoren CatM (Catechol Katabolismus) oder IciA (Inhibierung der DNA-Replikation), die keinen Effektor zur Regulation benötigen. Außerdem gibt es viele Proteine aus der LysR-Familie, die die Expression ihrer Zielgene nicht aktivieren, sondern wie LrhA reprimieren (z.B. CysB oder OxyR) (Schell, 1993). Für die nächsten Verwandten von LrhA, HexA und PecT, sind die Effektoren wie auch für LrhA nicht bekannt. Bei CbbR aus *Xanthobacter flavus* und *Ralstonia eutropha* dienen NADPH und Phosphoenolpyruvat als Effektoren (Van Keulen et al., 1998; Grzeszik et al., 2000). Diese und ähnliche Substanzen wurden daraufhin überprüft, ob sie in Gelretentionsexperimenten die Ausbildung oder Art des LrhA-Promotor-Komplexes

verändern. Doch die Bindung von LrhA an den Promotor von *flhDC* wurde durch keine dieser Substanzen beeinflusst. Auch Zwischenprodukte aus dem Acetat-Stoffwechsel riefen keine veränderte Bindung von LrhA hervor, so dass diese Metabolite vermutlich keine Effektoren von LrhA darstellen.

Die Expression von *flhDC* wird durch viele Umweltbedingungen und Regulatoren kontrolliert. Hohe Konzentrationen an Acetyl-Phosphat und die Osmolarität wirken über den Osmoregulator OmpR auf die Transkription von *flhDC*. Das Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase wird über den Regulator Csr (carbon storage regulator) an *flhDC* weitergegeben. pH-Wert, hohe Temperaturen und anorganisches Phosphat sind weitere Bedingungen, die die Expression von *flhDC* beeinflussen. Regulatoren, die diese Umweltsituationen vermitteln, sind bisher nicht identifiziert.

Auch die Regulation der Fimbriengene des Typs 1 hängt von äußeren Bedingungen ab. In der exponentiellen Wachstumsphase wird die Fimbrienexpression indirekt über den alternativen Sigmafaktor RpoS reprimiert. Anaerobes Wachstum und hohe Temperaturen verstärken die Expression der Fimbrien. Die für diese Verstärkung verantwortlichen Regulatoren sind bisher unbekannt.

Diese durch unbekannte Regulatoren hervorgerufenen Veränderungen der Expression, sowohl der Flagellen- als auch der Fimbriengene, sind Ansatzpunkte für die Suche nach dem Signal oder Reiz, die durch LrhA erkannt werden. Vielleicht ist LrhA in der Lage, eine solche Stoffwechselsituation zu vermitteln. Falls dies zutrifft, sollten *lacZ*-Fusionen der LrhA-regulierten Gene (wie z.B. *flhDC*, *fimE* oder *lrhA*) bei hohen Temperaturen, Anaerobiose oder unterschiedlichen pH-Werten eine veränderte Expression zeigen.

LrhA ist außerdem an der Regulation der Stabilität des alternativen Sigmafaktors RpoS beteiligt (Gibson und Silhavy, 1999). RpoS reguliert die Expression vieler Genen, die den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase bewerkstelligen. Wegen des Zusammenhangs zwischen LrhA und der Wachstumsphase wurde die Expression von *lrhA* in Abhängigkeit des Wachstums untersucht. Da auch hier kein Effekt festgestellt wurde, konnten bisher weder ein Signal noch eine Umweltbedingung identifiziert werden, die als Effektoren von LrhA dienen.

5.8 Einfluss von LrhA auf die Biofilmbildung

Die Bildung eines Biofilms hängt von der Anwesenheit der Flagellen und der Typ 1 Fimbrien ab. Diese beiden Faktoren werden für die Initiation der Biofilmbildung benötigt (Pratt und Kolter, 1998). LrhA reguliert die Expression der Flagellengene und der Gene der Typ 1

Fimbrien. Somit könnte LrhA eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung übernehmen. Um die bakteriellen Elemente und genetischen Bedingungen zu identifizieren und zu charakterisieren, die für die Entwicklung eines Biofilms notwendig sind, wurde ein einfacher Test zum genetischen Screenen entwickelt. Dazu wird eine Mikrotiterplatte benötigt, in deren Kammern sich ein Biofilm ausbilden kann. Mit geeigneten Färbelösungen (z.B. Kristallviolett) werden die Biofilme sichtbar gemacht (O'Toole et al., 2000). Dieses Verfahren wurde angewendet, um die Abhängigkeit der Biofilmbildung von LrhA zu testen. Doch eine Beteiligung von LrhA an der Biofilmbildung konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Durch weitere Versuche in diese Richtung mit besser geeignetem Oberflächenmaterial für die Bildung eines Biofilms, wie z.B. PVC, sollte der Frage nach einem Einfluss von LrhA nachgegangen werden.

Die Biofilmbildung ist von vielen äußeren Bedingungen der Zelle abhängig. Das können verschiedenste Faktoren sein, wie Temperatur, Nahrungsangebot, Osmolarität, pH-Wert, Eisen- und Sauerstoffgehalt (O'Toole et al., 2000). Viele andere regulatorische Bedingungen sind noch unbekannt. LrhA könnte eine dieser Bedingungen detektieren, welches letztendlich über eine Aktivierung der Flagellen und Fimbrien die Biofilmbildung anregen würde. Ein geeignetes Signal könnte LrhA als Effektor dienen.

5.9 Beteiligung von LrhA am Quorum Sensing?

Quorum Sensing ist die Regulation der Genexpression in Antwort auf die Änderungen in der Zelldichte. Quorum Sensing-fähige Bakterien produzieren und entlassen chemische Signalmoleküle, die Autoinducer genannt werden. Die Konzentration an Autoinducern steigt mit zunehmender Zelldichte. Bei *Erwinia carotovora* wurde dieses Signal als N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton (OHL) identifiziert. HexA ist an der Regulation der Synthese des Quorum Sensing-Pheromons OHL beteiligt. Ein Teil der Strukturgene für den Biosyntheseweg sind als Homologe auch in *E. coli* zu finden (Abb. 22). An dieser Regulation ist auch RpoS beteiligt. HexA hat wie LrhA einen Einfluss auf die Stabilität des Sigmafaktors RpoS (Mukherjee et al., 2000).

HexA kontrolliert die Produktion von OHL und extrazellulärer Enzyme nach folgendem Schema (Abb. 22): Die regulatorische RNA *rsmB* aktiviert die Produktion des Quorum Sensing-Signals OHL. Dieses wird benötigt, um die Produktion der Exoenzyme zu aktivieren; HexA, RsmA und KdgR regulieren diese Produktion negativ. RsmA und die RNA von *rsmB* (repressor of stationary phase metabolites) gehören zu einem Regulationssystem, welches die

Exoproteinsynthese regulieren kann. KdgR reprimiert die Expression der Gene für den Pectinabbau, z.B. Gene für Pectinasen, Proteasen und Cellulasen (Mukherjee et al., 2000).

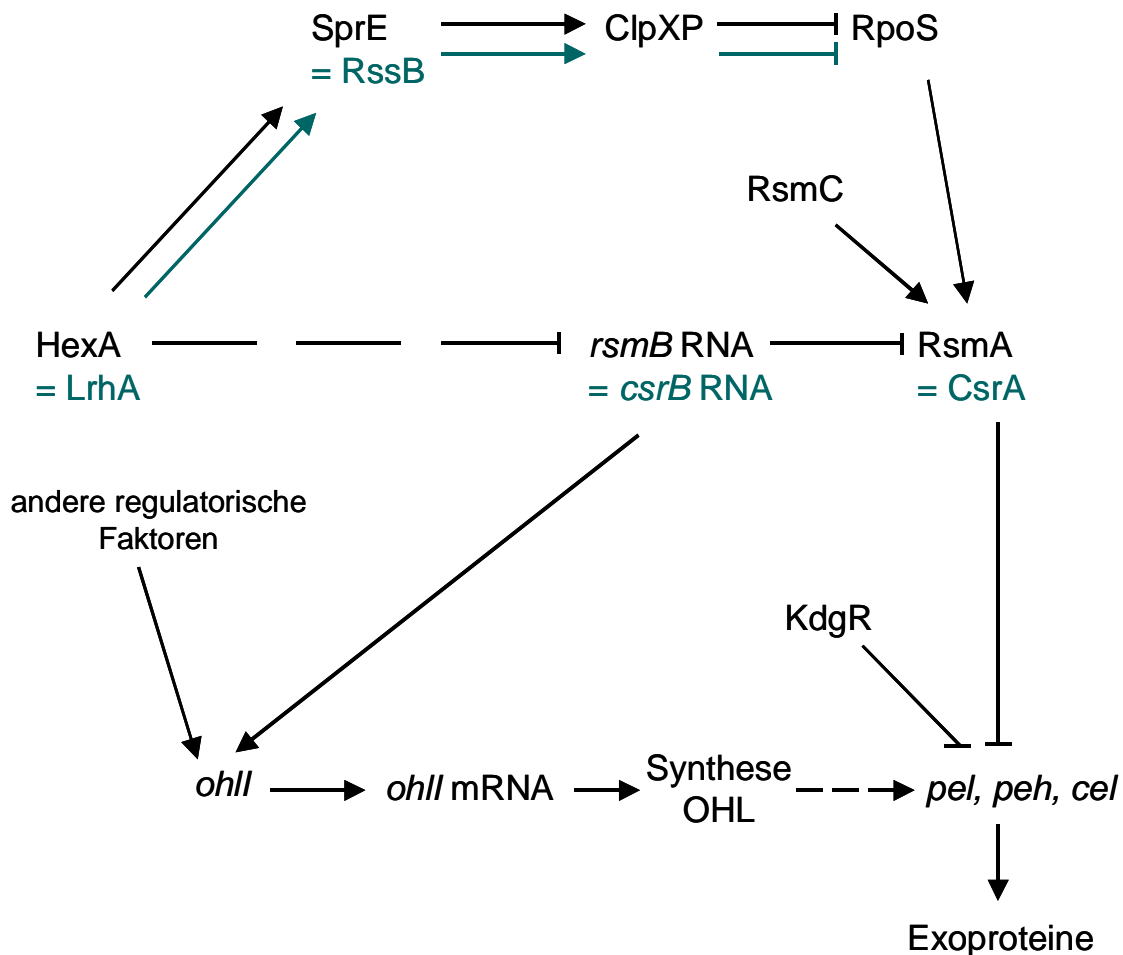


Abb. 22 Modell für HexA abhängige Regulation der Produktion von extrazellulären Enzymen und von N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton (OHL) in *Erwinia carotovora*. Zu *Escherichia coli* homologe Faktoren und Regulationen sind farbig dargestellt. *pel*, *peh* und *cel* = Gene für Pectatlyase, Polygalakturonase bzw. Cellulase. —▶ Aktivierung; —| Reprimierung; unterbrochene Linien deuten auf mehrere Zwischenschritte hin. Genaue Erläuterung im Text.

Analog zu LrhA in *E. coli* beeinflusst HexA in *E. carotovora* die Stabilität von RpoS über den Response-Regulator SprE und die Proteasen ClpX und ClpP. RpoS wiederum kontrolliert die Produktion von Exoproteinen über den Regulator RsmA, indem es die Expression von *rsmA* reguliert. Des Weiteren steht die Regulation von *rsmB* unter negativer Kontrolle von HexA.

HexA nimmt also über *rsmB* Einfluss auf die Synthese von OHL und damit über einen Umweg auch auf die Exproteinproduktion.

Die starke Homologie von LrhA zu HexA und der schon nachgewiesene Einfluss von LrhA auf RpoS stützen die Vermutung, dass auch LrhA ein ähnliches System wie HexA kontrolliert. In *E. coli* gibt es ein zu *rsmAB* homologes System, das *csrAB*-System (carbon storage regulator). HexA kontrolliert die Transkription von *rsmB* direkt (Mukherjee et al., 2000). Eine solche Kontrolle der homologen *csrB* RNA durch LrhA könnte man mit Messungen einer *csrB-lacZ*-Operonfusion überprüfen. Das CsrA/*csrB*-System in *E. coli* agiert als Regulator vieler Gene und Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, wie z.B. Gluconeogenese oder Glycogenbiosynthese. Neben dieser Funktion dient CsrA als Repressor der Biofilmbildung und aktiviert das Auflösen von Biofilmen. Diese von CsrA vermittelten Effekte scheinen über die Regulation der intrazellulären Glycogenbiosynthese vermittelt zu werden (Jackson et al., 2002). Somit wäre bei Einfluss von LrhA auf das *csrAB*-System ein Zusammenhang zwischen LrhA und der Biofilmbildung zu sehen. Das volle Spektrum der von Csr beeinflussten Systeme ist bisher noch nicht bekannt (Liu et al., 1997; Romeo, 1998). Deshalb kann man sich durchaus vorstellen, dass neben der Biofilmbildung das Quorum Sensing ebenfalls unter der Kontrolle des Csr-Systems steht.

In neuerer Zeit wird ein Zusammenhang zwischen Quorum Sensing und dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase diskutiert. Diese geht mit einer Resistenz gegen Umweltstress wie hohe Osmolarität, oxidative Agenzien oder hohe Temperaturen einher und wird durch den alternativen Sigmafaktor RpoS vermittelt. Es scheint so, als ob Quorum Sensing-Signale nicht nur dazu gebraucht werden, um die Zelldichte zu detektieren, sondern auch um den Übergang in die stationäre Phase zu regulieren. In *E. coli* werden die durch Quorum Sensing regulierten Gene teilweise auch durch RpoS reguliert (Lazazzera, 2000). Da LrhA RpoS beeinflussen kann und HexA als LrhA-Homologes die Synthese eines Quorum Sensing Signals kontrolliert, könnte LrhA ebenfalls in die Regulation der Synthese eines solchen Signals involviert sein. In *E. coli* nimmt man an, dass der Autoinducer-2 (AI-2) ein Quorum Sensing-Signalmolekül darstellt. AI-2 ist weit verbreitet und kommt z.B. in *V. harveyi*, *S. typhimurium* und *V. cholerae* vor. Kürzlich konnte die chemische Struktur dieses Autoinducers aufgeklärt werden (Chen et al., 2002). Es handelt sich um ein Furanosyl-Borat-Diester. Ein Überblick über die Zwischenstufen des Synthesewegs von AI-2 ist in Abb. 23 wiedergegeben.

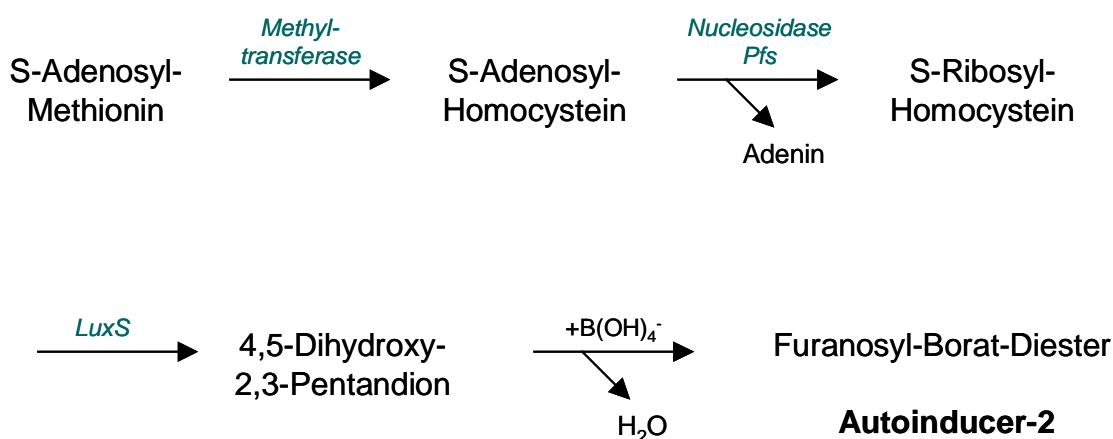


Abb. 23 **Synthese des Autoinducers-2 ausgehend von S-Adenosyl-Methionin über das Zwischenprodukt 4,5-Dihydroxy-2,3-Pentandion.** Benötigte Enzyme sind farbig dargestellt.

Ausgehend von S-Adenosylmethionin wird über mehrere Zwischenstufen der Autoinducer-2 synthetisiert. Für diese Synthese ist LuxS notwendig. Homologe Enzyme von LuxS lassen sich in vielen Organismen (*E. coli*, *S. typhimurium*, *V. harveyi*) finden und sind immer an der Synthese des Quorum Sensing-Pheromons beteiligt (Whitehead et al., 2001).

Sollte LrhA tatsächlich an der Regulation des Quorum Sensings beteiligt sein, müsste man Intermediate aus den Synthesewegen der Quorum Sensing-Signale wie Homoserinlactone, die in vielen Organismen als Autoinducer dienen (wie z.B. OHL bei *E. carotovora*), und des Autoinducers-2 als Effektor für LrhA testen. Eine Möglichkeit wäre die schon beschriebene Überprüfung einer veränderten DNA-Bindung in Gelretentionsexperimenten in Anwesenheit eines Effektors. Eine bessere Methode wäre aber vielleicht, die Bindung eines Moleküls an LrhA zu testen. Dies könnte mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen geschehen. Dazu müsste ein Austausch einer Aminosäure gegen einen Tryptophanrest in der Cofaktor-Bindedomäne von LrhA durchgeführt werden. Eine eventuelle Bindung eines Effektors in diesem Bereich wird dann durch veränderte Tryptophan-Fluoreszenz bestimmt.

6 Veröffentlichungen

Lehnen D., Blumer C., Polen T., Wackwitz B., Wendisch V.F. & Uden G. (2002)

LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*.

Molecular Microbiology 45: 521 – 532

Lehnen D., Blumer C. & Uden G. (2002)

The role of the LysR homolog LrhA in the regulation of type 1 pili in *Escherichia coli*.

In Bearbeitung.

7 Literatur

- Arfin S.M., Long A.D., Ito E.T., Toller L., Riehle M.M., Peagle E.S. & Hatfield G.W. (2000)
Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration
host factor.
Journal of Biological chemistry 275: 29672-29684
- Bartlett D.H., Frantz B.B. & Matsumura P. (1988)
Flagellar transcriptional activators FlbB and FlaI: gene sequences and 5' consensus
sequences of operons under FlbB and FlaI control.
Journal of Bacteriology 170: 1575-1581
- Bertin P., Terao E., Lee E.H., Lejeune P., Colson C., Danchin A. & Collatz E. (1994)
The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 176: 5537-5540.
- Bibikov S.I., Barnes L.A., Gitin Y. & Parkinson J.S. (2000)
Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the
aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci USA 97: 5830-5835
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V. & Riley M., et al. (1997)
The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.
Science 277: 1453-1474.
- Bongaerts J., Zoske S., Weidner U. & Uden G. (1995)
Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase genes
(*nuoA-N*) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene
regulators.
Molecular Microbiology 16: 521-534.
- Bradford M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B.L. & Hughson F.M.
(2002)
Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron.
Letters to nature 415: 545-548
- Chilcott G.S. & Hughes K.T. (2000)
Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica*
serovar typhimurium and *Escherichia coli*.
Microbiol Mol Biol Rev 64: 694-708
- Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S. & Svanborg C. (1996)
Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract.
Proc Natl Acad Sci USA 93: 9827-9832

- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-scott H.M. (1995)
Microbial biofilms.
Annu. Rev. Microbiol. 49 : 711-745
- Drapal N. & Sawers G., (1995)
Promoter 7 of the *Escherichia coli pfl* operon is a major determinant in the anaerobic regulation of expression by ArcA.
Journal of Bacteriology 177: 5338-5341
- Dobrindt U. (2001) persönliche Mitteilung
- Dorman C.J. & Bhriain N.N. (1992)
Thermal regulation of *fimA*, the *Escherichia coli* gene coding for the type 1 fimbrial subunit protein.
FEMS Microbiological Letters 99: 125-130
- Dove S.L., Smith S.G.J. & Dorman C.J. (1997)
Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role of RpoS.
Mol Gen Genet 254: 13-20
- Gally D.L., Bogan J.A., Eisenstein B.I. & Blomfield I.C. (1993)
Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media.
Journal of Bacteriology 175: 6186-6193
- Gibson K.E. & Silhavy T.J. (1999)
The LysR homolog LrhA promotes RpoS degradation by modulating activity of the response regulator SprE.
Journal of Bacteriology 181: 563-571.
- Grzeszik C., Jeffke T., Schäferjohann J., Kusian, B. & Bowien B. (2000)
Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the *cbb* CO₂ fixation operons in *Ralstonia eutropha*.
J Molecular Microbiology Biotechnol 2: 311-320.
- Hacker J. & Kaper J.B. (2000)
Pathogenicity islands and the evolution of microbes.
Annu. Rev. Microbiol. 54 : 641-679
- Harris S.J., Shih Y. Bentley S.D. & Salmond G.P.C. (1998)
The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants.
Molecular Microbiology 28: 705-717.
- Heeb S., Itoh Y., Nishijyo T., Schnider U., Keel C., Wade J. et al. (2000)
Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria.
Mol Plant Microbe Interact 13: 232-237.

- Hughes K.T., Gillen K.L., Semon M.J. & Karlinsey J.E. (1993)
Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator.
Science 262: 1277-1280.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Dominguez H. & Robert-Baudouy J. (1992)
Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937.
Journal of Bacteriology 174: 7807-7818
- Ikebe T., Iyoda S. & Kutsukake K. (1999)
Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*.
Micobiology 145: 1389-1396
- Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E. & Romeo T. (2002)
Biofilm formation and dispersal under the global regulator CsrA of *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 184: 290-301
- Jensen K.F. (1993)
The *Escherichia coli* K-12 'wild types' W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels.
Journal of Bacteriology 175: 3401-3407.
- Kalir S., McClure J., Pabbaraju K., Southward C., Ronen M., Leibler S. et al. (2001)
Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria.
Science 292: 2080-2083.
- Khodursky A.B., Peter B.J., Cozzarelli N.R., Botstein D., Brown P.O. & Yanofsky C. (2000)
DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci USA 97: 12170-12175.
- Ko M. & Park C. (2000a)
H-NS-dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein.
Journal of Bacteriology 182: 4670-4672.
- Ko M. & Park C. (2000b)
Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*.
Journal of Molecular Biology 303: 371-382
- Kutsukake K. (1997)
Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*.
Mol Gen Genet 254: 440-448.
- Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685

- Lazazzera B.A. (2000)
Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase.
Current opinion in Microbiology 3: 177-182
- Lengeler J.W., Drews G. & Schlegel H.G. (1999)
Biology of the prokaryotes.
Blackwell Science
- Liu M.Y., Gui G., Wie B., Preston J.F., Oakford L., Yüksel Ü., Giedroc D.P. & Romeo T. (1997)
The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*.
Journal of Biological Chemistry 272: 17502-17510
- Liu X. & Matsumura P. (1994)
The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons.
Journal of Bacteriology 176: 7345-7351
- Low D., Braaten B. & van der Woude M. (1996)
Fimbriae
In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt F.C. (ed.), 146-157, ASM Press, Washington, DC
- Macnab R.M. (1996)
Flagella and motility.
In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt F.C. (ed.), 123-145, ASM Press, Washington, DC
- Miller J.H. (1992)
A short course in bacterial genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Mukherjee A., Cui Y., Ma W., Liu Y., Ishihama A., Eisenstark A. & Chatterjee A.K. (1998)
RpoS (Sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*.
Journal of Bacteriology 180: 3629-3634
- Mukherjee A., Cui Y., Ma W., Liu Y. & Chatterjee A.K. (2000)
hexA of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strain Ecc71 negatively regulates production of RpoS and *rsmB* RNA, a global regulator of extracellular proteins, plant virulence and the quorum-sensing signal, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone.
Environmental Microbiology 2: 203-215.
- Neidhardt F. C., Bloch P.L. & Smith D.F. (1974)
Culture medium for Enterobacteria.
Journal of Bacteriology 119: 736 – 747

- Ostrow K.S., Silhavy T.J. & Garrett S. (1986)
cis-acting sites required for osmoregulation of *ompF* expression in *Escherichia coli* K-12.
Journal of Bacteriology 168: 1165-1171.
- O'Toole G.A. & Kolter R. (1998)
Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.
Molecular Microbiology 30: 295-304
- O'Toole G.A., Kaplan H.B. & Kolter R. (2000)
Biofilm formation as microbial development.
Annu. Rev. Microbiol. 54 : 49-79
- Pfeifer S., Sawers G. & Wirth R. (1993)
EMBO: Course on advanced archaeal and bacterial genetics.
Manual, University Munich
- Pratt L.A. & Silhavy T.J. (1996)
The response regulator SprE controls the stability of RpoS.
Proc Natl Acad Sci USA 93: 2488-2492
- Pratt L.A. & Kolter R. (1998)
Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type 1 pili.
Molecular Microbiology 30: 285-293
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C. & Lejeune P. (1999)
Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 181: 5993-6002
- Prüß B.M. & Wolfe A.J. (1994)
Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*.
Molecular Microbiology 12: 973-984
- Prüß B.M., Liu, X., Hendrickson W. & Matsumura P. (2001)
FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and *lacZ* gene fusions.
FEMS Microbiol Lett 197: 91-97.
- Rashid M.H., Rao N.N. & Kornberg A. (2000)
Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens.
Journal of Bacteriology 182: 225-227
- Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H. & Blattner F.R. (1999)
Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12.
Nucleic Acids Res 27: 3821-3835.

- Roesch P.L. & Blomfield I.C. (1998)
Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*.
Molecular Microbiology 27: 751-761
- Romeo T. (1998)
Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB.
Molecular Microbiology 29: 1321-1330
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schell M.A. (1993)
Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators.
Annu. Rev. Microbiol. 47: 597-626
- Schwan W.R., Lee J.L., Lenard F.A., Matthews B.T. & Beck M.T. (2002)
Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*.
Infection and Immunity 70: 1391-1402
- Schwyn B. & Neilands J.B. (1987)
Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.
Analytical Biochemistry 160: 47-56
- Shi W., Zhou Y., Wild J., Adler J. & Gross C.A. (1992)
DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 174: 6256-6263
- Shi W., Bogdanov M., Dowhan W. & Zusman D.R. (1993a)
The *pss* and *psd* genes are required for motility and chemotaxis in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 175: 7711-7714.
- Shi W., Li C, Louise C.J. & Adler J. (1993b)
Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 175: 2236-2240
- Shin S. & Park C. (1995)
Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR.
Journal of Bacteriology 177: 4696-4702.
- Silhavy T.J., Berman M. & Enquist L.W. (1984)
Experiments with gene fusions.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Soutourina O., Kolb A., Krin E., Laurent-Winter, C., Rimsky S., Danchin A. & Bertin P. (1999)
Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon.
Journal of Bacteriology 181: 7500-7508.
- Surgey N., Robert-Baudouy J. & Condemine G. (1996)
The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression.
Journal of Bacteriology 178: 1593-1599.
- Studier F.W. & Moffat B.A. (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
Journal of Molecular Biology 189:113-130.
- Tisa L.S. & Adler J. (1995)
Chemotactic properties of *Escherichia coli* mutants having abnormal Ca^{2+} content.
Journal of Bacteriology 177: 7112-7118
- Van Keulen G., Girbal L., van den Bergh E.R.E., Dijkhuizen L. & Meijer W.G. (1998)
The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO_2 fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor.
Journal of Bacteriology 180: 1411-1417
- Weerasuriya S., Schneider B.M. & Manson M.D. (1998)
Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli*: signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids.
Journal of Bacteriology 180: 914-920.
- Wei B.L., Brun-Zinkernagel A.-M., Simecka J.W., Prüß B.M., Babitzke P. & Romeo T. (2001)
Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*.
Molecular Microbiology 40: 245-256.
- Wendisch V.F., Zimmer D.P., Khodursky A.B., Peter B.J., Cozzarelli N. & Kustu S. (2001)
Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays.
Analytical Biochemistry 290: 205-213.
- Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L. & Salmond G.P.C. (2001)
Quorum-sensing in gram-negative bacteria.
FEMS Microbiology Reviews 25: 365-404
- Yanisch-Perron C.J., Vieira J. & Messing J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33: 103-119.

Zimmer D.P., Soupene E., Lee H.L., Wendisch V.F., Khodursky A.B., Peter B.J. et al. (2000)
Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a
defense against nitrogen limitation.
Proc Natl Acad Sci USA 97: 14674-14679.

Zoske S. (1994)
Untersuchungen zur Funktion des Genregulators GenR aus *Escherichia coli*.
Diplomarbeit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz