

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Charakterisierung eines für oxidativen Stress  
spezifischen Transkriptionsfaktors aus  
*Escherichia coli***

**Katharina M. Gebendorfer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. TUM Junior Fellow Dr. J. Winter
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 27.01.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 16.03.2011 angenommen.







# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Regulation der Transkription in <i>Escherichia coli</i></b>	<b>1</b>
1.1.1 Regulation der Transkription durch die Promotor-DNA-Sequenz	2
1.1.2 Regulation der Transkription durch Sigma-Faktoren	3
1.1.3 Regulation der Transkription durch kleine Liganden	3
1.1.4 Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren	4
1.1.5 Regulation der Transkription durch Chromosomenfaltung	5
<b>1.2. Transkriptionsfaktoren</b>	<b>5</b>
<b>1.3 LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren (LTTRs)</b>	<b>8</b>
1.3.1 Struktur und Funktion von LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren	9
1.3.2 Kristallstrukturen von LysR-Typ-Transkriptionsfaktoren	12
<b>1.4 Oxidativer Stress</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Hypochlorige Säure (HOCl)</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Mechanismen der Genregulation unter oxidativem Stress</b>	<b>15</b>
1.6.1 SoxR	16
1.6.2 OxyR	17
1.6.3 Weitere redox-regulierte Transkriptionsfaktoren	18
1.6.4 Weitere redox-regulierte Proteine	19
<b>1.7 Identifikation von YjiE als HOCl-Resistenz vermittelnden Transkriptionsfaktor</b>	<b>19</b>
<b>1.8 Zielstellung</b>	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien</b>	<b>22</b>
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Proteine und Antikörper	23
2.1.3 Sonstige Materialien	23
2.1.4 Geräte	24
2.1.5 Programme	26
2.1.6 Oligonukleotide	26
2.1.7 Plasmide	27
2.1.8 Bakterienstämme	27
2.1.9 Puffer und Medien	28
2.1.9.1 Medien	28
2.1.9.2 Antibiotika-Stammlösungen	29
2.1.9.3 Puffer für molekularbiologische Methoden	29

2.1.9.4 Puffer für proteinanalytische Methoden	30
2.1.9.5 Puffer für präparative Methoden	31
2.1.9.6 Weitere Puffer	31
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.2 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	34
2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	35
2.2.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen	35
2.2.7 Restriktionsverdau	36
2.2.8 Ligation	36
2.2.9 Fällung von DNA	37
2.2.10 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.11 Plasmidisolierung	38
2.2.12 DNA-Sequenzanalyse	38
2.2.13 Klonierung mit einem TA-Klonierungs-Kit	38
2.2.14 Transduktion der Deletion von <i>yjiE</i> mit Hilfe von P1-Phagen	39
2.2.14.1 Herstellung von P1-Phagen-Lysat	39
2.2.14.2 Bestimmung des Titers von P1-Phagen-Lysat	40
2.2.14.3 Transduktion mit P1-Phagen	40
2.2.14.4 Entfernung der Chloramphenicol-Resistenzkassette	41
<b>2.3 Proteinanalytische Methoden</b>	<b>41</b>
2.3.1 Fällung von Proteinen mit Trichloracetat	41
2.3.2 Bradford-Assay	42
2.3.3 Ellmans-Assay	42
2.3.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.3.5 Immunoblotting	43
2.3.6 Trypsinverdau für die Auftrennung auf Tricin-Gelen	44
2.3.7 Thioltrapping	45
2.3.8 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE)	46
2.3.8.1 Probenvorbereitung für die 2D-PAGE	47
2.3.8.2 Durchführung der 2D-PAGE	47
2.3.8.3 Colloidal Coomassie-Färbung von 2D-Gelen	48
2.3.9 Maldi ToF/ToF Massenspektrometrie	49
2.3.10 ESI-MS Massenspektrometrie	50
2.3.11 Analytische Gelfiltration	51
<b>2.4 Methoden der Proteinreinigung</b>	<b>53</b>
2.4.1 Anzucht von Bakterienkulturen	53
2.4.2 Zellaufschluss	54
2.4.3 Chromatographische Methoden	54
2.4.3.1 Affinitätschromatographie	54
2.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie	56
2.4.3.3 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	57
2.4.4 Abstpaltung des His <sub>6</sub> -Tag durch Thrombinverdau	59
2.4.5 Aufkonzentrieren der Proteinlösung	59
2.4.6 Pufferaustausch	60

<b>2.5 Spektroskopische Methoden</b>	<b>60</b>
2.5.1 UV/Vis-Spektrometrie	61
2.5.2 Fluoreszenzspektrometrie	62
2.5.3 Fluoreszenzpolarisation (Fluoreszenzanisotropie)	62
2.5.4 Circulardichroismus (CD)	64
2.5.5 Analytische Ultrazentrifugation	65
2.5.5.1 Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation	65
2.5.5.2 Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation	66
<b>2.6 Biochemische Methoden zur Bestimmung von Aktivitäten</b>	<b>67</b>
2.6.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	67
2.6.2 <i>In vitro</i> Transkriptions-Assay	68
2.6.4 Genexpressionsanalyse durch Transkriptionsprofile	72
<b>2.7 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>73</b>
2.7.1 Lebensfähigkeits-Assay	73
2.7.2 Motilitäts-Assay	74
<b>2.8 Strukturbiologische Methoden</b>	<b>75</b>
2.8.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	75
2.8.2 Röntgenstrukturanalyse	75
2.8.2.1 Reinigung von YjiE für die Kristallisation	76
2.8.2.2 Kristallisation von YjiE	76
2.8.2.3 Aufnahme von Röntgenstrukturdaten	78
2.8.2.4 Prozessierung und Datenreduktion	78
2.8.2.5 Phasenberechnung	79
2.8.2.6 Interpretation der Elektronendichte und Strukturverfeinerung	81
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>3.1 Lebensfähigkeits-Assays mit C600- und C600 <math>\Delta</math>yjiE-Zellen</b>	<b>82</b>
<b>3.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von YjiE</b>	<b>83</b>
3.2.1 Fern-UV-CD-Spektrum und thermische Entfaltung von YjiE	83
3.2.2 DNA-Bindung von YjiE	84
3.2.2.1 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) mit DNA und YjiE	84
3.2.2.2 Fluoreszenzpolarisations-Messungen mit DNA und YjiE	86
3.2.2.3 Analytische Ultrazentrifugation mit DNA und YjiE	88
3.2.2.4 Diskussion der Ergebnisse der DNA-Bindungs-Assays	90
3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie mit YjiE	92
3.2.4 Analytische Ultrazentrifugation mit YjiE	93
3.2.4.1 Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation mit YjiE	94
3.2.4.2 Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation mit YjiE	94
3.2.5 Analytische Gelfiltration von YjiE <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	95
3.2.5.1 Analytische Gelfiltration von gereinigtem YjiE	96
3.2.5.2 <i>In vivo</i> Oligomerisierungszustand von YjiE	97
3.2.6 Diskussion der biophysikalischen und biochemischen Charakterisierung von YjiE	98

<b>3.3 Einfluss von Oxidationsmitteln auf YjiE</b>	<b>99</b>
3.3.1 Ellmans-Assay mit HOCl-behandeltem YjiE	100
3.3.2 ESI-MS Analyse von HOCl-behandeltem YjiE	100
3.3.3 Fern-UV-CD-Spektrum und thermische Entfaltung von HOCl-behandeltem YjiE	101
3.3.4 Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation mit HOCl-behandeltem YjiE	102
3.3.5 DNA-Bindung von oxidiertem YjiE	102
3.3.6 Transmissionselektronenmikroskopie mit oxidiertem YjiE	104
3.3.7 Trypsinverdauung mit oxidiertem YjiE	105
3.3.8 Thioltrapping-Assays mit oxidiertem YjiE	107
3.3.9 Diskussion des Einflusses von Oxidationsmitteln auf YjiE	109
<b>3.4 Charakterisierung von YjiE aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl)</b>	<b>111</b>
3.4.1 DNA-Bindung von YjiE-HOCl	111
3.4.2 Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation mit YjiE-HOCl	114
3.4.3 Ellmans-Assay mit YjiE-HOCl	115
3.4.4 ESI-MS-Analyse von YjiE-HOCl	115
3.4.5 Diskussion zur Charakterisierung von YjiE-HOCl	116
<b>3.5 Dissoziation von YjiE mit Harnstoff und Arginin</b>	<b>117</b>
<b>3.6 <i>In vitro</i> Transkriptions-Assay</b>	<b>120</b>
<b>3.7 2D-PAGE mit C600- und C600 <math>\Delta yjiE</math>-Zellen</b>	<b>123</b>
<b>3.8 Genexpressionsanalyse von C600- und C600 <math>\Delta yjiE</math>-Zellen unter HOCl-Stress</b>	<b>125</b>
3.8.1 HOCl-regulierte Gene	125
3.8.2 YjiE-regulierte Gene	127
3.8.3 Gene, die möglicherweise durch YjiE reprimiert werden	127
<b>3.9 Motilitäts-Assays mit Wildtyp und <math>\Delta yjiE</math>-Zellen</b>	<b>130</b>
<b>3.10 Kristallisation von YjiE</b>	<b>130</b>
<b>4 Zusammenfassung der Charakterisierung von YjiE</b>	<b>133</b>
<b>5 Zusammenspiel des zellulären cAMP-Levels, der <math>\sigma^S</math>-Aktivität und der Resistenz gegen oxidativen Stress in <i>Escherichia coli</i></b>	<b>136</b>
<b>6 Anpassung von <i>Escherichia coli</i> an das Wachstum bei hohen Temperaturen</b>	<b>139</b>
<b>7 Abkürzungen</b>	<b>142</b>

<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>144</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>160</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Regulation der Transkription in *Escherichia coli*

Die Genexpression in Bakterien unterliegt einer starken Regulation (Überblick siehe Dale und Park, 2004), da sichergestellt werden muss, dass die richtigen Proteine in der korrekten Menge zum passenden Zeitpunkt synthetisiert werden. Bakterien müssen in der Lage sein einige Proteine, wie zum Beispiel Strukturproteine oder ribosomale Proteine, in großen Mengen herzustellen, während von anderen Proteinen, wie beispielsweise einigen regulatorischen Proteinen, nur geringe Mengen produziert werden. Außerdem sind Bakterien dadurch, dass sie unter bestimmten Bedingungen bestimmte Gene (z.B. Stressproteine) exprimieren, sehr anpassungsfähig und können unter einem breiten Spektrum von Umweltbedingungen gedeihen. Die Genexpression benötigt sehr viel Energie und wird präzise kontrolliert, um die Synthese von unnötigen Materialien zu vermeiden. Die Regulation erfolgt auf allen Ebenen des Pfades zwischen dem Gen und dem entsprechenden Protein und wird in drei Hauptphasen verwirklicht: Transkription der mRNA, Translation des Proteins und Kontrolle der Aktivität des Proteins. Unter diesen Rahmenbedingungen gibt es eine Reihe von potentiellen regulatorischen Faktoren wie (1) die Anzahl der Genkopien, (2) die Effizienz mit der das Gen transkribiert wird, welche hauptsächlich über den Grad der Initiation der Transkription bestimmt wird, (3) die Stabilität der mRNA, (4) die Effizienz mit der die mRNA zum Protein translatiert wird, (5) die Stabilität des Proteinprodukts und (6) posttranslationale Effekte wie die Proteinfaltung, kovalente Modifikationen, die die Aktivität des Proteins beeinflussen, sowie temporäre Inhibition oder Aktivierung bestimmter Enzyme. Aus wirtschaftlichen Gründen erfolgt die Regulation größtenteils bei der Initiation der Transkription der mRNA (Review siehe Browning und Busby, 2004). Die zentrale Komponente dabei ist die RNA-Polymerase, die die bakterielle Transkription ausführt. Sie besteht aus fünf Untereinheiten von denen vier ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\omega$ ) im Grundkörper mit der Zusammensetzung  $\beta\beta'\alpha_2\omega$  vorhanden sind (Burgess, 1969). Um die Transkription an einem Promotor initiieren zu können, muss dieser Grundkörper zusammen mit einer  $\sigma$ -Untereinheit (Sigma-Faktor) das sogenannte Holoenzym bilden. Die Verteilung der limitierenden RNA-Polymerase-Komplexe zwischen kompetitierenden Promotoren wird durch fünf verschiedene Mechanismen reguliert durch die das Expressionslevel von Genen verändert werden kann. Dazu gehören Promotor-DNA-Sequenzen, Sigma-Faktoren, kleine Moleküle wie

beispielsweise Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp), Transkriptionsfaktoren sowie die gefaltete Struktur des bakteriellen Chromosoms.

Die Ergebnisse der Forschung an der bakteriellen Transkriptionsinitiation in *Escherichia coli* dienen als Modell für das Verständnis der Transkriptionskontrolle in allen Reichen des Lebens. Viele Prinzipien der Genregulation sind in Bakterien und Eukaryoten sehr ähnlich. Allerdings sind in Eukaryoten eine viel größere Anzahl von Proteinen und viel längere DNA-Bereiche an der Regulation der Genexpression beteiligt (Überblick über die Genexpression in Eukaryoten siehe Alberts et al., 2007; Stryer et al., 2002). Dadurch ist die eukaryotische Genregulation zwar vergleichsweise sehr viel komplexer, ermöglicht es aber, dass viele Signale an einem einzelnen Promotor integriert werden können, um eine entsprechende Menge mRNA zu synthetisieren. So können Zellen in multizellulären Organismen zum Beispiel ihre Form, Wachstumsrate oder andere Charakteristika verändern, wenn sie Hormonen oder Wachstumsfaktoren ausgesetzt sind. Unterschiede in der Genexpression ermöglichen es auch, dass aus Zellen, die die gleichen genetischen Informationen enthalten, verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise Muskel- oder Nervenzellen, entstehen.

Im Folgenden werden die wichtigsten Mechanismen zur Regulation der Transkription in *E. coli* durch Kontrolle der Initiation der Transkription dargestellt.

### 1.1.1 Regulation der Transkription durch die Promotor-DNA-Sequenz

Die beiden Hauptelemente eines Promotors sind die -35 und die -10 Elemente, die jeweils 35 bzw. 10 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt liegen und von der  $\sigma$ -Untereinheit der RNA-Polymerase erkannt werden (siehe Abbildung 1). Es existieren Konsensussequenzen für beide Elemente, die sich für die verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren unterscheiden. Starke Promotoren, an denen es häufig zur Initiation der Transkription kommt, besitzen meist eine Sequenz, die nahe am idealen Konsensus liegt, während schwache Promotoren häufig Basenabweichungen oder einen veränderten Abstand zwischen den beiden Elementen aufweisen, wodurch die Transkription seltener initiiert wird. Das ausgedehnte (*extended*) -10 Element und das UP Element (*promoter upstream element*) stellen zwei weitere wichtige Elemente von Promotoren dar.



**Abbildung 1:** Stark vereinfachtes Modell eines bakteriellen Promotors. Der DNA-Doppelstrang ist in rot dargestellt. Vor dem Transkriptionsstartpunkt (+1) liegen die -10- und -35 Elemente (jeweils in hellblau dargestellt), die von der  $\sigma$ -Untereinheit der RNA-Polymerase erkannt werden.

### 1.1.2 Regulation der Transkription durch Sigma-Faktoren

Der  $\sigma$ -Faktor bestimmt die Spezifität des RNA-Polymerase-Holoenzym (Dunn und Bautz, 1969). *E. coli* besitzt einen primären  $\sigma$ -Faktor,  $\sigma^{70}$ , der für die Erkennung von Promotoren in exponentiell wachsenden Zellen verantwortlich ist (*housekeeping genes*). Außerdem besitzt *E. coli* sechs weitere  $\sigma$ -Faktoren, sogenannte alternative  $\sigma$ -Faktoren, die als Antwort auf spezifische Stresssituationen akkumulieren (Ishihama, 2000) und dadurch mit  $\sigma^{70}$  um RNA-Polymerase konkurrieren. Wenn der primäre  $\sigma$ -Faktor durch einen alternativen  $\sigma$ -Faktor ersetzt wird, wird die Erkennung von Promotorsequenzen durch die RNA-Polymerase radikal verändert (Maeda et al., 2000) und es kommt zu einer veränderten Genexpression. Als Folge von hohen Temperaturen kommt es beispielsweise zur Akkumulation von  $\sigma^{32}$  (dem sogenannten Hitzeschock- $\sigma$ -Faktor, siehe Grossman et al., 1984). Wenn  $\sigma^{32}$  an RNA-Polymerase bindet, kann diese an Promotoren von Hitzeschockgenen binden, wodurch es zur Expression dieser Gene, die benötigt werden um die hohe Temperatur zu verkraften, kommt (Yura und Nakahigashi, 1999). Ein weiterer alternativer  $\sigma$ -Faktor ist  $\sigma^S$ , das die allgemeine Stressantwort reguliert.  $\sigma^S$  akkumuliert beispielsweise in der stationären Phase, aber auch unter vielen anderen Stressbedingungen, und reguliert eine große Anzahl von Genen (Weber et al., 2005). Die Aktivität von  $\sigma$ -Faktoren wird häufig durch Anti-Sigma-Faktoren reguliert, die eine Interaktion mit dem RNA-Polymerase-Grundkörper verhindern (Hughes und Mathee, 1998).

### 1.1.3 Regulation der Transkription durch kleine Liganden

Auch mit Hilfe von kleinen Liganden kann die RNA-Polymerase schnell und effizient auf die Umweltbedingungen reagieren. Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp) wird beispielsweise synthetisiert, wenn ein Aminosäuremangel vorherrscht und dadurch die Translation gebremst wird und bindet an RNA-Polymerase (Chatterji und Ojha, 2001). ppGpp destabilisiert die

Bindung von RNA-Polymerase an Promotoren, die instabile offene Promotor-RNA-Polymerase-Komplexe bilden (Barker et al., 2001a; Barker et al., 2001b). Diese Promotoren regulieren meist Gene, die für Proteine kodieren, die für die Translation benötigt werden. Bei einer niedrigen Konzentration des Startnukleotids, welches normalerweise ATP ist, kommt es an solchen Promotoren in der Regel nicht zur Initiation der Transkription (Gaal et al., 1997; Schneider et al., 2002). Es wurde postuliert, dass ppGpp die Expression der Translationsmaschinerie unter Nährstoffmangel reguliert, während ATP die Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsrate kontrolliert (Schneider et al., 2003).

### 1.1.4 Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren koppeln ebenfalls die Genexpression an Umweltbedingungen und werden durch die Kontrolle ihrer Aktivität oder ihrer Expression reguliert. Die DNA-Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren kann durch kleine Moleküle (z.B. Allolaktose beim Lac-Repressor oder cAMP bei CRP, Müller-Hill, 1996) oder durch kovalente Modifikationen (z.B. Phosphorylierung des Responseregulators NarL durch die Sensor kinase NarX oder NarQ in einem sogenannten Zwei-Komponenten-System; Darwin und Stewart, 1996; Stock et al., 2000) verändert werden. Bei manchen Transkriptionsfaktoren wird die Aktivität auch anhand ihrer Konzentration in der Zelle reguliert. Die Konzentration wird entweder durch die Regulation ihrer Expression oder durch Proteolyse bestimmt. Beispielsweise wird die Antwort auf Superoxid-Stress durch die Konzentration an SoxS kontrolliert. Die Transkription von *soxS* wird wiederum durch SoxR reguliert, das direkt durch oxidierende Liganden aktiviert wird (Demple, 1996). In seltenen Fällen wird die Konzentration eines Transkriptionsfaktors auch durch ein regulatorisches Protein, das den Transkriptionsfaktor bindet, reguliert (Plumbridge, 2002).

Durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors an einen Promotor kann die Initiation der Transkription aktiviert oder reprimiert werden. Einige Transkriptionsregulatoren fungieren nur als Aktivator oder Repressor, während andere je nach Zielpromotor beide Funktionen besitzen (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Aktivatoren verbessern die Effizienz eines Promotors dadurch, dass sie seine Affinität für die RNA-Polymerase erhöhen. Repressor-Proteine verringern hingegen die Initiation der Transkription an ihren Zielpromotoren.

Unter 1.2 sind die Struktur und Funktion von Transkriptionsfaktoren genauer beschrieben.

### 1.1.5 Regulation der Transkription durch Chromosomenfaltung

Bakterielle Chromosomen sind durch *supercoiling* und Interaktionen mit Nukleoid-Proteinen und RNA stark verdichtet (Azam und Ishihama, 1999). Die Bindung von Nukleoid-Proteinen (Fis, IHF, H-NS, HU, StpA, Dps) an DNA und die daraus resultierende Faltung des bakteriellen Chromosoms beeinflusst die Verteilung der RNA-Polymerase auf verschiedene Promotoren. Das Protein H-NS kann beispielsweise durch die Bildung von ausgedehnten Nukleoproteinstrukturen die Genexpression komplett verhindern (z.B. an *proU*- und *bgl*-Promotoren; Jordi und Higgins, 2000; Petersen et al., 2002; Schnetz, 1995). An anderen Promotoren arbeiten Nukleoid-assoziierte Faktoren zusammen, um dadurch die Transkription zu beeinflussen. In Abhängigkeit von der Bindestelle kann es dadurch zur Aktivierung oder Repression kommen (McLeod und Johnson, 2001). An der regulatorischen Region von *nir* binden beispielsweise Fis, IHF und H-NS die DNA in einen geordneten Nukleoprotein-Komplex, der die Transkription verhindert (Browning et al., 2000). Es gibt auch zahlreiche Beispiele für Promotoren an denen spezifische Nukleoid-assoziierte Faktoren wie Fis und IHF als Aktivatoren der Transkriptionsinitiation rekrutiert werden (Gerstel et al., 2003; McLeod und Johnson, 2001).

## 1.2 Transkriptionsfaktoren

Die Aktivität der meisten bakteriellen Promotoren hängt nicht von einem, sondern von mehreren Umweltsignalen ab. Viele Promotoren werden daher auch von zwei oder mehr Transkriptionsfaktoren kontrolliert, von denen jeder ein Umweltsignal weiterleitet. In den meisten untersuchten Fällen erfolgt die komplexe Regulation durch Kombinationen von Aktivatoren und Repressoren oder durch eine Abhängigkeit von mehreren Aktivatoren. Es gibt jedoch auch wenige Beispiele für eine integrierte Regulation, die allein von Repressoren abhängt.

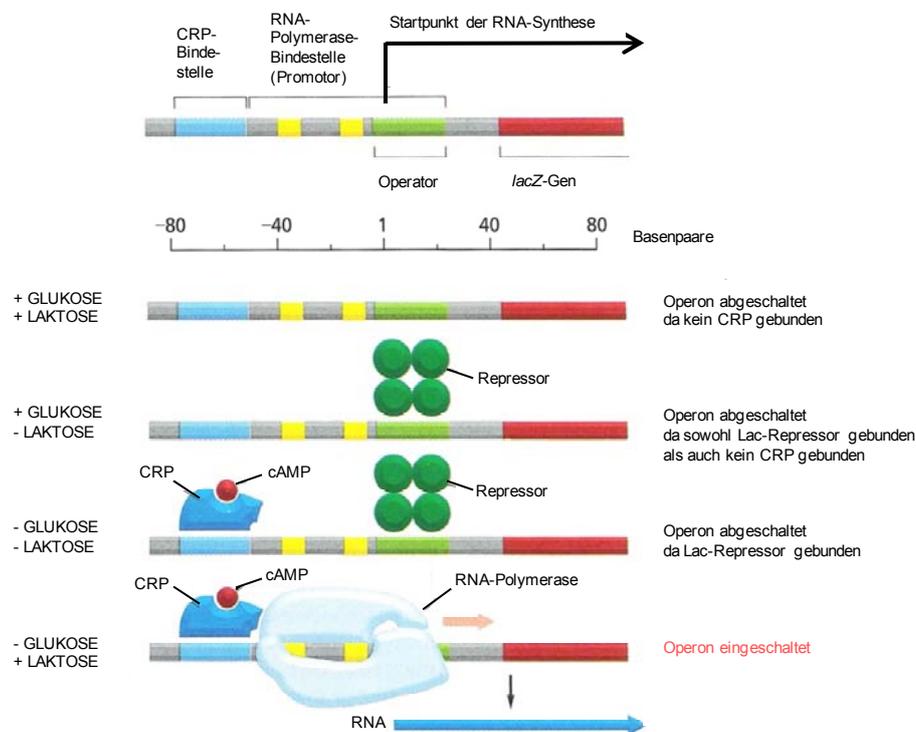
Ein gut untersuchtes Beispiel für einen Promotor, der von zwei Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird, ist der *E. coli lac*-Promotor, der das *lac*-Operon reguliert. Die Gene des *lac*-Operons kodieren für Proteine, die für die Aufnahme und den Abbau von Laktose nötig sind. Die Transkription am *lac*-Promotor wird durch den Lac-Repressor negativ und CRP (*cAMP receptor protein*) positiv reguliert. Das CRP-Dimer aktiviert Gene, die es *E. coli* ermöglichen

alternative Kohlenstoffquellen zu nutzen, wenn die bevorzugte Kohlenstoffquelle, Glukose, nicht zur Verfügung steht. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen steigt die zelluläre cAMP-Konzentration. cAMP bindet an CRP und aktiviert dieses dadurch, so dass es an eine DNA-Sequenz nahe des *lac*-Promotors binden und somit die Transkription der für den Laktosemetabolismus benötigten Gene initiieren kann. Es wäre jedoch verschwenderisch, wenn die Expression des *lac*-Operon induziert werden würde, wenn keine Laktose vorhanden ist. Daher verhindert das Lac-Repressor-Tetramer, das an die sogenannte Operator-Region bindet, die RNA-Synthese in Abwesenheit von Laktose. Wenn jedoch das Laktosederivat Allolaktose an den Lac-Repressor bindet, so kommt es zu einer allosterischen Veränderung der Proteinstruktur und der Transkriptionsfaktor kann nicht mehr an die Operator-Region binden. Dadurch wird die Initiation der Transkription ermöglicht. Am *lac*-Promotor werden folglich zwei verschiedene Signale integriert, wodurch es nur zu einer effektiven Transkription der Gene des Operons kommt, wenn Laktose vorhanden ist und gleichzeitig Glukosemangel herrscht. In allen anderen Fällen wird die RNA-Synthese verhindert (siehe Abbildung 2). Weiterführende Studien des *lac*-Promotors zeigten, dass das *lac*-Operon weitere Operator-Regionen in der Nähe besitzt. Das Lac-Repressor-Tetramer kann an zwei Operator-Regionen gleichzeitig binden und verursacht dadurch eine Krümmung der dazwischenliegenden DNA. Die Induktion einer Krümmung der DNA wird auch als *DNA bending* bezeichnet (genauere Beschreibung siehe 1.3.1). Im Fall des *lac*-Operons wird die Repression durch den Lac-Repressor durch das *DNA bending* verstärkt.

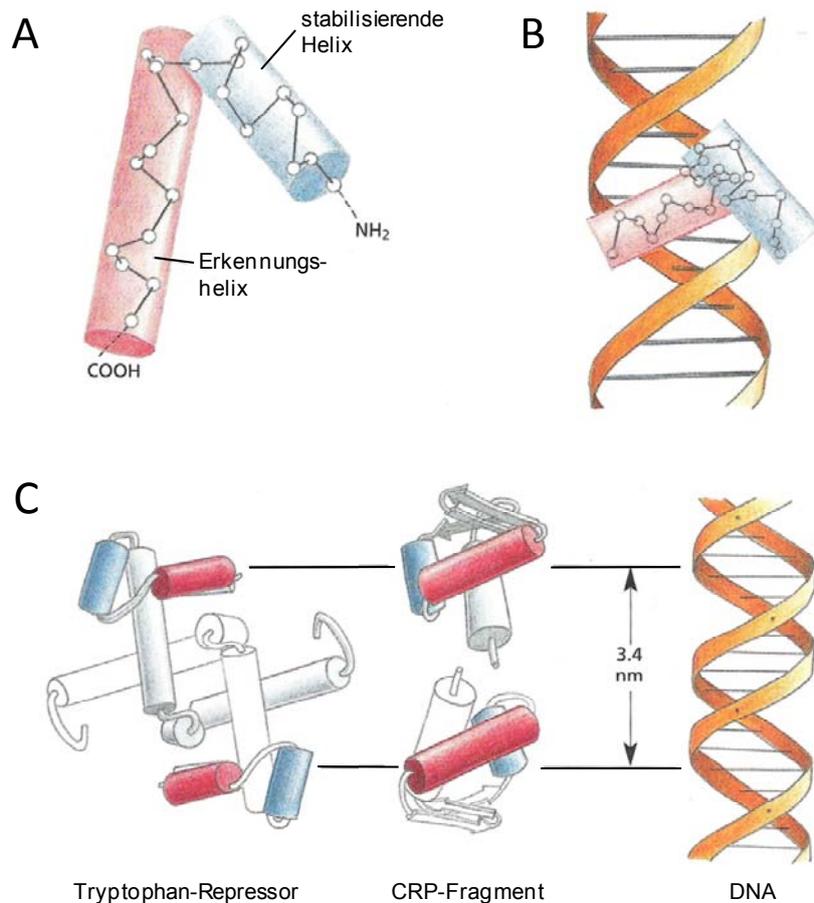
Transkriptionsfaktoren bestehen in der Regel aus mindestens zwei Domänen: einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer regulatorischen Domäne (RD). Die Klassifizierung von bakteriellen Transkriptionsregulatoren erfolgt anhand ihrer Sequenz und der Position der DBD. Derzeit sind 16 Hauptklassen von bakteriellen Transkriptionsfaktoren bekannt zu denen auch LysR-Typ-Transkriptionsfaktoren (siehe 1.3) gehören, deren DBD sich am N-Terminus befindet (Pareja et al., 2006; Pruess et al., 2005).

Die meisten DNA-bindenden Proteine in Prokaryoten besitzen ein sogenanntes Helix-turn-Helix (HTH)-Motiv, das aus einer Erkennungshelix für die spezifische Bindung an eine bestimmte DNA-Sequenz und einer stabilisierenden Helix besteht, die durch eine Windung, den sogenannten *turn* miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3A). In *E. coli* kommen 314 Transkriptionsregulatoren mit diesem Motiv in der DNA-bindenden Domäne vor. Bei der DNA-Bindung liegt die Erkennungshelix in der großen Furche, wo Aminosäurereste Kontakte mit den Basen der DNA ausbilden, während die stabilisierende Helix hauptsächlich an Kontakten mit dem DNA-Rückgrat beteiligt ist (siehe Abbildung 3B). Helix-turn-Helix-

Motive kommen sehr häufig in Proteinen vor, die DNA in Form von Dimeren binden. Daher sind zwei HTH-Einheiten vorhanden, die durch eine zweifache Symmetrie entlang der DNA-Doppelhelix miteinander verbunden sind und an ebenfalls symmetrische DNA-Sequenzen binden. HTH-Motive kommen beispielsweise beim Lac-Repressor, CRP und dem Tryptophan-Repressor vor (siehe Abbildung 3C). Obwohl das HTH-Motiv mit ca 95 % die am häufigsten vorkommende DNA-Bindeeinheit in Prokaryoten ist, binden nicht alle regulatorischen Proteine DNA mit einer solchen Einheit. Die restlichen 5 % der DNA-Bindeeinheiten besitzen Helix-loop-Helix-, Zinkfinger- oder antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Domänen (Aravind et al., 2005; Huffman und Brennan, 2002; Perez-Rueda und Collado-Vides, 2001).



**Abbildung 2: Duale Regulation des lac-Operons.** Die Initiation der Transkription des lac-Operons wird durch die Konzentrationen von Glukose und Laktose in der Zelle und ihre Auswirkungen auf CRP und den Lac-Repressor kontrolliert. Die Abbildung fasst die wichtigsten Eigenschaften des lac-Operons vereinfacht zusammen. (Abbildung aus Alberts et al. (2008) adaptiert)



**Abbildung 3: Das DNA-bindende Helix-turn-Helix-Motiv.** (A) Darstellung des HTH-Motivs in der weißen Kreise die zentralen Kohlenstoffatome von Aminosäuren darstellen. (B) Bei der Bindung an DNA bindet die Erkennungshelix an der großen Furche der DNA und die stabilisierende Helix bildet Kontakte mit dem DNA-Rückgrat aus. (C) Beispiele für DNA-bindende Proteine mit einem Helix-turn-Helix-Motiv. Beide Proteine binden DNA in Form von Dimeren, wobei die beiden Erkennungshelices genau eine Umdrehung der DNA-Helix voneinander entfernt sind. (Abbildungen aus Alberts et al. (2008) adaptiert)

### 1.3 LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren (LTTRs)

LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren (LTTRs) stellen die größte Familie von bakteriellen Transkriptionsfaktoren dar (Review siehe Maddocks und Oyston, 2008; Schell, 1993). Sie sind hoch konserviert und in Bakterien universell, wobei jedoch auch Orthologe in Archaeen und Eukaryoten vorkommen (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2001; Stec et al., 2006; Sun und Klein, 2004). Die LysR-Familie wurde 1988 von Heinikoff et al. entdeckt und nach dem ersten charakterisierten Mitglied der Familie, LysR, benannt (Stragier et al., 1983; Stragier und Patte, 1983). Seitdem werden ständig neue Mitglieder der Familie identifiziert. LTTRs sind globale Regulatoren, die als Aktivatoren oder Repressoren von einzelnen Genen oder

Operons fungieren können und deren Transkription häufig divergent stattfindet (Hernandez-Lucas et al., 2008; Heroven und Dersch, 2006). LTTRs zeigen außerdem häufig eine Autoregulation der eigenen Transkription und binden sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand an DNA (Schell, 1993). Für die Funktion von LTTRs als Aktivatoren oder Repressoren ist meist ein sogenannter *co-inducer* wichtig, der als allosterischer Regulator fungiert. Dabei handelt es sich in der Regel um ein kleines Molekül wie beispielsweise ein Substrat oder ein Intermediat des Stoffwechselweges, der durch einen LTTR reguliert wird (z.B. bei ArgP, CbbR, GltC; Celis, 1999; Picossi et al., 2007; van Keulen et al., 2003). LTTRs kommen in vielen verschiedenen Bakterienarten vor und besitzen ebenso zahlreiche unterschiedliche Funktionen. Sie sind zum Beispiel am Stoffwechsel, an der Zellteilung, am *quorum sensing*, an der Virulenz, an der Motilität, an der Stickstofffixierung, an oxidativen Stressantworten, an der Toxinproduktion, an der Anheftung von Bakterien an Oberflächen oder Zellen und an der Sekretion beteiligt (Byrne et al., 2007; Cao et al., 2001; Deghmane et al., 2000; Deghmane et al., 2002; Kim et al., 2004; Kovacicova und Skorupski, 1999; Lu et al., 2007; Russell et al., 2004; Sperandio et al., 2007).

### 1.3.1 Struktur und Funktion von LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren

Trotz des Vorkommens in vielen verschiedenen Bakterienarten und den zahlreichen unterschiedlichen Funktionen von LTTRs, sind sie sich in Hinsicht ihrer Struktur und ihres Funktionsmechanismus sehr ähnlich (Maddocks und Oyston, 2008).

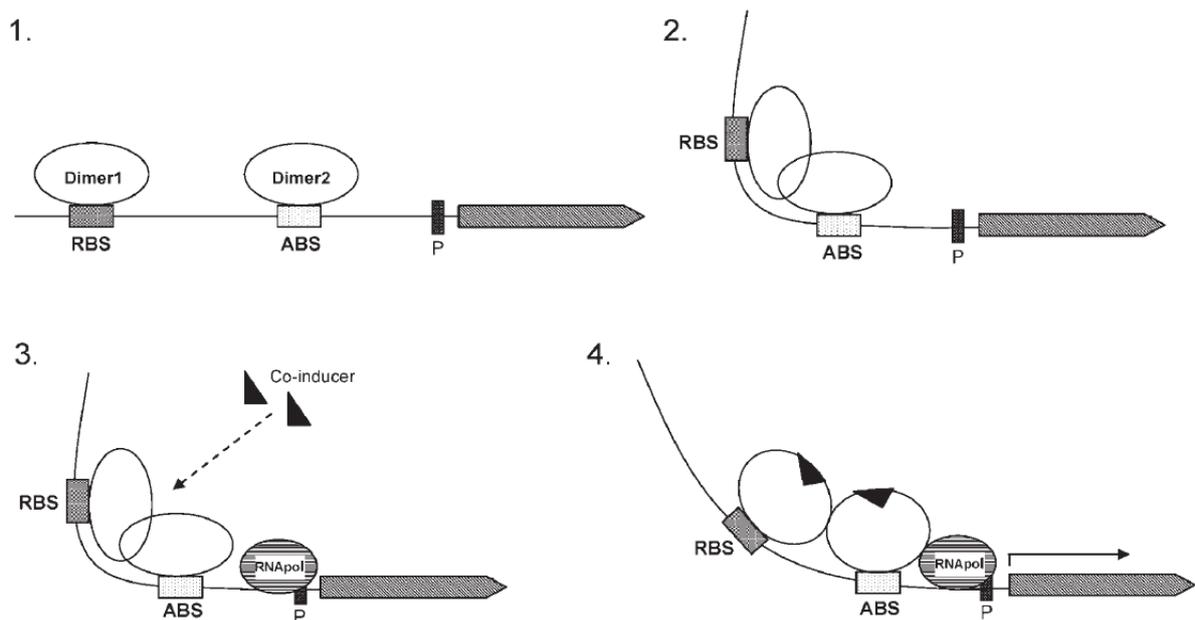
Der Aufbau von LTTRs ist in Abbildung 4 dargestellt. LTTRs sind ca. 300 Aminosäuren lang. Am N-Terminus befindet sich die DBD, die ein Helix-turn-Helix (HTH)-Motiv enthält (ca. Aminosäuren 1 bis 100; Ezezi et al., 2007; Jourdan und Stauffer, 1998; von Lintig et al., 1991; Zheng et al., 1998). Den C-Terminus bildet die RD (ca. ab Aminosäure 110), die eine *co-inducer*-Bindestelle besitzt und für die Oligomerisierung wichtig ist (Janes et al., 2003; Kullik et al., 1995a; Lochowska et al., 2001). Zwischen den beiden Domänen befindet sich ein kurzer Linker (ca. 10 Aminosäuren, Schell, 1993). Der N-Terminus von LTTRs ist hoch konserviert und besitzt ein sogenanntes geflügeltes Helix-turn-Helix-Motiv (*winged helix-turn-helix*, wHTH), während der Konservierungsgrad des C-Terminus vergleichsweise gering ist (Maddocks und Oyston, 2008).



**Abbildung 4: Domänenstruktur von LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren.** LTTRs besitzen eine N-terminale DNA-bindende Domäne mit einem Helix-turn-Helix-Motiv und eine C-terminale regulatorische Domäne, die eine *co-inducer*-Bindestelle besitzt und für die Oligomerisierung von Bedeutung ist. Die beiden Domänen sind durch eine Linker-Sequenz miteinander verbunden.

LTTRs binden in der Regel in Form von Dimeren oder Tetrameren an DNA und schützen daher in DNase I-Verdauen einen sehr großen DNA-Bereich von ca. 50 bis 60 bp (Muraoka et al., 2003a, Muraoka et al., 2003b; Rosario et al., 2010). Der Grund dafür ist, dass LTTRs mehrere Bindestellen im Promotorbereich von regulierten Genen besitzen. Zwischen ca. -35 und +20 bp befindet sich die regulatorische Bindestelle (*regulatory binding site*, RBS), wo auch die Autoregulation stattfindet, während zwischen ca. -40 und -20 bp die Aktivierungsbindestelle (*activation binding site*, ABS) liegt und es bei ca. -55 bp zur Hypersensitivität aufgrund von *DNA bending* kommen kann (Belitsky et al., 1995; Lochowska et al., 2001; Porrua et al., 2007). Die DNA-Bindung kann jedoch auch deutlich weiter vom Transkriptionsstart entfernt stattfinden. Es wurden bereits Bindestellen, die bis zu -218 bp und +350 bp entfernt waren, gefunden (Viswanathan et al., 2007; Wilson et al., 1995). An der RBS ist in der Regel eine sogenannte LTTR-Box mit einem zum Teil dyadischen Motiv mit der Sequenz T-N<sub>11</sub>-A zu finden, die sowohl in der Zusammensetzung der Basenpaare als auch in der Länge variieren kann (Goethals et al., 1992; Parsek et al., 1994). Durch die Bindung eines *co-inducers* ändert sich die meist dimere oder tetramere Struktur von LTTRs, wodurch sich auch die Affinität für verschiedene DNA-Bindestellen und dadurch die Regulation der Transkription ändern (Chang und Crawford, 1990; Ezezika et al., 2007; Goss, 2008; Hernandez-Lucas et al., 2008; Hoenke et al., 1997; Jorgensen und Dandanell, 1999; Kullik et al., 1995a; Kullik et al., 1995b; Lochowska et al., 2001; Porrua et al., 2007; Smirnova et al., 2004; Stec et al., 2006). Häufig findet ohne *co-inducer* lediglich eine Bindung an die RBS statt, während die ABS erst nach der Bindung des *co-inducers* besetzt wird (Tropel und van der Meer, 2004). Die RBS und die ABS werden jeweils durch LTTR-Dimere besetzt, die zusammen ein aktives Tetramer bilden und in manchen Fällen *DNA bending* verursachen (Maddocks und Oyston, 2008). *DNA bending* ist eine weit verbreitete Erscheinung in der bakteriellen Transkriptionsregulation und konnte für viele LTTRs gezeigt werden (Akakura und Winans, 2002a; Akakura und Winans, 2002b;

Hryniewicz und Kredich, 1994; Ogawa et al., 1999; van Keulen et al., 1998). Wie stark die DNA gekrümmt wird, hängt häufig von der Anwesenheit oder Abwesenheit eines *co-inducers* ab, durch dessen Bindung sich die Struktur des Tetramers und die Affinität für verschiedene DNA-Bindestellen ändern. Eine Verringerung der DNA-Krümmung führt dazu, dass in DNase I-Verdauen ein kürzerer DNA-Bereich geschützt wird (Kullik et al., 1995a; Kullik et al., 1995b; Lochowska et al., 2001) und scheint für die Aktivierung oder Repression der Transkription ausschlaggebend zu sein. Abbildung 5 zeigt beispielhaft die Regulation der Transkription durch einen LTTR, der *DNA bending* verursacht.



**Abbildung 5: Schema der Bedeutung von *DNA bending* für die Regulation der Transkription durch LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren.** (1) Jeweils ein LTTR-Dimer ist an die RBS und die ABS gebunden. (2) Proteininteraktionen führen zur Bildung eines Tetramers aus den beiden LTTR-Dimeren und einer Krümmung der DNA. (3) In Abwesenheit des *co-inducers* bindet die RNA-Polymerase zwar an den Promotor, es kommt jedoch nicht zur Aktivierung der Transkription. (4) Durch die Bindung des *co-inducers* kommt es zu einer Strukturänderung im LTTR-Tetramer und die DNA-Krümmung nimmt ab. Dadurch kann das LTTR-Tetramer mit der RNA-Polymerase interagieren und die Transkription wird aktiviert. (Abbildung aus Maddocks und Oyston (2008) übernommen)

Die Autoregulation von LTTRs wurde bisher kaum untersucht. Vermutlich ist die RBS eines benachbarten, divergent transkribierten Genes für die autoregulatorische Funktion verantwortlich. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass LTTR-Dimere ohne *co-inducer* als Autoregulatoren fungieren.

Klassische LysR-Typ-Transkriptionsfaktoren sind in Anwesenheit des *co-inducers* Aktivatoren der Transkription, die eine *co-inducer*-unabhängige negative Autoregulation

aufweisen, wie beispielsweise IlvY aus *E. coli* und *Salmonella spp.* (Blazey und Burns, 1980; Rhee et al., 1999). Ein Beispiel für einen Repressor der Transkription ist CcpC aus *Bacillus subtilis*, wobei es durch die Bindung des *co-inducers* zur Derepression kommt (Jourlin-Castelli et al., 2000; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003). LTTRs können jedoch auch Aktivator- und Repressorfunktion vereinen. GltC aus *Bacillus subtilis* beispielsweise kann in Abhängigkeit von zwei verschiedenen *co-inducern* an verschiedene Promotorbereiche binden und somit als Aktivator oder Repressor fungieren (Belitsky et al., 1995; Bohannon und Sonenshein, 1989; Picossi et al., 2007). Positive Autoregulation kommt zum Beispiel bei LrhA aus *E. coli* vor (Gibson und Silhavy, 1999).

Normalerweise bindet der *co-inducer* direkt an den LTTR, wodurch sich dessen Affinität für die Bindung spezifischer DNA-Sequenzen und/oder die Fähigkeit zum *DNA bending* verändert. Im Fall von GcvA aus *E. coli* jedoch erfolgt dies indirekt. Die Aktivierung der Transkription durch GcvA wird dadurch verhindert, dass es durch das Protein GcvR gebunden wird. Wenn jedoch Glycin an GcvR bindet, dissoziieren die beiden Proteine und GcvA kann als Transkriptionsaktivator wirken (Heil et al., 2002). Auch bei der Regulation von AphB aus *Vibrio cholerae* sind Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert. AphB und ein weiterer Transkriptionsfaktor, AphA, werden beide benötigt, um die Transkription zu aktivieren, wobei die Proteine offenbar direkt interagieren (Kovacikova et al., 2004).

### 1.3.2 Kristallstrukturen von LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren

Da die DBD aufgrund des wHTH-Motivs schwer zu kristallisieren ist und oligomere Proteine mit flexiblen Linkern generell schlecht löslich sind (Smirnova et al., 2004; Verschueren et al., 2001), wurden bisher nur wenige Strukturen von LTTRs in voller Länge röntgenkristallographisch gelöst. Von der C-terminalen Domäne hingegen sind bereits mehrere Kristallstrukturen verfügbar (z.B. CatM und BenM (Clark et al., 2004; Craven et al., 2009), OxyR (Choi et al., 2001; Sainsbury et al., 2010), AmpR (Balcewich et al., 2010), DntR (Smirnova et al., 2004), Cbl (Stec et al., 2004), CysB (Tyrrell et al., 1997; Verschueren et al., 1998)). Die erste Kristallstruktur eines LTTRs in voller Länge war die von CbnR aus *Ralstonia eutropha*. CbnR bildet ein Tetramer aus zwei Dimeren, das vermutlich auch die aktive Spezies darstellt und gut mit einem Funktionmechanismus, in den *DNA bending* involviert ist, vereinbar ist (Muraoka et al., 2003a). In der PDB Datenbank befindet sich eine weitere Struktur eines putativen LTTRs aus einer *structural genomics* Studie. Es handelt sich

um das PA01-Protein aus *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 3fzv). Bei CbnR und dem PA01-Protein liegt eine Art tetramere Ringstruktur vor. TsaR aus *Comamonas testosteroni* zeigt zwar auch eine tetramere Ringstruktur, allerdings ist diese sowohl mit als auch ohne *co-inducer* aufgrund von fehlenden C-terminalen Interaktionen weitaus geöffnet (Monferrer et al., 2010). Die Autoren schlagen ein Modell vor wonach ohne *co-inducer* eine kompakte Ringstruktur vorliegt, die sich durch die *co-inducer*-Bindung öffnet. Der LTTR ArgP aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigt unter Kristallisationsbedingungen und auch in Lösung eine dimere Struktur. Es konnten zwei verschiedene Formen des Dimers beobachtet werden, von denen eine vermutlich in Lösung vorliegt und die andere aktive Oligomere bildet. Die aktive Spezies von ArgP ist höchstwahrscheinlich ein Tetramer (Zhou et al., 2010). Im Gegensatz zu anderen LTTRs bildet CrgA aus *Neisseria meningitidis* unter Kristallisationsbedingungen und in Lösung Oktamere. Die Analyse von CrgA-DNA-Komplexen mit Hilfe von Massenspektrometrie ergab außerdem, dass durch DNA-Bindung eine Spezies von Doppel-Oktameren stabilisiert wird (Sainsbury et al., 2009).

## 1.4 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress werden Bedingungen bezeichnet unter denen sich reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) verstärkt in Zellen ansammeln. ROS sind teilweise reduzierte Sauerstoffspezies, die reaktiver sind als molekularer Sauerstoff selbst. Sie entstehen zwangsläufig als Nebenprodukte der aeroben Atmung (Imlay, 2008). Die Reduktion von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) mit einem Elektron bzw. zwei oder drei Elektronen resultiert jeweils in Superoxid ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und dem Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ) (siehe Abbildung 6).

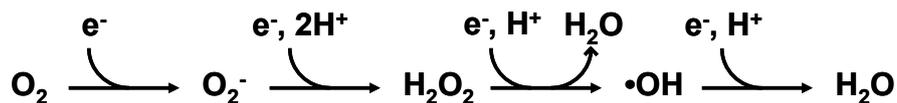


Abbildung 6: Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Reduktion von Sauerstoff.

$O_2^-$  und  $H_2O_2$  entstehen, wenn Elektronen von Elektronentransferenzymen (insbesondere Dehydrogenasen der Atmungskette mit Flavin-Cofaktoren) auf  $O_2$  übertragen werden

(Enzym-Autooxidation) (Messner und Imlay, 1999) und schädigen vor allem Eisen-Schwefel ([Fe-S])-Cluster von Dehydratasen, wodurch Eisen freigesetzt wird (Flint et al., 1993; Jang und Imlay, 2007; Kuo et al., 1987).  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt außerdem zu Cysteinoxidationen und Proteincarbonylierungen (Imlay, 2003). Das sehr kurzlebige und extrem reaktive  $\cdot\text{OH}$  entsteht hauptsächlich als Nebenprodukt der Atmungskette (Korshunov und Imlay, 2006) und durch die sogenannte Fenton-Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Es schädigt DNA und ist daher mutagen (Henle et al., 1999; Imlay et al., 1988). ROS werden jedoch auch durch Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen, wie beispielsweise *Lactobacillus* spp., gebildet, um das Wachstum von anderen Bakterienspezies zu inhibieren (Eschenbach et al., 1989; Zheng et al., 1994). *Mycoplasma pneumoniae* und *Streptococcus pneumoniae* beispielsweise produzieren  $\text{O}_2^-$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um Zellen des Wirtes zu schädigen (Almagor et al., 1984; Duane et al., 1993).  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann außerdem auch durch photochemische Prozesse entstehen sowie, wenn reduzierte Metall- oder Schwefelspezies aus Sedimenten in sauerstoffreiches Wasser gelangen.

## 1.5 Hypochlorige Säure (HOCl)

Eine weitere sehr bakterizide und hochreaktive Sauerstoffspezies ist Hypochlorige Säure (HOCl) (Klebanoff, 1999). HOCl wird in Haushalten und Krankenhäusern als Desinfektionsmittel für Oberflächen eingesetzt und wird auch zur Wasserdesinfektion verwendet. Neutrophile produzieren mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase HOCl, das zusammen mit weiteren reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies beim sogenannten oxidativen Burst Krankheitserreger, die in Phagosomen aufgenommen wurden, abtötet (Winterbourn et al., 2006). Auch Darmepithelzellen von *Drosophila* generieren HOCl, um die Vermehrung von Bakterien einzuschränken (Ha et al., 2005).

HOCl reagiert mit praktisch allen zellulären Makromolekülen, wie DNA, Proteinen und Lipiden, was zu Mutationen, Proteininaktivierungen und Störungen der Membranfunktion führt (Review siehe Davies, 2005; Imlay, 2003). Da Proteine die Hauptkomponente von biologischen Systemen darstellen, sind sie das Hauptziel der reaktiven Sauerstoffspezies. HOCl kann sowohl das Protein-Rückgrat, als auch die Seitenketten der Aminosäuren schädigen, wodurch es zur Inaktivierung, Strukturänderung, Entfaltung, Dimerisierung, Aggregation oder auch Fragmentierung der betroffenen Proteine kommen kann (Review siehe Hawkins et al., 2003). Eine für HOCl spezifische Aminosäuremodifikation ist die Oxidation von Tyrosin zu 3-Chlorotyrosin (Pitt und Spickett, 2008). Am häufigsten reagiert HOCl

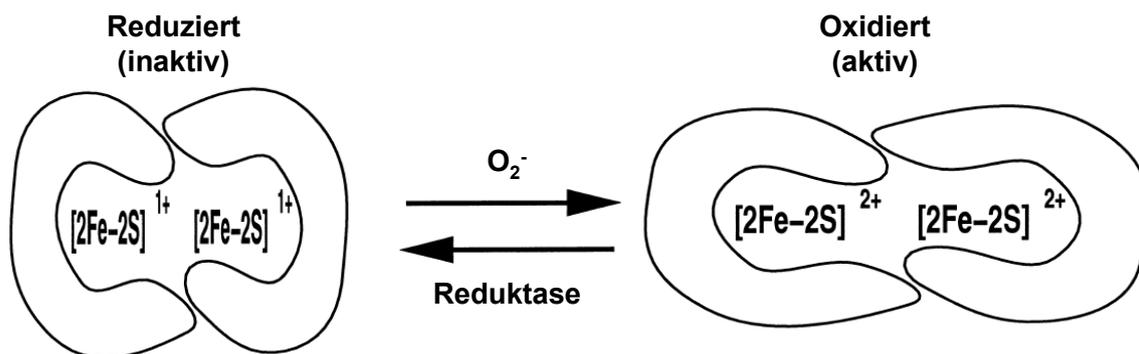
jedoch mit Cystein- und Methioninseitenketten. Bei der Reaktion mit Cysteinresten entstehen vor allem Disulfidbrücken bzw. Sulfen- (SOH), Sulfin- (SO<sub>2</sub>H) oder Sulfonsäuren (SO<sub>3</sub>H). Bis auf die Oxidation zu Sulfin- oder Sulfonsäure sind diese Thiolmodifikationen durch Reduktion reversibel (Kiley und Storz, 2004). *In vivo* geschieht die Reduktion durch Oxidoreduktasen des Thioredoxin- oder des Glutaredoxinsystems (Carmel-Harel und Storz, 2000; Fernandes und Holmgren, 2004). Wenn HOCl mit Methioninresten reagiert, entsteht hauptsächlich Methioninsulfoxid, das selten zu Methioninsulfon weiteroxidiert wird. Die Oxidation zu Methioninsulfoxid ist ebenfalls reversibel und geschieht *in vivo* durch Methioninsulfoxidreduktasen (Etienne et al., 2003; Moskovitz et al., 1999; Moskovitz et al., 2001; Spector et al., 2003; Stadtman et al., 2003; Weissbach et al., 2002). Wie Cysteine können auch Methionine als Antioxidantien fungieren, wenn sie sich an der Proteinoberfläche befinden, oder eine Funktion als Redox-Sensor oder Redox-Regulator besitzen (Review siehe Levine et al., 2000; Vogt, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die zyklische Oxidation eines Methioninrestes die Aktivität eines Kaliumkanals moduliert (Ciorba et al., 1997). Auch Phosphofruktokinase besitzt ein Methionin, das für die Substratbindung wichtig ist und dessen Oxidation vermutlich eine Funktion bei der Regulation der Enzymaktivität hat (Wang et al., 1998). Die Oxidation von Methioninresten von Calmodulin durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu Konformationsänderungen, wobei die Auswirkungen auf dessen funktionelle Aktivität bisher nicht exakt geklärt sind (Erickson et al., 2008; Gao et al., 1998; Yao et al., 1996). Bei der fünften Komponente des humanen Komplementsystems führt die Oxidation von Methioninresten zu einer Aktivierung (Vogt und Hesse, 1994).

## 1.6 Mechanismen der Genregulation unter oxidativem Stress

Bakterien haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu schützen. Für den Schutz vor O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das durch Enzym-Autooxidation gebildet wird, reichen basale Abwehrmechanismen wie der Abbau durch die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) bzw. Katalase und Peroxidasen aus. Wenn jedoch größere Mengen an ROS vorhanden sind, werden zusätzliche Stressantworten induziert. Da O<sub>2</sub><sup>-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress nicht immer zusammen auftreten und verschiedene Auswirkungen haben, existieren unterschiedliche Detektionsmechanismen und Antworten auf die beiden ROS, die durch redox-regulierte Transkriptionsfaktoren vermittelt werden (Review siehe Imlay, 2008; Pomposiello und Demple, 2001; Storz und Spiro, 2010).

### 1.6.1 SoxR

Wenn *E. coli*-Zellen mit Superoxid-induzierenden Substanzen wie Paraquat oder Menadion behandelt werden, wird der für  $O_2^-$ -Stress spezifische Transkriptionsfaktor SoxR aktiviert. SoxR gehört zur MerR-Familie von Transkriptionsaktivatoren und bildet Dimere, von denen jedes Monomer einen [2Fe-2S]-Cluster enthält (Amabile-Cuevas und Demple, 1991; Hidalgo et al., 1995; Wu und Weiss, 1991; Wu et al., 1995).  $O_2^-$  führt zur Oxidation der beiden [2Fe-2S]-Cluster und dadurch zu einer Strukturänderung und zur Initiation der Transkription (Hidalgo et al., 1997). Oxidiertes SoxR aktiviert die Expression des AraC-Typ-Transkriptionsregulators SoxS, der die Transkription der Gene des *soxRS*-Regulons initiiert (Amabile-Cuevas und Demple, 1991; Wu und Weiss, 1991). Der Mechanismus der Aktivierung von SoxR durch  $O_2^-$  ist in Abbildung 7 dargestellt.

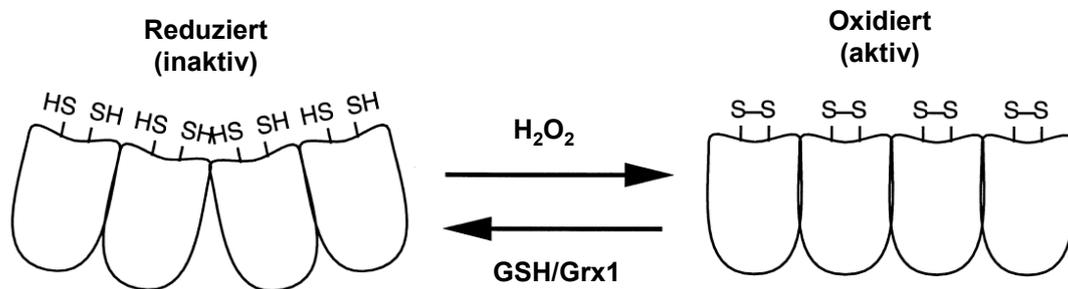


**Abbildung 7: Mechanismus der Aktivierung von SoxR durch  $O_2^-$ .** SoxR bindet sowohl im reduzierten, als auch im oxidierten Zustand an DNA. Durch  $O_2^-$  wird das Fe in den [2Fe-2S]-Clustern oxidiert, wodurch es zu einer Strukturänderung des SoxR-Dimers kommt. Dadurch kann oxidiertes SoxR die Transkription von *soxS* aktivieren. (Abbildung aus Zheng und Storz (2000) adaptiert)

Die Gene des *soxRS*-Regulons bewirken hauptsächlich den Schutz vor Schädigungen durch  $O_2^-$ , die Beseitigung und Regeneration von beschädigten Makromolekülen und die Wiederherstellung des zellulären NADPH-Pools (Blanchard et al., 2007). Zum *soxRS*-Regulon gehören beispielsweise Genprodukte wie Superoxiddismutase, Endonuklease IV, und  $O_2^-$ -resistente Dehydratasen. Wenn der oxidative Stress vorüber ist, wird SoxR durch einen ungeklärten Mechanismus wieder reduziert. Aufgrund der intrinsischen Instabilität von SoxS wird die Stress-Antwort relativ schnell abgeschaltet sobald SoxR reduziert worden ist (Griffith et al., 2004).

## 1.6.2 OxyR

Unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress wird der LTTR OxyR aktiviert, der Tetramere bildet.  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zur Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten (Cys199 und Cys208) der OxyR-Monomere, wodurch es zur Aktivierung kommt (Choi et al., 2001; Storz et al., 1990; Zheng et al., 1998). Oxidiertes OxyR kann an die Promotoren der ca. 20 Gene, die zum *oxyR*-Regulon gehören, binden und durch Interaktion mit RNA-Polymerase die Transkription initiieren (Tao et al., 1993; Zheng et al., 2001). Der Mechanismus der Aktivierung von OxyR durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Mechanismus der Aktivierung von OxyR durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** OxyR bindet sowohl im reduzierten, als auch im oxidierten Zustand an DNA. In Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt es zur Oxidation von Cysteinresten in OxyR, wodurch intramolekulare Disulfidbrücken innerhalb der Untereinheiten des Tetramers gebildet werden. Oxidiertes OxyR aktiviert die Transkription von Genen des *oxyR*-Regulons. (Abbildung aus Zheng und Storz (2000) adaptiert)

Auch die Gene des *oxyR*-Regulons dienen vorrangig dem Schutz vor  $\text{H}_2\text{O}_2$ -verursachten Schäden, der Beseitigung und Regeneration von beschädigten Makromolekülen und der Wiederherstellung des zellulären NADPH-Pools. Zum *oxyR*-Regulon gehören beispielsweise Genprodukte wie Katalase, das Peroxiredoxin AhpC und die Reduktase AhpF sowie das Eisen-bindende Protein Dps, das außerdem eine DNA-schützende Funktion besitzt (Zheng et al., 2001). Auch Gene, die für die Assemblierung von [Fe-S]-Clustern benötigt werden und Mangantransporter werden durch OxyR reguliert (Kehres et al., 2002; Outten et al., 2004). Die Reduktion und Inaktivierung von OxyR erfolgt *in vivo* durch das Glutathion-Glutaredoxin-1-System (GSH/Grx1-System, Aslund et al., 1999). Da sowohl Glutaredoxin als auch Glutathion-Reduktase zum *oxyR*-Regulon gehören, besitzt das System autoregulatorische Eigenschaften.

### 1.6.3 Weitere redox-regulierte Transkriptionsfaktoren

Es existieren zahlreiche weitere redox-regulierte Transkriptionsfaktoren, die reaktive Sauerstoffspezies oder auch Thioloxydation wahrnehmen.

In gram-positiven Bakterien reguliert PerR, ein Mitglied der Fur-Familie, die Antwort auf Peroxid-Stress. Der Transkriptionsfaktor wurde erstmals in *Bacillus subtilis* charakterisiert, wo er als Repressor von Genen wie Katalase, einer Alkylhydroperoxid-Reduktase und eines Dps-Homologen fungiert, die OxyR-regulierten Genen ähneln (Bsat et al., 1998; Storz und Spiro, 2010). Der Sensormechanismus für die Detektion von Peroxiden durch PerR funktioniert jedoch über die Eisen-katalysierte Oxidation eines Histidinrests und die daraus resultierende Inaktivierung von PerR (Lee und Helmann, 2006).

Ebenfalls in *Bacillus subtilis* reguliert OhrR, ein Mitglieder der MarR-Familie von Transkriptionsregulatoren, die Antwort auf organische Hydroperoxide. Der Transkriptionsfaktor reprimiert die Transkription der Reduktase für organische Hydroperoxide, Ohr (Fuangthong und Helmann, 2002). Durch die Oxidation eines Cysteinrestes zu einem gemischten Disulfid oder einem Proteinsulfenamid wird der Repressor inaktiviert, so dass Ohr exprimiert werden kann (Lee et al., 2007).

Auch die MarR-Transkriptionsfaktoren SarZ und MgrA aus *Staphylococcus aureus* sind redox-sensitiv (Chen et al., 2006; Chen et al., 2009).

Yap1 aus *Saccharomyces cerevisiae* vermittelt wie OxyR Resistenz gegen  $H_2O_2$  (Lee et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor ist jedoch nur aktiv, wenn er sich im Nukleus und nicht im Cytoplasma befindet. Die Signalsequenz für den Import in den Nukleus befindet sich am N-terminus, während die Signalsequenz für den Export aus dem Nukleus (*nuclear export sequence*, NES) am C-Terminus lokalisiert ist.  $H_2O_2$  führt zur Bildung einer Disulfidbrücke in Yap1, die die NES maskiert, was dazu führt, dass das Protein im Nukleus akkumuliert, wo es die Transkription initiieren kann (Kuge et al., 2001; Wood et al., 2004). Yap1 wird jedoch nicht direkt durch  $H_2O_2$  sondern durch ein weiteres Protein, die Glutathion-Peroxidase Gpx3, oxidiert, das als Sensor und Transducer fungiert (Delaunay et al., 2002). Wenn Gpx3 durch  $H_2O_2$  oxidiert wird, wird eine Disulfidbrücke mit einem Cysteinrest von Yap1 gebildet. Diese wird anschließend in eine intramolekulare Disulfidbrücke in Yap1 umgewandelt, wodurch die NES maskiert wird und der Regulator im Nukleus akkumuliert. Sowohl der Sensor, als auch der Regulator werden durch Thioredoxin reduziert, um die Antwort abzuschalten (Delaunay et al., 2002).

### 1.6.4 Weitere redox-regulierte Proteine

Nicht nur Transkriptionsfaktoren, sondern auch zahlreiche andere Proteine sind redox-reguliert.

Der Anti-Sigmafaktor RsrA aus *Streptomyces coelicolor* besitzt drei Cysteinreste, die im reduzierten Zustand, in dem das Protein  $\sigma^R$  bindet, ein  $Zn^{2+}$ -Ion koordinieren (Paget und Buttner, 2003). Thiol-Stress führt dazu, dass eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen ausgebildet wird, wodurch  $Zn^{2+}$  freigesetzt wird und das Protein eine Konformation annimmt, die  $\sigma^R$  nicht mehr binden kann (Bae et al., 2004; Li et al., 2003).

Ein weiterer Transkriptionsregulator unter Thiol-Stress ist Spx aus *Bacillus subtilis*, das in seiner aktivierten Form nicht an DNA, sondern an die  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase bindet (Zuber, 2009). Spx wird durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten aktiviert (Nakano et al., 2005).

Das redox-regulierte, ATP-unabhängige Chaperon Hsp33 wird unter oxidativem Stress bei hohen Temperaturen oder unter HOCl-Stress aktiviert, wodurch die Aggregation von entfaltenen Proteinen verhindert wird (Winter et al., 2005; Winter et al., 2008). Hsp33 besitzt vier konservierte Cysteine, die ein  $Zn^{2+}$ -Ion komplexieren (Jakob et al., 2000). Die Oxidation der vier Cysteinreste zu zwei Disulfidbrücken führt dazu, dass  $Zn^{2+}$  freigesetzt wird und Hsp33 eine nativ-ungefaltete Konformation annimmt, die Dimere bildet und entfaltete Proteine binden kann (Graf et al., 2004; Ilbert et al., 2007). Die Reduktion von Hsp33 erfolgt *in vivo* durch das Glutaredoxin- und das Thioredoxin-System (Hoffmann et al., 2004).

## 1.7 Identifikation von YjiE als HOCl-Resistenz vermittelnden Transkriptionsfaktor

Um Gene zu identifizieren, die bei Überexpression in *E. coli*-Zellen eine erhöhte Lebensfähigkeit unter HOCl-Stress vermitteln, wurde ein *Screen* durchgeführt (siehe Barth et al., 2009). Dazu wurde eine Plasmidbibliothek mit Fragmenten des *E. coli*-Genoms in *multi copy* Plasmiden (*genomic overexpression library*) in einen *E. coli*  $\Delta rpoH$ -Stamm (BB7224) transformiert. Diesem Stamm fehlt der alternative Sigmafaktor  $\sigma^{32}$ , weshalb keine Hitzeschock-Antwort möglich ist, was die Zellen empfindlicher gegenüber Bedingungen macht unter denen es zur Aggregation von Proteinen kommt. Um die Plasmidbibliothek zu

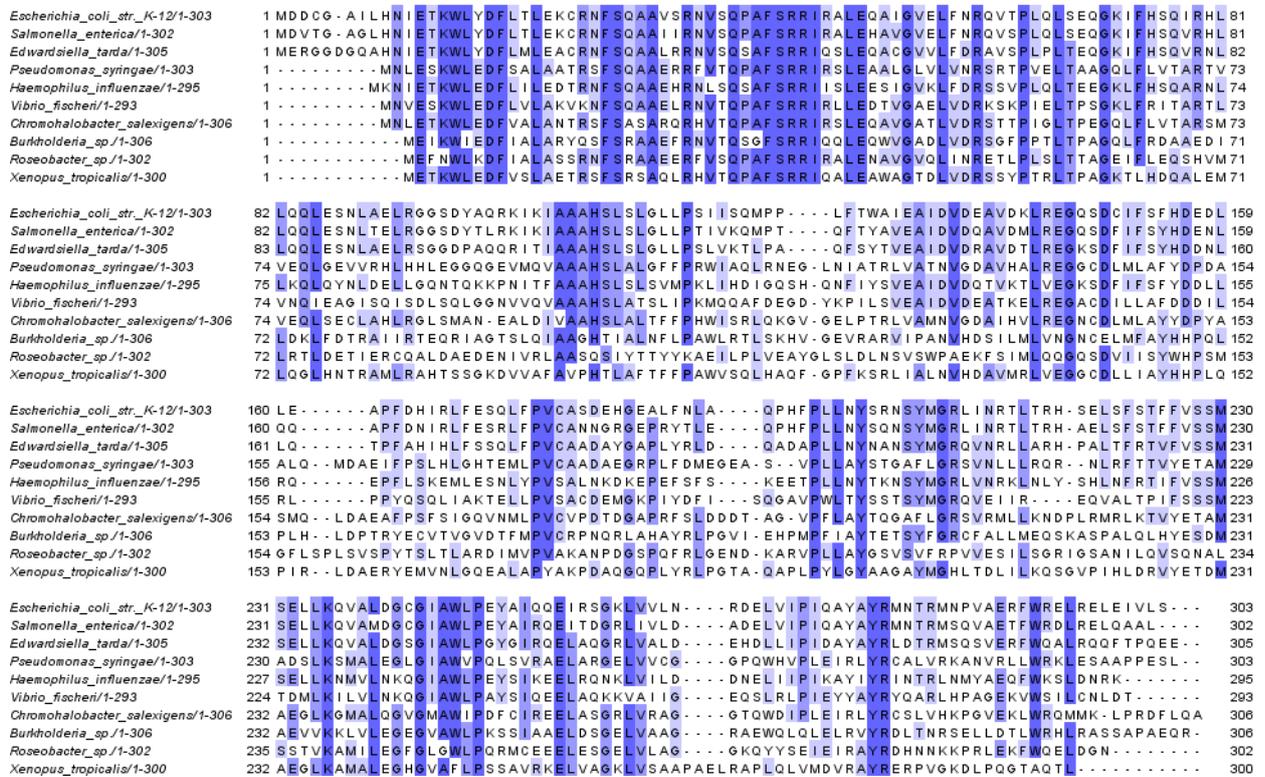
erstellen, wurde genomische DNA von MG1655  $\Delta hsp33$ -Zellen partiell mit Sau3AI verdaut und aus einem Agarosegel aufgereinigte Fragmente mit einer Größe zwischen 1 kb und 8 kb in BamHI-verdauten pUC18-Vektor kloniert. Nach der Ligation wurde zunächst in XL1-Blue MRF'-Zellen transformiert, auf Ampicillin-Platten selektiert und anschließend eine Plasmidisolierung mit den vereinigten transformierten Zellen durchgeführt. Die daraufhin mit der isolierten Plasmidbibliothek transformierten  $\Delta rpoH$ -Zellen wurden zur Selektion von resistenten Klonen auf Agarplatten mit 5 mM HOCl bei 43°C inkubiert. Auf diese Weise wurde von Dr. Jeannette Winter ein Klon identifiziert, der ein Plasmid mit einem DNA-Fragment mit Teilen der Gene *iraD* und *iadaA* und dem Gen *yjiE* als Insert enthielt. Das Plasmid wurde in  $\Delta rpoH$ -Zellen retransformiert, um sicherzustellen, dass die Resistenz Plasmid-vermittelt war. Die retransformierten Zellen besaßen im Vergleich zu  $\Delta rpoH$ -Zellen mit pUC18 ohne Insert eine 150-fach erhöhte Lebensfähigkeit in LB-Medium mit 5 mM HOCl. Es ist wahrscheinlich, dass *yjiE* die beobachtete Resistenz gegen HOCl-Stress vermittelt, da es das einzige im Insert des Plasmides komplett vorhandene Gen ist. Das Protein YjiE konnte durch Homologie als LTTR identifiziert werden. YjiE ist in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien sowie in Eukaryoten (*Xenopus tropicalis*) konserviert. Abbildung 9 zeigt ein von Yan Le erstelltes Alignment der Aminosäuresequenzen von YjiE aus verschiedenen Spezies. Vor allem die N-terminale DNA-bindende Domäne besitzt viele stark konservierte Aminosäuren, aber auch in der C-terminalen regulatorischen Domäne kommen einige konservierte Aminosäuren vor.

## 1.8 Zielstellung

Die bakterielle Stressantwort auf  $O_2^-$ - und  $H_2O_2$  durch SoxR bzw. OxyR ist bereits gut charakterisiert. Im Gegensatz dazu wurde bis jetzt noch kein HOCl-spezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert und bakterielle Schutzmechanismen gegen HOCl-verursachte Schäden wurden kaum untersucht. Dies ist erstaunlich, da HOCl physiologische Bedeutung für die Abtötung von Bakterien durch Neutrophile oder Darmepithelzellen besitzt. Bisherige Genexpressions- und Proteomstudien weisen darauf hin, dass HOCl die Hitzeschock- und die SoxR-Antwort induziert (Dukan et al., 1996; Wang et al., 2009).

Da die Überexpression von YjiE eine HOCl-Resistenz vermittelt, sollte untersucht werden wie dies geschieht. Dazu sollte YjiE biochemisch hinsichtlich seiner DNA-Bindung, seiner Oligomerisierung und potentiellen oxidativen Modifikationen analysiert werden. Zudem sollte

der Einfluß von YjiE auf *E. coli*-Zellen unter HOCl-Stress detailliert untersucht werden. Dadurch sollte geklärt werden wie der Transkriptionsfaktor die Resistenz gegen HOCl-Stress vermittelt.



**Abbildung 9:** Alignment der Aminosäuresequenzen von YjiE aus 10 repräsentativen Spezies. Konservierte Aminosäuren sind blau markiert und der Grad der Konservierung ist proportional zur Farbintensität dargestellt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMS)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Acrylamid (38% mit 2% Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agar-Agar	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Arabinose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DL-Arginin	Acros Organics (Geel, Belgien)
Bacto Trypton	Becton Dickinson (Sparks, USA)
CHAPS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloramphenicol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau S	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Spektroskopie	Merck (Darmstadt, Deutschland)
5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidium bromide	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GSSG (oxidiertes Glutathion)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Harnstoff für biochemische Zwecke	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Imidazol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium (Lennox), Powder	Serva (Heidelberg, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PEG-Maleimid (Sunbright ME-050MA)	NOF (Tokyo, Japan)
Pharmalyte 3 – 10	GE Healthcare
	(Amersham, UK)
Selenomethionin	Calbiochem
	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Serdolit MB-1	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Sodium hypochlorite solution, reagent grade, available chlorine 10-15 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protease Inhibitor Mix HP	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Serva Blau G-250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Serva Blau R-250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trifluoressigsäure (TFA), for spectroscopy	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), hydrochloride solution pH 7,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween20 Detergent, molecular biology grade	Calbiochem
	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid, 30 wt. % in H <sub>2</sub> O, ACS reagent	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xylencyanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) und besaßen, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A.. Alle Lösungen und Puffer wurden mit quartzbidestilliertem Wasser oder Reinstwasser aus einem TKA-GenPure Wasseraufbereitungssystem hergestellt.

## 2.1.2 Proteine und Antikörper

### Antikörper

polyklonales Serum (Kaninchen) gegen YjiE (von Petra Menhorn gereinigt)	Pineda Antikörper-Service (Berlin, Deutschland)
Monoklonales anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat (aus Ziege)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Monoklonaler anti-polyHistidin-Antikörper (aus Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Monoklonales anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (aus Schaf)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### Enzyme

BamHI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Catalase Suspension	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNase I from bovine pancreas, grade II (Pulver)	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>E. coli</i> RNA Polymerase Holoenzym	Epicentre Biotechnologies (Madison, USA)
Expand High Fidelity Polymerase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Go-Taq Polymerase	Promega (Madison, USA)
HindIII	New England Biolabs (Ipswich, USA)
M-MLV Reverse-Transkriptase	Invitrogen (Carlsbad, USA)
NdeI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4 DNA Ligase	Promega (Madison, USA)
Thrombin, bovine, high activity	Calbiochem (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Trypsin, sequencing grade modified	Promega (Madison, USA)

### Weitere Proteine

BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GroEL	Anja Osterauer
$\alpha$ B-Crystallin	Jirka Peschek

## 2.1.3 Sonstige Materialien

### Standards

Kit for Molecular Weights 12,000-200,000 (HPLC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mark12 unstained standard	Invitrogen (Carlsbad, USA)
peqGOLD 1 kb Leiter Orange G	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Roti-Mark prestained	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

### Kits

ECL plus Western Blotting Detektionssystem	GE Healthcare (Amersham, UK)
Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Thermo Scientific, Waltham, USA)
TA cloning kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
with OneShot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	
Wizard Plus SV Minipreps Kit	Promega (Madison, USA)
Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up Kit	Promega (Madison, USA)

### Chromatographiesäulen

HisTrap FF (5ml)	GE Healthcare (Amersham, UK)
HiTrap Q FF (5ml)	GE Healthcare (Amersham, UK)
Superdex 75 prep grade	GE Healthcare (Amersham, UK)
Superose 6 10/30 GL	GE Healthcare (Amersham, UK)

### Filtrations-, Konzentrations- und Dialyse- bzw. Entsalzungseinheiten

Amicon Ultra-4 (10000 MWCO) filter units	Millipore (Billerica, USA)
Amicon Ultra-15 (10000 MWCO) filter units	Millipore (Billerica, USA)
Slide-A-Lyzer Dialysenkassetten	Pierce (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Protein-Entsalzungssäulchen (protein desalating spin columns)	Pierce (Thermo Scientific, Waltham, USA)

PD-10 Ensatzungssäulchen  
 Spritzenfilter (0,22 µm)  
 Cellulose Acetat Filter (0,45µm)

GE Healthcare (Amersham, UK)  
 Millipore (Billerica, USA)  
 Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland)

#### Küvetten

Plastik-Halbmikroküvetten  
 Fluoreszenz-Küvette 105.250-QS  
 Fluoreszenz-Küvette 119-004F-QS (rührbar)  
 Absorptions-Küvette 110-1-40-QS (1mm)  
 Gene Pulser® Küvetten (0,1 cm)

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)  
 Hellma (Müllheim, Germany)  
 Hellma (Müllheim, Germany)  
 Hellma (Müllheim, Germany)  
 Bio-Rad (München, Deutschland)

#### Reaktionsgefäße, Mikrotiterplatten und Petrischalen

PE-Röhrchen (50ml, 15ml)  
 Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml, 0,5ml)  
 Kryoröhrchen (1,5 ml)  
 PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)  
 Sterile Mikrotiterplatten (96 well)  
 Petrischalen aus Polystyrol, 94mm  
 Petrischalen 120x120x16 mm

Greiner&Söhne (Nürtingen, Deutschland)  
 nerbe plus (Winsen/Luhe, Deutschland)  
 Nalgene (Roskilde, Dänemark)  
 Ratiolab (Dreieich, Deutschland)  
 Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)  
 Greiner&Söhne (Nürtingen, Deutschland)  
 nerbe plus (Winsen/Luhe, Deutschland)

#### Gele und WesternBlot-Materialien

Imobiline DryStrip pH 4 – 7, 24 cm  
 6 % TBE Gele (1 mm)  
 14 % Tris/Glycin Gele (1 mm)  
 16 % Tricin Gele (1 mm)  
 SERVAGel Neutral pH 7.4  
 SERVAGel™ Neutral pH 7.4 Gradient  
 Immobilon-P (PVDF) Membran  
 Filterpapier  
 Röntgenfilme X-OMAT™ AR

GE Healthcare (Amersham, UK)  
 Invitrogen (Carlsbad, USA)  
 Invitrogen (Carlsbad, USA)  
 Invitrogen (Carlsbad, USA)  
 Serva (Heidelberg, Deutschland)  
 Serva (Heidelberg, Deutschland)  
 Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
 Whatman (Maidstone, UK)  
 Eastman Kodak (Rochester, USA)

#### Kristallisationsmaterialien

96-well Kristallisationsplatten (3-Loch)

Linbro SuperClear pregreased 24 Platten  
 Kristallisations Screens

Cryo Loops

Art Robbins Instruments  
 Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland)  
 Jena Bioscience (Jena, Deutschland)  
 Hampton Research  
 VWR (Ismaning, Deutschland)  
 Hampton Research  
 VWR (Ismaning, Deutschland)

## 2.1.4 Geräte

#### Circulardichroismus-Spektropolarimeter

Jasco J-715  
 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit  
 Jasco J-710  
 mit PFD-350S Peltier Temperiereinheit

Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)

Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)

#### Fluoreszenzspektrometer

FluoroMax-4  
 Jasco FP-6500

HORIBA Jobin Yvon (Unterhaching, Deutschland)  
 Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)

#### UV-VIS-Spektrophotometer

Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer  
 Novaspec II Spectrophotometer

PEQLAB (Erlangen, Deutschland)  
 Pharmacia (Uppsala, Schweden)

#### Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

XCell SureLock Mini Cell  
 BlueVertical™ Mini Slab Gel System BV 102  
 Fast Blot Apparatur B44

Invitrogen (Carlsbad, USA)  
 Serva (Heidelberg, Deutschland)  
 Biometra (Göttingen, Deutschland)

45-2020 Gelelektrophoreseeinheit (Agarosegele)  
Ettan Dalt II  
IPGphor

PEQLAB (Erlangen, Deutschland)  
GE Healthcare (Amersham, UK)  
GE Healthcare (Amersham, UK)

### Spannungsquellen

EPS 3500, 301, 601 und 1001

GE Healthcare (Amersham, UK)

### Waagen

Analysenwaage BP 121 S  
Laborwaage 1601 004  
Halbmikrowaagen BL 310 und BL 1500S

Sartorius (Göttingen, Deutschland)  
Sartorius (Göttingen, Deutschland)  
Sartorius (Göttingen, Deutschland)

### Zentrifugen

Coulter Optima XL-A  
mit Fluoreszenz-Optik  
Avanti J26XP (JA-10/25 rotor)  
Fresco17  
Mikro20  
Universal 16R  
Univapo 150 H Vakuumkonzentrator

Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)  
Aviv (Lakewood, USA)  
Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)  
Heraeus (Thermo Scientific, Waltham, USA)  
Hettich (Tuttlingen, Deutschland)  
Hettich (Tuttlingen, Deutschland)  
UniEquip (Martinsried, Deutschland)

### Chromatographieranlagen

ÄKTA-FPLC System  
mit Fraktionskollektor Frac900  
Shimadzu HPLC Chromatographieranlage LC-20AT  
mit Entgaser DGU-20A3, UV/VIS Detektor SPD20-A,  
Fluoreszenzdetektor RF-10AXL, Autosampler SIL-20AT  
und Fraktionskollektor FRC-10A

GE Healthcare (Amersham, UK)

Shimadzu (Düsburg, Deutschland)

### Inkubatoren

Thermostat Plus  
Thermomixer comfort  
Thermoblock TB1  
Schüttelinkubator Unimax1010 mit Inkubator1000  
Schüttelinkubator Certomat BS1

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Biometra (Göttingen, Deutschland)  
Heidolph (Schwabach, Deutschland)  
Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland)

### Geldokumentationssysteme

ImageQuant 300  
Typhoon 9200

GE Healthcare (Amersham, UK)  
Amersham Biosciences  
GE Healthcare (Amersham, UK)

### Weitere Geräte

PCR Thermocycler Primus 25  
Gene Pulser Xcell Elektroporationsgerät  
Constant Cell Disruption System Basic Z  
Kodak Biomax WesternBlot-Kassette  
Optimax TR Entwicklermaschine  
Phoenix Mikrodispenser  
  
Desktop Autosealer  
pH-Meter Multical pH 538  
SANOclav Autoklav  
  
Eismaschine  
Magnetrührer RCT basic  
MS2 Minishaker (Vortexer)  
Sonorex RK100H Ultraschall-Bad  
-80°C-Schrank U725 Innova  
  
TKA-GenPure Wasseraufbereitungssystem  
Massenspektrometer Ultraflex I MALDI ToF/ToF  
JEOL JEM 100CX Elektronenmikroskop

PEQLAB (Erlangen, Deutschland)  
Bio-Rad (München, Deutschland)  
Constant Systems (Northants, UK)  
Sigma (St. Louis, USA)  
MS Laborgerät (Heidelberg, Deutschland)  
Art Robbins Instruments  
Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland)  
HJ-Bioanalytik (Mönchengladbach, Deutschland)  
WTW (Weilheim, Deutschland)  
Adolf Wolf (Bad Überkingen – Hausen,  
Deutschland)  
Ziegra (Isernhagen, Deutschland)  
IKA Werke (Staufen, Deutschland)  
IKA Werke (Staufen, Deutschland)  
Bandelin (Berlin, Deutschland)  
New Brunswick Scientific  
(Nürtingen, Deutschland)  
TKA (Niederelbert, Deutschland)  
Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland)  
JEOL Ltd. (Tokyo, Japan)

## 2.1.5 Programme

Adobe Photoshop 9.0  
 Adobe Reader 7.0  
 Microsoft Office 2007  
 Origin 8.0  
 Reference Manager 10  
 LC Solution  
 FluorEssence

Spectra Manager 1  
 Image Quant TL

Adobe Inc (San Jose, USA)  
 Adobe Inc (San Jose, USA)  
 Microsoft (Redmon, USA)  
 Originlab (Northhampton, USA)  
 ISI ResearchSoft (Berkley, USA)  
 Shimadzu (Düsbürg, Deutschland)  
 HORIBA Jobin Yvon  
 (Unterhaching, Deutschland)  
 Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland)  
 GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

## 2.1.6 Oligonukleotide

**Tabelle 1:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

name	Sequence 5' → 3'
D1-Fw deletion <i>yjiE</i>	gacagagtaaacgtaatggatgactgtggtgtgtaggctggagctgcttc
D2-Rv deletion <i>yjiE</i>	cgacgctggagaatgtcagctaagcacaatcatatgaatcctccttag
E1-Fw <i>yjiE</i>	ggaattccatatggatgactgtggtgcgattttg
E2-Fw prom- <i>yjiE</i>	ggaattccatatgcgaaattctgccaggcaatgatg
E8-Rv <i>yjiE</i>	cccaagctggatcctcagctaagcacaatctccagctc
E10-Rv Histag <i>yjiE</i>	cccaagctggatcctcagtgatggtgatggtgatggctaagcacaatctccagctc
I1-350bp- <i>E</i> -pr-fw	gaactcgagagggaatttaaccatcctcg
I2-500bp- <i>iadA</i> -fw	gaactcgagcaccgttctgccgaccgg
I3- <i>E</i> -atg-rv	gaaggatcctacgtttactctgtcagcc
I4- <i>osmY</i> -NTR-fw	gaactcgaggaattcccggggtccttc
I5- <i>osmY</i> -NTR-rev	gaaggatcccattttcctgtatgtttg
pBAD-FP	atgccatagcatttttatcc
pBAD-RP	tcagaccgcttctgcttct
T7	taatacgactcactataggg
M13-FP	tgtaaacgacggccagt
M13-RP	caggaaacagctatgacc
pET-RP	ctagttattgctcagcgg
Ctr1-Fw	cgaaattctgccaggcaatgatgc
Ctr2-Rv	gagctggtattgccgtcagctgcg
C1	ttatacgcaaggcgacaagg
100bp- <i>yjiE</i> -pr-fw	cccgaatggacgtagaatgc
Fw-158bp- <i>E</i> -Prom	gacggcaaacgctgctgaa
KG-974bp- <i>iadA</i> = AF488-974bp- <i>iadA</i>	cagcgatgcctgcgcccgtc
KG-600bp- <i>iadA</i>	cacatggcgacagtaaaaag
KG-50bp-RK- <i>yjiE</i> = AF488-50bp- <i>yjiE</i> -rk	cataaagccatttggttcaat
AF488- <i>tufA</i> -fw	gtgtctaagaaaaattgaacg
<i>tufA</i> -102bp-rv	gtgtctaagaaaaattgaacg
<i>tufA</i> -158bp-rv	ggtggtgattgcagcggtc
<i>tufA</i> -315bp-rv	gcgttatcgatctggtcgaatg
= AF488- <i>tufA</i> -315-rv	taccaggatcg gccgtc





**Zusammensetzung Aminosäure-Lösung**

Je 0,5 g/l aller L-Aminosäuren außer Methionin wurden in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,5 mM KCl pH 7,0 gelöst. Die Lösung wurde 1 Stunde gerührt und anschließend bei -20°C gelagert. Ungelöste Aminosäurepartikel wurden durch das Sterilfiltrieren direkt vor der Zugabe zum Medium entfernt. Alle verwendeten Aminosäuren stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar-Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf eine Temperatur unter 50°C abgekühlt und erst dann eventuell ein Antibiotikum zugefügt. Anschließend wurden die Platten gegossen und nach dem Festwerden bei 4°C gelagert.

Für Top-Agar wurden dem LB-Medium 7,5 g/l Agar-Agar zugefügt und nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 50°C 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 5 mM CaCl<sub>2</sub> zugegeben.

*2.1.9.2 Antibiotika-Stammlösungen*

Ampicillin-Stammlösung: 200 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
Kanamycin-Stammlösung: 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
Chloramphenicol-Stammlösung: 35 mg/ml in Ethanol

Antibiotika wurden bei -20°C gelagert und, wenn nicht anders vermerkt, dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

*2.1.9.3 Puffer für molekularbiologische Methoden*

50x TAE-Puffer: 2 M Tris/Acetat  
50 mM EDTA  
mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt

DNA-Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin  
0,025 % (w/v) Xylencyanol  
0,025 % (w/v) Bromphenolblau

10x TBE-Puffer: 0,89 M Tris  
0,02 M EDTA  
0,89 M Borsäure

EMSA-Auftragspuffer: 40 mM Tris pH 8,4  
4 mM EDTA  
0,2 % (w/v) Bromophenolblau  
25 % (v/v) Glycerin

#### 2.1.9.4 Puffer für proteinanalytische Methoden

5x Lämmli-Auftragspuffer: 300 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 % (w/v) SDS  
50 % (v/v) Glycerin  
0,05 % (w/v) Bromphenolblau  
5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

10x SDS-Laufpuffer: 250 mM Tris pH 8,8  
2 M Glycin  
1% (w/v) SDS

10x Tricin-Kathoden-Puffer: 1 M Tris pH 8,25  
1 M Tricin  
1 % (w/v) SDS

10x Tricin-Anoden-Puffer: 1 M Tris pH 8,9

Fairbanks A: 25 % (v/v) Isopropanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
0,05 % (w/v) Serva Blau R-250

Fairbanks D: 10 % (v/v) Essigsäure

Geltrocknungs-Puffer: 35 % (v/v) Ethanol  
2 % (v/v) Glycerin

10x PBS-Puffer : 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4  
(*phosphate buffered saline*) 160 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
1,15 M NaCl

PBS-T Puffer : 1x PBS Puffer  
0,1 % (v/v) Tween20

WesternBlot-Inkubationspuffer: 48 mM Tris pH 7,5  
39 mM Glycin  
0,37 % SDS  
20 % (v/v) Methanol

### 2.1.9.5 Puffer für präparative Methoden

Zellaufschluss-Puffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
HisTrap Puffer A:	50 mM Tris pH 7,5 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
HisTrap Puffer B:	50 mM Tris pH 7,5 300 mM NaCl 750 mM Imidazol
Verdünnungs-Puffer:	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 5 mM EDTA
Q-Sepharose Puffer A:	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5
Q-Sepharose Puffer B:	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 600 mM NaCl
Gelfiltrations-Puffer 1	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 400 mM NaCl
Gelfiltrations-Puffer 2	10 mM Tris pH 7,5 300 mM NaCl
Gelfiltrations-Puffer 3	10 mM Tris pH 7,5 400 mM NaCl
HPLC-Puffer 1:	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 150 mM NaCl
HPLC-Puffer 2:	40 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl

### 2.1.9.6 Weitere Puffer

YjiE storage buffer:	9,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 380 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin
DNA-Bindepuffer 1:	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 150 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin



### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um gezielt bestimmte DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) eingesetzt. Hierbei wird im Verlauf wiederholter Temperaturzyklen ein zwischen zwei Oligonukleotiden (Primern) liegender DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt. Die Zyklen, die jeweils 35mal wiederholt wurden, bestehen aus folgenden Schritten: (i) DNA-Denaturierung, (ii) Primer-Anlagerung (Annealing) und (iii) Primer-Verlängerung (Extension). Abschließend wird die Primer-Extension um 5 bis 10 min verlängert, damit eventuell unvollständige Produkte fertig synthetisiert werden können. In dieser Arbeit wurden GoTaq-Polymerase (Promega, ~ 1 kb/min) oder für längere DNA-Fragmente Expand-High-Fidelity-Polymerase (Roche, ~ 1,5 kb/min) oder die wesentlich schnellere Phusion DNA-Polymerase (NEB, 1 kb/ 15-30 sec) jeweils in Kombination mit dem mitgelieferten Puffern nach Anweisungen des jeweiligen Herstellers eingesetzt. Die letzten beiden Polymerasen besitzen eine *proof-reading*-Aktivität, die es möglich macht Fehler bei der Synthese zu reparieren. Die Annealing-Temperatur und die Synthesezeit wurden entsprechend der eingesetzten Primer und der Länge des zu amplifizierenden Produkts je nach Polymerase variiert. Bei Primern mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme und Überhängen, wurden zunächst einige Zyklen mit einer niedrigeren Annealing-Temperatur durchgeführt, da zunächst nicht der ganze Primer an das zu amplifizierende Gen annealt. Danach wurde der Annealing-Schritt ausgelassen und die Extensions-Zeit verlängert, da die Annealing-Temperatur über der Extensions-Temperatur liegt sobald einige Fragmente mit Schnittstellen vorliegen und der komplette Primer annealen kann. Alle Primer wurden von MWG Eurofins Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Um fluoreszenzgelabelte DNA-Fragmente zu erhalten wurden ein oder zwei 5'-AlexaFluor488 (AF488)-gelabelte Primer eingesetzt. Die Reaktionen wurden in ultradünnen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

#### **Standard-PCR-Zusammensetzung:**

5 µl 10x oder 10 µl 5x PCR-Puffer  
1 µl genomische DNA  
1 µl dNTPs (jeweils 10 mM)  
1 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)  
1 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)  
0,5 µl DMSO oder 1,5 µl DMSO (Phusion)  
1 µl Expand High Fidelity oder 0,25 µl Go Taq oder 0,4 µl Phusion Polymerase  
... µl H<sub>2</sub>O  
50 µl

**Tabelle 4:** Primer für verschiedene PCR-Fragmente

DNA-Fragment	Forward Primer	Reverse Primer
<i>yjiE</i>	E1-Fw <i>yjiE</i>	E8-Rv <i>yjiE</i>
prom- <i>yjiE</i>	E2-Fw prom- <i>yjiE</i>	E8-Rv <i>yjiE</i>
His-T- <i>yjiE</i>	E1-Fw <i>yjiE</i>	E8-Rv <i>yjiE</i>
295bp- <i>osmY</i> -NTR	I4- <i>osmY</i> -NTR-fw	I5- <i>osmY</i> -NTR-rev
350bp- <i>yjiE</i> -prom	I1-350bp- <i>E</i> -pr-fw	I3- <i>E</i> -atg-rv
737bp- <i>yjiE</i> -prom	I2-500bp- <i>iadA</i> -fw	I3- <i>E</i> -atg-rv
102bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	100bp- <i>yjiE</i> -pr-fw	KG-50bp-RK- <i>yjiE</i> oder AF488-50bp- <i>yjiE</i> -rk
158bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	Fw-158bp- <i>E</i> -Prom	KG-50bp-RK- <i>yjiE</i> oder AF488-50bp- <i>yjiE</i> -rk
315bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	KG-974bp- <i>iadA</i> oder AF488-974bp- <i>iadA</i>	KG-50bp-RK- <i>yjiE</i> oder AF488-50bp- <i>yjiE</i> -rk
689bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	KG-600bp- <i>iadA</i>	KG-50bp-RK- <i>yjiE</i> oder AF488-50bp- <i>yjiE</i> -rk
102bp- <i>tufA</i> -DNA	AF488- <i>tufA</i> -fw oder = AF488- <i>tufA</i> -fw	<i>tufA</i> -102bp-rv
158bp- <i>tufA</i> -DNA	AF488- <i>tufA</i> -fw oder = AF488- <i>tufA</i> -fw	<i>tufA</i> -158bp-rv
315bp- <i>tufA</i> -DNA	AF488- <i>tufA</i> -fw oder = AF488- <i>tufA</i> -fw	<i>tufA</i> -315bp-rv oder AF488- <i>tufA</i> -315-rv

**Beispiele für Thermocycler-Programme:****Expand High Fidelity**

95°C 2 min  
 95°C 30 sec } 5x  
 50°C 30 sec }  
 72°C 1 min }  
 95°C 30 sec } 30x  
 72°C 2 min }  
 72°C 10 min  
 4°C forever

**Phusion**

98°C 30 sec  
 98°C 10 sec } 5x  
 50°C 20 sec }  
 72°C 20 sec }  
 98°C 10 sec } 30x  
 72°C 30 sec }  
 72°C 10 min  
 4°C forever

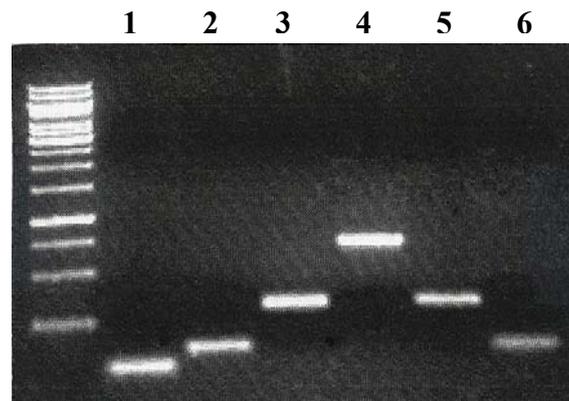
**GoTaq**

95°C 2 min  
 95°C 30 sec } 5x  
 50°C 30 sec }  
 72°C 20 sec }  
 72°C 5 min  
 4°C forever

**2.2.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese**

Der Erfolg von PCR-Reaktionen oder analytischen Verdauen wurde auf 1%igen Agarosegelen überprüft. Dafür wurde 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und dadurch gelöst. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur unter 60°C wurden ca. 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in einen entsprechenden Schlitten für die

Laufapparatur mit einem Kamm für die Taschen gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren des Agarosegels wurden die zuvor mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzten Proben aufgetragen und die Elektrophorese in 1x TAE-Puffer bei 120 mA durchgeführt. Als Längenstandard diente eine 1 kb DNA-Leiter von Peqlab. Das Ergebnis wurde mit UV-Licht mit einem ImageQuant 300 Geldokumentationssystem visualisiert. Auf Abbildung 10 ist ein Agarosegel der verschieden langen *yjiE*-Promotor-DNA-Fragmente, die für DNA-Bindungs-Experimente verwendet wurden, dargestellt



**Abbildung 10:** Agarosegel mit *yjiE*-promoter-Fragmenten verschiedener Länge mit und ohne Fluoreszenzlabel. (1) einfach AlexaFluor488-gelabelte 102bp-*yjiE*-Promotor-DNA, (2) einfach AlexaFluor488-gelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA, (3) einfach AlexaFluor488-gelabelte 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA, (4) einfach AlexaFluor488-gelabelte 689bp-*yjiE*-Promotor-DNA, (5) 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA, (6) 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA.

### 2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Alle PCR-Produkte wurden mit dem „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up“ Kit von Promega aufgereinigt. Dabei wurde mit 50 µl Wasser eluiert. Wenn die PCR unspezifische Banden enthielt, wurde die DNA zunächst über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und die daraus ausgeschnittene DNA-Bande anschließend mit dem Kit gereinigt. Nach präparativen Verdauen wurde ebenfalls die gewünschte DNA-Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten und gereinigt.

### 2.2.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Nanodrop Spektrophotometer mit 2 µl DNA-Lösung. Die Basen der DNA zeigen eine maximale UV-Absorption bei 260 nm. Wenn Konzentrationsangaben in ng/µl benötigt wurden, wurde die Funktion

„Nucleic Acids“ für doppelsträngige DNA verwendet verwendet. Waren hingegen Angaben in mol/l gewünscht, so wurde mit der Funktion „UV-Vis“ die Absorption bei 260 nm gemessen und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten und des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die molare Konzentration bestimmt. Die Konzentration in ng/μl konnte anschließend über die Formel  $c = m \cdot M$  ( $c$  = DNA-Konzentration [M];  $m$  = DNA-Konzentration [g/l];  $M$  = Molekulargewicht [g/mol]) berechnet werden.

$$\text{Lambert-Beer'sches-Gesetz: } A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$A$  = Absorption bei 260 nm (für AlexaFluor488-gelabelte DNA:  $A_{\text{DNA}} = A_{260} - (A_{492} \cdot 0,3)$ )

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]

(für DNA:  $6600 [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] \cdot N_{\text{Nukleotide}}$ )

$c$  = DNA-Konzentration [M]

$d$  = Schichtdicke

### **Molekulargewicht verschieden langer DNA-Fragmente**

102bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	62.898 g/mol
158bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	97.502 g/mol
315bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	194.680 g/mol
689bp- <i>yjiE</i> -Promotor-DNA	425.797 g/mol

## 2.2.7 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch, wobei überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen. Für präparative Verdau wurden 50 bis 100 μl Ansätze mit mehreren μg DNA über Nacht bei 37°C inkubiert. Analytische Verdau erfolgten in 10 μl-Ansätzen für 1 bis 2 Stunden bei 37°C. Die Zugabe der Enzyme erfolgte im Überschuss, wobei die gesamte eingesetzte Enzymmenge nie über 10 % (v/v) des Ansatzes lag. Es wurde jeweils ein Puffer des Herstellers gewählt, in dem die Enzyme eine hohe Aktivität zeigen.

## 2.2.8 Ligation

Mit Hilfe einer Ligase können zueinander passende überhängende Enden von verdauten DNA-Fragmenten wieder miteinander verbunden werden. Für die Ligation wurden der Vektor (Plasmid) und das Insert (DNA-Fragment, das eingefügt werden soll) im molaren Verhältnis 1:3 und 1:10 eingesetzt. Zusätzlich wurde immer eine Ligations-Kontrolle, die nur den Vektor

enthielt, durchgeführt, um zu überprüfen, ob es auch ohne Insert zur Religation kommt. Außer dem Vektor und dem Insert befanden sich in einem 20 µl-Ligations-Ansatz 1 µl T4 Ligase (Promega) und 2 µl des mitgelieferten 10x Ligase-Puffers. Ligierte wurde über Nacht bei 16°C.

### 2.2.9 Fällung von DNA

Um DNA in einer Lösung auszufällen, wurden 1/10 Volumen Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Volumen 100 % Ethanol zugesetzt und die DNA anschließend für mindestens 1 Stunde bei -20°C gefällt. Daraufhin wurde 20 min bei 13300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und 20 min bei 13300 rpm und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet.

### 2.2.10 Transformation von *E. coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA in *E. coli* XL1-Blue MRF' zu transformieren, wurden 2 µl des Ligations-Ansatzes oder das Pellet nach Fällung des gesamten Ligations-Ansatzes mit 50 µl elektrokompenten Zellen versetzt und anschließend in einer Elektroporationsküvette mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (Gene Pulser Xcell, Biorad) transformiert. Dazu wurde das bereits vorprogrammierte Programm für *E. coli*-Zellen in 1 mm Küvetten mit 1,8 kV verwendet. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml SOB-Medium zugegeben und anschließend 30 bis 60 min bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 200 µl Medium resuspendiert und auf einer Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn ein Plasmid bereits durch Plasmidisolierung (siehe 2.2.11) aus Zellen gereinigt wurde, wurden 0,5 µl Plasmid-Lösung zur Transformation der jeweiligen kompetenten Zellen eingesetzt. Für die Proteinexpression mit Hilfe von pET-Vektoren wurden der Stamm BL21(DE3) gold oder der Methionin-auxotrophe Stamm B834 (DE3) verwendet. Diese Stämme produzieren nach Induktion mit IPTG T7-RNA-Polymerase. Da auf den pET-Vektoren ein T7-Promotor vor dem zu exprimierenden Gen liegt, kann dieses daraufhin ebenfalls abgelesen werden.

### 2.2.11 Plasmidisolierung

Die Isolation von Plasmiden erfolgte aus 5 ml ÜN-Kulturen mit dem „Wizard Plus SV Minipreps“ Kit (Promega) nach Anweisung des Herstellers, wobei mit 50 µl Wasser eluiert wurde.

### 2.2.12 DNA-Sequenzanalyse

Bevor neu-klonierte Plasmide in Experimenten eingesetzt wurden, wurde durch Sequenzierung überprüft, ob die DNA-Sequenz des Inserts korrekt war. Dafür wurden 30 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration zwischen 30 und 100 ng/µl an die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt. Zum Teil wurden Primer verwendet, die GATC zur Verfügung stellt. Wenn kein passender Primer vorhanden war, wurden 30 µl des jeweiligen Primers (10 pmol/µl) mitgeschickt. Für pBAD22-Vektoren wurden die Primer pBAD-FP und pBAD-RP, für pET-Vektoren die Primer T7 und pET-RP und für pCR2.1-Vektoren (TA-Klonierungs-Kit) die Primer M13-FP und M13-RP für die Sequenzierung verwendet.

### 2.2.13 Klonierung mit einem TA-Klonierungs-Kit

Aufgrund von Problemen bei der Klonierung von *yjiE* in Vektoren auf dem herkömmlichen Weg, wurde hierfür der „TA cloning kit with OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli“ (Invitrogen) verwendet. Dabei können die von der Taq-Polymerase generierten überhängenden Adenine an den 3'-Enden des synthetisierten DNA-Fragments mit den überhängenden Thyminen an den 5'-Enden des mitgelieferten linearisierten pCR2.1-Vektors sehr effizient ligiert werden. Durch das Insert wird das im Vektor enthaltene  $\beta$ -Galaktosidase-Gen unterbrochen, so dass Kolonien von Bakterien, die ein Plasmid mit Insert enthalten, auf Platten mit X-Gal weiß erscheinen. Im Gegensatz dazu erscheinen Bakterien, die ein Plasmid ohne Insert enthalten, blau. Daher können selektiv nur weiße Kolonien auf das Vorhandensein des richtigen Inserts untersucht werden. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Lediglich die kompetenten Zellen wurden 1:1 mit 10 % (v/v) Glycerin verdünnt, um 2 Transformationen mit einem Aliquot durchführen zu können. Um Platten mit X-Gal herzustellen, wurden 40 µl X-Gal mit einer Konzentration von 40 mg/ml in DMSO auf Platten mit Ampicillin ausplattiert. Nachdem durch Sequenzierung sichergestellt wurde, dass

das jeweilige Insert die gewünschte Sequenz besitzt, wurde es mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus pCR2.1 ausgeschnitten und in den Zielvektor kloniert.

### 2.2.14 Transduktion der Deletion von *yjiE* mit Hilfe von P1-Phagen

Beim Verpacken von DNA in die Proteinhülle von P1-Phagen können zufällig Fragmente aus dem Genom der infizierten Bakterienzelle anstelle der Phagen-DNA verpackt werden. Ein P1-Phagen-Lysat aus einem Donor-Bakterienstamm enthält demnach einen geringen Anteil von Phagen die einen bestimmten Bereich des Genoms enthalten, der transduziert werden soll. Wird nun ein Empfänger-Bakterienstamm mit diesem Phagen-Lysat infiziert, so werden die meisten Zellen von Phagen mit dem P1-Genom lysiert. Manche Phagen injizieren jedoch ein Fragment des Genoms des Donor-Stammes, das mit dem existierenden homologen Bereich im Genom des Empfänger-Stammes rekombinieren und diesen ersetzen kann. Der Empfänger-Stamm wird anschließend auf einem Medium ausplattiert, das bezüglich des zu transduzierenden Genom-Fragments des Donor-Stammes selektiv ist, zum Beispiel auf einem Antibiotikum, wenn entsprechende Resistenzgene als Selektionsmarker genutzt werden. Durch Citrat im Medium, das das für die Infektion mit P1-Phagen notwendige Calcium abfängt, wird verhindert, dass die infektiösen P1-Phagen aus benachbarten Zellen die transduzierten Zellen infizieren.

#### 2.2.14.1 Herstellung von P1-Phagen-Lysat

Für die Herstellung von P1-Lysat, das die Deletion von *yjiE* transduzieren kann, wurden 5 ml ÜN-Kultur des Stammes FFS22 (MG1655  $\Delta yjiE$  mit einer Chloramphenicol-Resistenzkassette als Selektionsmarker) 10 min bei 5000 rpm abgeerntet und in 500  $\mu$ l 10 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $CaCl_2$  resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l Zellsuspension mit 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l oder 1  $\mu$ l eines P1-Lysats versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Lysat versetzt wurden. Danach wurde jeder Ansatz mit 2-3 ml warmem Top-Agar vermischt und die Mischung jeweils auf eine LB-Platte gegossen und verteilt. Die Platten wurden für 5 min stehen gelassen bis der Top-Agar fest war und anschließend 4-6 Stunden bei 37°C ohne Umdrehen der Platte inkubiert bis Lyse-Plaques sichtbar wurden. Die Zellen sollten nicht komplett lysiert sein. Der Top-Agar wurde dann mit 2-3 ml 10 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $CaCl_2$  abgekratzt, zerkleinert und in ein Greiner-Röhrchen

transferriert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 1 min gevortext. Dann wurde 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein Kryoröhrchen überführt, das nach Zugabe von 100 µl Chloroform bei 4°C gelagert wurde.

#### 2.2.14.2 Bestimmung des Titors von P1-Phagen-Lysat

Zur Bestimmung des Phagen-Titors eines Lysats wurden zunächst 100 µl einer ÜN-Kultur irgendeines Bakterienstammes mit 2-3 ml warmem Top-Agar vermischt und auf eine LB-Platte verteilt. Die Platte wurde dann 30 min inkubiert, so dass der Top-Agar fest werden und etwas trocknen konnte. Anschließend wurden serielle Verdünnungen des jeweiligen Lysats (unverdünnt,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ) auf die Platte pipettiert (jeweils 5µl) und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der Phagen-Plaques bei einer Verdünnungsstufe konnte dann bestimmt und anhand des Verdünnungsfaktors und des Auftragsvolumens von 5 µl die Phagen-Anzahl pro µl Lysat errechnet werden. Der Wert sollte mindestens  $5 \cdot 10^6$  Phagen/µl betragen, lag in der Regel jedoch sogar über  $1 \cdot 10^8$  Phagen/µl.

#### 2.2.14.3 Transduktion mit P1-Phagen

Für die Transduktion mit P1-Phagen wurden 5 ml einer ÜN-Kultur des zu transduzierenden Stammes (z.B. C600) 10 min bei 5000 rpm abgeerntet und anschließend in 500 µl 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Dann wurden 100 µl der Zellen mit 100 µl P1-Lysat des Stammes FFS22 versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Lysat und Lysat ohne Zellen. Nach der Inkubation wurde 1 ml LB-Medium mit 100 mM Natriumcitrat zugegeben und 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm abgeerntet, in etwas Medium resuspendiert und auf einer Platte mit 10 µg/ml Chloramphenicol und 100 mM Natriumcitrat ausplattiert, die anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Zellen in die die Deletion von *yjiE* übertragen wurde, sollten anstelle des *yjiE*-Gens nun ein Chloramphenicol-Resistenzgen haben und auf der Platte wachsen können. Die entstandenen Kolonien wurden anschließend durch PCR mit den Primern Ctr1 und Ctr2 (Wt → ~1,3 kb,  $\Delta yjiE$  → ~ 1,5kb), die beide außerhalb von *yjiE* annealen, oder Ctr1 und C1 (Wt → kein Produkt,  $\Delta yjiE$  → ~ 0,5 kb) auf die Deletion von *yjiE* und die Insertion der Chloramphenicol-Resistenz-Kassette überprüft. Der Primer C1 annealt im Chloramphenicol-Resistenzgen. Bevor Glycerinkulturen angelegt wurden, wurden

die Zellen zwei weitere Male auf LB<sub>Cam10</sub>-Platten mit 10 mM Natriumcitrat ausgestrichen, um eventuell noch vorhandene infektiöse P1-Phagen zu entfernen.

#### 2.2.14.4 Entfernung der Chloramphenicol-Resistenzkassette

Um mögliche Veränderungen in der Gentranskription durch die Insertion der Chloramphenicol-Resistenzkassette auszuschließen, ist es möglich das Gen, das zur Selektion der Deletionsmutanten nötig war, mit Hilfe von FLP-Rekombinase zu entfernen. Neben dem Chloramphenicol-Resistenzgen befinden sich entsprechende Schnittstellen für die FLP-Rekombinase. Die Vorgehensweise wurde von Datsenko und Wanner (2000) beschrieben (Datsenko und Wanner, 2000). Zunächst wurde der entsprechende Stamm mit pCP20 transformiert und über Nacht bei 30°C unter Selektion mit Ampicillin inkubiert. Diese Inkubationstemperatur ist wichtig, da durch höhere Temperaturen die Synthese der FLP-Rekombinase induziert wird und das Plasmid thermosensitiv ist. Anschließend wurden einige Kolonien auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und diese über Nacht bei 43°C inkubiert. Durch diese hohe Temperatur wird die FLP-Rekombinase induziert, das Chloramphenicol-Resistenzgen entfernt und die Zellen verlieren das Plasmid. Der dadurch bedingte Verlust beider Antibiotikaresistenzen wurde durch Ausstrich auf LB<sub>0</sub>-, LB<sub>Cam10</sub>- und LB<sub>Amp200</sub>-Platten überprüft. Zudem wurde die erfolgreiche Deletion der Chloramphenicol-Resistenz-Kassette durch PCR mit den Primern Ctr1 und Ctr2 ( $\Delta yjiE$ , Cam<sup>R</sup>  $\rightarrow$  ~ 1,5kb,  $\Delta yjiE$   $\rightarrow$  ~0,5 kb) sichergestellt.

## 2.3 Proteinanalytische Methoden

### 2.3.1 Fällung von Proteinen mit Trichloracetat

Um die in einer Protein-Lösung enthaltenen Proteine auszufällen, wurde die Probe mit einer 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)-Lösung versetzt, so dass die TCA-Endkonzentration bei ca. 15 % (w/v) lag. Anschließend wurden die Proteine in der gut durchmischten Probe für mindestens 1 Stunde bei -20°C gefällt und dann durch Zentrifugation für 30 min bei 13300 rpm und 4°C pelletiert. Das Protein-Pellet wurde zweimal mit Aceton gewaschen und anschließend 10 min bei 133000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet.

### 2.3.2 Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration von Zellysaten wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Dafür wurde Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce) 1:1 mit Wasser verdünnt und 1 ml der Lösung mit 100  $\mu$ l einer Proteinlösung versetzt. Im Fall von Lysaten wurden 1 bis 2  $\mu$ l Lysat mit 99  $\mu$ l Wasser verdünnt eingesetzt. Als Referenz diente Wasser. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer zuvor anhand von verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellten Eichgerade konnte die Proteinkonzentration des Lysats durch die Absorption bestimmt werden

### 2.3.3 Ellmans-Assay

Mit Hilfe von Ellmans-Assay können die frei zugänglichen Thiolgruppen eines Proteins nachgewiesen werden. Ellmans-Reagenz (DTNB) reagiert mit den exponierten Cysteinen zu einem gemischten Disulfid. Dabei wird ein 2-Nitrothiobenolat-Anion (NTB) frei, das anhand seiner charakteristischen Absorption bei 412 nm photometrisch bestimmt werden kann. Der Absorptionskoeffizient von NTB beträgt in verdünnten Lösungen  $14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  und in Puffern mit hohen Salzkonzentrationen wie 6 M Guanidiniumchlorid oder 8 M Harnstoff  $13700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

In einem Experiment wurde YjiE-His oder YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen und in einem anderen Experiment unbehandeltes YjiE und YjiE, das zunächst für 30 min bei 25°C mit 10-fachen Überschuss an HOCl oxidiert wurde, bevor mit Methionin gequenchet wurde, miteinander verglichen. Das unbehandelte YjiE wurde ebenfalls mit Methionin versetzt. In 120  $\mu$ l-Ansätzen wurde 1 h bei Raumtemperatur durch Zugabe von 6 M Harnstoff denaturiert. Anschließend wurden 3,6  $\mu$ l DTNB (4 mg/ml in 0,1 M Tris pH 8,0) zugegeben und erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 412 nm gemessen. Als Referenzproben dienten jeweils Proben mit gleicher Pufferzusammensetzung, die kein Protein enthielten, aber den gleichen Inkubationsschritten unterzogen wurden.

Anhand des Lambert-Beer'schen-Gesetzes konnte die Absorption, die ein freier Cysteinrest bei der jeweiligen Proteinkonzentration verursacht, berechnet werden. Durch Division des Absorptionswertes bei 412 nm durch diese Zahl ergab sich die Anzahl der freien Cysteine in der Probe.

### 2.3.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anhand der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dafür wurden die Proben zunächst 1:1 mit 1x Lämmli-Auftragspuffer oder 1:6 mit 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Das anionische Detergens SDS bindet dabei etwa mit 1,4 g/g Protein an die enthaltenen Proteine und maskiert deren Eigenladung, so dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Durch die Hitze und das  $\beta$ -Mercaptoethanol im Lämmli-Auftragspuffer wird das Protein denaturiert und Disulfidbrücken werden gespalten, so dass es zu einem Verlust der Struktur kommt. Die Proben wurden auf Neutral-Gele oder Neutral-Gradienten-Gele (Serva) geladen und bei 35 mA pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Als Marker wurden 10  $\mu$ l Mark12-Standard (Invitrogen) oder 5  $\mu$ l RotiMark *prestained* Marker (Roth), falls anschließend ein WesternBlot durchgeführt werden sollte, verwendet.

Die Detektion von Proteinen auf SDS-Gelen erfolgte meist mittels Coomassie-Färbung nach Fairbanks (Fairbanks et al., 1971). Der Farbstoff Coomassie lagert sich an die Proteinoberfläche an, wodurch diese blau gefärbt werden. Das Verfahren wurde abgekürzt und durch Hitze beschleunigt. Zunächst wurde das Gel in Fairbanks A aufgekocht und für 10 min unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde das Gel in Fairbanks D aufgekocht und unter Schütteln entfärbt, wobei der Farbstoff Coomassie nach dem Entfärben nur an den Proteinen zurück bleibt. Die Gele konnten anschließend gescannt und nach Inkubation für 30 min in Geltrocknungs-Puffer zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet werden.

### 2.3.5 Immunoblotting

Durch Immunoblotting (WesternBlot) können Proteine spezifisch und bereits in sehr geringen Mengen anhand von Antikörpern nachgewiesen werden. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln. Zunächst wurde eine SDS-PAGE mit RotiMark *prestained* Marker als Längenstandard durchgeführt. Eine PVDF-Membran in der Größe des Gels wurde durch Inkubation für 15 sec bis 2 min in Methanol aktiviert und anschließend gut mit Wasser gewaschen. Dann wurde die Membran für 20 min in WesternBlot-Inkubationspuffer inkubiert, bevor 6 Whatman-Filterpapiere in der Größe des Gels und das Gel selbst zugegeben wurden und Alles für weitere 10 min inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Proteine mit der Blot-Apparatur für 1 Stunde bei 130 mA vom Gel auf die Membran übertragen. Danach

wurden die Banden des RotiMark auf der Membran mit Kugelschreiber markiert und die freien Bindestellen der Membran durch Inkubation für 30-60 min mit PBS-T mit 5 % (w/v) Milchpulver blockiert. Dann wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen bevor für 45 min mit dem primären Antikörper in PBS-T mit 1 % (w/v) Milchpulver inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde dann ebenfalls 45 min mit dem sekundären Antikörper, der für den späteren Nachweis mit Peroxidase (POD) gekoppelt war, in PBS-T mit 1 % (w/v) Milchpulver inkubiert. Die Nachweisreaktion erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T mit Hilfe des ECL plus *Western Blotting* Detektionssystems. Die WesternBlot-Membran wurde dafür für 2 min mit 1 ml ECL-Lösung A, die zuvor mit 25 µl ECL-Lösung B vermischt wurde, inkubiert. Dann wurde überschüssige Lösung abgenommen und der Blot in eine WesternBlot-Kassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde daraufhin ein Film aufgelegt und die Lichtreaktion, die durch die Umsetzung des Substrats in der Lösung durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers erzeugt wird, detektiert. Der Film wurde je nach Stärke der Lichtreaktion für 1 sec bis über Nacht auf dem WesternBlot belassen, bevor er mit der Entwicklermaschine entwickelt wurde.

#### **Eingesetzte Verdünnungen der verschiedenen Antikörper**

anti-YjiE-Serum (polyklonal aus Kaninchen, von Petra Menhorn gereinigt):	1:10000
anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat (monoklonal aus Ziege):	1:4000
anti-polyHistidin-Antikörper (monoklonal aus Maus):	1:2000
anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (monoklonal aus Schaf):	1:4000

### **2.3.6 Trypsinverdauung für die Auftrennung auf Tricin-Gelen**

Anhand von Trypsinverdauen kann eine Aussage über die Sensitivität von Proteinen gegenüber der Protease Trypsin getroffen werden. Wenn ein Protein unter bestimmten Bedingungen eine höhere oder niedrigere Trypsin-Sensitivität besitzt, so hat sich offenbar etwas an der Struktur des Proteins geändert, so dass es nicht mehr so gut oder besser durch Trypsin gespalten werden kann.

YjiE wurde in den Experimenten unbehandelt eingesetzt oder zunächst mit verschiedenen ROS oxidiert und zum Teil anschließend wieder reduziert. Zur Oxidation wurde YjiE 30 min bei 25°C mit 100 µM HOCl oder 1 h bei 37°C mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 1 mM oxidiertem Gluthation (GSSG) inkubiert. Anschließend wurde das HOCl mit einem 10fachen Überschuss an Methionin gequench und das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Catalase abgebaut. GSSG musste nicht

gequencht werden. Die Reduktion mancher Proben erfolgte daraufhin für 1 h bei 37°C mit 3 mM TCEP. Dann wurden jeweils 2 µl Trypsin (20 µg in 350 µl 50 mM Essigsäure) zu den Ansätzen mit jeweils 10 µg YjiE gegeben und über Nacht bei 37°C verdaut. Nach der Zugabe von 5x Lämmli-Auftragspuffer wurden die Proben auf 16% Tricin-Gelen bei 125 V in Tricin-Kathoden-Puffer und Tricin-Anoden-Puffer aufgetrennt. Die Laufapparatur wurde dabei mit Eiswasser gekühlt.

### 2.3.7 Thioltrapping

Anhand des sogenannten Thioltrappings kann der Redox-Status der Cysteine eines Proteins nachgewiesen werden. Dabei werden zunächst die freien Cysteine mit einer thiolreaktiven Substanz modifiziert. Anschließend werden die oxidierten Cysteine, die zum Beispiel als Disulfidbrücken vorliegen können, reduziert und daraufhin mit einer anderen thiolreaktiven Substanz modifiziert.

Für die Analyse der Auswirkungen der Oxidation mit verschiedenen ROS auf YjiE wurde YjiE zunächst für 1 h bei 37°C mit 1 mM TCEP reduziert und das Reduktionsmittel anschließend mit einer PD-10 Säule in 10 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 mM NaCl pH 7,5 nach Anweisung des Herstellers abgetrennt. Das YjiE in den 140 µl-Ansätzen wurde dann wie für die Trypsinverdaue (siehe 2.3.6) beschrieben mit verschiedenen ROS behandelt. Ein Teil der Proben wurde anschließend für 1 h bei 37°C mit 1 mM TCEP reduziert. Die Proben wurden dann unter Verwendung von Entsalzungssäulchen (Pierce) nach Angaben des Herstellers wieder in 10 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 mM NaCl pH 7,5 gebracht. Anschließend wurden 5 mM AMS oder 5 mM PEG-Maleimide mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kDa (Stock-Lösungen in DAB-Puffer) zugegeben und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Ab der Zugabe von AMS bzw. PEG-Maleimide wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Dann wurde das Protein für 1 h bei 37°C mit TCEP reduziert und anschließend für 15 min bei 37°C unter Schütteln mit Iodacetamid modifiziert. Nach der Zugabe von 5x Lämmli-Auftragspuffer wurden die Proben auf 14% Tris/Glycin-Gelen bei 120 V in SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Da die Auftrennung sehr lange dauerte, wurde die Laufapparatur mit Eiswasser gekühlt.

Um die Auswirkungen der Oxidation von YjiE mit verschiedenen molaren Verhältnissen an HOCl zu analysieren, wurde YjiE zunächst 1 h bei 37°C mit TCEP reduziert und das Reduktionsmittel anschließend mit einem Entsalzungssäulchen (Pierce) nach Anweisung des Herstellers abgetrennt. Dann wurde das Protein in YjiE storage buffer für 30 min bei 25°C mit einem molaren Verhältniss von 1:1, 1:2, 1:5 oder 1:10 mit HOCl inkubiert, das anschließend

mit einem mindestens 10fachen Überschuss an Methionin gequenchet wurde. Daraufhin wurden 5 mM AMS oder 5 mM Iodacetamid (Stock-Lösungen in DAB-Puffer) zugegeben und für 1 h bei 20°C inkubiert. Ab diesem Schritt wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Die Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln. Anschließend wurden 20 mM DTT zugegeben und für 1 h bei 20°C inkubiert. Die Proben mit AMS wurden dann für 1 h bei 20°C mit 67 mM Iodacetamid inkubiert, wobei aufgrund der Verdünnung die AMS-Konzentration 0,7 mM und die DTT-Konzentration 7 mM betrage. Dann wurden die Proben mit TCA gefällt (siehe 2.3.1) und anschließend in 1x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert. Die Proben, die nach der Oxidation mit HOCl zunächst mit Iodacetamid behandelt wurden, wurden direkt nach der Reduktion mit DTT mit TCA gefällt und die Pellets anschließend für 1h bei 20°C mit 5 mM AMS in DAB-Puffer geschüttelt. Dann wurde 5x Lämmli-Auftragspuffer zugegeben. Die Proben wurden bei 150 V auf Serva Neutralgelen aufgetrennt und YjiE anschließend durch Immunoblotting (siehe 2.3.5) mit polyklonalem anti-YjiE-Serum als primären und monoklonalem anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat als sekundären Antikörper durch Immunoblotting nachgewiesen.

DAB-Puffer:           200 mM Tris pH 8,7  
                          10 mM EDTA  
                          0,5 % (w/v) SDS  
                          6 M Harnstoff

### 2.3.8 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE)

Durch 2D-PAGE können Proteine in der ersten Dimension durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) anhand ihres isoelektrischen Punktes und anschließend in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dadurch wird es möglich Unterschiede im Proteom von verschiedenen Zellen zu analysieren. Einzelne Proteine können aus dem Gel ausgestochen und nach einem Trypsinverdau mit Hilfe des Maldi ToF/ToF Massenspektrometers identifiziert werden. Die 2D-PAGE und die anschließende Färbung wurden von Bettina Richter durchgeführt.

### 2.3.8.1 *Probenvorbereitung für die 2D-PAGE*

Für die 2D-Gel-Proben wurden jeweils 4 ml C600- oder KMG214-Zellen mit einer  $OD_{600} \leq 0,5$  mit 4 ml LB-Medium versetzt und 0 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM oder 7 mM HOCl zugegeben. Die Proben wurden für 10 min inkubiert bevor 2 ml 5x LB-Medium, zum Quenchen des hoch reaktiven HOCl's und somit zum Abstoppen des dadurch verursachten oxidativen Stresses, zugegeben wurden. Die Zellen wurden daraufhin 10 min bei 5000 rpm abgeerntet. Dann wurde das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen und danach 5 min bei 13300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin zu einer  $OD_{600}$  von 2 in 2D-Lysepuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurden die Proben zunächst 1 Stunde bei 20°C aufgetaut und geschüttelt. Dann wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin unter Schütteln bei 20°C wieder aufgetaut. Nach Zentrifugation für 45 min bei 13300 und 4°C wurden 800 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2D-Lysepuffer:      7 M Harnstoff  
                          2 M Thioharnstoff  
                          65 mM DTT  
                          32,5 mM CHAPS  
                          1 % (w/v) Serdolit MB-1  
                          2 % (v/v) Pharmalyte 3-10

### 2.3.8.2 *Durchführung der 2D-PAGE*

In der ersten Dimension der 2D-PAGE erfolgte die IEF des Proteins auf einem vorgefertigten, auf einer Plastikfolie polymerisierten isoelektrischen Fokussierungsgradienten (Imobiline DryStrip pH 4 – 7, 24 cm von GE Healthcare). Dazu wurden in einem Keramikschieffchen 450 µl der jeweiligen Probe vorgelegt (entspricht 0,9 OD-Einheiten). Dann wurde der DryStrip blasenfrei darübergelegt und mit 1,6 ml Silikonöl überschichtet. Die IEF fand in einer IPGphor (GE Healthcare) statt (6 h, 30 V → 6 h, 60 V → 1 h, 200 V → 1 h, 500 V, 1 h, 1000 V → 30 min, Gradient 1000 – 8000 V → 10 h, 8000 V). Anschließend wurden die Strips jeweils für 15 min in DTT-Lösung und in IAA-Lösung äquilibriert. Dann wurden die Strips kurz in 2D-Laufpuffer gewaschen, auf 13 %ige 2D-Gele (19 x 24 cm) aufgelegt und in 2D-Agaroselösung eingebettet. Das SDS-PAGE Gel wurde vor dem Auflegen des Streifens bereits für 1 h bei 100 mA laufen gelassen. In einer Ettan Dalt II (GE Healthcare) wurden die

Proben dann zunächst für 1 h bei 165 mA in das Gel einlaufen gelassen und anschließend für ca. 20 h bei 160 – 170 mA aufgetrennt.

DTT-Lösung:	1 % (w/v) DTT in 2D-Äquibrierungspuffer
IAA-Lösung:	4 % (w/v) Iodacetamid in 2D-Äquibrierungspuffer
2D-Gelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,6 0,4 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Natriumazid
2D-Gel (13 %):	24,14 ml Acrylamid (30, 30,8 %) 14,28 ml 2D-Gelpuffer 2,86 g Glycerin 16,14 ml H <sub>2</sub> O 2,7 µl TEMED 0,28 ml APS (10 % w/v)
2D-Laufpuffer:	24 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2D-Agaroselösung:	0,5 % (w/v) Agarose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in 2D-Laufpuffer

### 2.3.8.3 Colloidal Coomassie-Färbung von 2D-Gelen

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele zunächst kurz mit Wasser gewaschen und dann über Nacht in Colloidal-Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wurden sie erneut kurz mit Wasser gewaschen und dann in 1 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden die Gele in Wasser aufbewahrt.

Colloidal-Coomassie-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,1 % (w/v) Serva Blau G-250 2 % (v/v) Phosphorsäure 20 % (v/v) Methanol
-----------------------------	---

### 2.3.9 MALDI-ToF/ToF-Massenspektrometrie

Durch Massenspektrometrie können Ionen, die in einem Hochvakuum erzeugt werden, nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) aufgetrennt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten MALDI-ToF/ToF-Spektrometer erfolgt die Ionisation der Probe durch Laserpulse auf die Probe, die in eine Matrix eingebettet ist (Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie). Die Ionen werden daraufhin beschleunigt und in einer feldfreien Driftstrecke nach ihrer Flugzeit (Time of Flight) aufgetrennt. Das verwendete Ultraflex I ToF/ToF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik) verfügt über zwei in Serie geschaltete ToF-Analysatoren. Am Ende des Analysators werden die Ionen durch Sekundärelektronenvervielfachung detektiert und ihr Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) ausgewertet. Zum Teil wurden Proteine in ihrer vollen Länge analysiert, um nach der Reinigung die korrekte Masse zu bestätigen. Proteine konnten aber auch zuerst mit Proteasen verdaut und anschließend das Peptidmuster anhand der Ionen analysiert werden. Die Datenanalyse erfolgte mit der Softwarepakete BioTools (Bruker Daltonik) und Mascot (Matrix Science).

Für die Analyse von Proteinen aus SDS-Gelen mit dem Massenspektrometer wurden zunächst kleine Gelstücke aus der Bande des entsprechenden Proteins aus dem SDS-Gel ausgestochen. Die weitere Aufarbeitung der Proben für die Massenanalyse wurde von Bettina Richter oder Bianca Ludwig durchgeführt. Für die gesamte Probenvorbereitung war es wichtig Massenspektrometrie-taugliche Spitzen und Reaktionsgefäße sowie spezielles Wasser zu verwenden. Die Gelstücke wurden zunächst zweimal für 10 min mit 100  $\mu$ l einer 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung inkubiert, die anschließend wieder abgezogen wurde. Dann wurde 10 min mit 100  $\mu$ l einer 1:1 Mischung aus Acetonitril und 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  inkubiert. Daraufhin wurden 100  $\mu$ l Reduktionslösung (0,1 mM Tris/HCl pH 8,2, 0,5 mM Guanidiniumchlorid, 0,8 mM EDTA, 80 mM DTT) zugegeben und 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Iodacetamid-Lösung (0,5 M in 0,1 M Tris pH 8,2) zugegeben und im Dunkeln für 15 min weiter geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde danach abgezogen, 100  $\mu$ l 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 5  $\mu$ l 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben und für weitere 5 min geschüttelt. Anschließend wurden die Gelstückchen in 5 Schritten jeweils für 10 min in 100  $\mu$ l Volumen gewaschen. Dies erfolgte in folgender Reihenfolge: 1) 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 2) Acetonitril 1:1 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 3) 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 4) Acetonitril 1:1 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5) 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Dann wurden die Gelstücke mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und daraufhin 2  $\mu$ l Trypsin-Lösung (Trypsin,

sequencing grade modified, Promega, 20 µg in 350 µl des mitgelieferten Puffers) zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA zugegeben und für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Analyse am Massenspektrometer erfolgte daraufhin durch Helmut Krause. Ein ZipTip (C18 für Peptide oder C4 für Vollängen-Proteine von Millipore) wurde mit 10 µl 50 % (v/v) Acetonitril und dann mit 10 µl 0,1 % (v/v) TFA gespült. Dann wurde die Probe 5 bis 6 mal aufgezogen und anschließend mit 10 µl 0,1 % (v/v) TFA gewaschen. Daraufhin wurden 1,3 µl der Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure, Sigma-Aldrich) aufgezogen und die Probe mit der Matrix auf das Target aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Probe im Massenspektrometer analysiert.

### 2.3.10 ESI-MS Massenspektrometrie

Für die Analyse von posttranslationalen Modifikationen wurde Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt. Bei der Elektrosprayionisation werden die zu untersuchenden Moleküle in einem flüchtigen Lösungsmittel an die Spitze einer leitfähigen Kapillare geführt. Durch ein elektrisches Feld zwischen der Kapillarspitze und dem Massenspektrometer wird der Spray erzeugt durch den es zur Ionisation kommt. Zur Analyse der Ionen wurde eine sogenannte Ionenfalle (*ion trap*) verwendet. Bei dieser Methode werden die Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld eingefangen und für eine variable Zeit auf stabilen Bahnen gehalten bevor ihre Masse analysiert wird. Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen, an die jeweils Wechselspannung angelegt wird. Jede Endkappe besitzt außerdem eine kleine Öffnung zum Einlass bzw. Auswurf der Ionen. Nachdem die Ionen über eine bestimmte Zeit in der Falle akkumuliert wurden, wird diese zunächst blockiert, damit keine weiteren Ionen mehr eintreten. Anschließend werden die Ionen mit ansteigendem Molekulargewicht aus der Falle ausgeworfen. Die Detektion der Ionen erfolgt mit einem Sekundärelektronenvervielfacher. Durch eine gekoppelte *reversed phase* HPLC werden die Proben für die ESI-MS Analyse vorbereitet und dadurch in ein mit dem ESI kompatibles Lösungsmittel gebracht. Außerde werden dadurch Verunreinigungen abgetrennt und scharfe Peaks generiert.

Für die Experimente wurde zu YjiE-His und YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl) bzw. unbehandeltes YjiE und YjiE das für 30 min bei 25°C mit einem 10-fachenmolaren Überschuss an HOCl behandelt wurde, bevor das HOCl mit Methionin gequencht wurde, verwendet. Zunächst wurde den Proben 8 M Harnstoff als Feststoff

zugegeben und gelöst. Dann wurde zur Denaturierung der Proteine 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 50 mM Ammoniumbicarbonat pH 7,8 auf eine Konzentration von 1 M Harnstoff verdünnt. Daraufhin wurde entweder Trypsin im Masseverhältnis 1:50 oder Chymotrypsin im Masseverhältnis 1:20 zugegeben und über Nacht bei 37°C (Trypsin) oder 25°C (Chymotrypsin) verdaut. Im Anschluss an die Proteaseverdauung wurden die Proben mit Hilfe des sogenannten *STAGE Tippings* anhand eines von Dr. Johannes Graumann aus dem Labor von Prof. Matthias Mann (Forschungsgruppe *Proteomics and Signal Transduction*, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried) erhaltenen Protokolls (Rappsilber et al., 2003) und ebenfalls von ihm zur Verfügung gestellten STAGE-Tips für die Massenanalyse vorbereitet. Bei den sogenannten STAGE-Tips handelt es sich um Pipettenspitzen, die etwas C<sub>18</sub>-Material zur Bindung der Peptide enthalten. Für die einzelnen Wasch- und Ladeschritte wurden Löcher in die Deckel von 2 ml-Reaktionsgefäßen gestochen. Die Tips wurden in die Löcher gesteckt und die Flüssigkeit, die das C<sub>18</sub>-Material durchlaufen sollte in die Pipettenspitze pipettiert. Anschließend wurde für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch die Flüssigkeit durch das C<sub>18</sub>-Material in das Reaktionsgefäß gedrückt wurde. Die Tips wurden zunächst mit 200 µl 80 % Acetonitril, 0,5 % Essigsäure gewaschen und anschließend mit 200 µl Methanol aktiviert. Dann wurde mit 200 µl 2 % Acetonitril, 0,1 % TFA äquilibriert und daraufhin die zuvor mit 2 % TFA versetzte Probe geladen. Für die Massenanalyse wurden ca. 5 µg Peptide benötigt. Dann wurden die Tips mit 200 µl 0,5 % Essigsäure gewaschen und bei -20°C gelagert bis sie für die weitere Analyse auf Trockeneis an Dr. Johannes Graumann geschickt wurden. Die LC-MS-Analyse erfolgte im Labor von Prof. Matthias Mann wie in Graumann et al., (2008) beschrieben. Es wurden ein Velos Orbitrap Massenspektrometer und Hochenergie-Kollisionsdissoziation als Fragmentierungsmethode (Nagaraj et al., 2010) verwendet. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Programms MaxQuant (Cox und Mann, 2008) interpretiert.

### 2.3.11 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration erfolgte mit einer Superose 6 10/300 Säule (GE Healthcare) und einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage von Shimadzu. Durch Gelfiltration können Proteine im nativen Zustand anhand ihrer Größe aufgetrennt und somit zum Beispiel der Oligomerisierungszustand analysiert werden. Die Probenauftrennung erfolgte für 50 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min.

Gereinigtes YjiE wurde unter Verwendung von HPLC-Puffer 1 analysiert. Dazu wurden 4,2 µg YjiE auf die Säule aufgetragen und die UV-Absorption bei 214 nm und 280 nm sowie die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm bei einem Verstärkungsgrad (*gain*) von 4 gemessen.

Für die Bestimmung der Oligomerisierung von YjiE *in vivo* wurden Zelllysate in HPLC-Puffer 2 aufgetrennt und Fraktionen der Elution aufgefangen. Die Stämme C600 und KMG230 wurden in 1 Liter LB<sub>0</sub> bzw. LB<sub>Amp200</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 angezogen. Der Stamm KMG229 wurde in 2 Liter LB<sub>Amp200</sub> bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 mit 0,1 % Arabinose induziert und anschließend 30 min exprimiert. Dann wurden die Zellen für 20 min bei 6000 rpm und 8°C geerntet. Nach dem Waschen des Zellpellets mit HPLC-Puffer 2 und anschließendem Zentrifugieren für 20 min bei 6000 rpm und 8°C wurden die Zellen in 30 ml HPLC-Puffer 2 resuspendiert und eine Spatelspitze DNase 1 (Roche) sowie 1:400 Serva Mix HP Proteaseinhibitor zugegeben. Die Zellen wurden dann anhand von 3 Durchläufen durch ein Zellaufschlussgerät (Constant Systems) bei einem Druck von 2 kbar aufgeschlossen und daraufhin für 45 min bei 20000 rpm und 8°C zentrifugiert. Das Lysat mit den löslichen Proteinen wurde filtriert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (siehe 2.3.2) bestimmt. Es wurde jeweils 1 mg Protein auf die Säule aufgetragen. Nach dem HPLC-Lauf wurden 0,5 ml Fraktionen der Elution mit TCA gefällt. Die Proteinpellets wurden in je 45 µl 1x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert und 20 µl davon auf Neutral-Gradienten-Gele aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde bei 20 mA durchgeführt und YjiE in den Fraktionen anschließend durch Immunoblotting mit einem polyklonalen anti-YjiE-Serum als primären und anti-Kaninchen-IgG-Konjugat als sekundären Antikörper nachgewiesen.

Unter Verwendung verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht wurde im jeweiligen HPLC-Puffer eine Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts anhand der Retentionszeit erstellt. Einige Standardproteine stammten aus dem „Kit for Molecular Weights 12,000-200,000“ (Sigma-Aldrich), andere Standardproteine wurden von Kollegen gereinigt.

#### **Verwendete Standard-Proteine:**

- GroEL (Anja Osterauer)	MW = 803 kDa
- Thyroglobulin (Sigma-Aldrich)	MW = 669 kDa
- αB-Crystallin (Jirka Peschek)	MW = 480 kDa
- Apoferritin (Sigma-Aldrich)	MW = 443 kDa
- β-Amylase (Sigma-Aldrich)	MW = 210 kDa
- BSA (Sigma-Aldrich)	MW = 66 kDa
- Carboanhydrase (Sigma-Aldrich)	MW = 29 kDa

## 2.4 Methoden der Proteinreinigung

### 2.4.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Für die Expression von rekombinantem YjiE in *E. coli* wurden 5 l-Kolben mit jeweils 1 l LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, verwendet. Das Medium wurde zunächst mit Kolonien von einer Agar-Platte mit einem BL21(DE3) Stamm, der ein Plasmid mit dem jeweiligen rekombinanten Protein enthielt, angeimpft (JC15 für YjiE-His, PM12 für YjiE<sup>94-303</sup>, KMG89 für YjiE). Anschließend wurden die Kolben über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Inkubation bei 37°C ohne Schütteln wird die Hitzeschock-Antwort induziert. Somit werden mehr Chaperone exprimiert, die die Faltung des rekombinanten Proteins unterstützen können. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter Schütteln für 1 Stunde bei 25°C abgekühlt und anschließend mit 100 µM IPTG induziert. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,4. Anschließend wurde das rekombinante Protein für 4 Stunden unter Schütteln bei 25°C exprimiert. Durch eine niedrige Expressions-Temperatur wird der Zellstoffwechsel verlangsamt und Proteine werden langsamer synthetisiert, so dass die Proteine mehr Zeit haben, um korrekt zu falten. Dadurch kann die Ausbeute von löslichen, rekombinanten Protein verbessert werden. Nach der Expression wurden die Zellen für 20 min bei 6000 rpm und 8°C geerntet. Das Pellet wurde dann mit Zellaufschluss-Puffer gewaschen und 10 min bei 6000 rpm und 8°C zentrifugiert, bevor es im selben Puffer resuspendiert wurde. Anschließend wurde der Zellsuspension Serva Mix HP Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:400 zugesetzt bevor sie bei -80°C gelagert wurde.

Wenn Methionin durch Selenomethionin ersetzt werden sollte, wurde NM-Medium verwendet, das mit B834 (DE3)-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid für das jeweilige rekombinante Protein angeimpft wurde (KMG187 für YjiE, KMG188 für YjiE<sup>94-303</sup>). Der Stamm B834 ist Methionin-auxotroph und kann somit selbst kein Methionin synthetisieren. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Zellen für 8 h bei 20°C geschüttelt und danach wie oben induziert. Bei der Induktion sollte die OD<sub>600</sub> bei ca. 0,3 liegen. Die Expression erfolgte über Nacht bei 20°C.

Wenn YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen gereinigt werden sollte, wurde zu JC15-Zellen nach dem Austarieren der Zentrifugenbecher zum Abernten der Zellen 2 mM HOCl (1,6 M HOCl-Stammlösung) zugegeben und sofort 10 min bei 8000 rpm und 8°C geerntet. Die Zellen wurden direkt in HisTrap Puffer A zum Abstoppen des oxidativen Stresses durch Tris

resuspendiert und die Zellsuspension nach Zugabe von Serva Mix HP Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:400 bei -80°C gelagert.

Vor der Induktion und nach der Expression wurde jeweils die OD<sub>600</sub> der Zellen gemessen und eine Probe für ein späteres SDS-Gel genommen. Dafür wurde 1 ml Zellen für 1 min bei 14000 rpm pelletiert und das Pellet in 1x Lämmli-Auftragspuffer zu einer OD<sub>600</sub> von 0,005 resuspendiert. Die Proben wurden 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert bevor später 10 µl auf das Gel aufgetragen wurden.

## 2.4.2 Zellaufschluss

Nach dem Auftauen der Zellsuspension wurden die Zellen anhand von 3 Durchläufen durch ein Zellaufschlussgerät (Constant Systems) bei einem Druck von 2 kbar aufgeschlossen und anschließend 45 min bei 20000 rpm und 8°C zentrifugiert. Das Lysat mit den löslichen Proteinen wurde filtriert und das enthaltene His-getagte YjiE anschließend chromatographisch gereinigt. Proben des Lysats und des Pellets sowie des späteren Durchlaufs durch die erste Säule wurden ebenfalls entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,005 mit Lämmli-Auftragspuffer verdünnt und davon später 10 µl auf das SDS-Gel aufgetragen.

## 2.4.3 Chromatographische Methoden

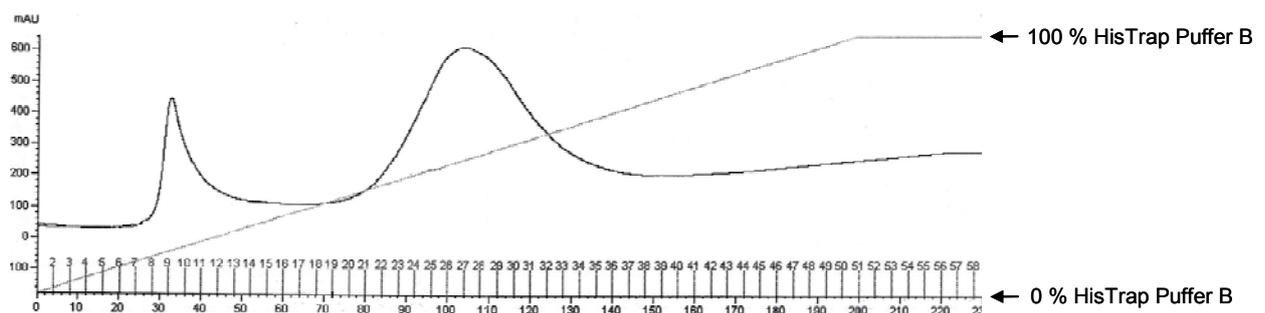
Die chromatographische Aufreinigung von YjiE wurde an einer ÄKTA-FPLC Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei der Fraktionskollektor mit Eis gekühlt wurde. Alle Puffer wurden vor ihrer Verwendung filtriert.

### 2.4.3.1 Affinitätschromatographie

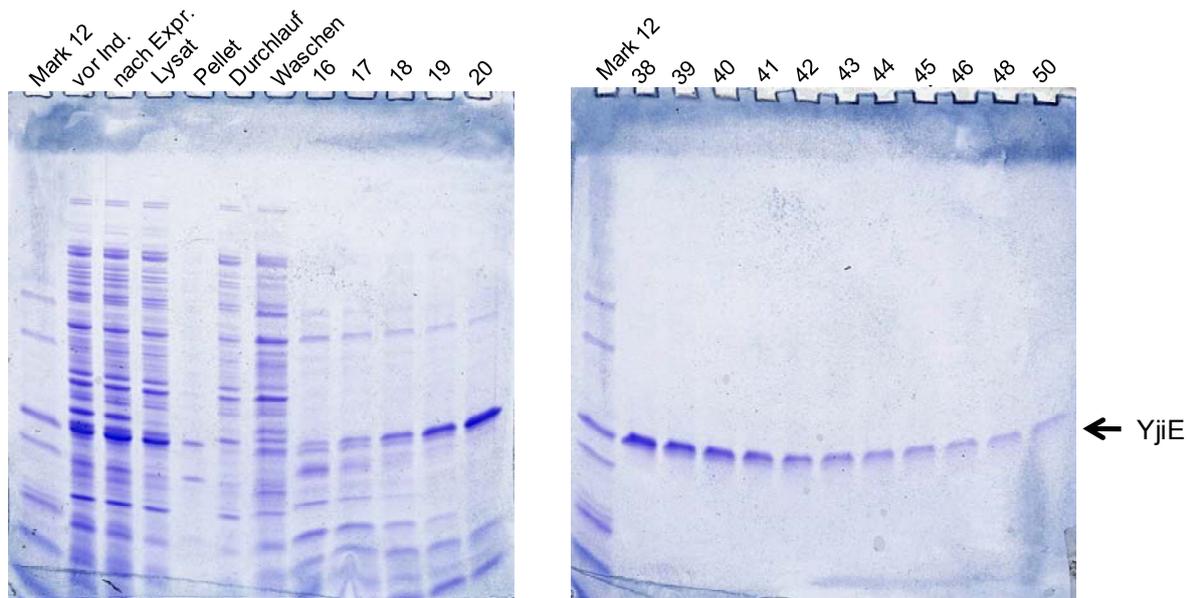
Im ersten Reinigungsschritt erfolgte eine Affinitätschromatographie unter Verwendung einer HisTrap-Säule (GE Healthcare). Beim Säulenmaterial handelt es sich bei diesen Säulen um Nickel-Sepharose, ein immobilisiertes Metallchelat-Affinitäts-Chromatographie-Material. Damit können rekombinante Proteine mit einem sogenannten HisTag, der einen Komplex mit den Nickel-Ionen der Säule bilden kann, gereinigt werden. Beim HisTag handelt es sich um eine künstliche Verlängerung des Proteins um sechs Histidine. Die Elution der Proteine von

der Säule erfolgt bei dieser Methode durch kompetitive Verdrängung des Proteins von der Matrix durch Imidazol.

Das Zellysate wurde direkt auf die mit HisTrap Puffer A äquilibrierte HisTrap-Säule (4x 5 ml-Säulen nacheinander, 20 ml Gesamtvolumen) geladen und anschließend mit dem gleichen Puffer gewaschen bis die Absorption des Säulendurchlaufes wieder den Anfangswert erreicht hatte. Dann wurde mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumen auf 100 % HisTrap Puffer B eluiert und die Säule anschließend mit 5 Säulenvolumen HisTrap Puffer B regeneriert (Chromatogramm siehe Abbildung 11). Während der Elution und Regeneration wurden 4 ml-Fractionen gesammelt. Von den Fractionen, die YjiE enthalten könnten, und vom Durchlauf während des Waschens der Säule, wurden 20 µl Proben genommen und mit 5 µl 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt. Die 25 µl-Proben wurden zusammen mit den 10 µl-Proben der Zellen vor der Induktion, der Zellen nach der Expression, des Lysats, des Pellets und des Durchlaufs auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt (siehe Abbildung 12). Nach dem Färben der Gele wurden Fractionen, die ausreichende Mengen an YjiE enthielten ohne zu stark mit anderen unspezifisch an die Säule gebundenen Proteinen kontaminiert zu sein, vereinigt (hier: Fractionen 19 bis 46). Mit Hilfe des Chromatogramms der Elution, in dem neben den Fractionen und ihrer UV-Absorption auch der Puffer-Gradient ablesbar war, konnte der ungefähre Salzgehalt der vereinigten Fractionen bestimmt werden. Für die anschließende Ionenaustauschchromatographie wurde die Proteinlösung mit Verdünnungs-Puffer auf einen Salzgehalt von ca. 200 mM verdünnt und anschließend aufgrund von Proteinaggregation bei der Verdünnung für 15 min bei 5000 rpm und 8°C zentrifugiert.



**Abbildung 11:** Chromatogramm der Elution von His-T-YjiE von der His-Trap-Säule mit einem Gradienten von 0 % auf 100 % HisTrap Puffer B.



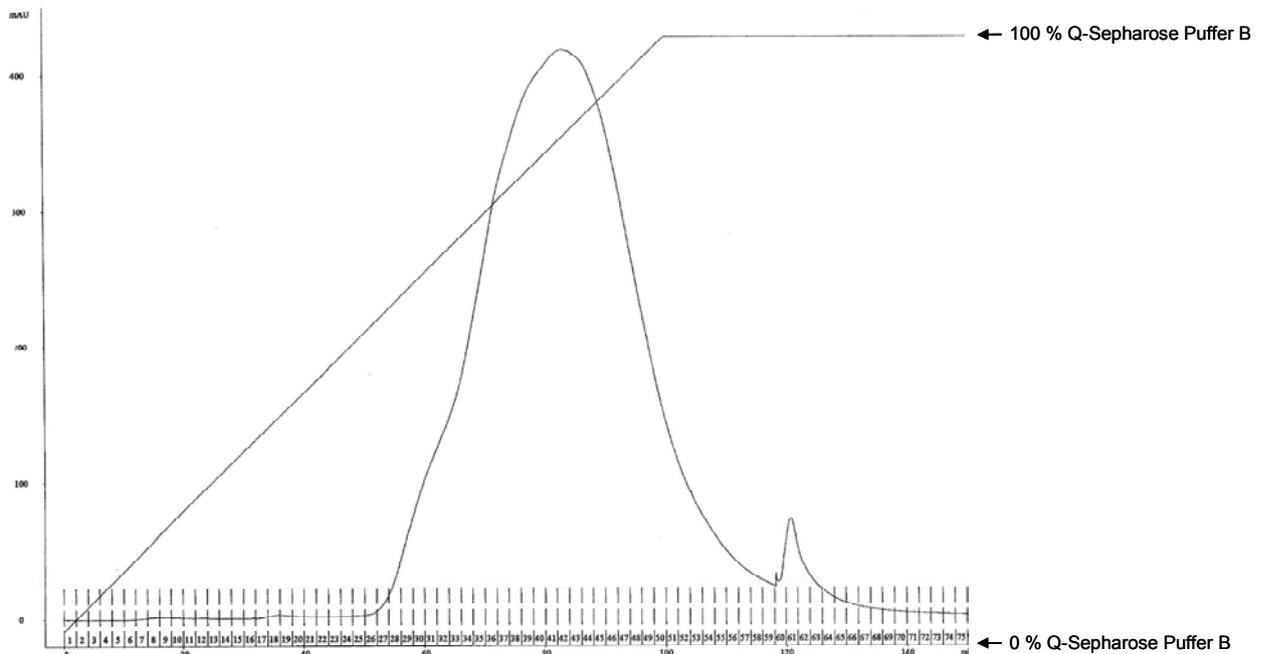
**Abbildung 12:** Analytische SDS-Gele der Reinigung von His-T-YjiE mit einer HisTrap-Säule. Es wurden Proben der *E. coli*-Zellen vor der Induktion (vor Ind.) und nach der Expression (nach Expr.), von Lysat, Pellet, Durchlauf und Waschen der HisTrap-Säule sowie den Elutionsfraktionen (hier Fraktionen 16 bis 50) aufgetrennt.

#### 2.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem zu reinigenden Protein und dem Säulenmaterial. Die Ladung des Proteins bei einem bestimmten pH-Wert kann anhand des theoretischen isoelektrischen Punktes, der mit dem Programm ProtParam ([www.expasy.ch/tools](http://www.expasy.ch/tools)) anhand der Proteinsequenz berechnet werden kann, abgeschätzt werden. Da YjiE bei pH 7,5 negativ geladen ist, wurden HiTrap Q FF-Säulen (GE Healthcare) verwendet. Es handelt sich hier um Q-Sepharose-Säulenmaterial, bei dem positiv geladene quartäre Ammonium-Ionen an Sepharose gekoppelt sind. Die Elution erfolgt bei der Ionenaustauschchromatographie durch Erhöhung der Ionenstärke des Puffers durch einen steigenden Salzgehalt.

Die in Q-Sepharose Puffer A äquilibrierte Säule (2x 5 ml-Säulen nacheinander, 10 ml Gesamtvolumen) wurde mit der verdünnten Proteinlösung von der HisTrap-Säule beladen und anschließend mit 5 Säulenvolumen Q-Sepharose Puffer A gewaschen. Dann wurde mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumen auf 100 % Q-Sepharose Puffer B eluiert und die Säule mit weiteren 5 Säulenvolumen Q-Sepharose Puffer B regeneriert (Chromatogramm siehe Abbildung 13). Während der Elution und Regeneration wurden 2 ml-Fractionen gesammelt. Mit Hilfe der UV-Absorption der einzelnen Fractionen im Chromatogramm wurden die Fractionen des großen Peaks, der, wie aus vorherigen Reinigungen bekannt war, YjiE

enthält, vereinigt (hier: Fraktionen 27 bis 59). Es wurden 20 µl-Proben der verdünnten Proteinvereinigung von der HisTrap-Säule, vom Durchlauf und vom Waschen der Q-Sepharose-Säule und von den vereinigten Proteinfractionen nach der Q-Sepharose-Säule genommen und mit 5 µl 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt.



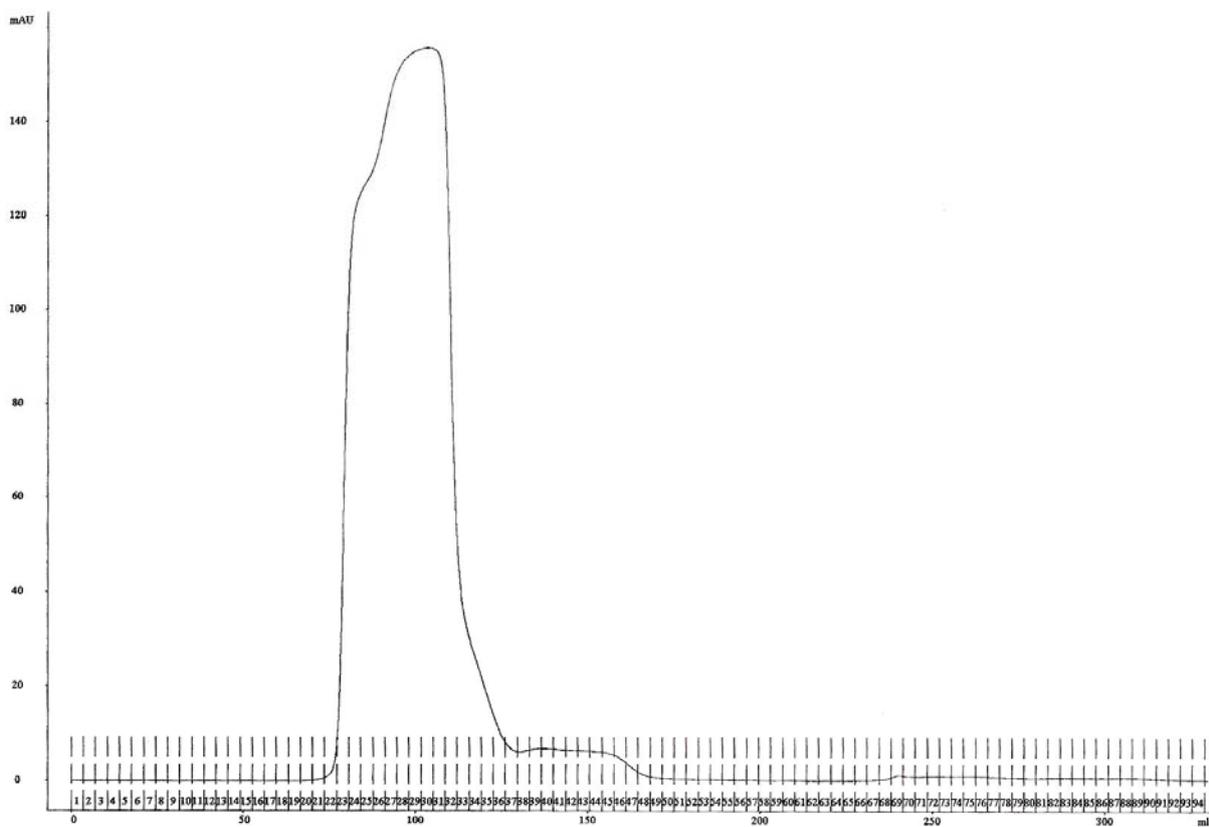
**Abbildung 13:** Chromatogramm der Elution von His-T-YjiE von der Q-Sepharosesäule mit einem Gradienten von 0 % auf 100 % Q-Sepharose Puffer B.

#### 2.4.3.3 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

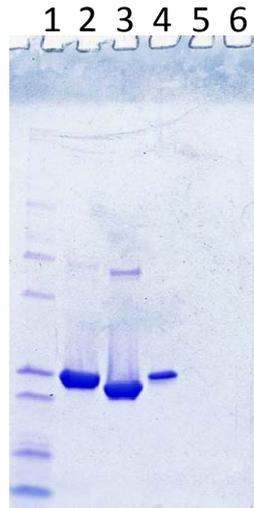
Bei der Gelfiltration erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe bzw. des hydrodynamischen Radius. Die Matrix der verwendeten Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße. Proteine, deren Durchmesser die Porengröße überschreitet, können nicht in das Trägermaterial diffundieren und eluieren im Ausschlussvolumen der Säule. Kleiner Proteine dringen hingegen in die Poren der Matrix ein und wandern folglich langsamer durch die Säule. Somit eluieren die kleinsten Komponenten zuletzt.

Mit der verwendeten Superdex 75 prep grade Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von ca. 300 - 330 ml können Proteine in einem Größenbereich zwischen 3 kDa und 70 kDa aufgetrennt werden. Das YjiE-Oligomer überschreitet diese Größe und eluiert daher im Ausschlussvolumen. Das Protein Thrombin und der von His-T-YjiE abgetrennte HisTag, die entfernt werden sollten, können jedoch in die Säulenmatrix diffundieren und werden dadurch zurückgehalten.

Das zu reinigende ungetagte YjiE wurde nach dem Thrombinverdau auf die im jeweiligen Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Für die präparative Reinigung von YjiE wurde Gelfiltrations-Puffer 1 verwendet. Anschließend wurde mit 330 ml Gelfiltrations-Puffer eluiert und dabei 3,5 ml Fraktionen gesammelt (Chromatogramm siehe Abbildung 14). Die Fraktionen des ersten großen Peaks, der, wie aus vorherigen Reinigungen bekannt war, YjiE enthielt, wurden vereinigt und aufkonzentriert (hier: Fraktionen 23 bis 36). Eine 20 µl-Probe der Proteinreinigung wurde mit 5 µl 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt und zusammen mit den Proben von der Q-Sepharose-Säule auf einem SDS-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 14:** Chromatogramm der Elution von YjiE von der Gelfiltrations-Säule mit 330 ml Gelfiltrations-Puffer.



**Abbildung 15:** Analytisches SDS-Gel der Reinigung von YjiE mit Mark 12 Standard (1) und Proben der Proteinreinigung nach der Q-Sepharose-Säule (His-T-YjiE) (2), der Proteinreinigung nach dem Thrombinverdau der Gelfiltration (ungetagtes YjiE) (3), der Proteinverdünnung nach der HisTrap-Säule (His-T-YjiE) (4) sowie dem Durchlauf (5) und dem Waschen der Q-Sepharose-Säule (6).

#### 2.4.4 Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tag durch Thrombinverdau

Die Abspaltung des N-terminalen, abspaltbaren HisTags, der vorhanden war, wenn His-T-YjiE gereinigt wurde, erfolgte durch Zugabe von 18,5 U Thrombin (bovine, high activity von Calbiochem) nach der Q-Sepharose-Säule. Das Thrombin wurde zuvor mit einer Konzentration von 1 U/ $\mu$ l in 50 mM Natriumcitrat; 200 mM NaCl pH 6,5; 0,1 % (w/v) PEG-8000; 50 % (v/v) Glycerin gelöst. Nach der Zugabe des Thrombins und anschließendem Mischen wurde für 15 min bei 5000 rpm und 8°C zentrifugiert um Proteinaggregate zu entfernen. Die Abspaltung des HisTags durch das Thrombin erfolgte dann durch eine Inkubation für mindestens 40 h bei 4°C. Anschließend wurden das Thrombin und der HisTag durch Gelfiltration (siehe 2.4.3.3) von YjiE abgetrennt.

#### 2.4.5 Aufkonzentrieren der Proteinlösung

Nach der Gelfiltrations-Säule wurde YjiE mit Hilfe von Amicon Ultra-4 oder Amicon Ultra-15 Zentrifugations-Filter-Einheiten (10000 MWCO, *molecular weight cut off*) von Millipore bei 4000 x g und 8°C aufkonzentriert. Wenn anschließend Kristallisations-Ansätze angesetzt werden sollten, wurde bis zu einer Konzentration zwischen 5 mg/ml und 10 mg/ml aufkonzentriert und das Protein dann für die Kristallisation verwendet. Sollte jedoch YjiE für eine Lagerung bei -80°C und spätere Verwendung in weiteren Experimenten präpariert

werden, so wurde nach der Gelfiltration in Gelfiltrations-Puffer 1 bis zu einer Absorption bei 280 nm von ca. 0,6 aufkonzentriert. Dann wurden 5 % (v/v) Glycerin zugegeben, gemischt und 15 min bei 5000 rpm und 8°C zentrifugiert um Proteinaggregate zu entfernen. YjiE wurde dann aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Im Fall von YjiE-His und YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen wurde bereits die Proteinreinigung nach der Q-Sepharosesäule aufkonzentriert und mit 5 % (v/v) Glycerin versetzt, wobei die genaue Natriumchlorid-Konzentration des Puffers in diesem Fall nicht bestimmt werden konnte. Die Gesamtzusammensetzung war jedoch dem YjiE storage buffer ähnlich.

Wenn für ein Experiment sehr hohe Proteinkonzentrationen benötigt wurden, wurde das gelagerte Protein nach dem Auftauen mit Amicon Zentrifugationseinheiten weiter aufkonzentriert.

#### 2.4.6 Pufferaustausch

Wenn YjiE in einen anderen Puffer überführt werden sollte, wurden Protein-Entsalzungssäulchen (protein desalting spin columns) oder Slide-A-Lyzer Dialysekassetten von Pierce nach Anweisung des Herstellers verwendet.

Durch mehrfache Verdünnung mit einem Puffer und anschließendes Aufkonzentrieren war auch mit Amicon Zentrifugationseinheiten zum Aufkonzentrieren von Proteinen ein Pufferaustausch möglich.

### 2.5 Spektroskopische Methoden

Alle in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren wurden gegen ein Spektrum des Puffers in dem sich die Probe befand als Referenz korrigiert oder es wurde vor der Messung eine Basislinie anhand des Probenpuffers erstellt.

### 2.5.1 UV/Vis-Spektrometrie

Für die Absorption von Proteinen sind die Peptidbindungen und die Seitenketten von Aminosäuren sowie zu einem geringen Anteil auch die Disulfidbrücken verantwortlich. Besonders die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin zeigen eine starke Absorption im UV-Bereich. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei ca. 280 nm.

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgte mit dem Nanodrop Spektrophotometer mit 3 µl Probenvolumen. Mit Hilfe der Funktion „Protein A280“ wurde die Absorption bei 280 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Mit dem Programm „ProtParam“ ([www.expasy.ch/tools](http://www.expasy.ch/tools)) konnte anhand der Aminosäuresequenz des Proteins der Extinktionskoeffizient bei 280 nm und das Molekulargewicht bestimmt werden (Tabelle 5 zeigt die Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte verschiedener YjiE-Konstrukte). Da YjiE ein cytosolisches Protein ist, wurde angenommen, dass alle Cysteine reduziert sind und nicht als Disulfidbrücken vorliegen. Über das Lambert-Beer'schen-Gesetz war es anschließend möglich die molare Konzentration des Proteins zu bestimmen. Die Konzentration in mg/ml wurde über die Formel  $c = m \cdot M$  ( $c$  = Protein-Konzentration [M],  $m$  = Protein-Konzentration [g/l],  $M$  = Molekulargewicht [g/mol]) berechnet.

$$\text{Lambert-Beer'sches-Gesetz: } A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A = Absorption bei 280 nm

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]

c = Protein-Konzentration [M]

d = Schichtdicke

**Tabelle 5: Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten verschiedener YjiE-Konstrukten**

<i>Protein</i>	<i><math>\varepsilon</math> (280nm) [<math>M^{-1}cm^{-1}</math>]</i>	<i>Molekulargewicht [g/mol]</i>
YjiE-His	32430	35534
His-T-YjiE	32430	36512
YjiE	32430	34992
His-T-YjiE(94-303)	25440	25748
YjiE(94-303)	25440	24229

### 2.5.2 Fluoreszenzspektrometrie

Die sogenannte „intrinsische Fluoreszenz“ von Proteinen wird durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan verursacht, die ein delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem besitzen. Durch die Absorption von Lichtquanten bei einer Anregungswellenlänge werden Elektronen auf ein energetisch höheres Orbital angehoben. Anschließend kehren sie spontan in den energieärmeren Zustand zurück, wobei die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz bei einer größeren Emissionswellenlänge wieder frei wird. Die größte Rolle spielen dabei die Tryptophanreste eines Proteins. Das Emissionsmaximum von Tryptophan wird stark durch die molekulare Umgebung bzw. die Lösungsumgebung beeinflusst. Bei einer hydrophoben Umgebung, z.B. im Proteininneren, liegt das Emissionsmaximum von Tryptophan bei ca. 300 nm, wohingegen es bei einer hydrophilen Umgebung, z.B. auf der Proteinoberfläche bei ca. 350 nm liegt. Dadurch ist es möglich Strukturänderungen eines Proteins anhand der Tryptophanfluoreszenz zu beobachten.

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren von 1  $\mu$ M YjiE mit verschiedenen Argininkonzentrationen zwischen 310 und 450 nm wurden mit einem FluoroMax-4 (HORIBA Jobin Yvon) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und 20°C aufgenommen. YjiE wurde zuvor zur Einstellung des Gleichgewichts bereits 1 h mit 200 mM, 250 mM oder 300 mM Arginin bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.5.3 Fluoreszenzpolarisation (Fluoreszenzanisotropie)

Bei der Fluoreszenzpolarisation werden Fluorophore mit polarisiertem Licht angeregt. In der Regel geben sie anschließend wiederum polarisiertes Licht ab. Wenn die Fluorophore frei beweglich sind, wie zum Beispiel in einer Lösung, dann wird die Fluoreszenzpolarisation durch die Bewegung der Fluorophore beeinflusst. Die Rotationsgeschwindigkeit von Fluorophoren ist meist groß genug, um Einfluss auf die gemessene Fluoreszenzpolarisation zu haben, obwohl die Zeit zwischen der Absorption eines Photons und der Emission eines Photons (Fluoreszenzlebensdauer) sehr klein ist.

Für die Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurde ein Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer verwendet, das entsprechende Polarisatoren besitzt. Nach einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit monochromatischem, vertikal linear polarisiertem Licht wird die Fluoreszenzintensität abwechselnd einmal bei vertikal und einmal bei horizontal gestelltem

Emissionpolarisator gemessen und die Polarisation bzw. die Anisotropie nach folgenden Formeln bestimmt:

$$P = (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp})$$

$$A = (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{\parallel} - 2 \cdot G \cdot I_{\perp})$$

P = Polarisation

A = Anisotropie

$I_{\parallel}$  = Intensität der parallelen Strahlung

$I_{\perp}$  = Intensität der perpendicularen Strahlung

G = G-Faktor (Gerätekonstante, die vor der Messung für die entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen bestimmt wird)

Da die Rotationsgeschwindigkeit eines Moleküls von seinem Volumen abhängt, kann mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation bzw. Fluoreszenzanisotropie zum Beispiel die Bindung eines Proteins an DNA beobachtet werden. Durch die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes ändert sich die Rotationsgeschwindigkeit und die Fluoreszenzpolarisation nimmt somit zu.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation von der Beweglichkeit des Fluorophors wird durch die Perrin-Gleichung beschrieben:

$$A_0/A = 1 + \tau / \phi$$

A = Anisotropie

$A_0$  = intrinsische Anisotropie des unbeweglichen Fluorophors

$\tau$  = Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors

$\phi$  = Rotationsrelaxationszeit

Die Fluoreszenzanisotropie-Experimente wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm bei 20°C oder 37°C durchgeführt. Zu 10 nM einfach-AlexaFluor488-gelabelter *yjiE*-Promotor-DNA oder *tufA*-DNA in DNA-Bindepuffer 2 wurde schrittweise YjiE zutitriert, wobei zwischen den einzelnen Zugaben mindestens 1 min gewartet wurde. Je nach Experiment wurden gelabelte 102bp-, 158bp-, 315bp- oder 689bp-DNA-Fragmente und reduziertes (1 h, 37°C mit 1 mM TCEP), unbehandeltes oder mit HOCl-behandeltes (30 min, 25°C → mit Methionin abgestoppt) YjiE, YjiE-His oder YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen eingesetzt. Aus den innerhalb 1 min gemessenen Anisotropie-Werten wurde mit Hilfe von Origin ein Mittelwert zur Erstellung

einer Bindekurve gebildet. In einem Kompetitions-Experiment wurde an 10 nM einfach AlexaFluor488-gelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA zunächst 1  $\mu$ M YjiE gebunden. Anschließend wurden zweimal 100 nM ungelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA zugegeben, um zu sehen, ob die gelabelte DNA durch einen Überschuss an ungelabelter DNA verdrängt werden kann.

### 2.5.4 Circular dichroismus (CD)

Der Circular dichroismus (CD) beruht auf der Chiralität von optisch aktiven Molekülen mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen. Ein Molekül ist optisch aktiv, wenn es links- und rechts-zirkular-polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert und somit die Ebene von linear polarisiertem Licht dreht. Bei Proteinen trägt neben den optisch aktiven Aminosäuren auch die Sekundärstruktur zur Chiralität bei. Im Fern-UV-Bereich (170 – 250 nm) ist für  $\alpha$ -Helices ein Doppelminimum bei ca. 208 und 222 nm charakteristisch, während  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu einem Minimum bei 215 nm bis 220 nm mit deutlich geringerer Intensität führen.

Als quantitatives Maß für die Größe des Circular dichroismus wird die Elliptizität verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, die auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren bezogen ist, erfolgt nach folgender Formel:

$$\Theta_{MRW} = (\Theta \cdot 100 \cdot M) / (m \cdot d \cdot N_A)$$

$\Theta_{MRW}$  = molare Elliptizität [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ]

MRW = mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren

$\Theta$  = gemessene Elliptizität [deg]

m = Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

M = Molekulargewicht [g/mol]

$N_A$  = Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Die Fern-UV-CD-Spektren wurden mit 0,1 mg/ml Protein bei 20°C zwischen 195 und 260 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min aufgenommen, wobei 16 Einzelspektren akkumuliert wurden. Für die Aufnahme von Spektren mit verschiedenen Argininkonzentrationen wurde DL-Arginin eingesetzt und wie oben Spektren zwischen 215 und 260 nm aufgenommen. YjiE wurde zuvor 1 h bei Raumtemperatur bei der

entsprechenden Argininkonzentration inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte.

Da die molare Elliptizität nicht von der Temperatur abhängt, ist es möglich Thermoübergänge mit dem CD-Spektrometer zu messen. Dafür wird die Wellenlänge mit dem stärksten sekundärstrukturspezifischen Signal gewählt und die Signalintensität während der thermischen Entfaltung gemessen. Im Fall von YjiE wurde bei 222 nm in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 80°C bei einer Heizrate von 20°C/h gemessen. Da YjiE die Denaturierung von YjiE irreversibel ist, wurde der Übergang zur Bestimmung der Schmelztemperatur mit einer Boltzmann-Funktion gefittet.

## 2.5.5 Analytische Ultrazentrifugation

Für die analytische Ultrazentrifugation wurde eine ProteomeLab XL-A Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter) verwendet. Wenn ein Fluoreszenzsignal detektiert werden sollte, wurde ein Fluoreszenzdetektor von Aviv eingesetzt. Die Bedienung der Ultrazentrifuge und die Auswertung der Läufe wurden von Dr. Titus Franzmann oder Alexander Bepperling durchgeführt.

### 2.5.5.1 Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation

Bei Sedimentationsgleichgewichtsläufen wird die Probe bei einer relativ niedrigen Geschwindigkeit zentrifugiert und die Gleichgewichtsverteilung der Proteine, die sich durch das Gegeneinander von Sedimentation und Diffusion einstellt, gemessen. Mit dieser Methode kann das Molekulargewicht sehr genau bestimmt werden.

$$c(r) = c(a) \exp[M_{\text{eff}} \cdot \omega^2 \cdot (r^2 - a^2) / 2RT]$$

c = Gleichgewichtskonzentrationsverteilung

r = beliebige Entfernung vom Rotorzentrum

a = feste Entfernung vom Rotorzentrum

$M_{\text{eff}} = M(1 - \bar{v}\rho_0)$  = effektives, um den Auftriebsterm reduziertes, Molekulargewicht

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors

R = Gaskonstante

T = Temperatur

Die Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurden bei 6000 rpm, 8000 rpm und 10000 rpm und 4°C durchgeführt. YjiE-His wurde mit einer Absorption von 0,5; 0,3 und 0,1 bei 280 nm eingesetzt. Für die Proben mit HOCl-behandeltem YjiE wurde YjiE-His mit einer Absorption von 0,5 bei 280 nm für 30 min mit einem molaren Verhältnis von 1:0; 1:0,5; 1:1 und 1:5 an HOCl versetzt bevor der oxidative Stress mit 1 mM Methionin abgestoppt wurde. Als Puffer wurde 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit ca. 400 mM NaCl bei pH 7,5 eingesetzt. Die Verteilung des Proteins in der Probe wurde nach der Einstellung des Gleichgewichts anhand der Absorption bei 280 nm und des Interferenz-Signals entlang der Zelle gemessen.

### 2.5.5.2 Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation

Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird der Sedimentationskoeffizient  $s$  bestimmt. Dieser spiegelt die Geschwindigkeit wieder, mit der sich ein Protein unter Einfluss der Zentrifugations-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegt. Auch hier kann eine Aussage über das Molekulargewicht eines Proteins getroffen werden. Allerdings spielen dabei auch die Moleküleigenschaften eine Rolle, ebenso wie die Dichte und die Viskosität des Lösungsmittels sowie die Temperatur. Deshalb erfolgt oft eine formale Umrechnung auf die Dichte und Viskosität von Wasser bei 20°C. Der zugehörige  $s$ -Wert wird mit  $s_{20,w}$  bezeichnet. Anhand des Reibungskoeffizienten (*frictional ratio*) kann eine Aussage über die Molekülform getroffen werden.

$$s = M (1 - \bar{v} \rho) / f$$

$s$  = Sedimentationskoeffizient [S] (1 S = 1 Svedberg-Einheit = 10<sup>-13</sup> sec)

$M$  = Molekulargewicht

$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen (in erster Näherung die reziproke Dichte)

$\rho$  = Dichte der Lösung

$f$  = Reibungskoeffizient des Moleküls

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden mit 35000 rpm bei 20°C durchgeführt. in YjiE storage buffer durchgeführt. YjiE wurde mit Konzentrationen von 15 µM, 3 µM und 0,6 µM eingesetzt, während die Konzentration von YjiE-His und YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen 12 µM betrug. In weiteren Experimenten wurde getestet, ob YjiE durch Harnstoff oder Arginin dissoziiert werden kann. Dazu wurde 4 µM reduziertes YjiE in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 mM NaCl, 1 mM TCEP pH 7,5 mit 0 M; 0,5 M; 0,6 M; 0,7 M; 0,8 M; 0,9 M oder 1 M Harnstoff oder 0,1 M; 0,15 M; 0,2 M; 0,25 M; 0,3 M; 0,4 M oder 0,5 M Arginin für

eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte. Während der Sedimentation wurde wiederholt die Absorption bei 235 und 280 nm entlang der Zelle gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der  $dc/dt$ -Methode (Schuck, 2000), dem Programm Sedview (Hayes und Stafford, 2010) oder der 2-Dimensionalen-Spektrum-Analyse (2DSA) (Brookes et al., 2010).

Für DNA-Bindestudien mit der analytischen Ultrazentrifuge wurde 10 nM AlexaFluor488-gelabelte 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA in DNA-Bindepuffer 1 mit 1 mM TCEP mit steigenden Konzentrationen an reduziertem YjiE (1 h, 37°C, 1 mM TCEP) versetzt. Nach einer Inkubation für 20 min bei 25°C wurde ein Sedimentationslauf bei 35000 rpm mit Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm durchgeführt.

## 2.6 Biochemische Methoden zur Bestimmung von Aktivitäten

### 2.7.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs), auch Gelshifts genannt, kann die Bindung eines Proteins an DNA nachgewiesen werden. Durch die Komplexbildung verringert sich die Mobilität der DNA bei der Auftrennung auf einem Acrylamid-Gel gegenüber freier DNA. Für die Assays wurde in 15 µl-Ansätzen 50 ng oder 100 ng *yjiE*-Promotor-DNA eingesetzt und in YjiE storage buffer oder DNA-Bindepuffer 1 mit verschiedenen molaren Verhältnissen YjiE inkubiert. In jedem Ansatz befand sich außerdem 1 mg/ml BSA. Die Proben wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor 2 µl EMSA-Auftragspuffer zugegeben wurden. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben in der Regel auf einem 6 % TBE-Gel von Invitrogen in TBE-Puffer bei 150 V. Es war aber auch eine Auftrennung auf einem Neutral-Gel von Serva in TAE-Puffer möglich. In diesem Fall wurden die Proben erst für 20 min bei 20 mA in das Gel einlaufen gelassen und dann bei 150 V weiter aufgetrennt. Da die Elektrophorese mit dem Neutral-Gel sehr lange dauerte, wurde die Laufapparatur mit Eiswasser gekühlt. Die DNA auf den Gelen wurde, wenn sie fluoreszenz-gelabelt war, zunächst mit dem Typhoon Scanner detektiert. Dann erfolgte eine Färbung der DNA in Wasser mit ca. 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Nach dem Abgießen der Ethidiumbromid-Lösung wurde das Gel zweimal kurz mit Wasser gewaschen und

anschließend für 5 min in Wasser entfärbt, bevor die DNA mit dem Image Quant 300 Geldokumentationssystem mit UV-Licht visualisiert wurde. Als spezifische DNA wurde *yjiE*-Promotor-DNA eingesetzt, da LysR-Transkriptionsfaktoren normalerweise Autoregulation zeigen. Um die Spezifität der DNA-Bindung von YjiE zu testen, wurden auch verschiedene andere DNA-Fragmente eingesetzt, die keine Bindestellen für YjiE besitzen sollten (z.B. *tufA*-DNA). In den Assays wurde entweder reduziertes YjiE (1 h, 37°C, 1 mM TCEP), YjiE-His oder YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl) verwendet. Für Assays mit YjiE, das mit verschiedenen ROS oxidiert wurde, wurde YjiE unbehandelt gelassen oder zur Oxidation für 30 min bei 25°C mit 50 µM oder 100 µM HOCl oder für 1 h bei 37°C mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. 1 mM oxidiertem Gluthation (GSSG) inkubiert. Anschließend wurde das HOCl mit Methionin gequencht und das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Catalase abgebaut. GSSG musste nicht gequencht werden. Manche Proben wurden daraufhin für 1 h bei 37°C mit 1 mM TCEP (HOCl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder 3 mM TCEP (GSSG) wieder reduziert

### 2.6.2 *In vitro* Transkriptions-Assay

Durch *in vitro* Transkription kann nachgewiesen werden, ob ein Transkriptionsfaktor unter bestimmten Bedingungen bei Bindung an ein entsprechendes Promotor-Konstrukt die Transkription aktivieren kann. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Martin Seizl im Labor von Prof. Patrick Cramer am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Dabei wurde größtenteils wie von Ranish und Hahn (1991) (Ranish und Hahn, 1991) und Koschubs, Seizl und Kollegen (2009) (Koschubs et al., 2009) beschrieben vorgegangen.

Zunächst wurden drei Promotorsequenzen mit XhoI und BamHI in den von Prof. Patrick Cramer erhaltenen pSH515 Vektor, der als Template-DNA für die Experimente diente, kloniert. Als Kontrolle wurden 295 bp der nicht translatierten Region von *osmY* (pSH515-295bp-*osmY*-NTR = pKMG40) verwendet. Dabei handelt es sich um einen konstitutiv aktiven Promotor bei dem kein zusätzlicher Transkriptionsfaktor nötig ist, damit Transkription stattfinden kann. Außerdem wurden 350 bp (pSH515-350bp-*yjiE*-prom = pKMG41) und 737 bp (pSH515-737bp-*yjiE*-prom = pKMG42) der nicht translatierten Region von *yjiE* kloniert, da nicht bekannt ist wo genau in der eigenen Promotorregion YjiE bindet.

Als Erstes wurde die Aktivität des verwendeten *E. coli* RNA Polymerase Holoenzym (Epicentre Biotechnologies; 0,5 µg/µl; 450 ng = 1 pmol) in einem *Run off Transcription*-Assay getestet. Dazu wurden in 25 µl-Ansätzen zu 1 µl Template (doppelsträngige DNA +

entsprechender FAM-gelabelter Primer, 5 pmol/ $\mu$ l) jeweils 2,5 pmol oder 5 pmol RNA-Polymerase in TB-Puffer gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 20°C und 350 rpm wurde 1 mM der NTP-stock Lösung zugegeben und anschließend für 10 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde durch Zugabe eines Volumenverhältnisses von 1:1 an Harnstoff-Puffer abgestoppt und 15  $\mu$ l der Proben auf TBE-Harnstoffgelen für 1 h bei 300 V aufgetrennt, bevor das Transkript mit dem Typhoon-Scanner anhand der FAM-Fluoreszenz detektiert wurde.

Anschließend wurden in ersten *in vitro* Transkriptions-Experimenten RNA-Polymerase-Konzentrationen von 1 pmol und 0,11 pmol mit den verschiedenen Plasmiden getestet (Zusammensetzung der Ansätze siehe S. 71). Als Kontrolle für die Entstehung eines Transkripts diente Hefe-Transkriptions-Extrakt (*yeast nuclear extract*) (Koschubs et al., 2009) anstelle von *E. coli* RNA-Polymerase und als Negativ-Kontrolle eine Probe ohne Plasmid mit *E. coli* RNA-Polymerase. Die *in vitro* Transkriptions-Ansätze ohne NTP-Mix wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert und die Transkription dann durch die NTP-Zugabe gestartet. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde mit 180  $\mu$ l Stop-Mix abgestoppt. Daraufhin wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dafür wurden 205  $\mu$ l Phenol-Chloroform zugegeben und gevortext bevor 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Von der oberen, wässrigen Phase, die die RNA enthielt, wurden 170  $\mu$ l abgenommen und die RNA gefällt. Dazu wurden 1/10 Volumen 3 M NaAc und 3 Volumen 100 %-Ethanol (-20°C) zugegeben. Die Proben wurden nach dem Mischen für 20 min auf Trockeneis inkubiert, bevor die gefällte RNA für 10 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert wurde. Die RNA-Pellets wurden mit 500  $\mu$ l 80 % (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und anschließend erneut für 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Ethanol abgenommen wurde, wurden die Pellets in einer Vakuumzentrifuge für 10 bis 15 min getrocknet. Für den anschließenden Primer-Extension-Assay wurde die RNA in 10  $\mu$ l Annealing-Mix, der einen für das Transkript spezifischen FAM-gelabelten Primer enthielt, resuspendiert, für 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend für 45 min bei 48°C inkubiert. Ab der Zugabe des Annealing-Mixes wurden die Proben vor Licht geschützt. Dann wurden 20  $\mu$ l Synthese-Mix für die reverse Transkription der RNA zu DNA zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden DNA und RNA wie nach der Phenol-Chloroform-Extraktion mit NaAc und Ethanol gefällt und die Pellets in 3  $\mu$ l RNase A (40  $\mu$ g/ml) resuspendiert. Es folgte ein 3-minütiger Inkubationsschritt in dem die RNA abgebaut wurde. Dann wurden 3  $\mu$ l Sequenziergel-Auftragspuffer (Formamid/EDTA, Bromphenolblau, Xylencyanol) zugegeben und für 1 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden danach sofort auf Eis abgekühlt und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben erneut kurz auf 95°C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und dann auf ein 8 %iges FQP-

Harnstoff-Gel geladen. Das Gel wurde in den entsprechenden FQP-Puffern für Kathode und Anode für 10 bis 20 min bei 500 V und 20 mA laufen gelassen. Anschließend wurde die FAM-gelabelte DNA mit dem Typhoon-Scanner detektiert.

Alle folgenden Assays wurden unter Verwendung von 1 pmol RNA-Polymerase durchgeführt. In weiteren Experimenten wurden 1 pmol, 3 pmol und 10 pmol YjiE in storage buffer sowie 3  $\mu$ M YjiE, das in molaren Verhältnissen von 1:1, 1:10 und 1:100 für 30 min bei 25°C mit HOCl inkubiert wurde, bevor der oxidative Stress mit Methionin abgestoppt wurde, verwendet. Außerdem wurde auch getestet, was passiert, wenn die drei verwendeten Plasmide mit der gleichen HOCl-Menge vorinkubiert wurden, um auszuschließen, dass die DNA durch HOCl zerstört wird. Im darauffolgenden Experiment wurden mit 100 pmol, 200 pmol und 395 pmol höhere YjiE-Konzentrationen eingesetzt.

In einem letzten Experiment wurde dann getestet, ob bei einer YjiE-Konzentration von 10 pmol die Transkription durch eine Komponente von LB-Medium oder HOCl-oxidiertem LB-Medium oder durch Zellysat oder Zellysat von HOCl-gestressten Zellen aktiviert werden kann. Für die Herstellung der Lysate wurden BB7224-Zellen bei einer OD von ca. 0,5 direkt abgeerntet oder zuvor für 10 min bei 30°C mit 4 mM HOCl behandelt. Die Zellpellets wurden mit 20 mM HEPES, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA pH 7,6 gewaschen und zentrifugiert, bevor sie im gleichen Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert wurden und etwas DNase I zugegeben wurde. Die Zellwände wurden dann für 30 min auf Eis mit Lysozym verdaut und die Zellen daraufhin zum Aufschließen 8-mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Dann wurde für 15 min bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert um das Lysat mit den löslichen Proteinen zu erhalten, dem anschließend 20 % (v/v) Glycerin zugegeben wurden. Die Konzentration der Lysate wurde durch Bradford-Assays (siehe 2.3.2) bestimmt. Kurz vor der Verwendung in den *in vitro* Transkriptions-Experimenten wurden 3 mM DTT und Proteaseinhibitor zugegeben. Das oxidierte LB-Medium wurde durch Zugabe von 4 mM HOCl hergestellt. Es wurden jeweils 2,5  $\mu$ l und 5  $\mu$ l der jeweiligen Medien und Lysate zusammen mit den drei verschiedenen Plasmiden und 10 pmol YjiE getestet.

**Zusammensetzung der *in vitro* Transkriptions-Ansätze (25µl)**

5 µl 5x TB-Puffer  
 0,63 µl 0,1 M DTT  
 3 µl Phospho-Kreatin (192 µg)  
 9,77 µl H<sub>2</sub>O oder YjiE in Puffer  
 0,25 µl RNase Inhibitor (10 U) (GE Healthcare)  
 0,1 µl Kreatin-Phosphokinase (0,2 µg)  
 1 µl Plasmid-DNA (150 ng)  
 5 µl HA-Puffer mit RNA-Polymerase  
 0,25 µl NTP-Mix (jeweils 10 mM)

5x TB-Puffer:            100 mM HEPES pH 7,6  
 (Transkriptions-        500 mM KAC  
 Puffer)                    5 mM EDTA  
                               25 mM MgOAc

HA-Puffer:              20 mM HEPES pH 7,9  
                               100 mM KAc  
                               1 mM EDTA  
                               1 mM DTT  
                               10 % (v/v) Glycerin  
                               → bei -70°C gelagert

Stop-Mix:                100 mM NaAc  
                               10 mM EDTA  
                               0,5 % (w/v) SDS  
                               0,15 % (v/v) tRNA (17 µg/ml)

Annealing-Mix:        5 mM Tris pH 8,3  
                               75 mM KCl  
                               1 mM EDTA  
                               0,15 % (v/v) FAM-Primer (0,125 pmol)

Synthese-Mix:         50 mM Tris pH 8,3  
                               75 mM KCl  
                               4,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                               15 mM DTT  
                               1,5 % (v/v) dNTP-Mix (10 mM each)  
                               2,5 % (v/v) M-MLV Reverse-Transkriptase (100 U/µl)

Harnstoffgele:         10 ml Acrylamid (19:1)  
 (für 2 kleine Gele)    2 ml 10x TBE  
                               8,41 g Harnstoff (7 M)  
                               → mit Wasser auf 20 ml auffüllen → entgasen  
                               20 µl TEMED  
                               100 µl APS (10 % w/v)

8 % FQP-Harnstoff-Gele: 8 % Polyacrylamid in FQP-Puffer  
→ 4 h polymerisieren lassen, Taschen mit Wasser spülen,  
→ Gel für 5 min bei 500 V und 20 mA vorlaufen lassen

50x FQP-Puffer: 170 mM Bis-Tris pH 7,5  
280 mM Tricin  
3,3 mM EDTA

FQP-Kathoden-Puffer (oben): 19,5 ml 50x FQP-Puffer + 175,5 ml H<sub>2</sub>O  
FQP-Anoden-Puffer (unten): 15 ml 50x FQP-Puffer + 735 ml H<sub>2</sub>O

## 2.6.4 Genexpressionsanalyse durch Transkriptionsprofile

Für die Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Transkriptionsprofilen wird RNA aus Zellen isoliert und mittels eines DNA-Microarrays, der komplementäre DNA-Sonden aus dem gesamten *E. coli* Genom enthält, analysiert, welche Gene gerade aktiv abgelesen werden. Anhand von Transkriptionsprofilen kann festgestellt werden wie sich die Genexpression unter bestimmten Bedingungen ändert.

Für die Experimente wurden zunächst C600-Zellen und KMG214- Zellen (C600  $\Delta yjiE$ -Zellen) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 kultiviert und anschließend 2 ml der Zellen zu 0,5 ml purem LB-Medium oder LB-Medium, in dem bereits HOCl vorgelegt war, so dass die Enkonzentration im Ansatz 2 mM betrug, gegeben. Nach 5 min Inkubation wurden 2 ml 5x LB-Medium zugegeben um das HOCl zu quenchen und die Zellen wurden für 5 min bei 5000 rpm abgeerntet. Der Überstand wurde komplett entfernt und die Zellen wurden nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert bis die Proben auf Trockeneis an die Firma MTF Services in Tübingen geschickt wurden, wo die RNA-Isolation und die Genexpressionsanalyse mit Hilfe von *E. coli* genome 2.0 GeneChips von Affymetrix erfolgten. Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe von Phenol-Extraktion und unter Verwendung des RNeasy Midi Kits (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Aus 3 µg RNA wurde nach der Fragmentierung nach dem Standard-Protokoll von Affymetrix (Prokaryotic Sample and Array Processing, Technical Manual 701030 Rev. 5, 2004, Affymetrix) biotinylierte cDNA hergestellt. Dann wurden 3 µg cDNA für 16 h bei 50°C auf *E. coli* genome 2.0 GeneChips hybridisiert. Die GeneChips wurden in der Affymetrix Fluidics Station 450 gewaschen und gefärbt und anschließend mit dem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G gescannt. Mit der Affymetrix<sup>TM</sup> GeneChip Operating Software wurde unter Verwendung des MAS5-Algorithmuses eine Zusammenfassung der RNA-Level der Proben

erstellt. Eine Normalisierung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Array Assist<sup>TM</sup> Software 10.0 (Agilent) unter Verwendung eines GC-RMA (*Robust Multichip Average*)-Algorithmuses durchgeführt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Gene, die in mindestens zwei der drei unabhängigen Experimente entweder ausschließlich in Zellen mit *yjiE* (C600) einen veränderten mRNA-Level (Induktions-Verhältnis  $>2$  in C600 und  $<2$  in KMG214, Verhältnis C600/KMG214  $>2$ ) oder ein mindestens zwei mal höheres Induktions-Verhältnis in C600- im Vergleich zu KMG214-Zellen zeigten, wurden als signifikant hoch- oder herunterreguliert betrachtet. Informationen über die Funktion der einzelnen Gene wurden über die Datenbank EcoCyc ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)) gewonnen.

## 2.7 Mikrobiologische Methoden

Für alle mikrobiologischen Methoden wurden sterilen Materialien und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.7.1 Lebensfähigkeits-Assay

Für die Lebensfähigkeits-Assays wurden C600 oder KMG214 Zellen bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} \leq 0,5$  kultiviert und dann mit verschiedenen HOCl-Konzentrationen inkubiert. Nach dem Quenchen des HOCl, wurden die Zellen in einer Mikrotiterplatte seriell 1:10 verdünnt und 5 µl Proben der einzelnen Verdünnungen auf gut getrocknete LB-Platten aufgebracht. Nachdem die sogenannten „Spots“ getrocknet waren, wurden die Platten über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Kolonien bei den einzelnen Verdünnungsstufen bestimmt. Die Zellzahl der nicht HOCl-behandelten Zellen wurde auf 100 % normiert und die relative Überlebensfähigkeit der Zellen unter HOCl-Stress berechnet. Es wurden jeweils Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten gebildet und die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Die HOCl-Behandlung wurde in LB-Medium oder Phosphat-Puffer durchgeführt. Wenn der HOCl-Stress direkt in LB-Medium erfolgte, wurden 200 µl Zellen zu 800 µl LB-Medium gegeben und 4 mM, 5 mM oder 6 mM HOCl zugegeben. Nach dem Mischen wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das HOCl mit 200 µl 5x LB-Medium gequencht. Wenn der HOCl-Stress in Phosphat-Puffer erfolgte, wurden die Zellen zunächst abgeerntet



## 2.8 Strukturbiologische Methoden

### 2.8.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Visualisierung von YjiE mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Nathalie Braun und Andreas Kastenmüller vom Department für Elektronenmikroskopie der Technischen Universität München. Für die Aufnahmen von YjiE mit dem Elektronenmikroskop (JEOL JEM 100CX) bei einer Vergrößerung von 50000 bei 100 kV wurde YjiE zunächst mit Entsalzungssäulchen (Pierce) nach Anweisung des Herstellers in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,5 gebracht. Die Probe wurde mit Wasser oder Puffer auf 0,01 bis 0,1 mg/ml verdünnt und 5 µl auf ein kohlenstoffbeschichtetes Netzchen (*grid*) aufgebracht. Der Kohlefilm wurde vorab durch Glimmentladung *gereinigt* und hydrophilisiert. Nach 2 min wurde überschüssige Proteinlösung entfernt. Die adsorbierte Probe wurde dann für 30 sec mit 5 µl 2 % (w/v) Uranylacetat pH 4,5 negativ kontrastiert und anschließend luftgetrocknet. Die daraufhin mit dem Elektronenmikroskop aufgenommenen Bilder (Negative) wurden mit Hilfe eines „FlexTight Precision II“ Flachbettscanners mit einer Schrittweite von 8,5 µm digitalisiert, was einer finalen Pixelgröße von 1,69 Å entspricht. Für die Bildanalyse wurden Einzelmoleküle mit dem Programm „boxer“ (EMAN Software-Paket, Ludtke et al., 2001) ausgewählt und mit der „IMAGIC Suite“ (van Heel et al., 1996) prozessiert. Nach der iterativen Alignierung wurden die zentrierten Bilder mittels multivariater statistischer Analyse (MSA) und Multi-Referenz-Alignierungen (MRA) klassifiziert. Entsprechend der Klasseneinteilungen wurden dann finale Mittelungsbilder erstellt.

Für Proben von YjiE, das mit verschiedenen ROS oxidiert wurde, wurde das Protein in YjiE storage buffer wie unter 2.3.6 beschrieben mit 100 µM HOCl oder 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Zum Teil wurden die Proben anschließend für 1 h bei 37°C mit 3 mM TCEP wieder reduziert. Dann wurden sie wie oben beschrieben verdünnt, negativ kontrastiert und Bilder mit dem Elektronenmikroskop aufgenommen.

### 2.8.2 Röntgenstrukturanalyse

Mit Hilfe von röntgenkristallographischen Methoden kann die dreidimensionale Struktur von Proteinen bei atomarer Auflösung bestimmt werden. Die Experimente wurden in

Zusammenarbeit mit Dr. Melissa Poynor und Prof. Michael Groll vom Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt. Für die Röntgenstrukturanalyse muss das Protein zunächst kristallisiert werden, um anschließend Röntgenbeugungsdaten der Kristalle aufnehmen zu können. Daraufhin müssen die Phasen bestimmt werden, damit die Elektronendichte interpretiert und das erhaltene Strukturmodell verfeinert werden kann.

### *2.8.2.1 Reinigung von YjiE für die Kristallisation*

Für die Kristallisation musste das Protein zunächst gereinigt werden (siehe 2.4). Die Reinigung von YjiE<sup>94-303</sup> für erste Kristallisationsversuche wurde von Yan Le (Doktorandin am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München) durchgeführt. Um die Stabilität des Proteins zu erhöhen, wurde es nach dem Thrombinverdau mit 6 mM Tris versetzt und dann für 30 min bei 27°C mit 300 µM HOCl oxidiert. Anschließend wurden zum Quenchen des HOCl's weitere 6,6 mM Tris zugegeben bevor die Reinigung mit der Gelfiltration in Gelfiltrations-Puffer 2 fortgesetzt wurde. Nach der Gelfiltration wurde das Protein mit einer Amicon Zentrifugationseinheit aufkonzentriert und durch Zugabe von insgesamt 20 ml 10 mM Tris, 40 mM NaCl pH 7,5 und anschließendes Aufkonzentrieren umgepuffert. Die Konzentration von YjiE<sup>94-303</sup> betrug letztendlich ca. 7 mg/ml. Um YjiE<sup>94-303</sup> mit Seleno-Methionin anstelle von Methionin für die Kristallisation zu reinigen, wurde das Protein ebenso behandelt. Es wurde jedoch Gelfiltrations-Puffer 3 verwendet.

Für die Kristallisation von YjiE in voller Länge wurde YjiE unter Verwendung von Gelfiltrations-Puffer 3 gereinigt und anschließend für 1 h bei 37°C mit 1 mM TCEP reduziert. Dann wurde das Protein mit einer Amicon Zentrifugationseinheiten aufkonzentriert und durch Zugabe von insgesamt 20 ml 10 mM Tris, 40 mM NaCl, 0,1 mM TCEP pH 7,5 (Niedrigsalzpuffer) bzw. 10 mM Tris, 400 mM NaCl, 0,1 mM TCEP pH 7,5 (Hochsalzpuffer) und anschließendes Aufkonzentrieren umgepuffert. Die Präparation von YjiE mit Seleno-Methionin anstelle von Methionin erfolgte ebenfalls mit reduziertem Protein in Hoch- und Niedrigsalzpuffer.

### *2.8.2.2 Kristallisation von YjiE*

Für die Röntgenstrukturanalyse werden große, hoch geordnete, einzelne Kristalle, sogenannte Einkristalle gebraucht. Da geeignete Bedingungen für die Kristallisation von biologischen

Makromolekülen nicht vorhergesagt werden können, beruht die Technik auf dem Prinzip von Versuch und Irrtum. Die Überstättigung der Proteinlösung und dadurch der Übergang in den festen Phasenzustand durch Kristallisation wird durch die Zugabe eines Fällungsmittels erreicht, das die Proteinmoleküle bei einer bestimmten Konzentration aus der Lösung verdrängt. Die Erhöhung der Proteinkonzentration und der Konzentration des Fällungsmittels erfolgt durch Entzug des Lösungsmittels, wodurch im Idealfall Protein-Protein-Wechselwirkungen ausgebildet werden und es zur Kristallisation kommt. Als Fällungsmittel werden beispielsweise Salze (Ammoniumsulfat, Natriumcitrat, Natrium-Kalium-Phosphat), organische Verbindungen wie Polyethylenglykole (400 – 20000 g/mol) oder Alkohole (Methylpentandiol, Ethanol, Isopropanol) verwendet. Die Fällungsmittel können auch kombiniert werden. Außerdem kann der Zusatz von anderen Salzen und Detergenzien getestet werden. Auch der pH-Wert hat Einfluss auf die Kristallisation, ebenso wie die Temperatur und die Protein- und Fällungsmittelkonzentration sowie verwendete Puffersubstanzen. Damit die Konzentrationen von Protein und Fällungsmittel langsam ansteigen, werden am häufigsten die Hängetropfen-Methode (*hanging drop*) oder die Sitztropfen-Methode (*sitting drop*) eingesetzt, die beide auf Gasphasendiffusion beruhen. Dazu wird eine kleine Menge der konzentrierten Proteinlösung mit dem gleichen Volumen des Kristallisationspuffers versetzt. Das Tröpfchen befindet sich entweder auf einem Deckplättchen, das über dem Reservoir mit dem Kristallisationspuffer platziert wird, oder es wird auf eine dafür vorgesehene Stelle in der Kristallisationsplatte gesetzt. Anschließend wird die Platte luftdicht verschlossen. Aufgrund der geringeren Konzentration des Fällungsmittels im Proteintropfen wird diesem solange über die Gasphase Wasser entzogen, bis ein Konzentrationsausgleich zwischen den Lösungen erreicht ist.

Bei den initialen *Screening*-Experimenten wurde die Sitztropfen-Methode eingesetzt und bei der anschließenden Optimierung der Bedingungen die Sitztropfen- oder die Hängetropfen-Methode verwendet. Für die Sitztropfen-Methode wurden kommerziell erhältliche Screens (Hampton Research) eingesetzt. Es wurden 96-well Kristallisationsplatten (Art Robbins) verwendet, in die die Kristallisationsansätze mit dem Phoenix Mikrodispenser (Art Robbins) pipettiert wurden. Im Reservoir wurden 40  $\mu\text{l}$  Kristallisationspuffer vorgelegt. Für die Proteinlösung wurden 0,1  $\mu\text{l}$  Protein und 0,1  $\mu\text{l}$  Kristallisationspuffer zusammenpipettiert. Wenn die Hängetropfen-Methode eingesetzt wurde, wurden Linbro 24-well Kristallisationsplatten (Jena Bioscience) verwendet. Im Reservoir wurden 300  $\mu\text{l}$  Kristallisationspuffer vorgelegt und 2  $\mu\text{l}$  Proteinlösung auf dem Deckplättchen mit 2  $\mu\text{l}$  Kristallisationspuffer versetzt. Die Kristallisationsplatten wurden mit einem Desktop

Autosealer (HJ-Bioanalytik) luftdicht verschlossen und anschließend bei 20°C oder 4°C inkubiert.

### 2.8.2.3 Aufnahme von Röntgenstrukturdaten

Für die Aufnahme von Röntgenstrukturdaten werden eine Röntgenstrahlungsquelle und ein Detektor zur Messung der gebeugten Röntgenstrahlen benötigt. Der größte Teil des primären Elektronenstrahls, der auf den Kristall gerichtet wird, durchquert diesen unverändert, aber ein Teil des Strahls wechselwirkt mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall. Dadurch werden Elektronen angeregt, die bei der Rückkehr in ihren Grundzustand Röntgenstrahlung in alle Richtungen abgeben. Dabei kommt es aufgrund der sich regelmäßig wiederholenden Anordnung im Kristall zur Interferenz, die meist zur Auslöschung führt, aber in bestimmten Richtungen auch eine konstruktive Interferenz ergeben kann. Eine konstruktive Interferenz führt zu einem im Bezug auf den Primärstrahl gebeugten Röntgenstrahl. Durch die von sämtlichen Atomen im Kristall abgegebenen Röntgenstrahlen und deren Interferenz ergibt sich die Beugung des Primärstrahls. Eine Fourier-Transformation gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome in der Einheitszelle und den gebeugten Röntgenstrahlen wieder.

Für die Röntgenbeugung wurden die Kristalle 20 sec in „cryo Protektans“ eingelegt, anschließend mit einem sogenannten *cryo loop* (Hampton Research), bei dem es sich um einen Nylonfaden mit 0,2 mm bis 1 mm Durchmesser handelt aus dem Cryopuffer entnommen und im Stickstoffstrom bei 100 K eingeforen. Die Messungen wurden an den Synchrotron *beamlines* X06SA des *Swiss Light Source* (SLS, Villingen, Schweiz) durchgeführt. Die Reflexe und Intensitäten der Röntgenstrahlen wurden mittels der Rotationsmethode aufgenommen bei der der Kristall in kleinen Intervallen (Rotationswinkel  $\phi$  zwischen 0,25° und 1°) um eine definierte Achse rotiert wird, um möglichst viele Kristallebenen im Beugungswinkel zum Primärstrahl zu orientieren. Die Belichtungszeit pro Rotationsaufnahme (*frame*) betrug 1 sec. Die Qualität der gemessenen Daten wird durch die Vollständigkeit und Genauigkeit der Reflexe sowie deren Intensitäten bestimmt.

### 2.8.2.4 Prozessierung und Datenreduktion

Die Rohdaten wurden mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) prozessiert. Im ersten Schritt wurde anhand weniger *frames* eine Orientierungsmatrix des Kristalls, die die Lage und

Dimension eines primitiven Kristallgitters bestimmt, erstellt. Dann wurden alle Reflexe und Skalierungen integriert und die Daten abschließend mit den Unterprogrammen XSCALE und XDSCONV reduziert. Dabei werden die skalierten Daten auf die asymmetrische Einheit des reziproken Raumes reduziert und in Intensitäten umgewandelt. Die statistische Analyse der Datenqualität erfolgte durch Überprüfung der Übereinstimmung mehrfach gemessener, identischer Reflexe ( $R_{\text{merge}}$ ), anhand des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ( $I/\sigma(I)$ ) und mit Hilfe der Vollständigkeit und Multiplizität der Daten.

### 2.8.2.5 Phasenberechnung

In den gebeugten Röntgenstrahlen eines Kristalls sind die kompletten Informationen über die dreidimensionale Anordnung der Atome im Kristall enthalten. Die drei beschreibenden Größen einer elektromagnetischen Welle sind die Wellenlänge, die Amplitude und die Phase. Da die Wellenlänge bei der Beugung nicht verändert wird, ist sie konstant und somit bekannt. Die Amplitude kann durch die relative Intensität der Reflexe bestimmt werden, eine Messung der Phase ist jedoch nicht möglich. Dadurch fehlt eine wichtige Information über die Anordnung der Atome im Kristall und somit für die Berechnung der Elektronendichte. Es gibt verschiedene Methoden zu Bestimmung der Phaseninformation.

Für den isomorphen Ersatz (*isomorphous replacement*, IR) werden Proteinkristalle in Lösungen von Schwermetallsalzen transferriert, die in den Kristall diffundieren und Aminosäuren modifizieren oder durch diese koordiniert werden. Durch die starke Streuung durch Schwermetallionen ändern sich die relativen Intensitäten auf dem Beugungsbild. Im Falle des gewünschten isomorphen Ersatzes, bei dem die Proteinstruktur oder Packung im Kristall nicht verändert wird, liegen die Reflexe auf den sich entsprechenden Beugungsaufnahmen an identischen Positionen und die Zellkonstanten sowie die Kristallsymmetrie ändern sich nicht. Mit Hilfe der Patterson-Funktion kann dann die Position des Schwermetalls bestimmt werden. Dadurch erhält man eine Phaseninformation mit der die Phasen für die Proteinstruktur abgeschätzt werden können. Bei der Methode bei der nur ein Schwermetallderivat verwendet wird und die daher als *single isomorphous replacement* (SIR) bezeichnet wird, ist der Fehler jedoch recht groß und die berechnete Elektronendichte ist meist nicht interpretierbar. Mit jedem zusätzlichen Derivat in dem das jeweilige Schwermetall an einer anderen Stelle im Protein bindet, kann durch Kombination der Phaseninformationen zu einem sogenannten *multiple isomorphous replacement* (MIR) der Fehler in der Phasenschätzung verringert werden. Somit wird die Elektronendichtekarte interpretierbar.

Mit Hilfe der multiplen anomalen Dispersion (*multiple wavelength anomalous dispersion*, MAD) kann ebenfalls die Phase bestimmt werden. Bei Proteinkristallen, die nur leichte Atome enthalten, existieren sogenannte Friedel-Paare. Dabei handelt es sich um Reflexe, die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind und die gleiche Identität besitzen. Sind jedoch Schwermetalle im Kristall vorhanden, so unterscheiden sich die Intensitäten der Friedel-Paare, wobei der Unterschied von der Wellenlänge des Röntgenstrahls abhängt. Wenn das Röntgenabsorptionsmaximum des Metalls der Wellenlänge des Röntgenstrahls entspricht oder in der Nähe liegt, werden die Elektronen angeregt und es kommt zu einer anomalen Dispersion durch eine Phasenverschiebung. Somit kann aus den Intensitätsunterschieden zwischen den Friedel-Paaren die Phaseninformation berechnet werden. Für ein MAD-Experiment werden drei Datensätze aufgenommen. Beim Absorptionsmaximum (Maximum der  $f''$ -Kurve) wird ein starkes anomales Signal gemessen und bei einer Wellenlänge die ca.  $0,0001 \text{ \AA}$  neben dem Absorptionsmaximum (Wendepunkt der  $f''$ -Kurve) liegt wird ein Datensatz aufgenommen, der isomorphe Differenzen zum dritten Datensatz ergibt. Der dritte Datensatz ist der nativ Datensatz, der ca.  $0,1 \text{ \AA}$  neben dem Absorptionsmaximum gemessen wird. Da alle Datensätze von einem einzigen Kristall stammen sollten, wird der Kristall in flüssigem Stickstoff eingefroren und während des Experiments ebenfalls auf diese Temperatur gekühlt um Schäden am Protein durch die starke Synchrotronstrahlung zu vermeiden. Meist kann durch die Kombination der anomalen und isomorphen Phasen eine interpretierbare Elektronendichte erhalten werden. Für MAD-Experimente werden häufig Kristalle aus rekombinanten Proteinen verwendet in denen Methionin durch Selenomethionin ersetzt wurde. Dafür werden methioninauxotrophe *E. coli*-Zellen für die Proteinexpression in Minimalmedium mit Selenomethionin anstelle von Methionin kultiviert. Da das Schwermetall Selen in diesem Fall bereits im Protein vorhanden ist, muss nicht lange nach einem geeigneten Schwermetallderivat gesucht werden.

Falls bereits eine Kristallstruktur eines Proteins mit relativ hoher Sequenzidentität bekannt ist, kann auch der molekulare Ersatz (*molecular replacement*, MR) zur Strukturbestimmung verwendet werden. Dafür werden aus den Koordinaten der vorhandenen Struktur die Amplituden und Phasen für das Modell rückwärts berechnet und mit den Modellphasen und den gemessenen Amplituden die Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur berechnet. Dazu muss allerdings zunächst die bekannte Struktur korrekt in der neuen Kristallzelle platziert werden, da sich meist die Raumgruppen und die Orientierung des Proteins unterscheiden.

Durch sogenannte Dichtemodifizierungsmethoden, wie zum Beispiel *solvent flattening*, kann eine existierende experimentelle Elektronendichte verändert werden, wodurch korrektere Phasen errechnet werden können, die zu einer verbesserten Elektronendichte führen.

In dieser Arbeit wurde ein MAD-Experiment mit Selenomethionin-Derivaten durchgeführt, wofür zunächst das Absorptionsmaximum des Selenomethionins in einem Fluoreszenzscan bestimmt wurde. Anschließend wurden die sogenannten Bijvoet-Differenzen zwischen den Friedel-Paaren bestimmt und die Substruktur des anomalen Streuers unter Anwendung der Patterson-Funktion mit Hilfe des Programms SHELXD (Schneider und Sheldrick, 2002) daraus berechnet.

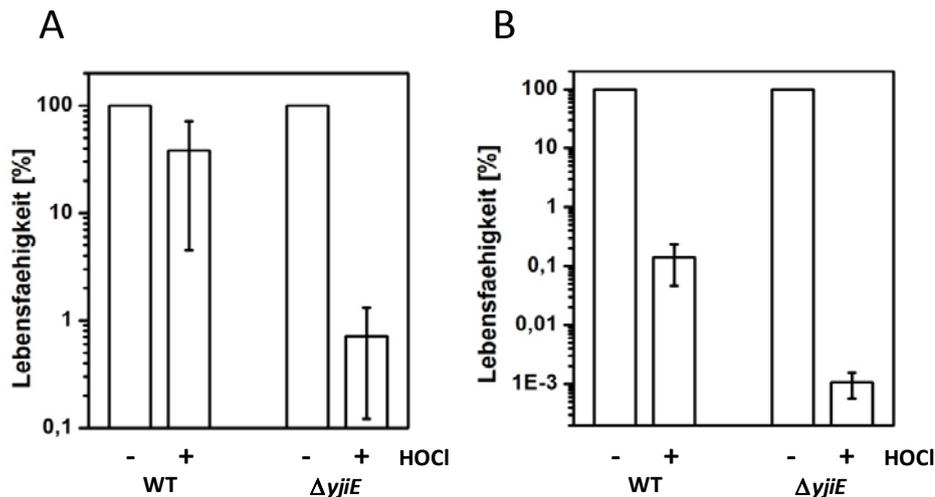
#### 2.8.2.6 Interpretation der Elektronendichte und Strukturverfeinerung

In die erhaltene Elektronendichtekarte werden manuell Aminosäuren oder Polypeptidfragmente platziert. Dadurch ergibt sich ein dreidimensionales Modell. Die meisten Proteinkristallstrukturen besitzen eine Auflösung zwischen 2 und 3 Å. Anschließend werden mit Hilfe von Computerprogrammen der R-Faktor und die B-Faktoren der Struktur optimiert und die Struktur dadurch verfeinert. Der R-Faktor drückt die Differenz zwischen den experimentell beobachteten Amplituden und den berechneten Amplituden des augenblicklichen Modells aus und sollte möglichst klein ( $< 0,2$ ) sein. Die B-Faktoren spiegeln die Beweglichkeit der Atome im Kristallgitter wieder und sollten für das gesamte Protein einen Mittelwert von 20 – 30 Å<sup>2</sup> oder weniger haben.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Lebensfähigkeits-Assays mit C600- und C600- $\Delta yjiE$ -Zellen

Das Gen *yjiE* wurde in verschiedenen *E. coli* K12 Laborstämmen durch P1-Transduktion (siehe 2.2.14) deletiert, um die Bedeutung von *yjiE* für die Lebensfähigkeit zu analysieren. Der Grund für die Verwendung verschiedener Stämme war, dass die verschiedenen Laborstämme unterschiedliche Mutationen aufweisen (Peters et al., 2003). Daher können sich in sehr robusten oder weniger robusten Stämmen durch eine weitere Deletion unterschiedliche Phänotypen ergeben. Es zeigte sich, dass *yjiE* in allen verwendeten Stämmen keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit unter Nicht-Stress-Bedingungen hatte. Da die Überexpression von YjiE in  $\Delta rpoH$ -Zellen (BB7224) jedoch eine HOCl-Resistenz vermittelt (siehe 1.7), wurde mit Hilfe von Lebensfähigkeits-Assays (siehe 2.7.1) die Lebensfähigkeit der Deletionsstämme im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Stamm analysiert. In C600-Zellen führte die Deletion von *yjiE* unter HOCl-Stress zu einer ca. 60-fach verringerten Lebensfähigkeit in LB-Medium mit 5 mM HOCl (siehe Abbildung 16A) und zu einer ca. 150-fach verringerten Lebensfähigkeit in Phosphatpuffer mit 6  $\mu$ M HOCl (Abbildung 16B). Diese Ergebnisse zeigen, dass YjiE unter HOCl-Stress für den Schutz der Zellen wichtig ist. Da HOCl sehr reaktiv ist, wird in LB-Medium wesentlich mehr HOCl für toxische Effekte benötigt, da ein Großteil der Chemikalie mit Komponenten des Mediums reagiert. In anderen *E. coli*-Stämmen konnte kein so signifikanter Effekt der Deletion von *yjiE* auf die Lebensfähigkeit unter HOCl-Stress beobachtet werden. Die Lebensfähigkeit unter Stress durch andere ROS wie beispielsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Diamide (Sigma-Aldrich) wurde durch die Deletion von *yjiE* in C600 nicht beeinflusst (Experimente von Yan Le durchgeführt), woraus geschlossen werden kann, dass YjiE eine spezifische Funktion unter HOCl-Stress besitzt.



**Abbildung 16:** Lebensfähigkeits-Assays von C600 und C600  $\Delta yjiE$  (KMG214)-Zellen unter HOCl-Stress. Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden in LB-Medium (A) oder Phosphatpuffer (B) für 10 min mit HOCl (+) behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Die HOCl-Konzentration betrug 5 mM (A) bzw. 6  $\mu$ M (B). Die Überlebensfähigkeit der unbehandelten Zellen wurde jeweils auf 100 % normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

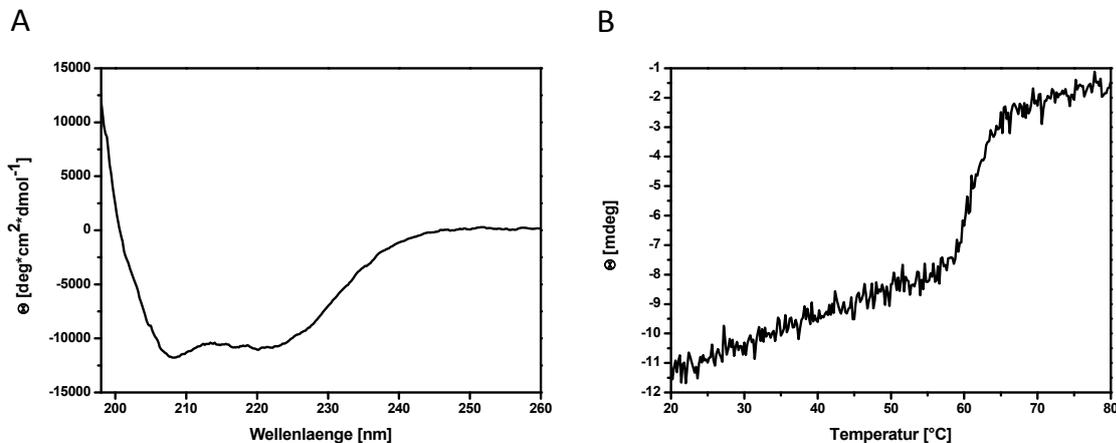
## 3.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von YjiE

### 3.2.1 Fern-UV-CD-Spektrum und thermische Entfaltung von YjiE

Die CD-Spektroskopie ist eine relativ schnelle Methode um die Konformation von Proteinen zu untersuchen. Fern-UV-CD-Spektren von Peptiden mit typischer  $\alpha$ -helikaler Konformation, mit  $\beta$ -Faltblattstruktur oder mit einer ungeordneten Konformation (*random coil*) zeigen charakteristische Maxima und Minima. So liefern  $\alpha$ -helikale Peptide Minima bei ca. 208 nm und 222 nm, sowie ein Maximum bei 192 nm. Ein Minimum bei 215 bis 220 nm und ein Maximum bei 195 nm weisen auf eine  $\beta$ -Faltblattstruktur hin. Um die Sekundärstruktur von YjiE zu untersuchen, wurden CD-Spektren aufgenommen (siehe 2.5.4). Wie in Abbildung 17A zu sehen ist, weist das Fern-UV-CD-Spektrum von YjiE Minima bei ca. 208 nm und 222 nm auf. Dies zeigt, dass das gereinigte YjiE gefaltet ist. Der hohe Anteil an  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur passt gut zum Helix-turn-Helix Motif der DNA-bindenden Domäne.

Mittels CD-Spektrometrie ist es auch möglich Temperaturübergänge von Proteinen zu messen und dadurch eine Aussage über die Thermostabilität zu treffen. Dazu misst man während der thermischen Entfaltung die Intensität bei einer Wellenlänge mit einem starken sekundärstrukturspezifischen Signal (siehe 2.5.4). Der Temperaturübergang von YjiE ist in

Abbildung 17B zu sehen. Der thermische Übergangsmittelpunkt von YjiE liegt bei ca. 60°C, was dafür spricht, dass das Protein relativ stabil ist.



**Abbildung 17:** (A) Fern-UV-CD-Spektrum von YjiE. Das Spektrum wurde mit 0,1 mg/ml YjiE in storage buffer zwischen 198 nm und 260 nm bei 20°C mit einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min aufgenommen. Es wurden 16 Einzelspektren akkumuliert. (B) Temperaturübergang von YjiE. Der Übergang wurde im CD-Spektrometer bei 222 nm zwischen 20°C und 80°C mit einer Heizrate von 20°C/h gemessen.

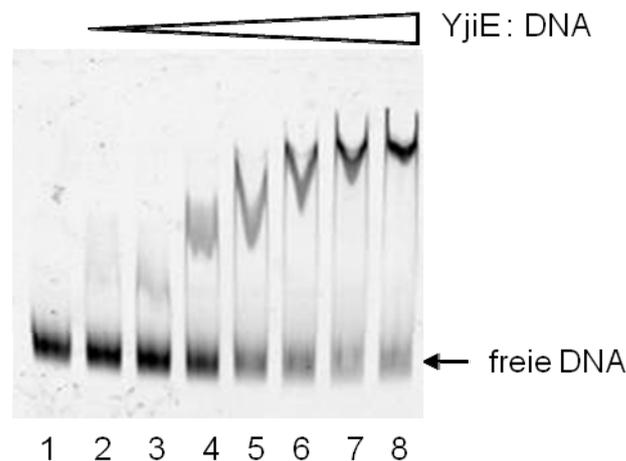
### 3.2.2 DNA-Bindung von YjiE

Wie bereits unter 1.7 beschrieben, konnte YjiE durch Homologie als LysR-Typ Transkriptionsregulator (LTTR, siehe 1.3) identifiziert werden. Normalerweise binden LTTRs sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand an DNA. Für die Aktivierung wird jedoch meistens ein sogenannter *co-inducer*, bei dem es sich häufig um ein kleines Molekül handelt, benötigt. Viele LTTRs zeigen auch eine Autoregulation ihrer eigenen Transkription. Daher wurden für die DNA-Bindungsexperimente unterschiedlich langen Fragmenten des Promotors von *yjiE* verwendet (102bp-*yjiE*-Promotor-DNA: Basenpaare -50 bis +52; 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA: Basenpaare -106 bis +52; 315bp-*yjiE*- Promotor-DNA: Basenpaare -263 bis +52; 689bp-*yjiE*- Promotor-DNA: Basenpaare -637 bis +52).

#### 3.2.2.1 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) mit DNA und YjiE

Durch sogenannte *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) kann die Bindung eines Proteins an DNA anhand der verringerten Mobilität des DNA-Protein-Komplexes bei der Auftrennung auf einem Acrylamid-Gel analysiert werden. Die Experimente wurden wie unter 2.6.1 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abbildung 18 für 315bp-*yjiE*-Promotor DNA gezeigt ist, bindet reduziertes YjiE an den eigenen Promotor. Mit steigender Proteinkonzentration kommt es zu einer immer stärkeren Mobilitätsverringerng, die bei einem molaren Verhältnis von DNA zum YjiE-Monomer von 1:60 in etwa seine maximale Höhe erreicht. Wenn *yjiE*-Promotor-DNA-Fragmente mit anderen Längen (102bp-, 158bp- oder 689bp-*yjiE*-Promotor-DNA) verwendet wurden, kam es zu vergleichbaren Ergebnissen. Dass ein so großer Überschuss an YjiE benötigt wird ist ungewöhnlich, da LTTRs normalerweise in Form von Tetrameren an DNA binden. Entweder ist ein großer Anteil des gereinigten Proteins inaktiv oder es bindet tatsächlich sehr viel YjiE an die DNA. Es ist aber auch möglich, dass die niedrige Affinität von YjiE für diese DNA-Fragmente daher rührt, dass YjiE im Gegensatz zu den meisten anderen LTTRs nicht effizient an seinen eigenen Promotor bindet, oder, dass eine Aktivierung von YjiE nötig ist, um eine höhere Affinität zu erreichen.



**Abbildung 18:** EMSAs von 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA. Es wurden 34,2 nM AlexaFluor488-gelabelte DNA (Bahn 1) eingesetzt und mit steigenden Konzentrationen an reduziertem YjiE inkubiert (Bahn 2 bis 8 mit jeweils 0,205  $\mu$ M, 0,41  $\mu$ M, 0,82  $\mu$ M, 1,23  $\mu$ M, 1,64  $\mu$ M, 2,05  $\mu$ M, and 2,46  $\mu$ M YjiE). Die Proben wurden auf einem Neutralgel aufgetrennt und das Fluoreszenzlabel der DNA anschließend mit dem Typhoon Scanner detektiert.

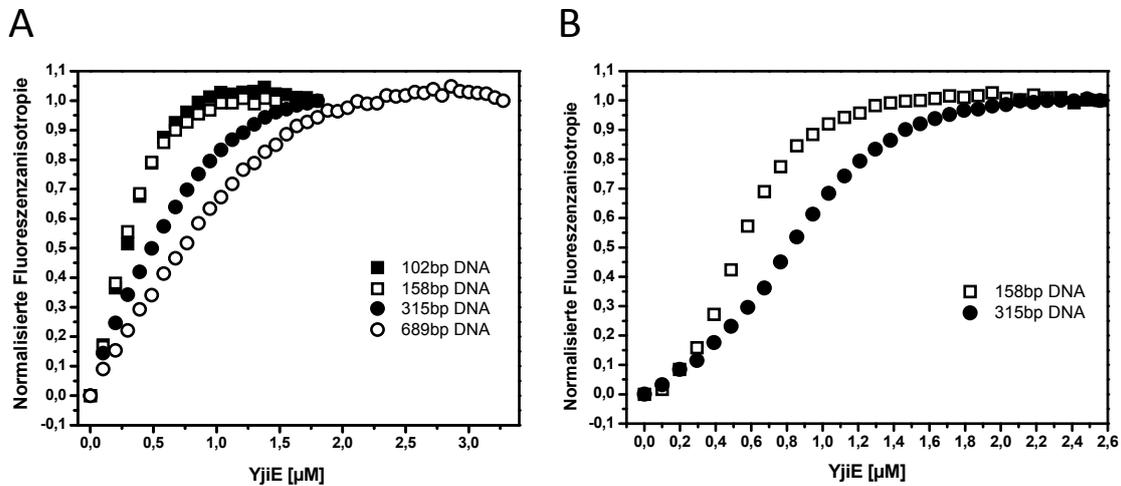
EMSAs mit DNA-Fragmenten, die keinen Promotor und daher keine Bindestelle für YjiE aufweisen sollten (393bp-*yjiD*-DNA, 576bp-*rpoE*-DNA, 315bp-*tufA*-DNA) zeigten, dass die Bindung von YjiE an DNA offenbar unspezifisch ist, da es zu einer vergleichbaren Mobilitätsverringerng kam. Da immer mindestens 150 mM Salz in den Proben vorhanden war, ist es unwahrscheinlich, dass die unspezifische Bindung auf reinen Ladungswechselwirkungen beruht. Bereits niedrige Konzentrationen von Heparin, um unspezifische DNA-Bindung zu verhindern, führten dazu, dass die DNA-Bindung komplett verloren ging, was ebenfalls zeigt, dass es sich scheinbar um unspezifische Bindung handelt.

Die Zugabe von HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder verschiedenen Eisensalzen zu YjiE führte nicht zu einer veränderten Bindung an DNA, wodurch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch diese Komponenten ausgeschlossen werden konnte. Experimente in denen Oxidationsprodukte von HOCl mit Ammoniumchlorid, Tris und Methionin oder auch Glutathion (GSSG), HOCl-oxidiertes LB-Medium oder HOCl-oxidiertes Lysat zugegeben wurden, wurden von Alexander Eichner und Yan Le durchgeführt und führten ebenfalls nicht zu einer veränderten DNA-Bindung von YjiE. Bis jetzt konnte keine Möglichkeit gefunden werden, um YjiE zu aktivieren. Es wurden auch analoge Promotor-Fragmente des Gens *cydA*, das durch YjiE reguliert wird (siehe Tabelle 1 im Anhang) und daher Bindestellen für YjiE in der Promotorregion besitzen sollte, getestet, aber auch hier konnte keine außergewöhnliche Veränderung der Mobilität der DNA beobachtet werden.

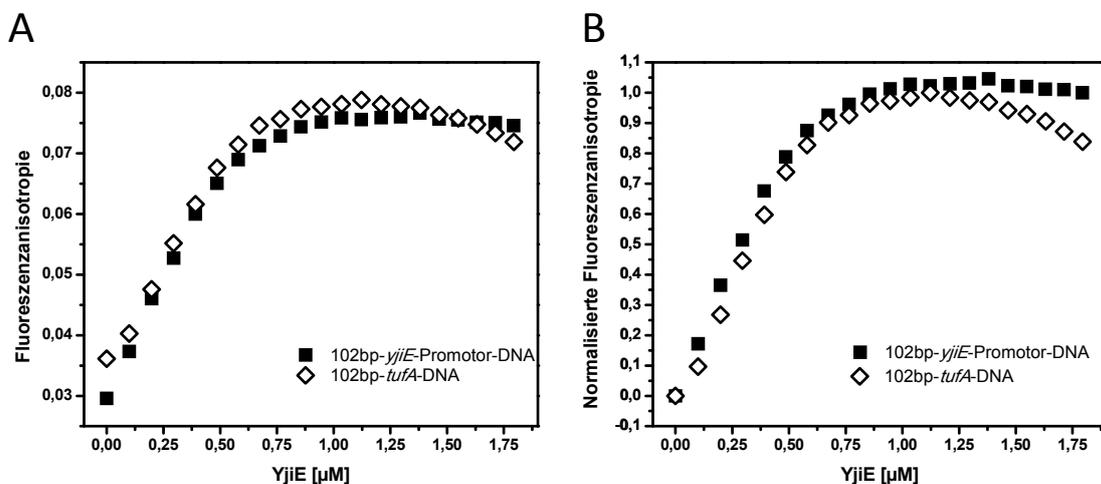
### 3.2.2.2 Fluoreszenzpolarisations-Messungen mit DNA und YjiE

Die Bildung eines DNA-Protein-Komplexes kann auch mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation bzw. Fluoreszenzanisotropie (siehe 2.5.3) verfolgt werden, da sich durch die Komplexbildung die Rotationsgeschwindigkeit ändert und der Anisotropiewert somit zunimmt. Für die Anisotropiemessungen mit YjiE wurden jeweils 10 nM verschiedener einfach AlexaFluor488-gelabelter *yjiE*-Promotor-DNA-Fragmente (102bp-, 158bp, 315bp- und 689bp-*yjiE*-Promotor DNA) in DNA-Bindepuffer 2 verwendet. In einer rührbaren Küvette wurde reduziertes YjiE in 100 nM-Schritten zutitriert. Aus den in den 60 sec zwischen den einzelnen Titrationsschritten gemessenen Anisotropiewerten wurden Mittelwerte gebildet. Wie in Abbildung 19A zu sehen ist, wurden alle DNAs von YjiE gebunden. Bei den längeren DNA Fragmenten war jedoch mehr YjiE nötig um eine Sättigung zu erreichen. Die Experimente wurden mehrfach wiederholt und ergaben sehr ähnliche Bindungskurven. Allerdings hatten die Bindekurven in manchen Fällen einen sigmoidalen Verlauf, wie in Abbildung 19B zu sehen ist. Bei den kürzeren DNA-Fragmenten (102 bp und 158 bp) wurde eine Sättigung der Bindestellen bei einer Konzentration von ca. 1 µM YjiE erreicht. Das entspricht einem 100-fachen Überschuss an YjiE gegenüber den DNA-Fragmenten. Interessant ist, dass für die Sättigung der Bindung von 102bp- und 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA scheinbar gleich viel YjiE benötigt wird, während für die 315bp-DNA bereits mehr und für die 689bp-DNA sogar noch mehr YjiE nötig ist. Dass für längere DNA-Fragmente mehr Protein für die Sättigung der Bindestellen nötig ist, lässt vermuten, dass die Bindung unspezifisch ist und YjiE überall an die DNA binden kann. Die unspezifische Bindung an DNA konnte auch dadurch

nachgewiesen werden, dass AlexaFluor488-102bp-*yjiE*-Promotor-DNA und AlexaFluor488-102bp-*tufA*-DNA, die keine spezifischen Bindestellen für YjiE aufweisen sollte, gleich gut gebunden wurden (siehe Abbildung 20).



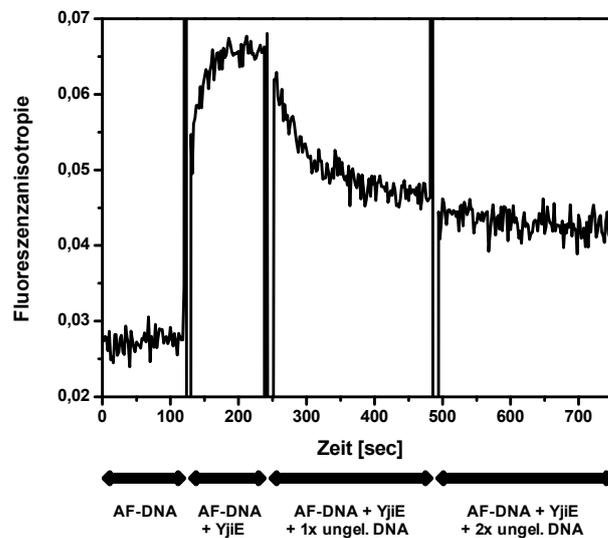
**Abbildung 19:** Fluoreszenzanisotropie-Bindekurven mit verschiedenen langen AlexaFluor488-gelabelten *yjiE*-Promotor-DNA Fragmenten und YjiE. Zu 10 nM der jeweiligen DNA in einer gerührten Küvette wurde reduziertes YjiE in 100 nM-Schritten zutitriert. Die Anisotropie wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gemessen. (A) Messungen mit 102bp-, 158bp-, 315bp- und 689bp-*yjiE*-Promotor-DNA bei 20°C. (B) Messungen mit 158bp- und 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA bei 37°C.



**Abbildung 20:** Fluoreszenzanisotropie-Bindekurven mit spezifischer AlexaFluor488-102bp-*yjiE*-Promotor-DNA und unspezifischer AlexaFluor488-102bp-*tufA*-DNA. Zu 10 nM der jeweiligen DNA in einer gerührten Küvette wurde reduziertes YjiE in 100 nM-Schritten titriert. Die Anisotropie wurde bei 20°C bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm gemessen. (A) Nicht-normalisierte Daten. (B) Normalisierte Daten.

In Kompetitions-Experimenten wurde zu 10 nM AlexaFluor488-158bp-*yjiE*-Promotor-DNA 1 µM YjiE zugegeben um die DNA komplett zu binden. Anschließend wurden zweimal 100 nM ungelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA zur Konkurrenz der gelabelten DNA zugegeben. Abbildung 21 zeigt, dass der Anisotropie-Wert nach der Zugabe von ungelabelter

DNA stark abnimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bindung von YjiE an DNA dynamisch ist, da die gelabelte DNA durch ungelabelte DNA verdrängt werden kann.

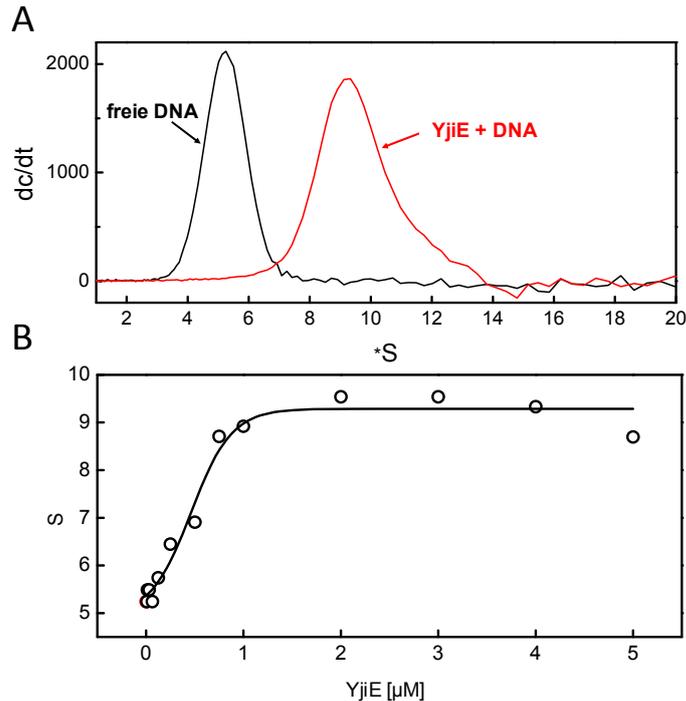


**Abbildung 21:** Fluoreszenzanisotropie-Rohdaten zur Konkurrenz von AlexaFluor488-158bp-*yjiE*-Promotor-DNA mit ungelabelter 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA. An 10 nM AlexaFluor488-158bp-*yjiE*-Promotor-DNA (AF-DNA) wurde 1  $\mu$ M YjiE gebunden und anschließend zweimal 100 nM ungelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA (ungel. DNA) zugegeben. Die Messung wurde bei 20°C durchgeführt.

### 3.2.2.3 Analytische Ultrazentrifugation mit DNA und YjiE

Die Komplexbildung von DNA und YjiE kann auch mittels analytischer Ultrazentrifugation nachgewiesen werden. Dazu wurden zu 10 nM zweifach AlexaFluor488-gelabelter 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA in DNA-Bindepuffer 1 steigende Mengen an reduziertem YjiE zugegeben und anschließend ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf durchgeführt bei dem das Fluoreszenzsignal detektiert wurde (siehe 2.5.5.2). Wie in Abbildung 22A zu sehen ist, besitzt freie DNA einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 5 S, während nach der Zugabe von einer großen Menge YjiE keine freie DNA mehr vorhanden ist und ein Komplex mit einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 9 S entsteht. Freies YjiE konnte durch Fluoreszenz nicht detektiert werden, da nur die DNA gelabelt war. Aus der Tatsache, dass freies YjiE jedoch einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 11 S besitzt (siehe 3.2.4.2), kann geschlossen werden, dass YjiE bei Zugabe von DNA dissoziiert und kleinere Oligomere an DNA binden. Abbildung 22B zeigt die Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten des Komplexes von der YjiE-Konzentration. Es werden ca. 1,3  $\mu$ M YjiE benötigt um eine Sättigung der Bindung zu erreichen, was einem 130-fachen Überschuss an Protein gegenüber der DNA entspricht.

Auch mit Hilfe von weiteren Experimenten mit gelabelter 315bp- und 689bp-*yjiE*-Promotor-DNA, die beide gebunden wurden, konnte keine Aussage über die Bindestöchiometrie getroffen werden, da das partielle spezifische Volumen des DNA-YjiE-Komplexes nicht bekannt ist. Diese Variable könnte mit Hilfe eines Anton-Paar-Densitometers bestimmt werden. Ein entsprechendes Gerät ist jedoch am Department Chemie nicht vorhanden. Messungen mit AlexaFluor488-gelabelter 315bp-*tufA*-DNA zeigten erneut, dass YjiE auch diese DNA bindet und es sich offenbar um unspezifische Bindung handelt. Alle diese Experimente in DNA-Bindepuffer 1, die zusammen mit Titus Franzmann durchgeführt wurden, waren später nicht mehr reproduzierbar. Weitere Versuche unter Verwendung von DNA-Bindepuffer 2, der kein Salz enthielt, zeigten, dass YjiE an alle *yjiE*-Promotor-Fragmente (102bp, 158bp, 315bp, 689bp) sowie an *tufA*-DNA bindet und sehr große Komplexe mit ca. 20 S bildet. Der Vergleich von DNA-Bindepuffer 1 und DNA-Bindepuffer 2 und verschiedenen Puffern mit einer dazwischenliegenden Salzkonzentration in Experimenten, die zusammen mit Alexander Bepperling durchgeführt wurden, führte zu dem Ergebnis, dass die DNA-Bindung offenbar stark von der Salzkonzentration abhängt. Da jedoch bereits durch den YjiE storage buffer relativ viel Salz mit dem Protein in die Proben gebracht wurde, kann es sich bei den großen Komplexen im Grunde nicht um reine Ladungswchselwirkungen handeln. Die Abhängigkeit der DNA-Bindung von der Salzkonzentration konnte auch bereits zusammen mit Titus Franzmann gezeigt werden, da in Sedimentationsgeschwindigkeitläufen keine DNA-Bindung beobachtet werden konnte, wenn YjiE storage buffer, der 380 mM NaCl enthält, verwendet wurde.



**Abbildung 22:** Analyse der DNA-Bindung an YjiE durch Sedimentationsgeschwindigkeits-Ultrazentrifugation. In DNA-Bindepuffer 1 mit 1 mM TCEP wurde 10 nM zweifach AlexaFluor488-gelabelte 315bp-*yjiE*-Promotor-DNA mit steigenden Konzentrationen an reduziertem YjiE versetzt und während der Sedimentation bei 35000 rpm und 20°C das Fluoreszenzsignal detektiert. Die S-Werte wurden mit der dc/dt-Methode bestimmt. (A) Sedimentationskoeffizienten-Verteilung von freier DNA (schwarze Linie) und dem DNA-YjiE-Komplex (rote Linie) bei gesättigter Bindung. (B) Diagramm der bestimmten S-Werte in Abhängigkeit von der YjiE-Konzentration (Bindekurve).

### 3.2.2.4 Diskussion der Ergebnisse der DNA-Bindungs-Assays

Bei allen Methoden zur Detektion der DNA-Bindung war ein hoher ca. 100-facher Überschuss an YjiE gegenüber *yjiE*-Promotor-DNA nötig um die Bindung zu sättigen. Dies ist ungewöhnlich, da LTTRs normalerweise als Tetramere an DNA binden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass ein großer Anteil des gereinigten YjiE inaktiv ist. Womöglich binden aber auch tatsächlich viele YjiE-Moleküle an die DNA. Bei anderen LTTRs sind zum Teil ebenfalls relativ große Proteinmengen für eine vollständige DNA-Bindung nötig. Zum Teil reicht jedoch auch bereits ein äquimolares Verhältnis aus. Für OxyR beispielsweise existiert keine Konsensussequenz für die DNA-Bindestellen und oxidiertes OxyR bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene regulierte Gene. Mit *ahpC*-Promotor-DNA konnte gezeigt werden, dass die Bindung an spezifische Bindstellen um den Faktor  $10^6$  höher ist als an zufällige DNA-Sequenzen. Für eine vollständige Bindung der *ahpC*-Promotor-DNA ist jedoch ebenfalls ein relativ hoher ca. 90-facher Überschuss an OxyR nötig (Tartaglia et al., 1992). Um *gdhA*-Promotor-DNA durch NAC komplett zu binden wurde hingegen lediglich

ein Verhältnis von NAC zu DNA von ca. 1:1 benötigt (Janes et al., 2003). Für die Bindung von CysB an *cysP*-Promotor-DNA konnte durch quantitative EMSAs ein  $K_D$  von  $4,72 \pm 0,35$  nM berechnet werden, wobei auf dem entsprechenden Gel zu sehen ist, dass ein ca. 45-facher Überschuss von CysB gegenüber DNA für die vollständige Bindung nötig ist (Lochowska et al., 2004). In Habdas et al. (2010) wurde YjiE kürzlich als Zelldichte-abhängiger Motilitätsrepressor (QseD) identifiziert. In den in der Veröffentlichung gezeigten EMSA-Experimenten mit Qsed aus *E. coli* K-12 (= YjiE) wurde sogar ein ca. 2500-facher Überschuss an Protein gegenüber DNA benötigt, um eine maximale Verringerung der Mobilität der DNA zu erreichen, und es war ein starker Schmier-Effekt bei den Banden zu beobachten.

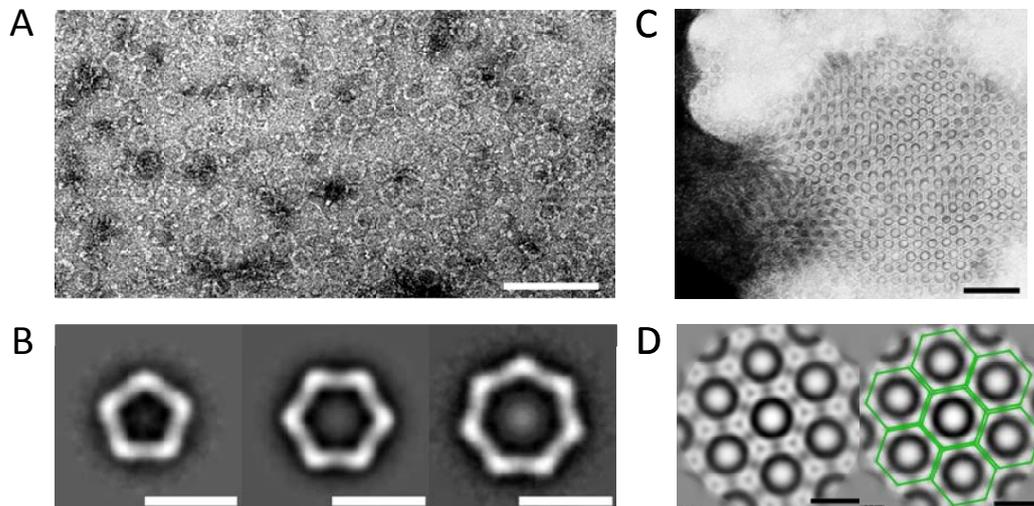
Mit allen eingesetzten Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Bindung von YjiE offenbar unspezifisch ist, da auch DNA-Fragmente gebunden werden, die keine Bindestellen für YjiE aufweisen sollten. Möglicherweise muss das gereinigte YjiE erst durch einen *co-inducer* aktiviert werden, damit eine höhere Affinität erlangt wird und der Transkriptionsfaktor spezifisch an bestimmte Promotorbereiche bindet. Bisherige Versuche mit verschiedenen oxidierenden oder oxidierten Substanzen, Medien und Lysaten waren erfolglos. Da YjiE in *E. coli*-Zellen resistenter gegenüber HOCl-Stress macht (siehe 3.1), scheint es *in vivo* in Anwesenheit von HOCl aktiv durch zu sein. Eine Möglichkeit den *co-inducer* zu identifizieren wäre daher die Auftrennung von Zellysaten aus HOCl-gestressten Zellen durch HPLC. In den aufgefangenen Fraktionen würden sich jeweils nur Zellkomponenten mit einer bestimmten Größe befinden. Anschließend könnte mittels DNA-Bindungs-Assays getestet werden, ob eine dieser Fraktionen YjiE aktivieren kann. Die aktivierende Komponente könnte daraufhin in weiteren Experimenten identifiziert werden. Auch eine Immunopräzipitation von YjiE aus gestressten und nicht gestressten Zellen und eine anschließende Identifizierung von co-präzipitierten Molekülen könnte eine Identifikation eines Aktivators oder auch eines eventuell vorhandenen Repressors ermöglichen. Entsprechende Experimente wurden von Yan Le durchgeführt. Es konnte jedoch kein Bindungspartner von YjiE identifiziert werden. Eine weitere Erklärung für die niedrige Affinität der DNA-Bindung an *yjiE*-Promotor-Fragmente wäre, dass YjiE im Gegensatz zu vielen anderen LTTRs keine Autoregulation aufweist und daher nicht an seine eigene Promotorregion bindet. DNA-Sequenzen an die YjiE spezifisch bindet, könnten beispielsweise durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) identifiziert werden. Dieses Experiment wurde von Adrian Drazic durchgeführt. YjiE wurde *in vivo* mit DNA gecrosslinkt und anschließend die DNA zusammen mit dem Transkriptionsfaktor durch Co-

Immunopräzipitation isoliert. Daraufhin wurde versucht die DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren und zu sequenzieren. Es konnten jedoch keine Sequenzen an die YjiE bindet identifiziert werden. Die Ursache für das Scheitern der beiden Experimente in denen YjiE immunopräzipitiert wurde, ist vermutlich, dass die Konzentration von YjiE in Wildtyp-Zellen zu gering ist. Der Transkriptionsfaktor konnte in Wildtyp-Zellen nicht durch Immunoblotting nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie mit YjiE

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa visualisiert werden. Da die Strahlendosis auf ein Minimum reduziert wird, um Strahlenschäden zu vermeiden, sind die Einzelaufnahmen der Moleküle in der Regel sehr verrauscht. Deshalb wurden aus einer Vielzahl von Bildern Einzelbilder (9918 Moleküle) ausgewählt und Mittelungsbilder von vielen Molekülen mit der gleichen Orientierung erstellt, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich verbessert wird. Um YjiE für die Visualisierung mit dem Transmissionselektronenmikroskop vorzubereiten, wurde das Protein zunächst auf einem kohlenstoffbeschichteten Netzchen (*grid*) adsorbiert und anschließend mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Die genaue Vorgehensweise zur Visualisierung von YjiE ist unter 2.8.1 beschrieben. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Nathalie Braun und Andreas Kastenmüller vom Department für Elektronenmikroskopie der TU München durchgeführt. Abbildung 23A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von YjiE in der zu sehen ist, dass YjiE vor allem ringförmige Strukturen bildet von denen die meisten hexagonal (75 %) sind. Die Bildanalyse (typische Mittelungsbilder siehe Abbildung 23B) zeigte zudem, dass auch geringere Anteile an pentagonalen (15 %) und heptagonalen (10 %) Strukturen vorhanden sind. Die überwiegend vorkommenden hexagonalen Strukturen besitzen einen Durchmesser von ca. 24 nm bei einer Segmentlänge und -breite von jeweils 11 nm und 3 nm. Aufgrund der Tatsache, dass YjiE offenbar eine bevorzugte Adsorptionsorientierung auf der Kohleschicht aufweist, sind nur Aufsichten auf das ringförmige Oligomer zu beobachten. Mittels Kryoelektronenmikroskopie, bei der die Probe schockgefroren wird, so dass die Moleküle im nativen Zustand untersucht werden können, könnte YjiE vermutlich in allen Orientierungen beobachtet werden, was eine 3D-Rekonstruktion ermöglichen würde. Da YjiE in Lösung 12mere bildet (siehe 3.2.4), stellen die beobachteten hexagonalen Strukturen entweder einen Ring mit 12 Untereinheiten oder zwei aufeinander sitzende Ringe mit jeweils 6

Untereinheiten dar. Durch eine Aufnahme von einer um einen kleinen Winkel gekippten Probe im Transmissionselektronenmikroskop konnte bisher nicht festgestellt werden, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft.



**Abbildung 23:** Elektronenmikroskopische Bilder von YjiE. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von mit Uranylacetat negativ kontrastiertem YjiE (0,1 mg/ml, 2 % (w/v) Uranylacetat). Maßstabsbalken: 100 nm (B) Klassen-Mittelungsbilder der pentagonalen, hexagonalen und heptagonalen YjiE-Oligomere, die in (A) zu sehen sind. Maßstabsbalken: 20 nm. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativ-kontrastierten 2D-Kristalls von YjiE. Maßstabsbalken: 100 nm. (D) Mittelungsbild aus (C). Im rechten Bild ist die Lage der hexagonalen Strukturen im 2D-Kristall gezeigt. Maßstabsbalken: 20 nm.

Zum Teil wurden mit dem Elektronenmikroskop auch Pseudo-2D-Kristalle beobachtet, die sich zufällig in der Proteinlösung gebildet hatten (siehe Abbildung 23C). Anhand der bereits mit Hilfe von Einzelbildmittelungen erhaltenen hexagonalen Ringstruktur konnte die Lage dieser Ringe in Mittelungsbildern der 2D-Kristalle markiert werden (siehe Abbildung 23D). Optimierte 2D-Kristalle könnten auch mittels Elektronenkristallographie untersucht werden. Dazu werden klassische TEM-Aufnahmen mit Beugungsbildern kombiniert. Mit dieser Methode können sehr hohe Auflösungen (6 - 8 Å) der untersuchten Moleküle erzielt werden.

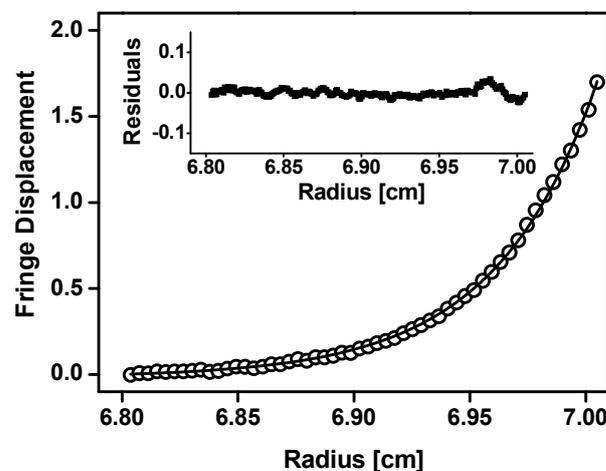
### 3.2.4 Analytische Ultrazentrifugation mit YjiE

Um das Molekulargewicht und somit den Oligomerisierungszustand von YjiE zu bestimmen, wurden Ultrazentrifugationsexperimente durchgeführt. Mit Hilfe von Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation, bei der bei einer relativ niedrigen Drehzahl solange zentrifugiert wird bis sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion eingestellt hat, kann

das Molekulargewicht sehr genau bestimmt werden. Durch Sedimentationsgeschwindigkeits-ultrazentrifugation ist es ebenfalls möglich das Molekulargewicht zu berechnen, jedoch spielen dabei auch einige weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Molekülform eine Rolle. Die Messungen wurden wie unter 2.5.5 beschrieben zusammen mit Dr. Titus Franzmann durchgeführt.

### 3.2.4.1 Sedimentationsgleichgewichtsaltrazentrifugation mit YjiE

In Abbildung 24 ist die Konzentrationsverteilung von 15  $\mu\text{M}$  YjiE-His bei einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf unter Gleichgewichtsbedingungen zu sehen. Mit Hilfe eines *Single Species Fits* konnte für YjiE-His ein Molekulargewicht von 370 kDa berechnet werden. Für 9  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  YjiE-His sowie bei anderen Drehgeschwindigkeiten ergaben sich sehr ähnliche Werte und ein Gleichgewichtslauf mit nicht-getagtem YjiE führte zu einem Molekulargewicht von 420 kDa. Diese Daten zeigen, dass YjiE offenbar ein 12mer bildet (Monomer: ca. 35 kDa).

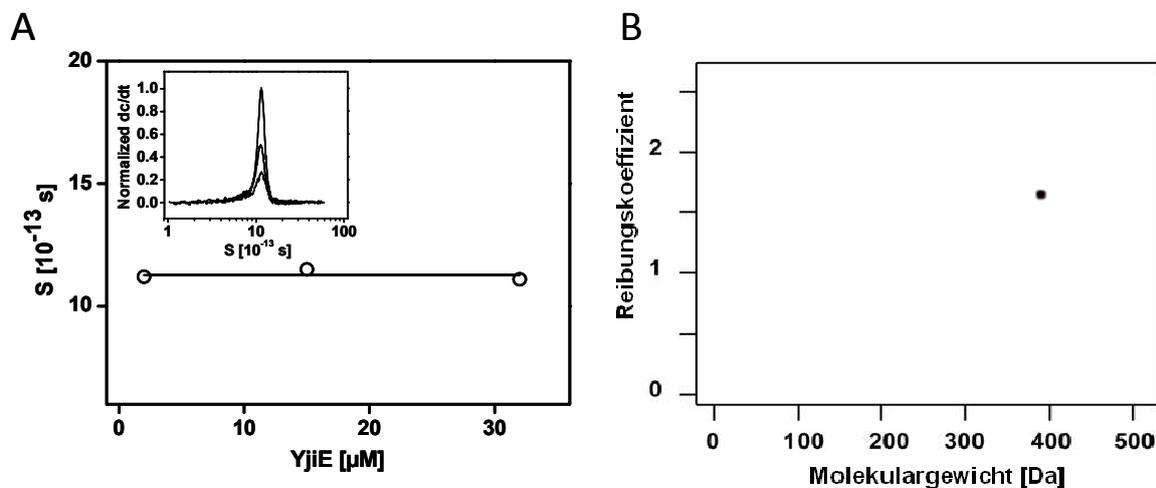


**Abbildung 24:** Sedimentationsgleichgewichtskonzentrationsverteilung des Sedimentationsgleichgewichtslaufs von 15  $\mu\text{M}$  YjiE-His bei 8000 rpm und 4°C. Inset: Residuals des *Single Species Fits* der experimentellen Daten.

### 3.2.4.2 Sedimentationsgeschwindigkeitultrazentrifugation mit YjiE

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe zeigten, dass YjiE konzentrationsunabhängig mit einem Sedimentationskoeffizienten von  $11,1 \pm 0,3$  S sedimentierte (siehe Abbildung 25A). Mit Hilfe von 2-dimensionaler Spektrumanalyse (2DSA, Brookes et al., 2010) konnten das Molekulargewicht und der Reibungskoeffizient des YjiE-Oligomers berechnet werden. Das

Molekulargewicht des 11 S-Partikels betrug  $395 \pm 10$  kDa. Dieser Wert stimmt gut mit dem Molekulargewicht für das YjiE-Dodekamer aus den Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten (siehe 3.2.4.1) überein. Der Reibungskoeffizient sagt etwas über die Form des Moleküls aus und war mit 1,66 relativ hoch (siehe Abbildung 25B), was für eine längliche oder ausgedehnte Form des Oligomers spricht (ein kugelförmiges Partikel besitzt einen Reibungskoeffizienten von 1). Die mit dem Elektronenmikroskop beobachteten, außergewöhnlichen, ringförmigen Strukturen, die YjiE bildet (siehe 3.2.3), passen gut zu diesem ungewöhnlichen Wert.



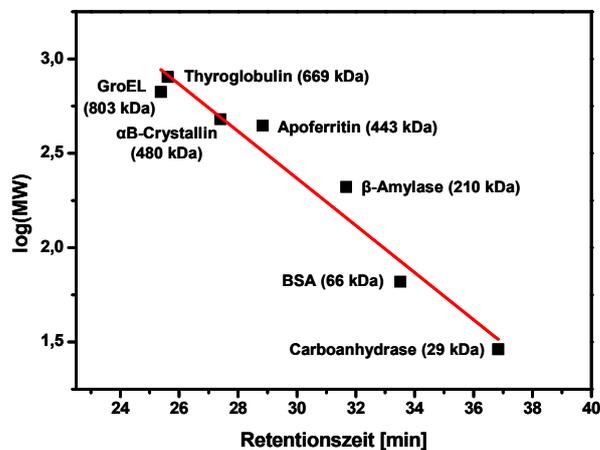
**Abbildung 25:** Ergebnisse der Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation von YjiE. (A) Konzentrationsabhängige Analyse des Sedimentationskoeffizienten von YjiE. 15  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  und 0,6  $\mu\text{M}$  YjiE wurden in storage buffer bei 35000 rpm und 20°C sedimentiert. Inset: Verteilung der Sedimentationskoeffizienten bei den verschiedenen YjiE-Konzentrationen. (B) Pseudo-3D-Repräsentation der 2DSA-Analyse.

### 3.2.5 Analytische Gelfiltration von YjiE *in vitro* und *in vivo*

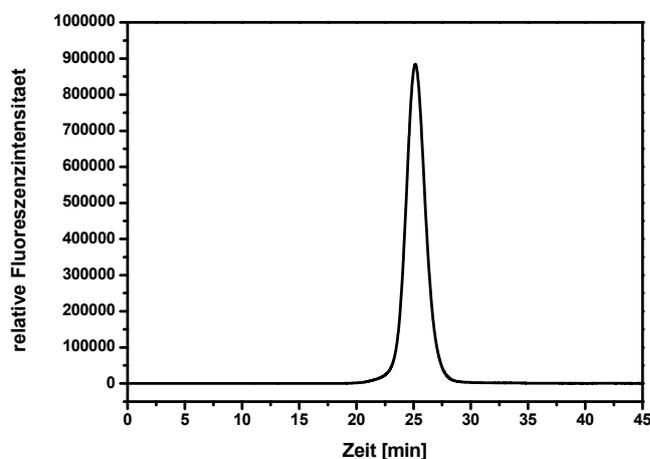
Mittels analytischer Gelfiltration können Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden (Prinzip Gelfiltration siehe 2.4.3.3). Die Experimente wurden wie unter 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe der Retentionszeit verschiedener Standardproteine und deren Molekulargewicht eine Eichgerade (siehe Abbildung 26) erstellt, um das Molekulargewicht von YjiE abschätzen zu können.

### 3.2.5.1 Analytische Gelfiltration von gereinigtem YjiE

Die Analyse von gereinigtem YjiE mittels analytischer Gelfiltration ergab einen Peak bei einer Retentionszeit von 25,16 min (siehe Abbildung 27). Mit Hilfe der Geradengleichung der Eichgeraden (siehe Abbildung 26) konnte für das YjiE-Oligomer ein Molekulargewicht von ca. 935 kDa berechnet werden. Daraus würde sich rechnerisch anhand des Molekulargewichts des YjiE-Monomers von knapp 35 kDa ergeben, dass es sich um ein 27mer handelt. Allerdings ist die Retentionszeit bei der Gelfiltration stark von der Form des Moleküls abhängig, so dass die ausgedehnte ringförmige Struktur von YjiE (siehe 3.2.3) vermutlich ein sehr ungewöhnliches Laufverhalten zur Folge hat. Es kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass es sich bei YjiE offenbar um ein großes Oligomer handelt.



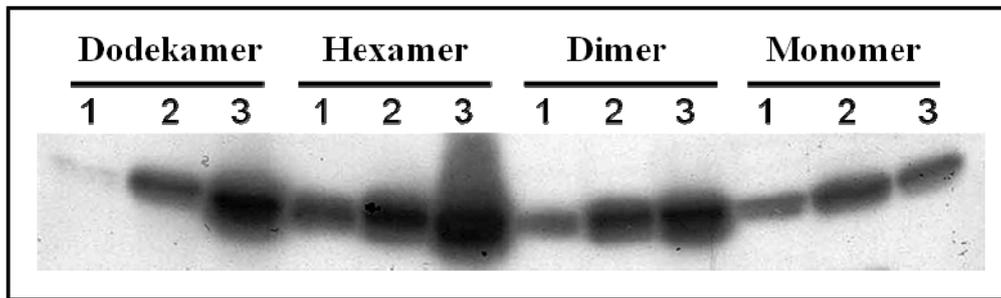
**Abbildung 26:** Eichgerade, die unter Verwendung einer Superose 6 10/300 Säule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min zur Bestimmung des Molekulargewichts anhand der Retentionszeit erstellt wurde. Die Retentionszeit verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht wurde gegen den Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts aufgetragen (schwarze Quadrate) und eine Ausgleichsgerade (rote Linie) erstellt. Geradengleichung:  $y = (-0,12478) \cdot x + 6,11032$ .



**Abbildung 27:** Fluoreszenzchromatogramm des HPLC-Laufs zur Analyse des Oligomerisierungszustandes von gereinigtem YjiE. Es wurden 4,2 µg gereinigtes YjiE auf einer Superose 6 10/300 Säule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min analysiert und die Fluoreszenz detektiert. Die Anregungswellenlänge lag bei 295 nm und die Emissionswellenlänge bei 350 nm (gain x4).

### 3.2.5.2 *In vivo* Oligomerisierungszustand von YjiE

Um zu überprüfen, ob die *in vivo* beobachteten 12mere von YjiE auch *in vivo* relevant sind, wurden Lysate von C600-Zellen (Wildtyp), eines Stammes, der eine leichte Überexpression von *yjiE* zeigt (KMG230) und eines Stammes mit einer starken induzierten Überexpression von *yjiE* (KMG229) durch analytische Gelfiltration aufgetrennt und Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden Proben der Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und YjiE durch Immunoblotting mit einem anti-YjiE-Antikörper nachgewiesen. Die Vorgehensweise ist detailliert unter 2.3.11 beschrieben und das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt. Wie zu sehen ist, bildet YjiE in Wildtyp-Zellen verschieden große Oligomere (Monomere, Dimere, Hexamere und Dodekamere), wobei das Hexamer die am häufigsten vorkommende Spezies ist (mit 1 beschriftete Bahnen in Abbildung 28). In KMG230-Zellen, die doppelt so viel YjiE wie Wildtyp-Zellen (0,0026 % im Vergleich zu 0,0014 % des Gesamtzellproteins) exprimieren, wurden die gleichen oligomeren Spezies beobachtet. Allerdings war die Verteilung leicht zu den größeren Oligomeren hin verschoben (mit 2 beschriftete Bahnen in Abbildung 28). Im Gegensatz dazu wurden in KMG229-Zellen, die *yjiE* stark überexprimieren (0,18 % des Gesamtzellproteins), größtenteils Dodekamere und Hexamere beobachtet (mit 3 beschriftete Bahnen in Abbildung 28, die Fraktionen wurden vor der WesternBlot-Analyse 100-fach verdünnt). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer steigenden Expression von *yjiE* in *E. coli* das Gleichgewicht zwischen größeren und kleineren Oligomeren in Richtung der Komplexe mit einem höheren Molekulargewicht verschoben wird. Vermutlich wird das Gleichgewicht bei einer Überexpression von *yjiE* zu etwa 10 % des Gesamtzellproteins für die Proteinaufreinigung komplett zu den Dodekameren hin verschoben, weshalb beim gereinigten Protein nur 12mere vorhanden sind. Dass YjiE *in vivo* auch kleinere Oligomere bildet, konnte ebenfalls von Adrian Drazic und Alexander Bepperling durch Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation und von Dr. Jeannette Winter durch Sukrosegradientenzentrifugation jeweils unter Verwendung von Lysaten, die FLAsH-gelabeltes YjiE enthielten, gezeigt werden. Wahrscheinlich sind die beobachteten Dodekamere eine Art Lagerzustand von YjiE bei hohen Konzentrationen in der Zelle. Bei der aktiven Spezies handelt es sich vermutlich um kleinere Oligomere. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass YjiE in Gegenwart von DNA in Tetramere und Hexamere dissoziiert, was von Adrian Drazic in Sedimentationsultrazentrifugationsläufen gezeigt werden konnte.



**Abbildung 28:** WesternBlot mit Proben von nach einer analytischen Gelfiltration von Lysaten gesammelten Fraktionen. Es wurde Lysat aus C600- (1), KMG230- (2) und KMG229-Zellen (3) analysiert. Fraktionen, die eine bestimmte oligomere Spezies enthalten, wurden jeweils nebeneinander aufgetragen. Die Fraktionen des KMG-229-Lysats wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. YjiE wurde mit Hilfe eines anti-YjiE-Antikörpers detektiert

### 3.2.6 Diskussion der biophysikalischen und biochemischen Charakterisierung von YjiE

Anhand der Analyse von YjiE mittels Fern-UV-CD-Spektrometrie und thermischer Entfaltung konnte gezeigt werden, dass gereinigtes YjiE einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur besitzt und mit einem thermischen Übergangsmittelpunkt von ca. 60°C relativ stabil ist.

Mit Hilfe von EMSAs, Anisotropiemessungen und analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass YjiE an DNA bindet. Allerdings war in allen Experimenten ein hoher Überschuss an YjiE gegenüber der verwendeten *yjiE*-Promotor-DNA nötig um eine Sättigung zu erreichen. Dass YjiE auch an DNA-Fragmente bindet, die keine Bindestellen für den Transkriptionsfaktor besitzen sollten, zeigte, dass die Bindung offenbar unspezifisch ist. Vermutlich ist eine Aktivierung von YjiE durch einen *co-inducer* nötig, der noch identifiziert werden muss. Es ist jedoch auch möglich, dass YjiE im Gegensatz zu anderen LTTRs keine Autoregulation zeigt und deshalb nicht an *yjiE*-Promotor-DNA bindet. Eventuell bindet YjiE spezifisch an den Promotor eines Gens, das durch eine Genexpressionsanalyse als Teil des YjiE-Regulons identifiziert wurde (siehe 3.8).

Sedimentationsgleichgewichtsuptrazentrifugation von YjiE ergab ein Molekulargewicht von ca. 400 kDa, was zeigte, dass YjiE ein 12mer bildet. Sedimentationsgleichgewichtsexperimente bestätigten die dodekamere Struktur von YjiE. Die Visualisierung von negativ-kontrastiertem YjiE durch Transmissionselektronenmikroskopie und eine anschließende Bildmittelung zeigte, dass der Transkriptionsfaktor ungewöhnliche ringförmige Strukturen bildet, die größtenteils hexagonal sind. Es kamen jedoch auch pentagonale und heptagonale

Ringe vor. Der anhand von Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugations ermittelte Wert für den Reibungskoeffizienten, der mit 1,66 relativ hoch war, spiegelte ebenfalls eine ausgedehnte Form von YjiE wieder.

Die analytische Gelfiltration von gereinigtem YjiE ergab aufgrund der außergewöhnlichen Form von YjiE ein zu hohes Molekulargewicht von ca. 935 kDa, da die Eichgerade mit Hilfe von globulären Referenzproteinen erstellt wurde, die sich ideal verhalten.

Um zu analysieren, ob die ringförmige, dodekamere Struktur von YjiE, die in den vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, auch *in vivo* relevant ist, wurden Lysate von Zellen, die verschiedene Mengen *yjiE* exprimierten, mittels analytischer Gelfiltration aufgetrennt. Anschließend wurden gesammelte Fraktionen, die jeweils ein bestimmtes Molekulargewicht und somit einen bestimmten Oligomerisierungszustand repräsentierten, mit Hilfe eines WesternBlots analysiert. Es zeigte sich, dass *in vivo* vor allem kleinere Oligomere (Dimere, Tetramere, Hexamere) vorhanden sind, Dodekamere kommen jedoch auch vor. Das Gleichgewicht verschiebt sich zunehmend in Richtung der höheren Oligomere je mehr *yjiE* exprimiert wird. Das lässt vermuten, dass das 12mer eine Art Lagerzustand von YjiE darstellt, der vorliegt, wenn mehr YjiE vorhanden ist als benötigt wird. Die aktive Spezies stellen wahrscheinlich die kleineren Oligomere dar.

### 3.3 Einfluss von Oxidationsmitteln auf YjiE

Wie bereits beschrieben wurde (siehe 1.3), werden LysR-Typ-Transkriptionsfaktoren (LTTRs) häufig durch kleine Moleküle aktiviert. Diese werden als *co-inducer* bezeichnet. Bei OxyR und SoxR handelt es sich wie bei YjiE für oxidativen Stress spezifische Transkriptionsfaktoren. OxyR wird durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und SoxR durch O<sub>2</sub><sup>-</sup> aktiviert (siehe 1.6). Beide Transkriptionsfaktoren werden direkt durch Oxidation durch die stressverursachende ROS reguliert. Das legt nahe, dass auch YjiE möglicherweise direkt durch HOCl oxidiert und somit aktiviert wird. Daher wurde der Effekt von HOCl und auch von anderen Oxidationsmitteln auf YjiE genauer untersucht. Da bereits ein 10-facher molarer Überschuss an HOCl ausreicht um das redox-regulierte Chaperon Hsp33 zu aktivieren (Winter et al., 2008), wurden hier ebenfalls niedrige molare HOCl-Überschüsse eingesetzt.

### 3.3.1 Ellmans-Assay mit HOCl-behandeltem YjiE

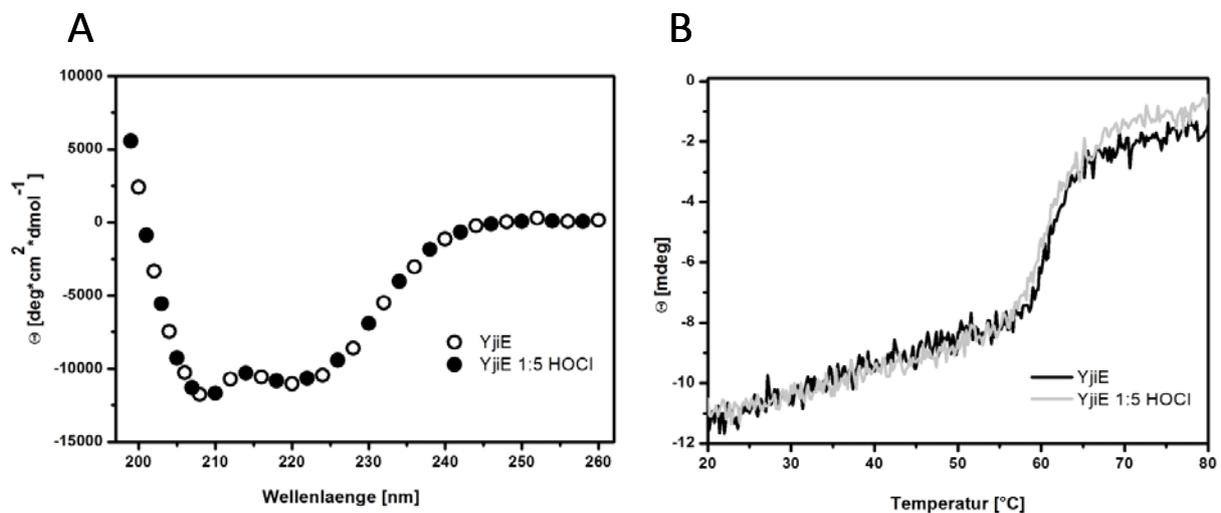
Mit Hilfe von Ellmans-Assays können die frei zugänglichen Thiolgruppen eines Proteins nach der Reaktion mit Ellmans-Reagenz (DTNB) photometrisch bestimmt werden. Das Protein YjiE besitzt 5 Cysteine von denen keines konserviert ist. Um nachzuweisen, ob HOCl-behandeltes YjiE aufgrund von Cysteinmodifikationen eine geringere Anzahl freier Thiolgruppen besitzt als unbehandelte YjiE, wurde der Transkriptionsfaktor zunächst mit einem 10-fachen molaren Überschuss an HOCl oxidiert, anschließend mit Harnstoff denaturiert und mittels Ellmans-Assays die Anzahl freier Thiolgruppen bestimmt (siehe 2.3.3). Für HOCl-behandeltes YjiE wurde eine Anzahl von 0,7 freien Thiolen bestimmt. Im Vergleich dazu wurden für denaturiertes, unbehandeltes YjiE im Durchschnitt 3,4 freie Thiolen berechnet. Da es sich bei YjiE um ein cytosolisches Protein handelt, sollten alle Cysteine in reduzierter Form vorliegen. Dass bereits beim unbehandelten YjiE nicht mehr alle Thiolreste unmodifiziert waren, zeigt, dass das Protein durch Luft oxidiert wird. Daher wurde YjiE in der Regel für Experimente zunächst mit TCEP komplett reduziert, um sicher zu stellen, dass YjiE vollständig reduziert vorlag.

### 3.3.2 ESI-MS Analyse von HOCl-behandeltem YjiE

Durch Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) können posttranslationale Modifikationen der Aminosäurereste eines Proteins nachgewiesen werden. Um zu bestimmen, welche Aminosäuren von YjiE durch die Oxidation mit einem 10-fachen molaren Überschuss an HOCl modifiziert werden, wurde wie unter 2.3.10 beschrieben vorgegangen. Eine unbehandelte und eine HOCl-behandelte Probe von YjiE wurden mit 8 M Harnstoff versetzt und anschließend auf Trockeneis für die weitere Analyse an Dr. Johannes Graumann vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried geschickt. Die Analyse nach Trypsinverdauen ergab, dass außer den Cysteinresten keine weiteren Aminosäuren des Transkriptionsfaktors durch HOCl modifiziert wurden.

### 3.3.3 Fern-UV-CD-Spektrum und thermische Entfaltung von HOCl-behandeltem YjiE

Um Aussagen über eventuelle Effekte der HOCl-Oxidation von YjiE auf die Sekundärstruktur und die Stabilität des Proteins zu treffen, wurden Fern-UV-CD-Spektren und Thermoübergänge von unbehandeltem und mit einem 5-fachen molaren Überschuss an HOCl behandeltem YjiE (30 min, 25°C → mit Methionin abgestoppt), gemessen (Vorgehensweise siehe 2.5.4). Wie in Abbildung 29A zu sehen ist, überlagern sich die CD-Spektren von unbehandeltem und oxidiertem YjiE. Spektren, die nach Oxidation mit einem equimolaren Verhältnis oder einem 10-fachen Überschuss an HOCl aufgenommen wurden, sahen ebenfalls sehr ähnlich aus. Demnach hat die Oxidation des Proteins keine Auswirkungen auf die Sekundärstruktur. In Abbildung 29B ist zu sehen, dass auch der Thermoübergang des oxidierten YjiE nahezu dem des unbehandelten Proteins entspricht. Dementsprechend lag der thermische Übergangsmittelpunkt in beiden Fällen bei ca. 60°C. Die Oxidation von YjiE durch geringe HOCl-Konzentrationen hat daher keinen Effekt auf die Stabilität des Proteins.



**Abbildung 29:** Analyse der Eigenschaften von unbehandeltem und mit einem 5-fachen molaren Überschuss an HOCl behandeltem YjiE mittels CD-Spektrometrie. (A) Fern-UV-CD-Spektren mit 0,1 mg/ml YjiE in storage buffer bei 20°C und einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min. Es wurden 16 Einzelspektren akkumuliert. (B) Temperaturübergänge bei 222 nm zwischen 20°C und 80°C mit einer Heizrate von 20°C/h.

### 3.3.4 Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation mit HOCl-behandeltem YjiE

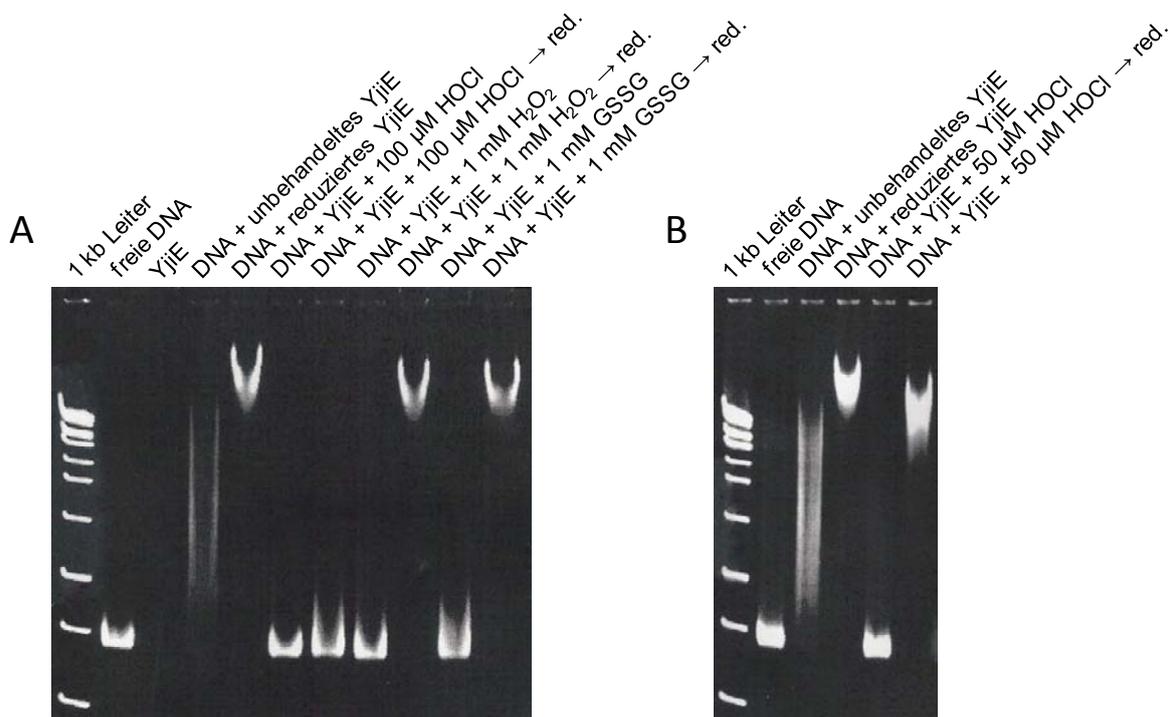
Um zu überprüfen, ob die Oxidation von YjiE einen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand hat, wurde das Molekulargewicht von C-terminal His-getagtem YjiE (YjiE-His), das mit einem equimolaren Verhältnis oder einem 5-fachen molaren Überschuss an HOCl versetzt wurde, anhand von Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation (siehe 2.5.5.1) bestimmt. Das berechnete Molekulargewicht war dem von unbehandeltem YjiE (siehe 3.2.4.1) sehr ähnlich, woraus geschlossen werden kann, dass die Oxidation von YjiE durch geringe Mengen HOCl nicht zu einer Änderung des Oligomerisierungszustandes führt.

### 3.3.5 DNA-Bindung von oxidiertem YjiE

Mit Hilfe von EMSAs und Fluoreszenzanisotropie-Messungen (Vorgehensweise siehe 2.5.3 und 2.6.1) wurde überprüft, ob YjiE, das durch HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder oxidiertes Glutathion (GSSG) oxidiert wurde, ein verändertes DNA-Bindungsverhalten zeigt. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Oxidation durch die verschiedenen ROS reversibel ist, indem das Protein anschließend mit TCEP reduziert wurde. Abbildung 30A zeigt, dass reduziertes YjiE die Mobilität von *yjiE*-Promotor-DNA deutlich stärker verringerte als unbehandeltes YjiE. Die Oxidation mit 100 µM HOCl, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 1 mM GSSG führte zu einem kompletten Verlust der DNA-Bindefähigkeit von YjiE. Die DNA-Bindefähigkeit wurde wieder hergestellt, wenn YjiE nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder GSSG mit TCEP reduziert wurde. Die DNA-Bindefähigkeit von YjiE, das mit 100 µM HOCl (ca. 25-facher molarer Überschuss) oxidiert wurde, konnte durch Reduktion nicht wieder hergestellt werden. In Abbildung 30B ist jedoch zu sehen, dass nach einer Oxidation von YjiE mit 50 µM HOCl (ca. 12,5-facher Überschuss an HOCl) die anschließende Reduktion mit TCEP zur vollständigen Wiederherstellung der DNA-Bindefähigkeit führte.

Fluoreszenzanisotropie-Messungen zeigten ebenfalls, dass YjiE, das mit einem 10-fachen Überschuss an HOCl oxidiert wurde, kaum noch an DNA bindet (siehe Abbildung 36A). Zusammenfassend wird deutlich, dass reduziertes YjiE eine sehr starke DNA-Bindefähigkeit besitzt, die durch Oxidation verloren geht. Unbehandeltes YjiE wurde während der Reinigung bereits teilweise durch Luft oxidiert und bindet daher schlechter an DNA als reduziertes YjiE.

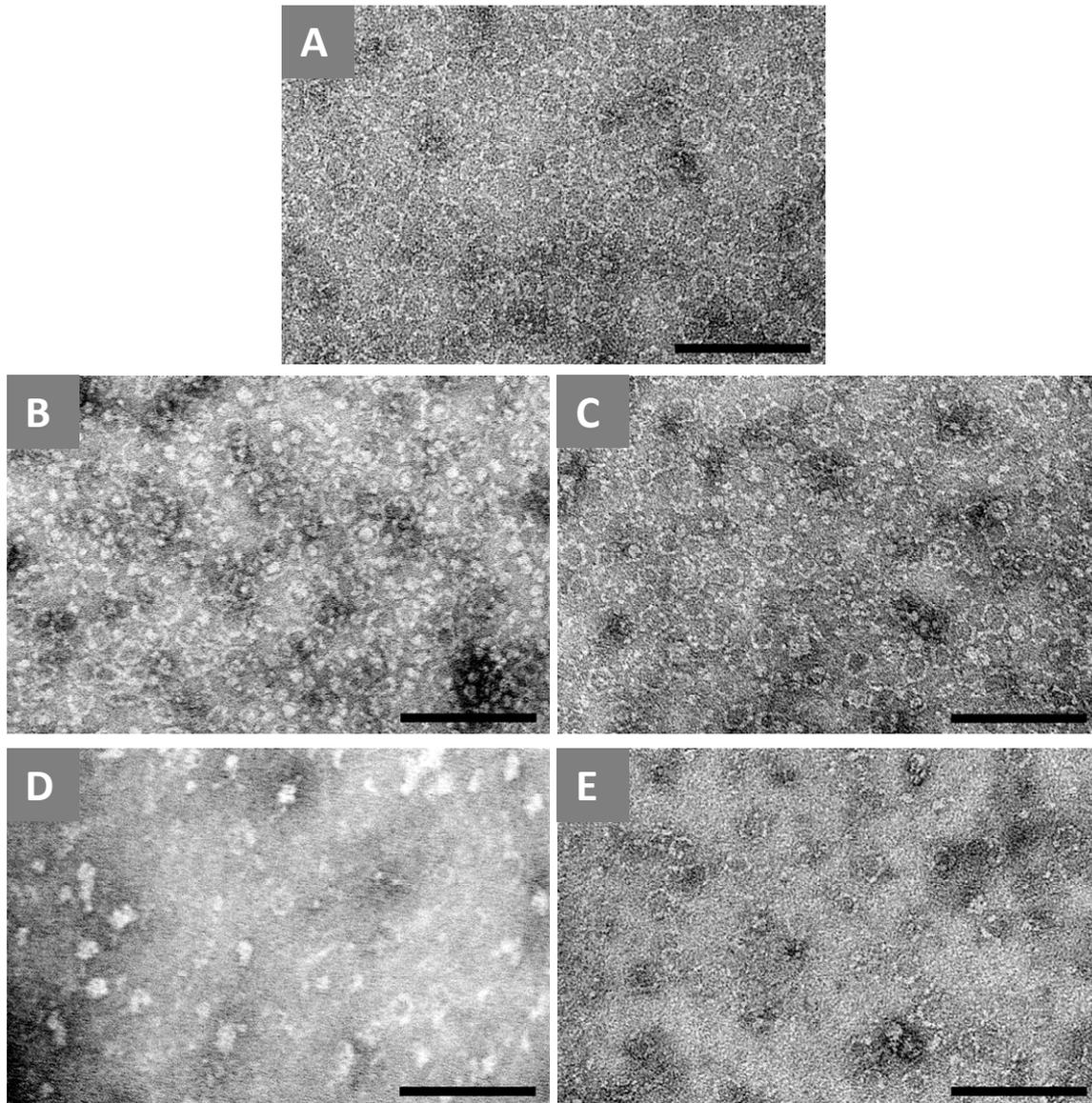
Eine zusätzliche Oxidation durch verschiedene ROS führt zum kompletten Verlust der DNA-Bindfähigkeit, wobei die Oxidation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und GSSG, die beide nur Cysteine modifizieren, vollständig reversibel ist. Mehrere Experimente mit HOCl zeigten, dass diese ROS schwer zu handhaben ist, da es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kam, obwohl gleiche Konzentrationen eingesetzt wurden. Es kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass eine Oxidation mit einem geringen Überschuss an HOCl durch Reduktion mit TCEP reversibel ist, während hohe HOCl-Konzentrationen offenbar zu Modifikationen führen, die durch TCEP nicht rückgängig gemacht werden können. Experimente mit geringen molaren Überschüssen an HOCl zeigten, dass YjiE bereits bei einem 3-fachen molaren Überschuss an HOCl die DNA-Bindfähigkeit vollständig verliert. Da sowohl die Oxidation von YjiE durch Luft,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder GSSG, als auch die Oxidation durch HOCl zu einem Verlust der DNA-Bindfähigkeit führen, scheint YjiE *in vitro* nicht durch HOCl aktiviert zu werden.



**Abbildung 30:** EMSAs mit oxidiertem und zum Teil anschließend wieder reduziertem YjiE (red.). Es wurde 16,4 nM 689bp-*yjiE*-Promotor DNA und 3,94  $\mu\text{M}$  YjiE eingesetzt. Die Proben wurden auf 6 %-TBE-Gelen aufgetrennt bevor die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und visualisiert wurde. (A) EMSAs mit YjiE, das mit verschiedenen ROS oxidiert wurde. (B) EMSAs mit YjiE, das mit 50  $\mu\text{M}$  HOCl oxidiert wurde.

### 3.3.6 Transmissionselektronenmikroskopie mit oxidiertem YjiE

Anhand von Transmissionselektronenmikroskopie wurde untersucht, ob die Oxidation von YjiE mit verschiedenen ROS zu einer Änderung in der beobachteten ringförmigen Struktur (siehe 3.2.3) führt. Die Experimente wurden wie unter 2.8.1 beschrieben in Zusammenarbeit mit Dr. Nathalie Braun und Andreas Kastenmüller vom Department für Elektronenmikroskopie der TU München durchgeführt. Abbildung 31A zeigt, dass reduziertes YjiE sehr schöne Ringe bildete. Wenn der Transkriptionsfaktor mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert wurde, zerfielen viele Ringe (Abbildung 31B). Eine anschließende Reduktion mit TCEP führte dazu, dass wieder mehr Ringstrukturen vorhanden waren (Abbildung 31C). Nach Oxidation von YjiE mit  $100 \mu\text{M HOCl}$  waren lediglich wenige Ringstrukturen zu sehen (Abbildung 31D). Wenn das Protein anschließend reduziert wurde, waren wieder etwas mehr Ringe zu erkennen (Abbildung 31E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Oxidation von YjiE zu einem Zerfall der beobachteten Ringstrukturen führt. Wenn das Protein nach der Oxidation mit TCEP reduziert wurde, konnten wieder mehr Ringe beobachtet werden. Die oxidativen Modifikationen scheinen folglich reversibel zu sein. Dass nach der Reduktion nach der HOCl-Behandlung nur relativ wenige Ringstrukturen vorhanden waren, liegt vermutlich daran, dass die eingesetzte Konzentration von  $100 \mu\text{M HOCl}$  sehr hoch war und es somit vermutlich auch zu irreversiblen Modifikationen und strukturellen Änderungen kam. Für die unter 3.3.5 beschriebenen EMSAs wurden die selben Proben verwendet und auf Abbildung 30A ist zu sehen, dass auch die DNA-Bindefähigkeit von YjiE, das mit  $100 \mu\text{M HOCl}$  oxidiert wurde, durch Reduktion mit TCEP nicht wieder hergestellt werden konnte. Bildmittelungen von unbehandeltem YjiE im Vergleich mit YjiE das mit verschiedenen, niedrigen molaren Überschüssen an HOCl ( 1:1, 1:2, 1:5, 1:10) oxidiert wurde, zeigten keine Unterschiede in den daraus erhaltenen Ringstrukturen.

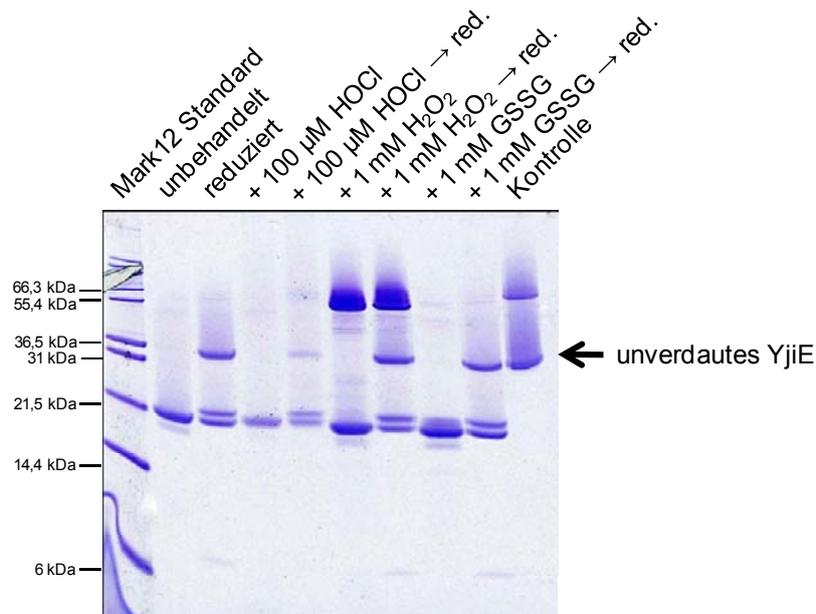


**Abbildung 31:** Mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommene Bilder von negativ-kontrastiertem YjiE (0,1 mg/ml, 2 % (w/v) Uranylacetat), das mit verschiedenen ROS oxidiert und anschließend mit TCEP wieder reduziert wurde. (A) reduziertes YjiE, (B) YjiE + 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (C) YjiE + 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → reduziert, (D) YjiE + 100 µM HOCl, (E) YjiE + 100 µM HOCl → reduziert. Maßstabsbalken: 100 nm.

### 3.3.7 Trypsinverdaue mit oxidiertem YjiE

Durch Trypsinverdaue kann analysiert werden, ob es unter bestimmten Bedingungen zu einer Strukturänderung in einem Protein kommt, die zu einer veränderten Sensitivität gegenüber der Protease Trypsin führt. Mit dieser Methode wurde untersucht, ob die Oxidation von YjiE mit verschiedenen ROS einen Einfluss auf die Proteinstruktur hat, und, ob die oxidativen Modifikationen durch Reduktion mit TCEP rückgängig gemacht werden können (Vorgehensweise siehe 2.3.6). Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Trypsinverdaue. Es ist zu erkennen, dass reduziertes YjiE nach dem Verdau mit Trypsin ein anderes Peptidmuster

aufwies als unbehandeltes YjiE. Bei unbehandeltem Protein entstanden hauptsächlich ein Peptid mit ca. 21,5 kDa und ein etwas kleineres Peptid mit ca. 18 kDa. Wenn YjiE hingegen reduziert wurde, waren zwei starke Peptidbanden mit ca. 21,5 und 24 kDa, eine Bande bei ca. 7 kDa und unverdautes YjiE mit einem Molekulargewicht von 35 kDa zu erkennen. Unverdautes YjiE, das als Kontrolle verwendet wurde, wies außerdem eine Bande bei ca. 55 kDa auf, die vermutlich ein kovalentes Dimer darstellt, da sie durch Maldi-MS als YjiE identifiziert werden konnte. Diese Bande war in allen trypsinverdauten Proben verschwunden, was vermuten lässt, dass diese kovalenten Dimere nicht stabil sind. Proben, die mit HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder GSSG oxidiert wurden, besaßen das gleiche Peptidmuster wie unbehandeltes YjiE, wohingegen Proben, die nach der Oxidation wieder reduziert wurden das gleiche Peptidmuster wie reduziertes YjiE zeigten. Die zusätzlichen Banden bei ca. 55 kDa und knapp darüber in den Proben, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert wurden, stammen von Katalase, mit der die Reaktion abgestoppt wurde. Die Daten zeigen, dass das gereinigte, unbehandelte YjiE bereits zum Teil durch Luft oxidiert wurde, da es ein anderes Peptidmuster aufweist als komplett reduziertes YjiE. Reduziertes YjiE ist stabiler gegenüber der Protease Trypsin, da nach dem Verdau sogar noch unverdautes Protein vorhanden ist. Das Peptidmuster von mit verschiedenen ROS oxidiertem YjiE entspricht dem des unbehandelten Transkriptionsfaktors. Durch Reduktion mit TCEP im Anschluss an die Oxidation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSSG und auch durch HOCl können die oxidativen Modifikationen wieder rückgängig gemacht werden und das Peptidmuster entspricht wieder dem von reduziertem YjiE. Dass die Intensität der Proteinbanden nach Oxidation mit HOCl etwas geringer war, weist darauf hin, dass es vermutlich aufgrund der hohen HOCl-Konzentration von 100 µM teilweise zur Aggregation von YjiE kam. Dass oxidiertes YjiE weniger stabil ist als reduziertes YjiE, lässt vermuten, dass es durch die Oxidation zu einer Strukturänderung kommt, die den Transkriptionsfaktor sensitiver für die Protease Trypsin macht.



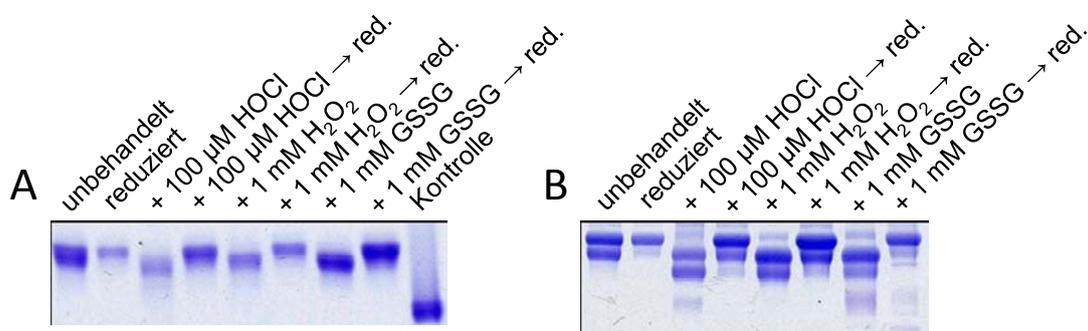
**Abbildung 32:** 16 % Tricin-Gel mit den Proben der Trypsinverdaue von YjiE, das mit verschiedenen ROS modifiziert und zum Teil anschließend wieder reduziert wurde (red.). Als Kontrolle diente unverdautes YjiE.

### 3.3.8 Thioltrapping-Assays mit oxidiertem YjiE

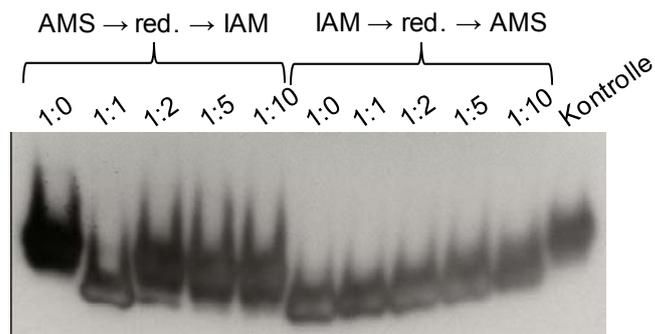
Mit Hilfe des sogenannten Thioltrappings kann der Redoxstatus der Cysteine eines Proteins analysiert werden, indem zunächst die freien Cysteine eines Proteins mit einer thiolreaktiven Substanz modifiziert werden, während die restlichen Cysteine nach ihrer Reduktion mit einer anderen thiolreaktiven Substanz behandelt werden. Die Methode (Vorgehensweise siehe 2.3.7) wurde eingesetzt um zu analysieren, ob die Oxidation von YjiE mit verschiedenen ROS zu spezifischen Modifikationen der 5 Cysteinreste von YjiE führt, und ob diese reversibel sind. Eine der beiden verwendeten thiolreaktiven Substanzen war Iodacetamid (IAM), das nur zu einer sehr geringen Masseänderung führt. Die zweite thiolreaktive Substanz war entweder AMS, das einen Massezuwachs von ca. 0,5 kDa pro reduziertem Cystein verursacht, oder PEG-Maleimid mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kDa pro reduziertem Cystein. Die modifizierten Proben wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung oder Immunoblotting nachgewiesen. Es wurde untersucht, welchen Effekt die Oxidation mit verschiedenen ROS auf den Redoxstatus der Cysteine von YjiE hat und, ob die Modifikationen reversibel sind (siehe Abbildung 33). Außerdem wurde analysiert welche Auswirkungen die Oxidation von YjiE mit verschiedenen, niedrigen molaren Verhältnissen an HOCl auf den Redoxstatus der Cysteine des Transkriptionsfaktors hat (siehe Abbildung 34). In Abbildung 33 ist zu sehen, dass bereits bei unbehandeltem YjiE zum Teil

ein Cystein oxidiert war, da sowohl eine Bande auf der Höhe des reduzierten YjiE, als auch eine etwas darunter liegende Bande erkennbar sind. Bei YjiE, das mit 100  $\mu\text{M}$  HOCl, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder 1 mM GSSG oxidiert wurde, wurden weitere Cysteine oxidiert, denn die YjiE-Bande auf Höhe des reduzierten Proteins ist verschwunden und es sind weitere, bei einem niedrigeren Molekulargewicht gelegene Banden entstanden. Eine Reduktion nach der Oxidation durch die verschiedenen ROS führte zu einer Bande auf Höhe des reduzierten Proteins und einem geringeren Anteil einer etwas kleineren Spezies. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass bereits die Cysteine des gereinigten Transkriptionsfaktors geringfügig durch Luft oxidiert wurden und die Behandlung mit verschiedenen ROS zur Oxidation von weiteren Cysteinen führt. Die entstehenden Cysteinmodifikationen scheinen jedoch größtenteils durch Reduktion mit TCEP reversibel zu sein. Die Ergebnisse des Thioltrappings mit AMS und PEG-Maleimid stimmen gut überein.

Abbildung 34 zeigt, dass die Behandlung von YjiE mit einem bis zu 10-fachen molaren Überschuss an HOCl offenbar zu keinen weiteren Cysteinoxidationen führt, da alle Banden jeweils auf der gleichen Höhe liegen. Beim Verhältnis 1:1 bei den Proben, die zuerst mit AMS modifiziert, dann reduziert und dann mit Iodacetamid behandelt wurden, ist vermutlich ein Fehler während der Durchführung des Thioltrappings passiert. Die Auftrennung der Proben ist jedoch schlecht und die aufgetragene Proteinmenge zu groß, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Banden mit einem geringfügig abweichenden Molekulargewicht, wie sie zu erwarten wären, nicht erkennbar sind. Aus den beiden Experimenten kann geschlossen werden, dass ein hoher Überschuss an HOCl Cysteinmodifikationen verursacht, während ein geringer Überschuss nicht zu einer Oxidation von Cysteinresten von YjiE führt.



**Abbildung 33:** 14 % Tris/Glycin-Gele mit Proben der Thioltrapping-Assays mit YjiE, das mit verschiedenen ROS oxidiert und zum Teil anschließend mit TCEP wieder reduziert wurde (red.). (A) Die Proben wurden zunächst mit AMS behandelt, dann reduziert und anschließend mit Iodacetamid modifiziert. Als Kontrolle diente YjiE, das nicht mit AMS modifiziert wurde. AMS führt zu einer Zunahme des Molekulargewichts um 0,5 kDa pro reduziertem Cysteinrest. (B) Die Proben wurden erst mit PEG-Maleimid modifiziert, dann reduziert und im Anschluss mit Iodacetamid behandelt. PEG führt zu einer Zunahme des Molekulargewichts um 5 kDa pro reduziertem Cysteinrest.



**Abbildung 34:** WesternBlot der Thioltrapping Assays von reduziertem YjiE, das mit verschiedenen molaren Verhältnissen an HOCl oxidiert wurde. Nach der Oxidation wurden die Proben zunächst mit AMS behandelt und nach anschließender Reduktion mit Iodacetamid (IAM) modifiziert oder erst mit Iodacetamid behandelt und nach darauffolgender Reduktion mit AMS modifiziert. Als Kontrolle diente reduziertes YjiE, das mit AMS modifiziert wurde.

### 3.3.9 Diskussion des Einflusses von Oxidationsmitteln auf YjiE

Die beiden Transkriptionsfaktoren OxyR und SoxR, die die  $H_2O_2$ - bzw. die  $O_2^-$ -Stress-Antwort regulieren, werden jeweils durch Oxidation durch die stressverursachende reaktive Sauerstoffspezies selbst aktiviert. Daher wurden die Auswirkungen der HOCl-vermittelten Oxidation auf YjiE untersucht, um festzustellen, ob der Transkriptionsfaktor möglicherweise direkt durch HOCl aktiviert wird.

Sowohl im Ellmans-Assay, als auch in EMSAs, Trypsinverdauen und Thioltrapping-Assays konnte beobachtet werden, dass das gereinigte YjiE offenbar bereits partiell durch Luft oxidiert wurde. Daher wurde für DNA-Bindungsstudien und auch die meisten anderen Experimente YjiE zunächst immer für 1 h bei 37°C mit 1 mM TCEP reduziert, um standardisierte Bedingungen zu schaffen.

Mit Hilfe von Ellmans-Assays konnte gezeigt werden, dass ein 10-facher molarer Überschuss an HOCl gegenüber YjiE zur Oxidation von 4 der 5 nicht-konservierten Cysteine des Proteins führt. Ein Fern-UV-CD-Spektrum von YjiE mit einem 5-fachen molaren Überschuss an HOCl ergab, dass es durch die Oxidation nicht zu einer Strukturänderung kommt. Der anschließend gemessene Thermoübergang zeigte, dass auch die Stabilität des Proteins unverändert war. Durch Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation von YjiE mit einem 5-fachen molaren Überschuss an HOCl wurde nachgewiesen, dass das Molekulargewicht ebenfalls gleich bleibt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein geringer molarer Überschuss an HOCl gegenüber YjiE zwar zur Oxidation von Cysteinen, jedoch nicht zu irgendeiner Änderung in der Struktur, Stabilität oder Oligomerisierung des Transkriptionsfaktors führt.

Mit EMSAs, transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen, Trypsinverdauen und Thioltrapping-Assays wurde untersucht, welchen Effekt die Oxidation mit größeren Mengen HOCl, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 1 mM GSSG auf die Eigenschaften von YjiE hat, und, ob diese Auswirkungen reversibel sind. Die EMSAs zeigten, dass die Oxidation von YjiE zum Verlust der DNA-Bindfähigkeit führt. Diese konnte jedoch durch Reduktion im Fall von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und GSSG wieder hergestellt werden. Die reaktive Sauerstoffspezies HOCl war deutlich schwerer zu handhaben und führte bei gleichen eingesetzten Mengen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass eine Oxidation mit einem geringen Überschuss an HOCl reversibel ist. Höhere HOCl-Konzentrationen führen hingegen offenbar zu irreversiblen Proteinmodifikationen. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von YjiE zeigten, dass oxidiertes YjiE die beobachtete Ringstruktur verliert und zerfällt. Wenn die Proben nach der Oxidation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder HOCl wieder reduziert wurden, konnten wieder mehr Ringe beobachtet werden. Hier wurde ein großer Überschuss an HOCl eingesetzt, wodurch sich der Widerspruch zum Ergebnis der Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation, die keine Änderung des Oligomerisierungszustandes bei Oxidation mit geringen HOCl-Mengen ergab, erklären lässt. Durch Trypsinverdauung konnte nachgewiesen werden, dass reduziertes YjiE stabiler gegenüber der Protease Trypsin ist, als oxidiertes YjiE, was eine Strukturänderung vermuten lässt. Dieses Ergebnis widerspricht dem der CD-Messungen in denen es unter Verwendung von geringen HOCl-Mengen zu keiner Strukturänderung kam, was vermutlich wiederum auf die für die Trypsinverdauung eingesetzte deutlich höhere HOCl-Konzentration zurückzuführen ist. Möglicherweise können sehr kleine Strukturänderungen auch durch CD-Messungen nicht nachgewiesen werden, haben aber eine Auswirkung auf die Trypsinsensitivität. Eine Reduktion nach der Oxidation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSSG oder HOCl machte die Änderung in der Trypsinsensitivität und somit die Strukturänderung rückgängig. In Thioltrapping-Assays konnte gezeigt werden, dass die Oxidation von YjiE durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSSG oder HOCl zu Cysteinmodifikationen führt, die ebenfalls durch Reduktion rückgängig gemacht werden können. Ein geringer Überschuss an HOCl scheint beim Thioltrapping zu keinen Cysteinmodifikationen zu führen, was den Ergebnissen der Ellmans-Assays widerspricht. Diese Ergebnisse lassen zusammen den Schluss zu, dass die Oxidation von YjiE durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder GSSG reversibel ist. Bei HOCl ist dies jedoch nur bei geringen Konzentrationen der Fall. Hohe Überschüsse an HOCl führen zu irreversiblen Proteinmodifikationen. Widersprüchliche Ergebnisse sind entweder auf sehr unterschiedliche verwendete HOCl-Konzentrationen oder darauf zurückzuführen, dass HOCl sehr reaktiv und daher schwer handzuhaben ist. Daher

kann es bei gleichen eingesetzten HOCl-Konzentrationen gelegentlich zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen.

Geringe HOCl-Konzentrationen haben folglich scheinbar keinen Einfluss auf die Struktur von YjiE. Da jedoch sowohl Luftoxidation als auch Oxidation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder GSSG sowie die Oxidation durch HOCl zu einem Verlust der DNA-Bindefähigkeit von YjiE führen, scheint der Transkriptionsfaktor *in vitro* nicht durch HOCl aktiviert zu werden.

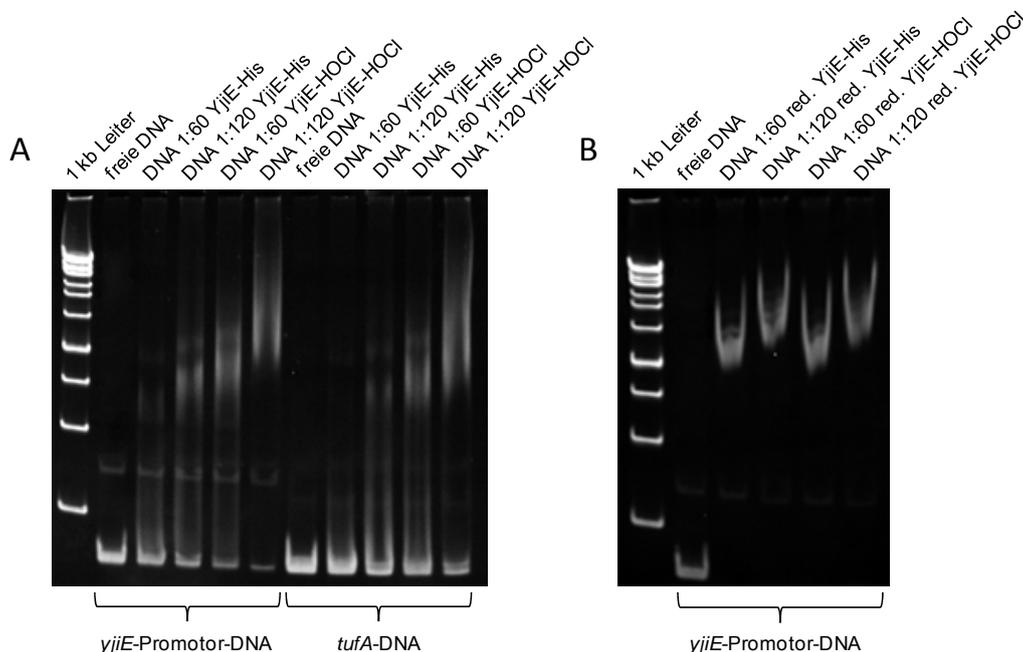
### 3.4 Charakterisierung von YjiE aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl)

Da YjiE *in vitro* nicht durch HOCl aktiviert werden konnte, wurde getestet, ob durch HOCl-Stress *in vivo* aktiviertes YjiE aus *E. coli*-Zellen gewonnen werden kann. Dafür wurden YjiE-His exprimierende Zellen wie unter 2.4.1 beschrieben mit HOCl behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und YjiE-His chromatographisch gereinigt (siehe 2.4.3). Das so gewonnene YjiE-His aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl) wurde in weiteren Experimenten charakterisiert.

#### 3.4.1 DNA-Bindung von YjiE-HOCl

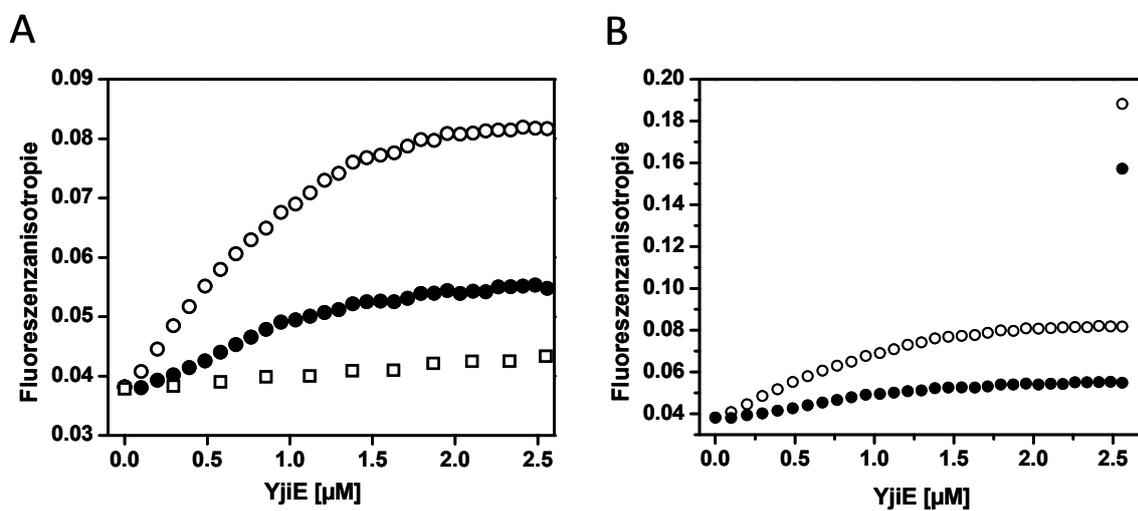
Anhand von EMSAs und Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurde untersucht, ob YjiE-HOCl im Vergleich zu YjiE-His eine Änderung im DNA-Bindevverhalten zeigt, und, ob es möglicherweise spezifisch an DNA bindet. Die Vorgehensweise für die EMSAs ist unter 2.6.1 und die Vorgehensweise für die Anisotropie-Messungen unter 2.5.3 beschrieben. Wie in Abbildung 35A gezeigt ist, führten gleiche Mengen an YjiE-HOCl zu einer stärkeren Mobilitätsverringerng der DNA im Vergleich zu YjiE-His. Es kam jedoch bei *yjiE*-Promotor-DNA und *tufA*-DNA, die keine Bindestellen für YjiE besitzen sollte, jeweils zu einer gleich starken Mobilitätsverringerng. Eine Reduktion von YjiE-HOCl und YjiE-His vor der Verwendung in EMSAs führte dazu, dass die beiden Proteine die Mobilität von *yjiE*-Promotor-DNA gleich stark verringerten (siehe Abbildung 35B). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass YjiE durch die HOCl-Behandlung in Zellen in irgendeiner Form modifiziert und dadurch aktiviert wird, so dass es eine höhere Affinität zu DNA besitzt. Da spezifische und unspezifische DNA gleich gut gebunden werden, ist die DNA-Bindung jedoch immer

noch unspezifisch. Die Tatsache, dass es nach einer Reduktion von YjiE-HOCl und YjiE-His mit TCEP in EMSAs zu einer gleich starken Mobilitätsverringering der DNA kam, lässt zunächst vermuten, dass es sich bei der aktivierenden Modifikation um eine Oxidation handelt, die reversibel ist. Es fällt auf, dass reduziertes YjiE-His im Vergleich zu unbehandeltem YjiE-His zu einer stärkeren Mobilitätsverringering führte, während YjiE-HOCl im unbehandelten und im reduzierten Zustand die Mobilität in etwa gleich stark verringert. Es wurde bereits in vorherigen Experimenten festgestellt, dass unbehandeltes YjiE DNA zu einer geringeren Mobilitätsverringering führt als reduziertes YjiE (siehe 3.3.5), was an der teilweisen Oxidation des Proteins an der Luft liegt. Wenn unbehandeltes YjiE aus nicht-gestressten oder HOCl-gestressten Zellen verwendet wurde, kam es zu einem stärkeren Schmier-Effekt bei den Banden als bei reduziertem YjiE. Der Grund dafür ist vermutlich, dass das unbehandelte Protein im Vergleich zu reduziertem YjiE aufgrund von Luftoxidation inhomogen hinsichtlich der Anzahl der oxidativen Modifikationen ist. Dieser Schmier-Effekt ist auch bei den EMSAs mit unbehandeltem QseD aus *E. coli K-12* (=YjiE) von Habdas et al. (2010) zu erkennen, wobei in diesen Experimenten ein deutlich größerer Überschuss an Transkriptionsfaktor gegenüber DNA eingesetzt wurde als in den hier gezeigten Experimenten.



**Abbildung 35:** EMSAs zum Vergleich der DNA-Bindfähigkeit von YjiE-HOCl und YjiE-His. Es wurde 100 ng DNA eingesetzt. Die Proben wurden auf 6 %-TBE-Gelen aufgetrennt bevor die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und visualisiert wurde. (A) YjiE-His und YjiE-HOCl wurden in 60-fachem und 120-fachem Überschuss zu 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA oder 158bp-*tufA*-DNA gegeben. (B) YjiE-His und YjiE-HOCl wurden zunächst mit TCEP reduziert und dann in 60-fachem und 120-fachem Überschuss mit 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA inkubiert.

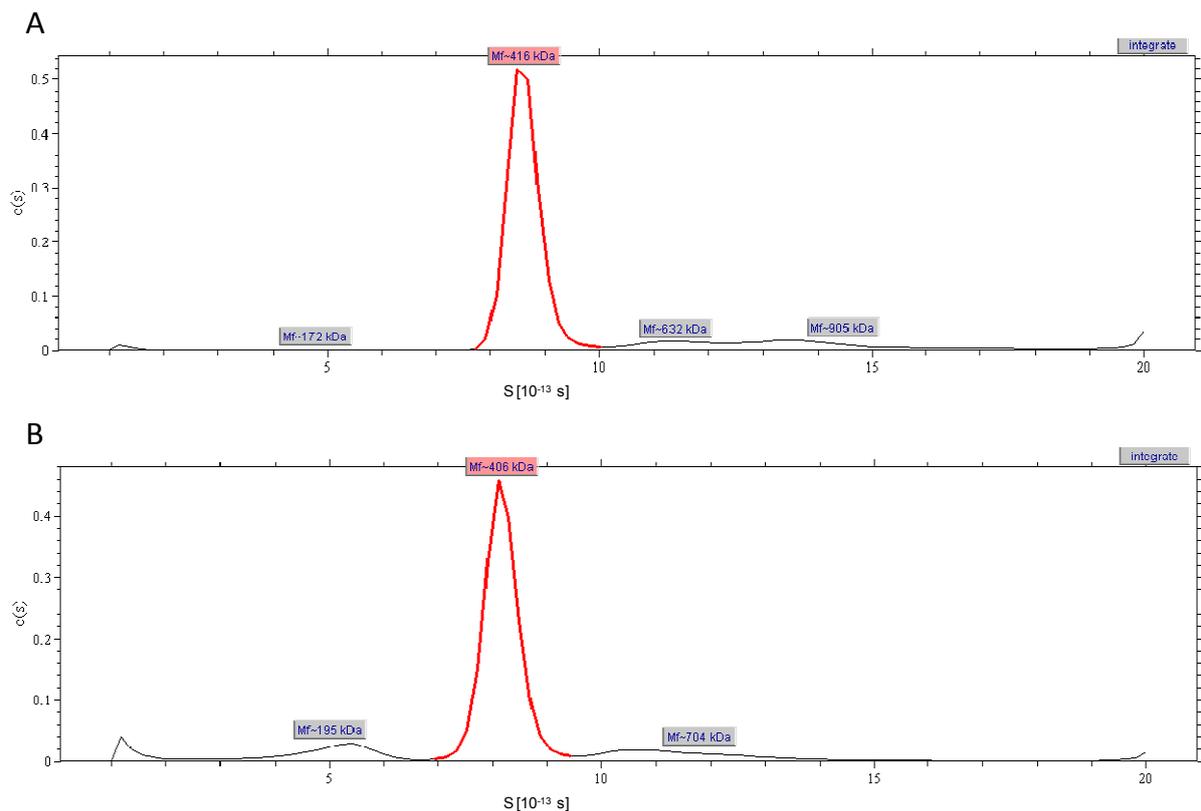
Die Anisotropie-Messungen (siehe Abbildung 36) zeigten, dass YjiE-HOCl im Vergleich zu YjiE-His bei DNA-Bindung zu einer deutlich stärkeren Signaländerung führte (siehe Abbildung 36A). Das deutet darauf hin, dass es zur Bildung eines anders zusammengesetzten oder anders geformten Komplexes kommt, was eine Aktivierung von YjiE in HOCl-gestressten Zellen vermuten lässt. Experimente mit aus Lysat, das *in vitro* mit HOCl versetzt wurde, gewonnenem YjiE, wurden von Yan Le durchgeführt. Es konnte in diesem Fall keine Aktivierung von YjiE beobachtet werden, wodurch die Aussage getroffen werden kann, dass für die Aktivierung von YjiE durch HOCl offenbar eine definierte zelluläre Umgebung benötigt wird. Nach der Reduktion von YjiE-HOCl und YjiE-His mit TCEP im Anschluss an die Titration zu *yjiE*-Promotor-DNA zeigt sich in den Anisotropie-Messungen eine in etwa gleich starke Signalzunahme bei beiden Proteinen (siehe Abbildung 36B). Das spricht dafür, dass die Reduktion von YjiE-HOCl die DNA-Bindfähigkeit zusätzlich zu der aktivierenden Modifikation in HOCl-gestressten Zellen erhöht und, dass die aktivierende Modifikation durch Reduktion mit TCEP nicht reversibel ist. Der in den Anisotropie-Messungen beobachtete Unterschied zwischen DNA-Protein-Komplexen von reduziertem YjiE-HOCl und reduziertem YjiE-His kann durch EMSAs offenbar nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35B).



**Abbildung 36:** Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit YjiE-HOCl. Es wurde 10 nM einfach AlexaFluor488-gelabelte 158bp-*yjiE*-Promotor-DNA verwendet. Die DNA wurde in einer gerührten Küvette vorgelegt und YjiE in Schritten zutitriert während die Anisotropie bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm bei 37°C gemessen wurde. (A) Bindekurven von YjiE-His (gefüllte Kreise), YjiE-HOCl (offene Kreise) und YjiE, das mit einem 10-fachen molaren Überschuss an HOCl behandelt wurde (offene Quadrate). (B) Bindekurven von YjiE-His (gefüllte Kreise) und YjiE-HOCl (offene Kreise) mit einem zusätzlichen Wert am Ende, der nach anschließender Reduktion für 1 h bei 37°C bestimmt wurde.

### 3.4.2 Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugation mit YjiE-HOCl

Um zu überprüfen, ob die in den DNA-Bindungs-Experimenten beobachtete Aktivierung von YjiE auch eine Änderung im Oligomerisierungszustand zur Folge hat, wurden zusammen mit Alexander Bepperling Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugationsläufe mit YjiE-HOCl und YjiE-His durchgeführt und anschließend das jeweilige Molekulargewicht bestimmt. Dazu wurde wie unter 2.5.5.2 beschrieben vorgegangen. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, besitzt YjiE-His ein Molekulargewicht von 416 kDa, während YjiE-HOCl ein Molekulargewicht von 406 kDa aufweist. Die beiden Werte sind sehr ähnlich und stimmen gut mit den Ergebnissen vorheriger Experimente überein, in denen bestimmt wurde, dass YjiE ein 12mer bildet (siehe 3.2.4). Da die Aktivierung von YjiE durch HOCl-Behandlung *in vivo* nichts an der dodekameren Struktur des Proteins ändert, geht sie nicht mit einer Änderung im Oligomerisierungszustand einher.



**Abbildung 37:** Ergebnisse der Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugationsläufe von YjiE-His (A) und YjiE-HOCl (B). Es wurde 12  $\mu$ M Protein in YjiE storage buffer eingesetzt und bei 35000 rpm und 20°C sedimentiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Sedview (Hayes und Stafford, 2010).

### 3.4.3 Ellmans-Assay mit YjiE-HOCl

Um zu überprüfen, ob YjiE-HOCl mehr modifizierte Cysteine besitzt als YjiE-His aus nicht gestressten Zellen, wurden Ellmans-Assays durchgeführt (Vorgehensweise siehe 2.3.3). Die Experimente zeigten, dass YjiE-His durchschnittlich 3,7 freie Cysteine besaß, während YjiE-HOCl durchschnittlich 3,5 freie Cysteine aufwies. Da zwischen den beiden Werten kein signifikanter Unterschied besteht, scheint es bei der Behandlung von YjiE mit HOCl *in vivo* offenbar nicht zu Cysteinmodifikationen zu kommen.

### 3.4.4 ESI-MS-Analyse von YjiE-HOCl

Mit Hilfe von Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde daraufhin analysiert, welche Aminosäuren von YjiE-His durch die Behandlung mit HOCl *in vivo* modifiziert werden. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Johannes Graumann vom Labor von Prof. Matthias Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie wie unter 2.3.10 beschrieben durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass YjiE-HOCl di- und tri-oxidierte Cysteine (Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>25</sup>, Cys<sup>150</sup>, Cys<sup>242</sup>) und oxidierte Methionine (Met<sup>1</sup>, Met<sup>206</sup>, Met<sup>230</sup>, Met<sup>280</sup>, Met<sup>284</sup>) besitzt. Da keines der Cysteine konserviert ist und *in vitro* HOCl-behandeltes YjiE vier oxidierte Cysteine besitzt und trotzdem inaktiv ist (siehe 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.5), sind Cysteinmodifikationen höchstwahrscheinlich nicht am Aktivierungsmechanismus beteiligt. Von den Methioninresten sind lediglich Met<sup>206</sup> und Met<sup>230</sup> konserviert. Im Anschluss wurden von Yan Le Einzelmutanten hergestellt in denen die Methionine durch Isoleucin oder Glutamin substituiert wurden. Die Mutanten wurden von ihr hinsichtlich ihrer *in vivo* Aktivität untersucht. Isoleucin sollte den hydrophoben Charakter von Methionin erhalten, während Glutamin den hydrophilen Charakter von Methioninsulfoxid (Vogt, 1995) nachahmen sollte. Wie erwartet waren die Isoleucin-Mutanten *in vivo* inaktiv und konnten den Phänotyp von  $\Delta yjiE$ -Zellen nicht komplementieren. Im Gegensatz dazu resultierte die Substitution durch Glutamin in aktivem YjiE, das den Wachstumsdefekt von  $\Delta yjiE$ -Zellen unter HOCl-Stress kompensieren konnte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Oxidation der konservierten Methioninreste Met<sup>206</sup> and Met<sup>230</sup> zu Methioninsulfoxid eine zentrale Bedeutung für die Aktivierung von YjiE in HOCl-behandelten *E. coli*-Zellen besitzt.

### 3.4.5 Diskussion zur Charakterisierung von YjiE-HOCl

Da YjiE durch Oxidation mit HOCl *in vitro* nicht aktiviert werden konnte, wurde YjiE aus Zellen gereinigt, die *in vivo* mit HOCl-behandelt wurden, und untersucht, ob das so gewonnene YjiE-HOCl aktiv ist.

Bei der Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von YjiE-HOCl mittels EMSAs konnte beobachtet werden, dass YjiE-HOCl die Mobilität von DNA stärker verringert als YjiE-His. Die Mobilitätsverringerng war jedoch bei *yjiE*-Promotor-DNA und *tufA*-DNA, die keine Bindestellen für YjiE besitzen sollte, in etwa gleich stark. Es kommt folglich offenbar zu einer Aktivierung von YjiE in intakten Zellen unter HOCl-Stress. Die DNA-Bindung ist jedoch trotz der Aktivierung immer noch unspezifisch.

In Anisotropie-Messungen wurde festgestellt, dass YjiE-HOCl im Vergleich zu YjiE-His zu einer stärkeren Signaländerung bei der Bildung des DNA-Protein-Komplexes führt, was darauf hindeutet, dass der gebildete Komplex anders zusammengesetzt oder anderes geformt ist. Das unterstützt die Vermutung, dass YjiE in Zellen, die mit HOCl behandelt werden, aktiviert wird. Yan Le konnte zeigen, dass es in Zellysats, das *in vitro* mit HOCl versetzt wird, nicht zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommt. Eine Reduktion von YjiE-HOCl und YjiE-His mit TCEP im Anschluss an die Titration zu DNA ergab in beiden Fällen eine gleich starke Signalzunahme. Demnach erhöht die Reduktion von YjiE die DNA-Bindfähigkeit zusätzlich zu der Modifikation in HOCl-gestressten Zellen, was darauf hindeutet, dass die aktivierende Modifikation nicht durch TCEP reduziert werden kann.

Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugations-Experimente ergaben, dass YjiE-HOCl ebenfalls Dodekamere bildet und die Aktivierung von YjiE folglich nicht mit einer Änderung des Oligomerisierungszustandes einhergeht.

Eine Untersuchung des Redoxzustandes der Cysteine in Ellmans Assays zeigte, dass YjiE-HOCl im Vergleich zu YjiE-His keine weiteren Cysteinmodifikationen aufwies. Eine Analyse von YjiE-HOCl mit ESI-MS ergab zwar, dass di- und tri-oxidierte Cysteine vorkommen, da aber keines der Cysteine konserviert ist und *in vitro* HOCl-oxidiertes YjiE zwar oxidierte Cysteine besitzt, aber inaktiv ist, ist die Oxidation von Cysteinen höchstwahrscheinlich nicht am Aktivierungsmechanismus beteiligt. Der Grund dafür, dass in ESI-MS-Analysen im Gegensatz zu Ellmans-Assay weitere oxidierte Cysteine in YjiE-HOCl nachgewiesen werden konnten ist vermutlich, dass lediglich ein Teil der Cysteine modifiziert ist. Diese können in ESI-MS-Analysen nachgewiesen werden. Ellmans-Assays ergeben jedoch nur einen Durchschnittswert für die Anzahl freier Cysteine eines Proteins. Die Massenanalyse zeigte

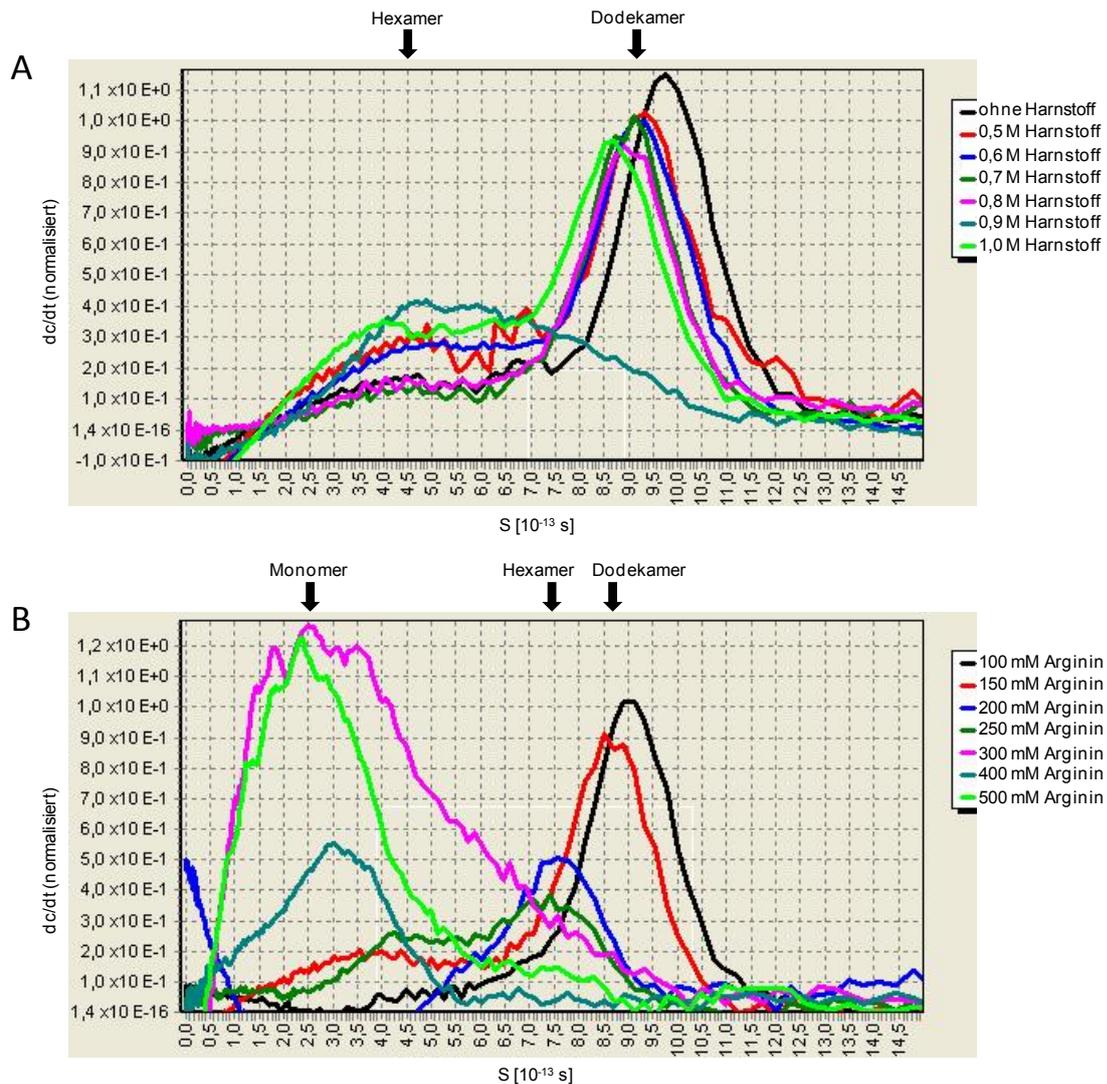
außerdem, dass auch Methioninreste oxidiert waren von denen Met<sup>206</sup> und Met<sup>230</sup> konserviert sind. Yan Le konnte in Experimenten mit Methionin-Mutanten von YjiE zeigen, dass die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid eine zentrale Bedeutung für die Aktivierung von YjiE in HOCl-behandelten Zellen zu haben scheint. Methioninsulfoxid kann durch TCEP nicht reduziert werden, was gut zu den Ergebnissen der Anisotropie-Messungen passt.

### 3.5 Dissoziation von YjiE mit Harnstoff und Arginin

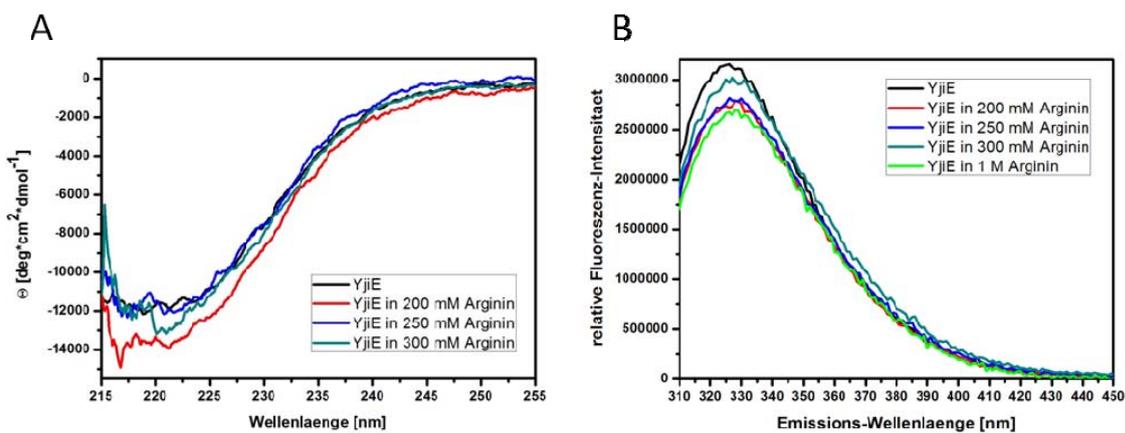
Da YjiE *in vivo* hauptsächlich kleinere Oligomere bildet, die vermutlich die aktive Spezies darstellen (siehe 3.2.5.2), wurde untersucht, ob YjiE durch Harnstoff oder Arginin dissoziiert und dadurch aktiviert werden kann. Dazu wurde YjiE in ersten Experimenten zur Dissoziation des Dodekamers für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte. Anschließend zusammen mit Alexander Bepperling Sedimentationsgeschwindigkeitsultrazentrifugationsläufe zur Bestimmung des Molekulargewichts und somit des Oligomerisierungszustandes durchgeführt (Vorgehensweise siehe 2.5.5.2). Abbildung 38A zeigt, dass selbst eine Konzentration von 1 M Harnstoff nicht zu einer kompletten Dissoziation des 12mers führte. Es konnten lediglich eine Spezies beobachtet werden, die in etwa einem Hexamer entsprach. YjiE ist demzufolge in Gegenwart von Harnstoff sehr stabil. Die leichte Verschiebung der Peaks zu einem niedrigeren S-Wert mit steigender Harnstoffkonzentration ist darauf zurückzuführen, dass die Viskosität des Puffers durch die Zugabe von Harnstoff steigt und eine entsprechende Korrektur der Werte mit dem verwendeten Programm nicht möglich ist. Wurde hingegen Arginin eingesetzt, so kam es bereits bei einer Konzentration von 200 mM zur Dissoziation zu einem Hexamer und bei 300 mM Arginin war YjiE bereits vollständig dissoziiert (siehe Abbildung 38B). Die leichte Verschiebung der Peaks mit zunehmender Argininkonzentration ist wiederum auf die Zunahme der Pufferviskosität zurückzuführen. Da YjiE durch relativ geringe Argininkonzentrationen dissoziiert werden kann, wurde in weiteren Ultrazentrifugationsexperimenten zunächst untersucht, ob der Transkriptionsfaktor wieder reassoziert, wenn die Argininkonzentration nach der Dissoziation durch Verdünnung wieder verringert wird. Dies war in der Tat der Fall, so dass es nicht möglich war die Argininkonzentration für andere Assays, in denen eine hohe Argininkonzentration stört, weiter zu senken.

Anhand von CD- und Fluoreszenz-Emissions-Messungen mit YjiE bei Argininkonzentrationen zwischen 200 und 300 mM (Vorgehensweise siehe 2.5.2 und 2.5.4) wurde überprüft, ob es bei der Dissoziation von YjiE auch zu Strukturänderungen kommt. Sowohl die CD-Spektren (für CD-Messungen wurde DL-Arginin eingesetzt), als auch die Fluoreszenz-Emissionsspektren waren denen von nativem YjiE sehr ähnlich (siehe Abbildung 39). Daraus kann geschlossen werden, dass sich an der Sekundärstruktur und auch an der molekularen Umgebung der Tryptophanreste von YjiE nichts verändert und es folglich nicht zu einer Strukturänderung kommt.

Abschließend wurde zusammen mit Alexander Bepperling die DNA-Bindung von YjiE bei verschiedenen Argininkonzentrationen mit der analytischen Ultrazentrifuge analysiert (Vorgehensweise siehe 2.5.5.2). Es zeigte sich, dass es nur bei Argininkonzentrationen bis zu ca. 100 mM zu einer Komplexbildung zwischen DNA und dem Transkriptionsfaktor kommt. Bei höheren Konzentrationen konnte nur noch freie DNA beobachtet werden, da die hohe Salzkonzentration vermutlich eine Bindung von YjiE an DNA verhindert.



**Abbildung 38:** Auswertung der Sedimentationsultrazentrifugationsläufe mit  $4 \mu\text{M}$  reduziertem YjiE, das zur Dissoziation des 12mers mit verschiedenen Harnstoff- oder Argininkonzentrationen versetzt wurde. Die Proben wurden bei 35000 rpm und  $20^\circ\text{C}$  sedimentiert. (A) Experimente mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen. (B) Experimente mit verschiedenen Argininkonzentrationen.



**Abbildung 39:** CD- und Fluoreszenzspektren zur Detektion von Strukturänderungen von YjiE bei verschiedenen Argininkonzentrationen. (A) Fern-UV-CD-Spektren von  $0,1 \text{ mg/ml}$  YjiE zwischen 215 nm und 260 nm bei  $20^\circ\text{C}$  und einer Scangeschwindigkeit von 20 nm/min. Es wurden 16 Einzelspektren akkumuliert. Für die CD-Messungen wurde DL-Arginin eingesetzt. (B) Fluoreszenz-Emissionsspektren von  $1 \mu\text{M}$  YjiE zwischen 310 nm und 450 nm bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und  $20^\circ\text{C}$ .

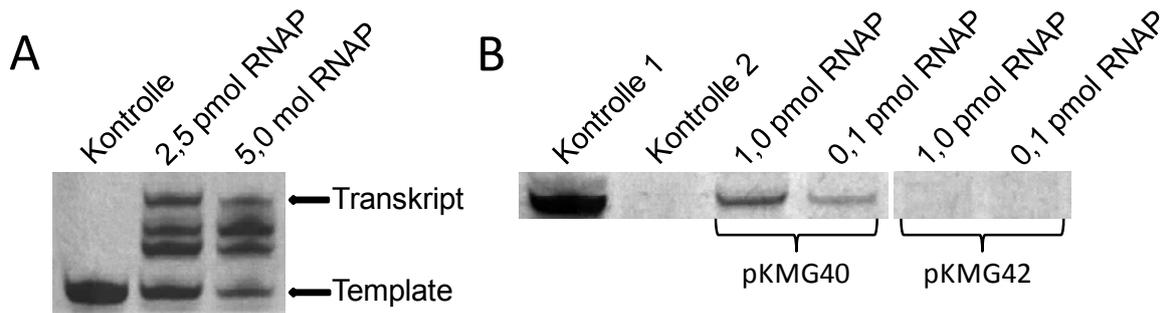
### 3.6 *In vitro* Transkriptions-Assay

Um zu analysieren, ob YjiE tatsächlich ein aktiver Transkriptionsfaktor ist und bei der Bindung an den eigenen Promotor die Gentranskription initiiert, wurden in Kooperation mit Martin Seizl im Labor von Prof. Patrick Cramer am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München *in vitro* Transkriptions-Assays durchgeführt. Die Vorgehensweise ist detailliert unter 2.6.2 geschildert. Zunächst wurde die Aktivität des verwendeten *E. coli* RNA Polymerase Holoenzym (RNAP) in einem *Run off Transcription*-Assay getestet. Wie auf Abbildung 40A zu sehen ist, kam es, in Gegenwart von RNA-Polymerase zur Synthese eines Transkriptes. Es waren auch Abbaubanden des Transkriptes zu erkennen. Die verwendete Polymerase war demzufolge aktiv. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Enzyms in ersten *in vitro* Transkriptions-Assay eingesetzt, um zu bestimmen wie viel Polymerase eingesetzt werden sollte. Es wurde sowohl das Plasmid pKMG40, das den konstitutiv aktiven *osmY*-Promotor enthielt, der auch ohne die Zugabe eines Transkriptionsfaktors transkribiert wird, als auch das Plasmid pKMG42, das einen großen Bereich (737 bp) der *yjiE*-Promotor-Region enthielt, verwendet. Abbildung 40B zeigt, dass es bei *in vitro* Transkriptions-Assays mit pKMG40 und Hefe-Transkriptions-Extrakt, der aktive Hefe-Polymerase enthält, wie erwartet zur Bildung von sehr viel Transkript (Kontrolle 1) kam. Wenn pKMG40 und 1 pmol oder 0,1 pmol der *E. coli*-RNA-Polymerase verwendet wurden, entstand ebenfalls Transkript, während es, wenn pKMG42 eingesetzt wurde, nicht zur Transkription kam. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die RNA-Polymerase in den *in vitro* Transkriptions-Assays aktiv ist, da es zur Transkription kommt, wenn ein konstitutiv aktiver Promotor vorhanden ist. Beim *yjiE*-Promotor kommt es hingegen nicht zur Bildung von Transkript, da ein Transkriptionsfaktor zur Aktivierung der Transkription benötigt wird. Da die Transkript-Bande unter Verwendung von 1 pmol RNA-Polymerase intensiver war, als unter Verwendung von 0,1 pmol, wurde in den folgenden Experimenten 1 pmol RNA-Polymerase eingesetzt.

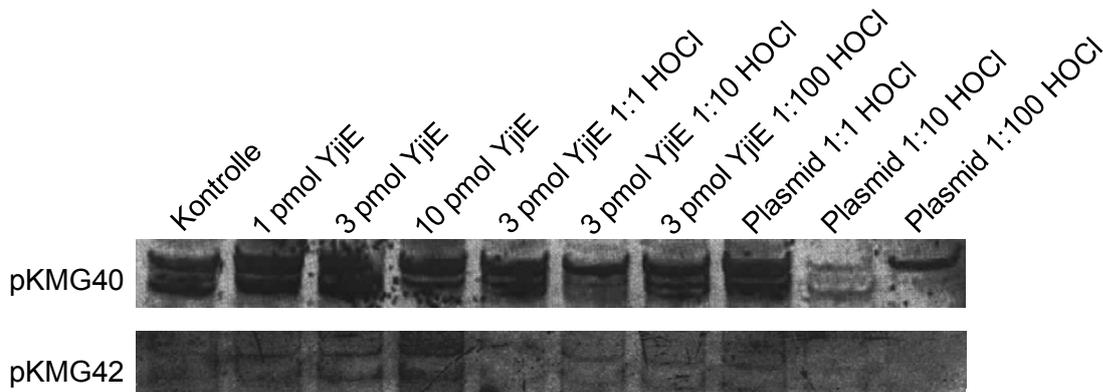
Als nächstes wurden verschiedene Mengen YjiE (1 pmol, 3 pmol, 10 pmol) in den *in vitro* Transkriptions-Assay eingesetzt. Außerdem wurde getestet, ob YjiE durch Vorinkubation mit verschiedenen molaren Verhältnissen an HOCl aktiviert werden kann, und, ob die Plasmid-DNA durch Vorinkubation mit diesen HOCl-Mengen zerstört wird oder der Promotor direkt durch HOCl aktiviert werden kann. In Abbildung 41 ist zu sehen, dass es bei Verwendung von pKMG40 mit dem konstitutiv aktiven Promotor, wie zu erwarten, immer zur Bildung von Transkript kam. Da die Banden deutlich schwächer waren, wenn das Plasmid mit großen Mengen HOCl vorinkubiert wurde, scheinen hohe HOCl-Konzentrationen die DNA zu

zerstören. Bei den Proben mit pKMG42, das den *yjiE*-Promotor enthält, waren hingegen keine deutlichen Banden zu erkennen. Etwas stärker werdende Schatten bei steigender YjiE-Konzentration ließen jedoch die Vermutung zu, dass möglicherweise mehr Transkriptionsfaktor zur Aktivierung benötigt wird. Aufgrund dessen wurden im nächsten Experiment größere Mengen YjiE eingesetzt. Dieses Mal wurde neben pKMG40 und pKMG42 auch ein Plasmid mit einem etwas kürzeren Teil des *yjiE*-Promotors, der 350 bp lang war, (pKMG41) verwendet. Abbildung 42 zeigt, dass es wiederum nur bei pKMG40 zur Synthese von Transkript kam. Daraus wurde geschlossen, dass YjiE auf irgendeine Weise aktiviert werden muss, um die Transkription initiieren zu können. Mögliche aktivierende Komponenten könnten kleine Moleküle, aber auch Proteine oder andere Zellbestandteile sein. Der sogenannte *co-inducer* könnte zum Beispiel eine Substanz sein, die durch HOCl oxidiert wurde. Daher wurde zu den *in vitro* Transkriptions-Assays LB-Medium, oxidiertes LB-Medium, Zelllysate oder Lysate von HOCl-gestressten Zellen zugegeben. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, kam es bei pKMG40 wiederum in allen Proben zur Bildung von Transkript, während bei pKMG42 in keiner der Proben Transkript nachgewiesen werden konnte. YjiE scheint also nicht durch eine Komponente des Mediums, lösliche Zellbestandteile, Oxidationsprodukte des Mediums oder von Zellbestandteilen oder einer löslichen, durch HOCl-Stress regulierten Zellkomponente aktiviert zu werden.

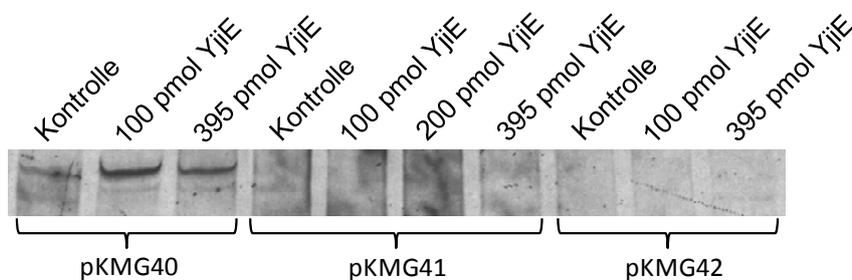
Da sehr viele Faktoren bei *in vitro* Transkriptions-Assays eine Rolle spielen und möglicherweise falsch gewählt worden sein könnten, kann der genaue Grund für das Nicht-Funktionieren der Assays nicht festgestellt werden. Es könnte jedoch zum Beispiel sein, dass mit dem storage buffer von YjiE zuviel Salz in die Proben gebracht wurde, so dass keine DNA-Bindung möglich war. Eventuell ist die Initiation der Transkription am *yjiE*-Promotor zu selten, um eine ausreichende Menge an Transkript zu erhalten. WesternBlot-Analysen der Menge an YjiE in Wildtyp-Zelllysaten von Yan Le haben gezeigt, dass nur sehr wenig YjiE vorhanden ist. Möglicherweise bindet YjiE auch nicht an seinen eigenen Promotor oder muss durch einen *co-inducer* aktiviert werden, der nicht in den verwendeten Medien und Lysaten enthalten war. Vielleicht war auch irgendeine der eingesetzten Komponenten lediglich nicht im richtigen Konzentrationsbereich. Es sollten auf jeden Fall weitere Versuche unternommen werden, um die Transkriptionsaktivität von YjiE nachzuweisen. Eine wichtige Voraussetzung dafür wäre jedoch, dass aktives YjiE, das spezifisch an DNA bindet, eingesetzt werden kann.



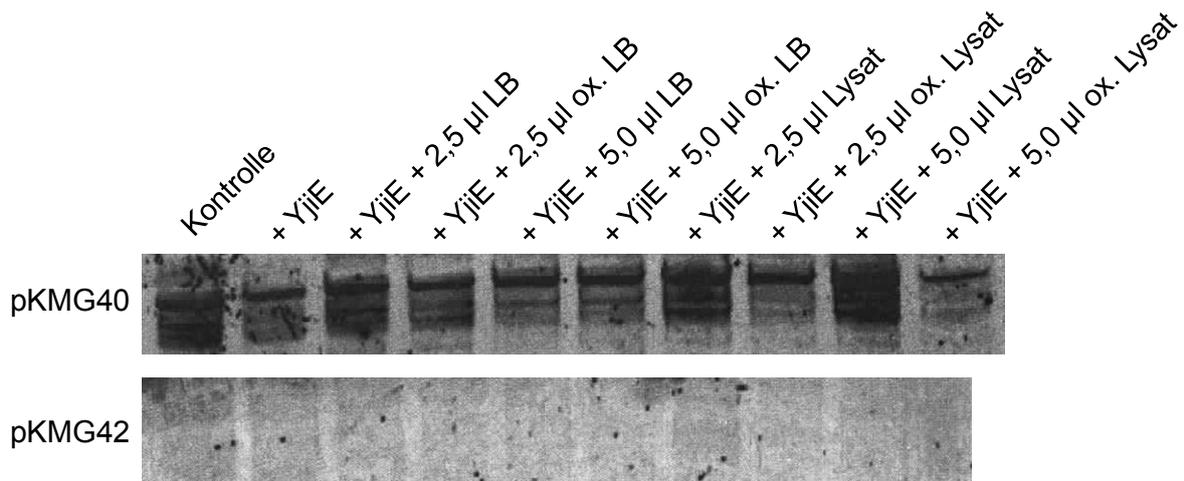
**Abbildung 40:** Assays zum Nachweis der Polymeraseaktivität und zur Bestimmung der Polymerasemenge, die für die folgenden Experimente verwendet werden sollte. (A) TBE-Harnstoff-Gel mit den Proben der *Run off Transcription*-Assays mit denen die Polymeraseaktivität sichergestellt wurde. Als Kontrolle wurde das Template aufgetragen. (B) FQP-Harnstoff-Gel mit Proben der *in vitro* Transkriptions-Assays in denen verschiedene Polymerasemengen getestet wurden. Als Kontrollen dienten pKMG40, dem Hefe-Transkriptions-Extrakt zugegeben wurde, (Kontrolle 1) und pKMG40, dem keine Polymerase zugegeben wurde (Kontrolle 2).



**Abbildung 41:** FQP-Harnstoff-Gele mit Proben der *in vitro* Transkriptions-Assays in denen die Auswirkungen von verschiedenen YjiE-Mengen, von YjiE, das mit verschiedenen molaren Verhältnissen an HOCl vorinkubiert wurde, und der Vorinkubation der Plasmide mit den gleichen HOCl-Mengen auf die Transkriptsynthese untersucht wurde. Es wurden pKMG40 und pKMG42 verwendet. Als Kontrolle wurde jeweils das Plasmid ohne Transkriptionsfaktor und ohne HOCl-Behandlung eingesetzt.



**Abbildung 42:** FQP-Harnstoff-Gel mit Proben der *in vitro* Transkriptions-Assays in denen größere Mengen YjiE zusammen mit pKMG40, pKMG41 und pKMG42 eingesetzt wurden. Als Kontrolle wurde jeweils das Plasmid ohne Transkriptionsfaktor verwendet.

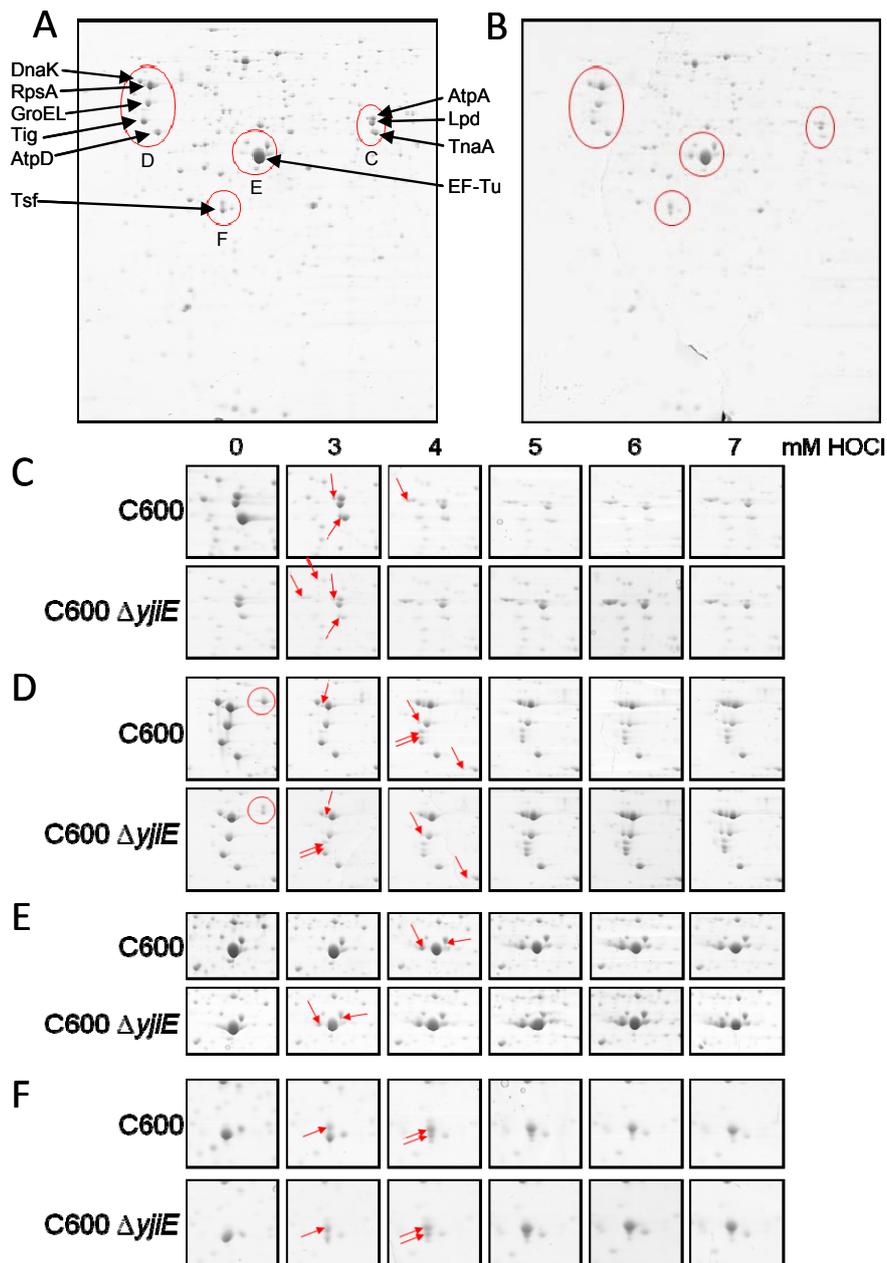


**Abbildung 43:** FQP-Harnstoff-Gele mit Proben der *in vitro* Transkriptions-Assays in denen getestet wurde, ob verschiedene Mengen LB-Medium, oxidiertes LB-Medium (ox. LB), Lysat oder Lysat von HOCl-gestressten Zellen (ox. Lysat) den Transkriptionsfaktor YjiE aktivieren können. Es wurden pKMG40 und pKMG42 verwendet. Als Kontrolle wurde jeweils das Plasmid ohne Transkriptionsfaktor eingesetzt.

### 3.7 2D-PAGE mit C600 und C600 $\Delta yjiE$ -Zellen unter HOCl-Stress

Mit Hilfe von zweidimensionaler SDS-PAGE (2D-PAGE) können Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Größe in zwei Dimensionen aufgetrennt werden, wodurch es möglich wird Unterschiede im Proteom von verschiedenen Zellen zu analysieren. Um zu untersuchen, welche Funktion YjiE unter HOCl-Stress hat, wurde eine 2D-PAGE mit Proben von C600-Zellen (WT) und KMG214-Zellen (C600  $\Delta yjiE$ ), die mit verschiedenen HOCl-Konzentrationen behandelt wurden, durchgeführt. Die Vorgehensweise ist unter 2.3.8 beschrieben. Anschließend wurden die Intensitäten und das Muster der Protein-Spots verglichen. In Abbildung 44A und 44B sind die beiden 2D-Gele von WT- und  $\Delta yjiE$ -Zellen bei einer Konzentration von 3 mM HOCl zu sehen. Abbildung 44C zeigt eine Zusammenfassung der Bereiche in denen Unterschiede bei den beiden Stämmen zu beobachten waren bei allen eingesetzten HOCl-Konzentrationen, wobei die Unterschiede rot eingekreist oder mit roten Pfeilen markiert wurden. Es ist zu sehen, dass es in  $\Delta yjiE$ -Zellen offenbar bereits bei niedrigeren HOCl-Konzentrationen zu Proteinmodifikationen kommt, wodurch Isoformen von Proteinen gebildet werden. Diese Isoformen sind als zusätzliche Protein-Spots, die neben einem bereits bestehenden Spot entstehen, zu erkennen. Durch MALDI-MS konnten die Proteine, die die verschiedenen Spots bildeten, identifiziert werden. Die Chaperone DnaK, GroEL und Tig (Trigger Faktor), sowie die Proteine RpsA (Protein S1

der 30S-Untereinheit des Ribosoms), AtpA (Untereinheit der ATP-Synthase), AtpD (Untereinheit der ATP-Synthase), Tsf (Elongationsfaktor Ts), EF-TU (Elongationsfaktor Tu), TnaA (Tryptophanase) und Lpd (Lipoamid-Dehydrogenase) werden in  $\Delta yjiE$ -Zellen bereits bei niedrigeren HOCl-Konzentrationen oxidativ modifiziert als in WT-Zellen. Dies konnte bei einer Wiederholung des Experiments bestätigt werden. YjiE scheint demnach Zellen vor oxidativen Proteinmodifikationen zu schützen.



**Abbildung 44:** Auswertung der 2D-PAGE-Experimente mit C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen, die mit verschiedenen HOCl-Mengen behandelt wurden. Bereiche in denen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen auftraten, wurden rot eingekreist oder mit roten Pfeilen markiert. (A) 2D-Gel der C600-Zellen bei einer HOCl-Konzentration von 3 mM. (B) 2D-Gel der C600  $\Delta yjiE$ -Zellen bei einer HOCl-Konzentration von 3 mM. (C) – (F) Zusammenfassung zum direkten Vergleich der Bereiche in denen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen auftraten bei allen verwendeten HOCl-Konzentrationen.

### 3.8 Genexpressionsanalyse von C600 und C600 $\Delta yjiE$ -Zellen unter HOCl-Stress

Um einen Einblick in die regulatorische Funktion von YjiE zu bekommen und einschätzen zu können wie YjiE Zellen vor HOCl-Stress schützt, wurden Genexpressionsanalysen von C600-WT (C600)- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen (KMG214) unter HOCl-Stress durchgeführt. Dazu wurden wie unter 2.6.4 beschrieben Proben für Transkriptionsprofile hergestellt und an die Firma MTF Services in Tübingen geschickt, wo die RNA-Isolierung und die Microarray-Analyse erfolgten. Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit einer geringen Menge HOCl behandelt, um eine spezifische transkriptionelle Antwort auf HOCl-Stress bei 100 %iger Lebensfähigkeit der Zellen hervorzurufen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Anschließend wurden die Genexpressionswerte der beiden Stämme unter beiden Bedingungen verglichen und die Gene, deren Level sich als Antwort auf HOCl-Stress änderte, sowie YjiE-regulierte Gene bestimmt. Gene, die in mindestens zwei von drei unabhängigen Experimenten eine Änderung um wenigstens einen Faktor 2 aufwiesen, wurden als signifikant reguliert betrachtet.

Wenn kein Stress vorhanden war, waren im Vergleich zwischen C600- und KMG214-Zellen nur wenige Gene mit geringen Unterschieden im RNA-Level zu beobachten. Dazu gehörten *katG* und *sthA* (in KMG214-Zellen 2,1-fach hochreguliert) sowie *fimAICDG*, *fruA*, *proVW* und *yjiY* (in KMG214-Zellen 2,2 – 3,5-fach herunterreguliert). Unter HOCl-Stress änderten sich die RNA-Level hingegen drastisch. Insgesamt zeigten 385 Gene eine mindestens 2-fache Veränderung im RNA-Level als Antwort auf HOCl in C600-Zellen (166 hochreguliert, 219 herunterreguliert) und die RNA-Level von 382 Genen änderten sich in KMG214-Zellen (240 hochreguliert, 142 herunterreguliert). Diese Gene können in drei Kategorien eingeordnet werden: (I) Gene, die sowohl in C600-, als auch in KMG214-Zellen unter HOCl-Stress reguliert werden, (II) Gene, die in C600- im Vergleich zu KMG214-Zellen eine stärkere Änderung zeigen (YjiE-Regulon), und (III) Gene, die in KMG214- im Vergleich zu C600-Zellen eine stärkere Änderung zeigen.

#### 3.8.1 HOCl-regulierte Gene

Die HOCl-Behandlung resultierte in einer mindesten 5-fachen Änderung der RNA-Level von 132 Genen in C600- und KMG214-Zellen (siehe Tabelle A2 im Anhang). Diese große Anzahl

lässt vermuten, dass die Mehrheit der Gene, die als Antwort auf HOCl reguliert werden, unabhängig von YjiE ist. Von vielen dieser Gene ist bekannt, dass sie unter oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder HOCl induziert werden (*cysP*, *dps*, *fliY*, *grxA*, *iscRSU*, *katG*, *marRAB*, *oxS*, *sbp*, *soxS*, *trxC*, *bhsA*, *yhhW*, *yjgHI*, *ykgCI*) (Wang et al., 2009; Zheng et al., 2001). *soxS* und *oxyS* stellen jeweils das Herzstück der Antwort auf Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Imlay, 2008; Pomposiello und Demple, 2001; Storz und Spiro, 2010) dar, während KatG, Dps, TrxC und GrxA reaktive Sauerstoffspezies beseitigen oder intrazelluläre Thiolgruppen reduzieren, die aufgrund von oxidativem Stress oxidiert wurden (Imlay, 2008). Die große Überlappung bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und HOCl-regulierten Genen deutet darauf hin, dass die jeweiligen Genprodukte schädlichen Effekten, die sowohl durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, als auch durch HOCl verursacht werden, entgegenwirken. Eine derartig breite Funktion konnte für die Katalase KatG, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abbaut und, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und durch einen bis heute unbekanntem Mechanismus, die Resistenz von *E. coli*-Zellen gegenüber HOCl erhöht, gezeigt werden (Dukan und Touati, 1996). Das DNA-bindende Protein Dps fungiert als Radikalfänger unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress und schützt DNA vor Mutationen, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und HOCl verursacht werden (Barth et al., 2009; Dukan und Touati, 1996; Park et al., 2005). Viele der stark durch HOCl regulierten Gene werden jedoch in *E. coli* O157:H7 weder unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, noch durch HOCl-Behandlung reguliert. Einige von ihnen besitzen keine annotierte Funktion (*ybiJ*, *ygiD*, *yhaL*, *yigJ*, *yqiF*), während andere in oxidativem Stress involviert zu sein scheinen (*yhaK* und *ydiE*). *yhaK* wird durch Nitrosoglutathion stark hochreguliert und die Cysteine von YhaK sind sensitiv für Oxidationen (Gurmu et al., 2009). *ydiE* wird durch den Transkriptionsregulator und -repressor Fur reguliert und könnte einen neuartigen Eisentransporter kodieren (McHugh et al., 2003). Auch viele andere Fur-regulierte Gene oder Gene, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind, werden durch HOCl-Stress mehr als zweifach herunterreguliert (*cirA*, *cydA*, *entB*, *entC*, *entH*, *exbBD*, *fecABC*, *fecIR*, *feoABC*, *fepA*, *fepDC*, *fes*, *fhuE*, *fhuF*, *ryhB*, *tonB*, *ydiE*). Ihre Herunterregulierung unter HOCl-Behandlung könnte dazu dienen, dass die zelluläre Eisenlast reduziert und begleitend die Verstärkung des HOCl-verursachten oxidativen Stresses durch Redox-Zyklen des freien Eisens verhindern wird. Dementsprechend werden Gene, die an der Eiseneinfügung in Proteine beteiligt sind, unter HOCl-Stress hochreguliert (*hemH*, *iscRSU*, *nfuA*). Dukan und Touati konnten zeigen, dass *fur*-Mutanten, die aufgrund der fehlenden Herunterregulation der Eisenaufnahme ein erhöhtes intrazelluläres Eisenlevel besitzen, empfindlicher auf HOCl-Stress reagieren. Das deutet darauf hin, dass es in *E. coli*-Zellen mit einem höheren intrazellulären Eisenlevel zu einer verstärkten ROS-Bildung durch die Fenton-Reaktion

kommt (Dukan und Touati, 1996), und, dass die Herunterregulation der Eisenaufnahme für das Überleben unter HOCl-Stress von Bedeutung ist.

### 3.8.2 *YjiE-regulierte Gene*

Einige der HOCl-regulierten Gene zeigen eine stärkere Regulation in C600-Zellen, während andere sogar ausschließlich in C600-Zellen reguliert und in KMG214 Zellen nicht durch HOCl beeinflusst werden. Diese 48 Gene gehören zum YjiE-Regulon (siehe Tabelle A1 im Anhang). Entsprechend ihrer Funktion können sie in Gene, die in die Methionin-Biosynthese (hochreguliert), die Eisenaufnahme (herunterreguliert) oder den aeroben Stoffwechsel (herunterreguliert) involviert sind und in Beziehung zu RNA stehende Gene (herunterreguliert) unterteilt werden. Da Methionin unter HOCl-Stress offenbar schnell oxidiert und dadurch abgereichert wird, wird durch die Hochregulation der Methionin-Biosynthese wieder neues Methionin generiert. Viele der HOCl-regulierten Gene, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind (siehe oben) werden durch YjiE reguliert (*entC*, *entH*, *fecCDE*, *fecR*, *yncE*). Einige zusätzliche Eisenstoffwechsel-Gene werden unter HOCl-Stress weniger ausgeprägt in Abhängigkeit von YjiE reguliert (*entEBA*, *ybbiX*; 1,5 bis 2-fache Änderung). Das deutet darauf hin, dass die Herunterregulation der Eisenaufnahme für das Überleben unter HOCl-Stress wichtig ist. Es sollte jedoch beachtet werden, dass diese Regulation unter HOCl-Stress nicht gänzlich durch Fur vermittelt zu werden scheint, da einige stark durch Fur regulierte Gene keine Veränderung als Antwort auf HOCl-Stress zeigen. Die Herunterregulation von in Beziehung zu RNA stehenden Prozessen ist anscheinend spezifisch für YjiE, da die Gene *fnt*, *ksgA*, *rne*, *rnpA*, *rsmB*, und *truB* ausschließlich in C600-Zellen reguliert werden. Die Level von *rttR* und *rhyB*, die beide für kleinere RNA-Moleküle (*small RNA*, sRNA) kodieren, werden zwar durch HOCl beeinflusst, sind jedoch stark YjiE-abhängig. *rhyB* ist ein Fur-abhängiges, regulatorisches sRNA-Molekül, das offenbar für die Regulation von einigen Fur-abhängigen Genen verantwortlich ist (Masse und Gottesman, 2002).

### 3.8.3 *Gene, die möglicherweise durch YjiE reprimiert werden*

Als Antwort auf HOCl änderten sich die Level von 76 Genen zwar signifikant in KMG214-, jedoch nicht in Wildtyp-Zellen (siehe Tabelle 2 im Anhang). Der Grund dafür könnte eine potenzielle Funktion von YjiE als Repressor (analog zu OxyR, Zheng et al., 2001) oder eine

veränderte Regulation dieser Gene, die durch die Deletion von *yjiE* verursacht wird, sein. Die Mehrheit der Gene wird hochreguliert (72 Gene). Sie können in Gene, die in die Proteinfaltung und die Proteolyse (*clpA*, *clpP*, *fkpB*, *glpG*, *ibpB*), die Bildung von Biofilmen und Stress (*alx*, *bhsA*, *bssS*, *oxyS*, *sufA*, *trxC*, *xthA*) oder den aeroben Stoffwechsel ( das heißt den Cystein- und Sulfatstoffwechsel) involviert sind, sowie in Gene mit unbekannter Funktion (*yaaA*, *ybeZ*, *yceA*, *ydeN*, *yebA*, *yeeD*, *yeeE*, *yhaK*, *yhhL*, *yhhW*, *yhiI*, *yijE*, *yjeI*, *yjgH*, *yqjF*) eingeteilt werden. Anscheinend macht die Deletion von *yjiE* Zellen unter HOCl-Stress sehr angreifbar, was zusätzliche Stressantworten hervorruft. Das könnte darauf hindeuten, dass YjiE eine kritische Funktion in der Homöostase von reaktiven Sauerstoffspezies unter HOCl-Stress besitzt, die durch andere Systeme kompensiert werden muss, wenn kein YjiE vorhanden ist.

Ähnlich wie die anderen Transkriptionsfaktoren für oxidativen Stress aus *E. coli*, OxyR und SoxR, wird YjiE spezifisch durch eine reaktive Sauerstoffspezies aktiviert und reguliert begleitend eine große Anzahl von Genen. Die Regulation vieler Gene ähnelt der von OxyR und SoxR, da die verursachten Schäden vielfältig sind, ist aber ungewöhnlich für einen LysR-Typ-Transkriptionsregulator, die üblicherweise nur wenige Gene regulieren (Maddocks und Oyston, 2008). Im Fall von SoxR und OxyR verringern die entsprechenden Genprodukte das Ausmaß des intrazellulären oxidativen Stresses und reparieren beschädigte Makromoleküle (Blanchard et al., 2007, Zheng et al., 2001). YjiE unterscheidet sich von OxyR und SoxR indem es keine Gene reguliert, die augenscheinlich in den Abbau von ROS involviert sind. Mit *yedY* wird nur ein Gen reguliert, das in die Reduktion von oxidierten Metaboliten involviert sein könnte (Loschi et al., 2004). Ob die Gene mit unbekannter Funktion eine zentrale Rolle bei Schutz von *E. coli* vor HOCl-Stress spielen, muss untersucht werden.

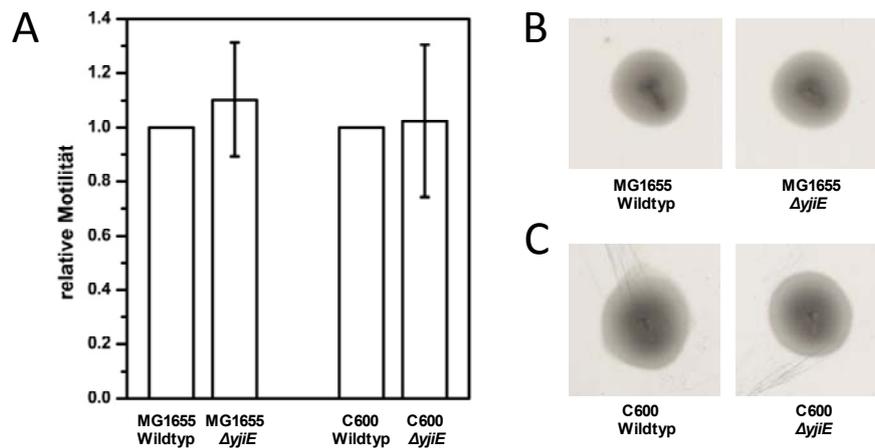
Der Mittelpunkt der durch YjiE ausgelösten Antwort scheint darin zu liegen, dass die intrazelluläre Last an reaktiven Sauerstoffspezies durch die Herunterregulation von Fur-regulierten Genen, die in die Eisenaufnahme involviert sind, verringert wird. *rhyB*, das für eine sRNA kodiert, die den Umgang mit Eisen signifikant verändert, könnte auch eine zentrale Rolle spielen, da es indirekt *fur* herunterreguliert (Masse et al., 2005; Vecerek et al., 2007). Die Herunterregulation von *rhyB* könnte daher indirekt die Expression von *fur* hochregulieren und in einem höheren Level des aktiven Fur-Repressors resultieren (Anmerkung: in den hier durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden 1,9-fach höhere *fur*-Level unter HOCl-Stress in Wildtyp-Zellen beobachtet). OxyR und SoxR aktivieren die Expression von *fur* unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Behandlung ungefähr 10-fach, was zu einer

Verdopplung der Fur-Konzentration führt (Zheng et al., 1999). Das deutet darauf hin, dass die Kontrolle der Eisenhomöostase in *E. coli* einen wesentlichen Teil der Antwort zur Abwehr von Oxidantien darstellt. Trotz der Erhöhung der Fur-Konzentration durch OxyR und SoxR gehören Fur-regulierte Gene nicht zu deren Regulons. Im Fall von HOCl-Stress werden einige, aber nicht alle Fur-kontrollierten Gene herunterreguliert, was darauf hinweist, dass so etwas wie eine Feinabstimmung der Eisenhomöostase durch YjiE ermöglicht werden könnte. Es wurde vorgeschlagen, dass HOCl in Anwesenheit von Eisen eine Fenton-Reaktion eingehen kann (Dukan und Touati, 1996).  $\text{H}_2\text{O}_2$  und möglicherweise auch HOCl können durch die Fenton-Reaktion cytotoxische Hydroxylradikale bilden, die Zellschäden verursachen.  $\text{O}_2^-$  kann zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt werden und Eisen-Schwefel-Proteine attackieren, wodurch das Eisenlevel erhöht und begleitend die Bildung von Hydroxylradikalen verstärkt wird (Imlay, 2003). Mutmaßlich könnte eine HOCl-induzierte oxidative Entfaltung Eisen-enthaltende Proteine stärker als andere reaktive Sauerstoffspezies beschädigen und dadurch zur Bildung von großen Mengen freien Eisens führen, weshalb eine direkte Regulation von Genen der Eisenhomöostase nötig wird. Daher sollte die Minimierung der Aufnahme von zusätzlichem Eisen in Zellen eine Schlüsselfunktion eines HOCl-Abwehrmechanismus sein.

### 3.9 Motilitäts-Assays mit Wildtyp- und $\Delta yjiE$ -Zellen

Da YjiE kürzlich als Zelldichte-abhängiger Motilitätsrepressor (QseD) in *E. coli* K-12 beschrieben wurde (Habdas et al., 2010), wurde mit Hilfe von Motilitäts-Assays untersucht, ob Wildtyp- und  $\Delta yjiE$ -Zellen eine unterschiedliche Motilität besitzen. Die Assays wurden wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt. In den Experimenten wurden C600-Zellen und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen ohne Chloramphenicol-Kassette als Selektionsmarker anstelle des *yjiE*-Gens (KMG232), sowie MG1655-Zellen und MG1655  $\Delta yjiE$ -Zellen ohne Chloramphenicol-Resistenz (KMG231) miteinander verglichen. Die Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde entfernt, damit die Vergleichbarkeit zu den Experimenten von Habdas et al. (2010) gewährleistet war (Vorgehensweise siehe 2.2.14.4). Für MG1655 wurden 28 und für C600 26 biologische Replikate in unabhängigen Experimenten erzeugt. Der Durchmesser der Kolonien wurde jeweils an zwei Stellen gemessen und ein Mittelwert gebildet. Anschließend wurde der Durchmesser der Wildtyp-Stämme auf 1 normiert und die relative Motilität der

Deletionsstämme bestimmt. Abbildung 45 zeigt, dass die Motilität von MG1655- und MG1655  $\Delta yjiE$ -Zellen sowie von C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen jeweils vergleichbar war. Da kein Unterschied in der Motilität von Zellen mit und ohne  $yjiE$  zu vorhanden ist, besitzt YjiE scheinbar keine Funktion in der Regulation der Motilität von *E. coli*-Zellen. Dies war auch nicht zu erwarten, da die Genexpressionsanalysen (siehe 3.8) keine veränderten RNA-Level von Flagellen-Genen oder anderen Genen, die Einfluss auf die Motilität haben (*flgA-N*, *flhA-E*, *fliA-Z*, *motAB*, *fliA*, *flk*, *ycgR*, *yhjH*), in C600  $\Delta yjiE$ - im Vergleich zu C600-Zellen ergaben.



**Abbildung 45:** Auswertung der Motilitäts-Assays mit MG1655- und MG1655  $\Delta yjiE$ -Zellen (KMG231) sowie C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen (KMG232). (A) Relative Motilität der verschiedenen Stämme nach Mittelung der Ergebnisse aus allen durchgeführten Experimenten, wobei die Motilität der Wildtyp-Stämme auf 1 normiert wurde. Für MG1655 wurden 28 und für C600 26 biologische Replikate gemittelt und die Standardabweichung in Form von Fehlerbalken angegeben. (B) und (C) Beispiele für Kolonien der Stämme auf Trypton-Soft-Agar nachdem von einer Einzelkolonie auf die Platte aufgebrachte Zellen für 8 h bei 37°C und anschließend für 15 h bei 25°C inkubiert wurden. (B) MG1655- und MG1655  $\Delta yjiE$ -Zellen. (C) C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen.

### 3.10 Kristallisation von YjiE

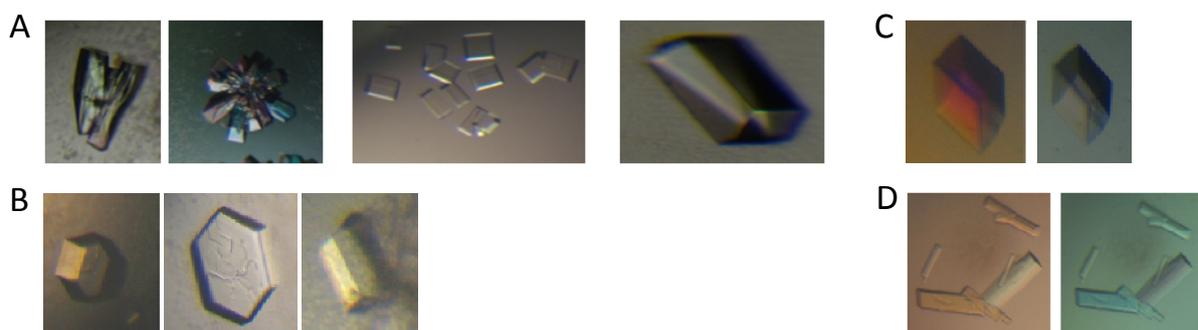
Um die dreidimensionale atomare Struktur von YjiE zu bestimmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Melissa Poynor und Prof. Michael Groll vom Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München Röntgenstrukturanalysen durchgeführt. Für die Analysen muss das gereinigte Protein zunächst kristallisiert werden. Anschließend werden Röntgenbeugungsdaten aufgenommen, woraufhin die Phase bestimmt werden muss, damit die Elektronendichte interpretiert werden kann. Die Experimente wurden wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt. Da LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren (LTTRs) schwer zu kristallisieren sind, konnten bisher nur wenige Kristallstrukturen von vollständigen LTTRs gelöst werden. Aus diesem Grund wurde zunächst nur eine verkürzte YjiE-Variante eingesetzt

(Aminosäuren 94 bis 303 von YjiE (YjiE<sup>94-303</sup>)) in ersten Kristallisations-*Screens* eingesetzt. Diesem Konstrukt fehlt die DNA-bindende Domäne, die in allen LTTRs sehr ähnlich ist. Daher besteht es sozusagen nur aus der Effektor-domäne (*co-inducer*-Bindedomäne und C-terminale Domäne). Es wurde erwartet, dass ein verkürztes Konstrukt leichter zu kristallisieren ist (vergleiche Choi et al., 2001). Abbildung 46A zeigt die Ergebnisse der Kristallisations-*Screens* mit HOCl-oxidiertem YjiE<sup>94-303</sup>. Erste Versuche ergaben vielversprechende Ergebnisse in 0,2 M Ammoniumcitrat, 20 % PEG 3350 pH 7,0. Allerdings führten *Fein-Screens* unter diesen Bedingungen nur zu aggregierten Kristallen (auf den linken beiden Bildern von Abbildung 46A zu sehen). Daher wurde im optimierten Puffer (0,25M Ammoniumcitrat, 22 % PEG 4000 pH 7,0) ein *Screen* mit Additiven durchgeführt. Dazu wurden 96 Kristallisationstropfen für die Hängetropfen-Methode mit einem Volumen von 2 µl vorbereitet und jeweils 0,2 µl einer Additiv-Lösung zugegeben. Die Zugabe von 0,1 M Natriumiodid führte zu Kristallen, die jedoch flach waren und keine dritte Dimension besaßen (auf dem dritten Bild von Abbildung 46A zu sehen). In einem weiteren Additiv-*Screen* konnten durch Zugabe von 0,1 M Guanidinium-Hydrochlorid dreidimensionale Kristalle erhalten werden (auf dem letzten Bild von Abbildung 46A zu sehen). HOCl-oxidiertes YjiE<sup>94-303</sup> in 10 mM Tris, 40 mM NaCl pH 7,5 konnte folglich in 0,25M Ammoniumcitrat, 0,1 M NaI, 0,1 M GdmCl, 22 % PEG 4000 pH 7,0 kristallisiert werden. Die Kristalle führten am Synchrotron zu einer Elektronenbeugung mit einer Auflösung von ca. 2,5 Å. Da bisher keine Struktur aufgeklärt wurde, die eine starke Homologie zu YjiE aufweist, musste das Phasenproblem experimentell gelöst werden. Deshalb wurde YjiE<sup>94-303</sup> in methioninauxotrophen Zellen in Minimalmedium, das Selenomethionin anstelle von Methionin enthielt, exprimiert (siehe 2.4.1) und anschließend gereinigt. So konnte Methionin im Protein durch Selenomethionin ersetzt werden und dadurch ein Schwermetall für die folgenden MAD-Experimente direkt in YjiE eingebaut werden. Das HOCl-oxidierte Protein in 10 mM Tris, 40 mM NaCl pH 7,5 konnte in 0,25 M Ammoniumcitrat, 0,1 M GdmCl, 22 % PEG 4000 pH 7,0 kristallisiert werden (siehe Abbildung 46B). Anschließend wurde am Synchrotron zunächst durch einen Röntgenwellenlängen-Scan das Absorptionsmaximum des Selens bestimmt ( $\lambda = 0.979939 \text{ \AA}$ ). Daraufhin wurden zwei anomale Datensätze bei 0.9796 Å und 0.9797 Å aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm XDS prozessiert und initiale Phasen wurden berechnet. Es konnte ein starkes anomales Signal mit einer Auflösung von ca. 3,5 Å (siehe Abbildung A1 im Anhang) detektiert werden. YjiE<sup>94-303</sup> besitzt 5 Methionine und sollte daher 5 Selenomethionine aufweisen. Mit dem SHELX Softwarepaket konnten 8 hoch besetzte Selenomethioninlokalisationen bestimmt werden (siehe Tabelle A4

im Anhang). Ein Lösungsmittelanteil von ca. 40 %, wie er häufig in Kristallen vorkommt, führt jedoch zu einem Molekulargewicht von 48,7 kDa, was dafür spricht, dass es sich bei dem kristallisierten YjiE<sup>94-303</sup> mit einem Monomergewicht von 24,2 kDa um ein Dimer handelt (siehe Tabelle A3 im Anhang). Durch *solvent flattening* und anschließende Dichtemodifikation mit dem Programm sharp konnten initiale Strukturfaktoren berechnet werden. Die Erstellung eines Strukturmodells von YjiE aus der berechneten Elektronendichtekarte kann nun erfolgen. Der Zeitaufwand wird jedoch relativ hoch sein, da das Lösen der Struktur in diesem Fall nicht trivial ist (persönliche Mitteilung von Prof. Michael Groll).

Da bisher nur wenige Kristallstrukturen von LTTRs gelöst werden konnten, wurde ebenfalls versucht YjiE in voller Länge zu kristallisieren. Erste Kristallisations-Screens zeigten für das Volllängenprotein eine Tendenz zur Kristallbildung in Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer. Anschließende Fein-Screens, in denen die Salzkonzentration und der pH-Wert variiert wurden, ergaben schöne, große Kristalle bei 0,8 M Natrium-Kalium-Phosphat bei pH 5,0 (siehe Abbildung 46C), die am Synchrotron zu einer Elektronenbeugung mit einer Auflösung von ca. 2,9 Å führten. Zur Lösung des Phasenproblems wurde ebenfalls versucht Volllängen YjiE mit Selenomethionin anstelle von Methionin zu kristallisieren. Es wurden mehrere Kristallisations-Screens durchgeführt, die jedoch keine Kristalle ergaben, die für Elektronenbeugungs-Experimente eingesetzt werden konnten. Abbildung 46D zeigt ungeordnete Kristalle von YjiE mit Selenomethionin in 0,1 M Tris, 3 % Isopropanol pH 8,0, die nicht den Anforderungen entsprachen.

Die aus den Röntgenstrukturanalysen von YjiE<sup>94-303</sup> und YjiE erhaltenen Daten sind in Tabelle A5 im Anhang zusammengefasst. Nach der Erstellung eines Strukturmodells von YjiE<sup>94-303</sup> kann die Struktur von YjiE in voller Länge voraussichtlich durch molekularen Ersatz (*molecular replacement*, MR) gelöst werden.



**Abbildung 46:** Bilder der in verschiedenen Kristallisations-Screens entstandenen Kristalle. (A) Kristalle von YjiE<sup>94-303</sup> bei 20°C. (B) Kristalle von YjiE<sup>94-303</sup> mit Selenomethionin anstelle von Methionin bei 4°C. (C) Kristalle von YjiE bei 20°C. (D) Kristalle von YjiE mit Selenomethionin anstelle von Methionin bei 20°C.

## 4 Zusammenfassung der Charakterisierung von YjiE

HOCl ist eine extrem reaktive und bakterizide reaktive Sauerstoffspezies (*reaktive oxygen species*, ROS), die als Desinfektionsmittel eingesetzt wird und auch von Neutrophilen und Darmepithelzellen produziert wird, um Bakterien abzutöten (Winterbourn et al., 2006, Ha et al., 2005). Trotz der physiologischen Bedeutung von HOCl für die Abtötung von Bakterien, wurden bakterielle Schutzmechanismen gegen HOCl verursachte Schäden bisher kaum untersucht. Antworten auf oxidativen Stress werden in Prokaryoten und Eukaryoten normalerweise durch Transkriptionsfaktoren, die für die Stress-verursachende ROS spezifisch sind, reguliert. Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Antworten auf O<sub>2</sub><sup>-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress wurde bisher noch kein Transkriptionsfaktor gefunden, der Bakterien vor Schäden durch HOCl schützt. Das Gen *yjiE* wurde von Dr. Jeannette Winter durch *Screening* einer Plasmid-Bibliothek von *E. coli* identifiziert. Es vermittelt HOCl-Resistenz bei Überexpression. In dieser Arbeit wurde der putative LysR-Typ-Transkriptionsfaktor (LTTR) YjiE *in vivo* und *in vitro* charakterisiert.

Die Analyse von C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen zeigte, dass die Deletion von *yjiE* zu einer verminderten Lebensfähigkeit unter HOCl-Stress führt, woraus geschlossen werden kann, dass YjiE eine bedeutende Funktion für die HOCl-Resistenz der Zellen besitzt.

CD-Messungen zeigten, dass gereinigtes YjiE gefaltet und relativ stabil ist. Dass der Transkriptionsfaktor an DNA bindet konnte durch *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA), Fluoreszenzpolarisations-Messungen und analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden. Die Affinität der Bindung von YjiE an *yjiE*-Promotor DNA, die verwendet wurde, weil LTTRs meist Autoregulation zeigen, war jedoch relativ gering. Außerdem konnte durch Verwendung von beliebigen weiteren DNA-Fragmenten gezeigt werden, dass YjiE unspezifisch an DNA bindet. Vermutlich muss YjiE erst durch einen sogenannten *co-inducer*, bei dem es sich in der Regel um ein kleines Molekül handelt, aktiviert werden, damit eine spezifische Bindung mit hoher Affinität möglich wird. Versuche YjiE *in vitro* durch oxidierende oder oxidierte Substanzen oder auch Zellysate zu aktivieren und den *co-inducer* zu identifizieren sowie *in vitro* Transkriptions-Assays zum Nachweis der Transkriptionsaktivität von YjiE waren bisher nicht erfolgreich. Möglicherweise zeigt YjiE im Gegensatz zu anderen LTTRs aber auch keine Autoregulation.

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde beobachtet, dass YjiE sehr ungewöhnliche, größtenteils hexagonale Ringstrukturen bildet. Durch Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um Dodekamere handelt. Dies steht im Kontrast zu anderen LTTRs, die in der Regel Dimere oder Tetramere bilden. Um festzustellen, ob diese 12mere auch *in vivo* von Bedeutung sind, wurden Lysate von Zellen, die verschiedene Mengen an YjiE produzierten, mit Hilfe von analytischer Gelfiltration untersucht. Anschließendes Immunoblotting von Fraktionen, die verschiedene Oligomere repräsentierten, zeigte, dass *in vivo* Monomere, Dimere, Hexamere und Dodekamere vorkommen. Dabei stellen Hexamere in Wildtyp-Zellen die häufigste Spezies dar. Mit zunehmender Überexpression verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der höheren Oligomere. Höchstwahrscheinlich stellen kleinere Oligomere die aktive Spezies und die Dodekamere eine Art Lagerform von YjiE dar, die bei hohen YjiE-Konzentrationen gebildet wird.

Die Transkriptionsfaktoren für oxidativen Stress, OxyR und SoxR, werden jeweils spezifisch durch die ROS aktiviert gegen die sie eine Resistenz vermitteln. Deshalb wurde eine potentielle Aktivierung von YjiE durch HOCl analysiert. CD-Messungen und Sedimentationsgleichgewichtultrazentrifugation zeigten, dass die Oxidation mit einem geringen molaren Überschuss an HOCl nicht zu einer Veränderung der Struktur, Stabilität oder Oligomerisierung von YjiE führt. Mit Hilfe von Ellman-Assays, ESI-MS-Analysen und Thioltrapping-Assays konnte jedoch beobachtet werden, dass Cysteinreste modifiziert werden. EMSAs zeigten aber, dass YjiE unter diesen Bedingungen seine DNA-Bindfähigkeit verliert, woraus geschlossen werden kann, dass YjiE *in vitro* nicht durch HOCl aktiviert wird. Daraufhin wurde YjiE aus HOCl-gestressten Zellen (YjiE-HOCl) gereinigt. EMSAs und Fluoreszenzanisotropie-Messungen ergaben, dass YjiE-HOCl im Vergleich zu YjiE aus nicht-gestressten Zellen eine höhere Affinität zu DNA besitzt und zu einer stärkeren Änderung des Anisotropiesignals führt. Das deutet darauf hin, dass der entstehende DNA-Proteinkomplex anders geformt oder anders zusammengesetzt ist. Offenbar kann YjiE also in einer intakten zellulären Umgebung durch HOCl-Behandlung aktiviert werden. Sedimentationsgeschwindigkeitultrazentrifugation und Ellmans-Assays mit YjiE-HOCl zeigten jedoch keine Veränderung des Molekulargewichts und der Cysteinmodifikationen im Vergleich zu YjiE aus nicht-gestressten Zellen. Eine ESI-MS-Analyse ergab, dass YjiE-HOCl auch oxidierte Methioninreste besitzt. Yan Le konnte mit Hilfe von Mutanten zeigen, dass die Oxidation der konservierten Methioninreste Met<sup>206</sup> und Met<sup>230</sup> offenbar eine zentrale Bedeutung für die Aktivierung von YjiE in HOCl-behandelten *E. coli*-Zellen besitzt.

Um die Funktion von YjiE unter HOCl-Stress zu untersuchen, wurden 2D-PAGE-Experimente und Genexpressionsanalysen mit C600- und C600  $\Delta yjiE$ -Zellen mit und ohne HOCl-Stress durchgeführt. Die 2D-Gele zeigten, dass in  $\Delta yjiE$ -Zellen manche Proteine bereits bei niedrigeren HOCl-Konzentrationen oxidativ modifiziert werden, woraus geschlossen werden kann, dass YjiE zelluläre Proteine vor oxidativen Schäden schützt. Die Genexpressionsanalysen ergaben, dass YjiE 48 Gene reguliert von denen im Gegensatz zu OxyR und SoxR keines augenscheinlich in den Abbau von ROS und nur eines in die Reduktion von oxidierten Metaboliten involviert zu sein scheint. Die Funktion von YjiE scheint eher darin zu liegen die intrazelluläre ROS-Konzentration durch Repression der Eisenaufnahme und -freisetzung zu verringern. Dadurch schützt YjiE die zellulären Makromoleküle vor oxidativen Schäden und erhöht somit die Lebensfähigkeit von *E. coli*-Zellen unter HOCl-Stress.

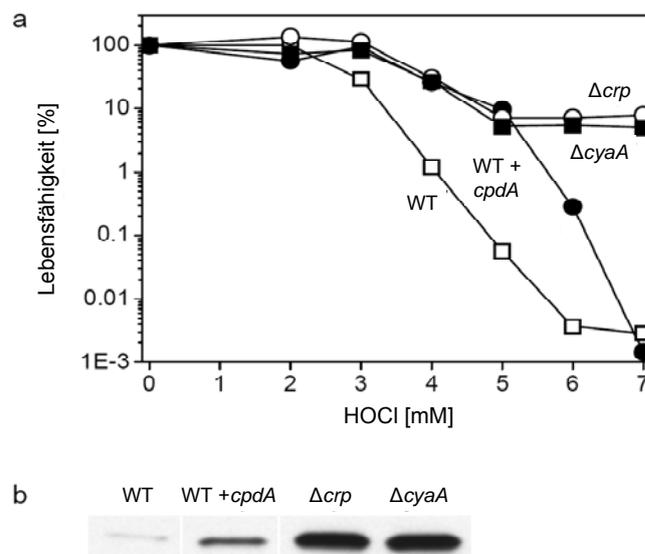
YjiE wurde kürzlich als Zelldichte-abhängiger Motilitätsrepressor (QseD) in *E. coli* K-12 beschrieben wurde (Habdas et al., 2010). Deswegen wurden Motilitäts-Assays mit Wildtyp- und  $\Delta yjiE$ -Zellen in den Stämmen C600 und MG1655 durchgeführt und gezeigt, dass YjiE keine Funktion in der Regulation der Motilität von *E. coli*-Zellen besitzt.

Ein verkürztes Konstrukt von YjiE bei dem die DNA-Bindedomäne deletiert wurde (YjiE<sup>94-303</sup>) konnte kristallisiert werden und führte zur Röntgenbeugung mit einer Auflösung von ca. 2 Å. Mit Hilfe von Kristallen mit Selenomethionin anstelle von Methionin konnten in sogenannten MAD-Experimenten initiale Strukturfaktoren berechnet werden mit deren Hilfe nun unter großem Aufwand die Elektronendichtekarte interpretiert werden kann. Es konnte auch Elektronenbeugung an Kristallen von Vollängen-YjiE durchgeführt werden. Allerdings war es nicht möglich Kristalle von ausreichender Qualität von Vollängen-YjiE mit Selenomethionin zu erhalten. Wenn jedoch die Struktur von YjiE<sup>94-303</sup> gelöst ist, kann die Struktur von YjiE höchstwahrscheinlich mit Hilfe von *molecular replacement* ebenfalls geklärt werden.

## 5 Zusammenspiel des zellulären cAMP-Levels, der $\sigma^S$ -Aktivität und der Resistenz gegen oxidativen Stress in *Escherichia coli*

Wie bereits unter 1.7 beschrieben wurde ein *Screen* mit einer Plasmid-Bibliothek des *E. coli*-Genoms durchgeführt um Gene zu identifizieren, die in  $\Delta rpoH$ -Zellen eine HOCl-Resistenz vermitteln. Auf diesem Wege wurde auch das Gen *cpdA* identifiziert, das in  $\Delta rpoH$ -Zellen eine ungefähr 700-fach erhöhte Lebensfähigkeit unter HOCl-Stress im Vergleich zum Kontrollstamm bewirkte. Bei CpdA handelt es sich um eine Phosphodiesterase, die cAMP hydrolysiert. Neben CpdA wird die zelluläre cAMP-Konzentration auch durch die Adenylatcyclase CyaA, die cAMP synthetisiert, reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CpdA zu einer 10-fachen Verringerung des cAMP-Levels führt.

Die verminderte Wachstumsfähigkeit von *cpdA*-überexprimierenden Zellen auf Glycerin oder Laktose als einziger Kohlenstoffquelle deutete darauf hin, dass CRP durch das reduzierte cAMP-Level zum Teil inaktiviert wird. Bei CRP (*cAMP receptor protein*) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch cAMP aktiviert wird und zum Beispiel Enzyme reguliert, die das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen ermöglichen. *E. coli*-Zellen, die kein *crp* oder kein *cyaA* besitzen, konnten auf diesen beiden Kohlenstoffquellen überhaupt nicht wachsen.  $\Delta crp$ -Zellen besitzen sehr hohe cAMP-Level, während  $\Delta cyaA$ -Zellen kein cAMP synthetisieren können. Beide Stämme zeigten jedoch eine fast 10.000-fach erhöhte Lebensfähigkeit unter HOCl-Stress und eine über 1.000-fach erhöhte Lebensfähigkeit unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress. Die Tatsache, dass die Lebensfähigkeit des *cpdA*-überexprimierenden Stammes (WT +*cpdA*) unter HOCl- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress zwar höher war als bei Wildtyp-Zellen, aber die Lebensfähigkeit von  $\Delta crp$  und  $\Delta cpdA$ -Zellen nicht erreichen konnte, zeigt, dass die geringe Menge an cAMP in diesem Stamm für eine geringe Aktivität von CRP ausreicht (siehe Abbildung 47a). Es wurde vorgeschlagen, dass CRP die *rpoS*-Expression negativ reguliert oder reprimiert (Hengge-Aronis, 2002). *rpoS* kodiert für den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^S$ , der die generelle Stressantwort in *E. coli* reguliert. Ein Vergleich der  $\sigma^S$ -Konzentrationen (siehe Abbildung 47b) zeigte, dass das  $\sigma^S$ -Level in WT +*cpdA*-Zellen dreimal höher ist als in Wildtyp (WT)-Zellen. In  $\Delta crp$  und  $\Delta cpdA$ -Zellen war das  $\sigma^S$ -Level sogar 10-fach erhöht und dem  $\sigma^S$ -Level in der stationären Phase sehr ähnlich. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Inaktivierung von CRP zu einer Aufhebung der Repression der Transkription und somit zu einer Akkumulation von RpoS während des exponentiellen Wachstums führt.



**Abbildung 47:** Stämme mit einem nicht-funktionellen cAMP-CRP-System sind resistent gegenüber oxidativem Stress. (a) *E. coli* MC4100 (WT), WT +*cpdA*,  $\Delta crp$ - und  $\Delta cyaA$ -Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C kultiviert und anschließend serielle Verdünnungen der Kulturen auf Platten mit den angegebenen HOCl-Mengen aufgebracht, um die Lebensfähigkeit zu analysieren. Die Lebensfähigkeit von Zellen auf Platten ohne HOCl wurde auf 100 % normiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (b) Die  $\sigma^S$ -Level der *E. coli*-Stämme, die wie in (a) in LB-Medium bei 37°C kultiviert wurden, wurden mit Hilfe eines WesternBlots mit Antikörpern gegen  $\sigma^S$  analysiert. (Abbildung aus Barth et al. (2009) adaptiert)

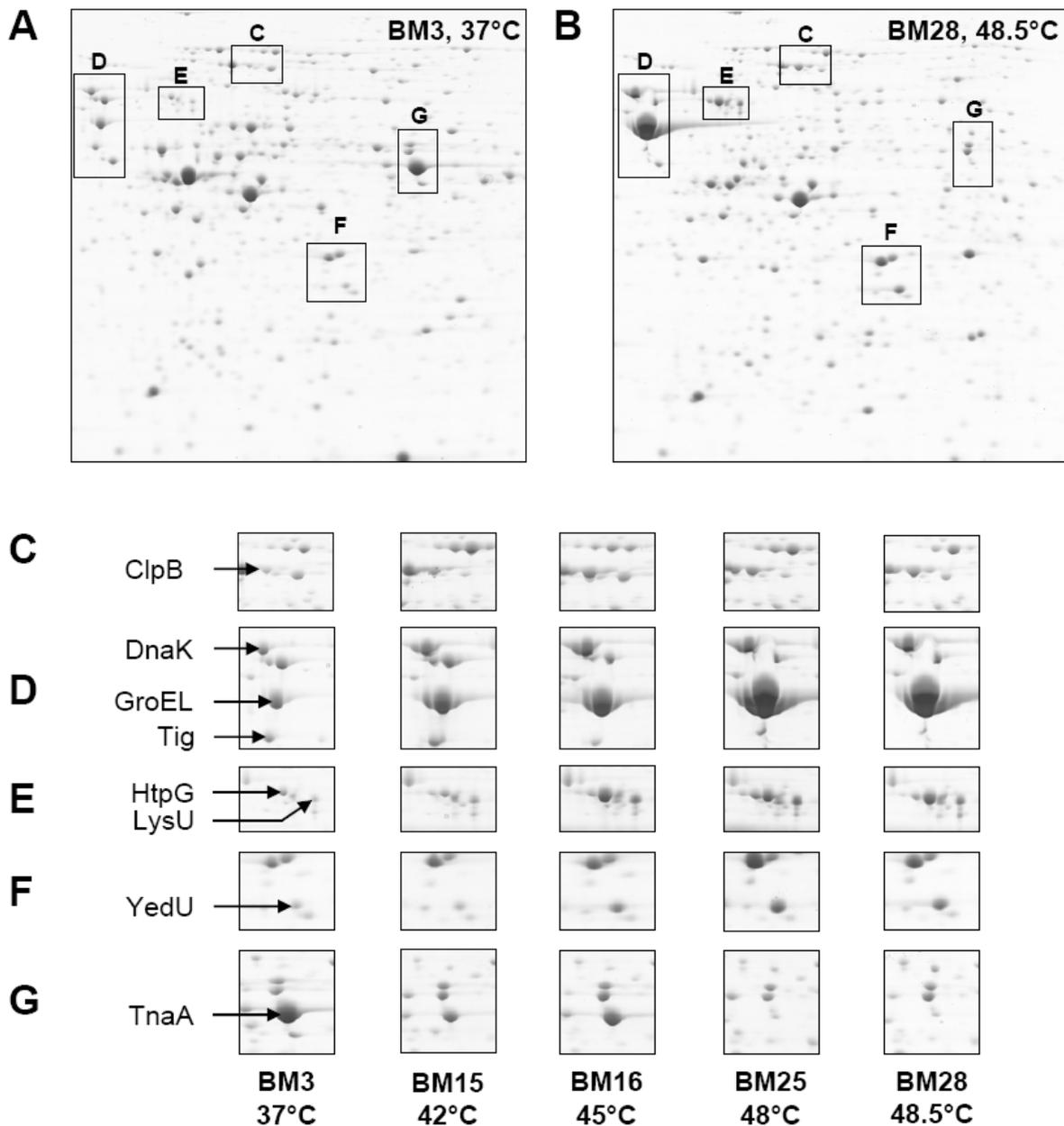
Es wurde beobachtet, dass  $\Delta rpoS$ -Zellen sehr sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind. Dieser Effekt konnte durch Expression von *rpoS*, jedoch nicht durch die Überexpression von *cpdA* kompensiert werden.  $\Delta crp$   $\Delta rpoS$ -Zellen hingegen waren genauso sensitiv gegenüber oxidativem Stress wie  $\Delta rpoS$ -Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass einzig die durch CRP vermittelte Hochregulierung von  $\sigma^S$  und die resultierende Hochregulierung der  $\sigma^S$ -abhängigen Genexpression für die beobachtete Resistenz gegen oxidativen Stress verantwortlich sind. Es stellte sich nun die Frage, wie  $\sigma^S$  eine Resistenz gegen zwei so verschiedene ROS vermitteln kann. Da  $\sigma^S$  normalerweise in der stationären Phase exprimiert wird und Veränderungen der Zelloberfläche und -form in dieser stressresistenten Phase typisch sind, wurde die Zellmorphologie der Stämme mittels Elektronenmikroskopie verglichen. Anhand von Dünnschnitten der exponentiell wachsenden Stämme wurden die Dicke der Zellwand und das Volumen des Periplasmas abgeschätzt. Der Gesamtanteil am totalen Zellvolumen war bei WT- und bei  $\Delta rpoS$ - und  $\Delta crp$   $\Delta rpoS$ -Zellen sehr ähnlich. Bei Zellen mit einer höheren Resistenz gegen oxidativen Stress besaßen die Zellwand und das Periplasma hingegen einen größeren Anteil am Gesamtvolumen. Im Fall von WT +*cpdA*-Zellen war der Anteil doppelt so hoch und bei  $\Delta crp$  und  $\Delta cpdA$ -Zellen war der Anteil sogar so hoch wie bei WT-Zellen in der stationären Phase. Das deutet darauf hin, dass eine dickere Zellwand eine

effizientere physikalische Barriere gegen ROS darstellen könnte und diese effektiv davon abhält in die Zellen einzudringen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zusätzlich untersucht wie gut die verschiedenen Stämme von außen zugegebenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abbauen können. Es zeigte sich, dass  $\Delta crp$ -Zellen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schneller und effektiver abbauen können als WT-,  $\Delta rpoS$ - und  $\Delta crp \Delta rpoS$ -Zellen. Diese Fähigkeit wird offenbar größtenteils durch den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abbau durch Katalase (KatE) vermittelt, da  $\Delta crp \Delta katE$ -Zellen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deutlich schlechter abbauen konnten. Eine Überexpression von  $\sigma^S$  erhöhte die Abbaufähigkeit, führte jedoch selbst bei maximaler Induktion nicht zu einer ebenso hohen Abbauproduktivität wie in  $\Delta crp$ -Zellen, da entweder nicht das gesamte exprimierte RpoS aktiv ist oder CRP weitere Faktoren negativ reguliert, die die Resistenz gegen oxidativen Stress RpoS-unabhängig regulieren. Die Resistenz von  $\Delta crp$ -Zellen scheint also nicht, oder zumindest nicht primär, durch die dickere Zellwand verursacht zu werden, sondern durch eine erhöhte ROS-Abbaufähigkeit. Um  $\sigma^S$ -regulierte Gene, die die Resistenz gegen oxidativen Stress vermitteln, zu identifizieren, wurden einige der ca. 150  $\sigma^S$  regulierten Gene in WT- und  $\Delta crp$ -Zellen deletiert. Die Entfernung von *bolA*, das Einfluss auf die Zellmorphologie hat, oder *osmC*, das unter Salzstress wichtig ist und *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abbauen kann (Lesniak et al., 2003; Weber et al., 2006), hatte sowohl unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress, als auch unter HOCl-Stress, keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von WT- oder  $\Delta crp$ -Zellen. KatE hingegen schützte  $\Delta crp$ -, aber nicht WT-Zellen, unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress. Die Deletion der Exonuclease III XthA führte sowohl in WT-, als auch in  $\Delta crp$ -Zellen zu einer geringeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenz. Eine Entfernung des *dps*-Gens hatte hingegen sowohl in WT-, als auch in  $\Delta crp$ -Zellen einen signifikanten Einfluss unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und HOCl-Stress. Da  $\Delta crp \Delta dps$ -Zellen jedoch immer noch sehr viel resistenter gegen HOCl waren als WT-Zellen, muss es weitere Faktoren geben, die *E. coli* gegen HOCl schützen. Unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress wird das in Dps gebundene Eisen oxidiert, wodurch die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen verhindert wird. Außerdem bildet Dps Kristalle mit DNA und schützt diese dadurch. Wie Dps gegen HOCl-Stress schützt ist unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass  $\Delta dps$ - und  $\Delta crp \Delta dps$ -Zellen unter HOCl-Einfluss wesentlich stärker mutieren, was auf eine DNA-schützende Funktion von Dps unter HOCl-Stress hindeutet. Diese Ergebnisse zeigen, dass hauptsächlich *katE* und *dps* für die erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress in  $\Delta crp$ -Zellen und generell in Zellen mit einem erhöhten *rpoS*-Level verantwortlich sind. Details bezüglich aller Methoden und Ergebnisse können in Barth et al., (2009) nachgelesen werden.

## 6 Anpassung von *Escherichia coli* an das Wachstum bei hohen Temperaturen

Unphysiologische Bedingungen induzieren Überlebensmechanismen wie beispielsweise veränderte Transkriptions- oder Expressionsmuster, die dazu führen, dass Organismen mit diesem Stress besser zurechtkommen und sich anpassen. Aufgrund von limitierender Membranpermeabilität und der Proteinstabilität können *E. coli* Laborstämme bei Temperaturen über 44 – 46°C nicht mehr wachsen. Die Synthese von Hitzeschock-Proteinen (Hsps, *heat shock proteins*) aufgrund einer Erhöhung der Kultivierungstemperatur führt zu einer Thermotoleranz während dieser Stresssituation (Guisbert et al., 2008). Zu den Hsps gehören Chaperone, die die Faltung von neu-synthetisierten Proteinen unterstützen und stress-induzierte Entfaltung sowie die irreversible Aggregation von Proteinen verhindern, und Proteasen, die irreparabel geschädigte Proteine abbauen. Um den Prozess der evolutionären Anpassung von Bakterien an hohe Temperaturen zu untersuchen, wurde der *E. coli*-Stamm MG1655 verwendet, der in LB-Medium eine maximale Wachstumstemperatur von 45,5°C besitzt. Die Evolution wurde von Birgit Rudolph durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien entweder bei 37°C belassen und kontinuierlich kultiviert (BM3) oder schrittweise bei höheren Temperaturen inkubiert (42°C (BM15), 45°C (BM16), 48°C (BM25), 48,5°C (BM28)). Die maximale Wachstumstemperatur von 48,5°C wurde durch eine sukzessive Erhöhung der Temperatur über 620 Generationen erreicht. Eine kontinuierliche Weiterkultivierung für ca. 600 Generationen bei 48,5°C führte zu keiner weiteren Erhöhung der Thermoresistenz. Die maximale Wachstumstemperatur des Stammes BM3, der für fast 3000 Generationen bei 37°C inkubiert wurde (BM3), lag immer noch bei 45,5°C. Es zeigte sich, dass die Wachstumsrate von BM15 bei 37°C etwas höher war als die von BM3, wohingegen BM16, BM25 und BM28 bei dieser Temperatur langsamer wuchsen. Das deutet auf stress-induzierte Mutationen hin und lässt vermuten, dass die Anpassung an höhere Temperaturen auf Kosten der Generationszeit geschieht. Da alle Stämme bei ihrer jeweiligen Wachstumstemperatur eine ähnliche Morphologie besaßen, scheint die Hitzeanpassung unabhängig vom  $\sigma^S$ -Level zu sein. Die Lebensfähigkeit von BM3 und BM28 unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress war vergleichbar, was vermuten lässt, dass BM28 ausschließlich an Stress durch extreme Temperaturen angepasst ist. Veränderungen im Proteom der hitzeresistenten Stämme wurden mit Hilfe von 2D-Gelen analysiert (siehe Abbildung 48). Der größte Unterschied zwischen BM3 und den Hitze-adaptierten Stämmen bestand in einer erhöhten zellulären Konzentration von Hsps (ClpB,

DnaK, GroEL, GroES, HtpG, YedU) und LysU. Die Menge von GroEL/GroES (= GroE) in BM25 und BM28 war 16-mal höher als in WT-Zellen und machte ungefähr 20 % des Gesamtzellproteins aus. GroE ist ein ATP-abhängiges Chaperon, das die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt (Grallert und Buchner, 2001). Das deutet darauf hin, dass hohe GroE-Level während der Hitzeanpassung benötigt werden, um eine erhöhte Proteinfaltungskapazität für thermolabile Proteine zu erreichen.



**Abbildung 48:** Hohe Hsp-Mengen in Hitze-adaptierten *E. coli*-Zellen. Über-Nacht-Kulturen von BM3, BM15, BM16, BM25 und BM28 bei ihrer spezifischen Wachstumstemperatur wurden auf 2D-Gele analysiert. (A) und (B) 2D-Gele von BM3 und BM28 in denen die Regionen, die Hsps zeigen, jeweils mit Boxen markiert sind. Die aufgetrennten Proteine weisen einen isoelektrischen Punkt zwischen 3 und 10 (von links nach rechts) und ein Molekulargewicht zwischen 150 und 10 kDa (von oben nach unten) auf. (C) - (F) ausgewählte Regionen auf 2D-Gele, die die Veränderungen in den *Spot*-Intensitäten von Hsps (mit einem Pfeil markiert) zeigen. (Abbildung aus Rudolph et al. (2010) übernommen)

Durch Sequenzierung von *rpoH*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *htpG* und *yedU* und ihrer Promotorregionen konnte ausgeschlossen werden, dass eine Mutation die veränderte Expression der Hitzeschock-Gene verursacht. Erstaunlicherweise waren die Hsp-Mengen nur bei Hitze erhöht und entsprachen bei 37°C den Mengen in WT-Zellen. Die einzige Ausnahme war die GroE-Konzentration in BM28, die auch bei 37°C noch sehr hoch war. Da BM28-Zellen, deren Kultivierungstemperatur von 37°C auf 49°C oder von 48,5°C auf 49°C erhöht wurde, die gleiche Lebensfähigkeit besaßen, scheint die hohe GroE-Konzentration für die Thermoresistenz verantwortlich zu sein. Aus der Tatsache, dass plasmid-kodiert GroE-überexprimierende BM3-Zellen (BM3 pBB541) eine geringere maximale Wachstumstemperatur und Lebensfähigkeit bei 49°C als BM28 aufwiesen, wurde geschlossen, dass weitere Faktoren für die hohe Hitzeresistenz von BM28-Zellen benötigt werden. Die maximale Wachstumstemperatur von BM3 pBB541 lag jedoch mit 47,5°C höher als bei BM3, was darauf schließen lässt, dass GroE den *E. coli*-Zellen eine signifikante Thermotoleranz verleiht. Da weder GroEL noch GroES posttranslationale Modifikationen aufwiesen und eine spezifische Induktion von *groELS*, sowie eine Genduplikation als Gründe für das hohe GroE-Level ausgeschlossen werden konnten, wurde untersucht, ob die erhöhte LysU-Konzentration dafür verantwortlich sein könnte. LysU ist hitze-induzierbar und synthetisiert einige Adenyldinukleotide wie beispielsweise Ap<sub>4</sub>A (Ap<sub>4</sub>A), die unter Hitzeschock-Bedingungen akkumulieren und an GroEL und andere Hsps binden (Tanner et al., 2006). Die LysU-Konzentration in BM28 war allerdings nur im Fall einer Kultivierung bei 48,5°C erhöht und nicht bei 37°C. Trypsinverdauung von Zellextrakten von BM28-Zellen, die bei 37°C und 48,5°C kultiviert wurden, zeigten keinen Unterschied in der Stabilität von GroEL/GroES. Daher kann ein stabilisierender Effekt von LysU oder Ap<sub>4</sub>A ausgeschlossen werden. Eine Deletion von *lysU* in BM3 und BM28 zeigte, dass in diesen beiden Stämmen die Expression von Hsps unter Hitzeschock-Bedingungen unabhängig von LysU hochreguliert wird. Permanent hohe GroE-Mengen werden jedoch durch LysU vermittelt, da BM28  $\Delta$ *lysU*-Zellen keine erhöhten GroE-Mengen und eine stark verringerte Lebensfähigkeit bei 49°C aufweisen, die mit der Lebensfähigkeit von BM3 bei dieser Temperatur vergleichbar ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein von LysU und eine permanent erhöhte GroE-Konzentration für die Thermoresistenz von BM28-Zellen essentiell sind. Vermutlich können durch die hohe GroE-Konzentration die negativen Effekte von Mutationen abgeschwächt und thermolabile Proteine auch bei hohen Temperaturen stabilisiert und somit aktiv gehalten werden. Die Methoden und Ergebnisse sind in Rudolph et al. (2010) detailliert beschrieben.

## 7 Abkürzungen

2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ABS	Aktivierungsbindestelle ( <i>activation binding site</i> )
AF488	AlexaFluor488
Amp	Ampicillin
AMS	4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bp	Basenpaare
Cam	Chloramphenicol
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CD	Circulardichroismus
CRP	cAMP-Rezeptorprotein ( <i>cAMP receptor protein</i> )
Da	Dalton (1 Da entspricht 1 g/mol)
DBD	DNA-bindende Domäne
deg	<i>degrees</i> = Grad
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ESI	Elektrosprayionisation
g	Gramm
GSSG	oxidiertes Gluthation
h	<i>hours</i> = Stunden
HOCl	Hypochlorige Säure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HTH	Helix-turn-Helix
IAM	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
k	Kilo
Kan	Kanamycin
l	Liter
LTTR	LysR-Typ-Transkriptionsregulator
Maldi	<u>M</u> atrix-unterstützte <u>L</u> aserdesorption/ <u>I</u> onisation
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NES	Signalsequenz für den Export aus dem Nukleus ( <i>nuclear export sequence</i> )
NTB	2-Nitrothiobenzoat-Anion
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
RBS	regulatorische Bindestelle ( <i>regulatory binding site</i> )
RD	regulatorische Domäne
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAP	RNA-Polymerase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium lauryl sulfate</i> )
s	Sedimentationskoeffizient [S]
S	Svedberg
sec	Sekunden
TCA	Trichloracetat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracetat (Trifluoressigsäure)
ToF	<i>time of flight</i>
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
X-Gal	2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 8 Literaturverzeichnis

- Akakura, R und Winans, SC (2002a) Constitutive mutations of the OccR regulatory protein affect DNA bending in response to metabolites released from plant tumors. *J.Biol.Chem.* 277, 5866-5874.
- Akakura, R und Winans, SC (2002b) Mutations in the occQ operator that decrease OccR-induced DNA bending do not cause constitutive promoter activity. *J.Biol.Chem.* 277, 15773-15780.
- Alberts B., Johnson A., Walter P., Lewis J., Raff M., Roberts K., Orme N. (2007) *Molecular Biology of the Cell. 5. überarbeitete Auflage*, Taylor & Francis, London.
- Almagor, M, Kahane, I, Yatziv, S (1984) Role of superoxide anion in host cell injury induced by mycoplasma pneumoniae infection. A study in normal and trisomy 21 cells. *J.Clin.Invest* 73, 842-847.
- Amabile-Cuevas, CF und Demple, B (1991) Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19, 4479-4484.
- Aravind, L, Anantharaman, V, Balaji, S, Babu, MM, Iyer, LM (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol.Rev.* 29, 231-262.
- Aslund, F, Zheng, M, Beckwith, J, Storz, G (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 6161-6165.
- Azam, TA und Ishihama, A (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J.Biol.Chem.* 274, 33105-33113.
- Bae, JB, Park, JH, Hahn, MY, Kim, MS, Roe, JH (2004) Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in Streptomyces coelicolor: zinc release and disulfide bond formation. *J.Mol.Biol.* 335, 425-435.
- Balcewich, MD, Reeve, TM, Orlikow, EA, Donald, LJ, Vocadlo, DJ, Mark, BL (2010) Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible ampC beta-lactamase. *J.Mol.Biol.* 400, 998-1010.
- Barker, MM, Gaal, T, Gourse, RL (2001a) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J.Mol.Biol.* 305, 689-702.
- Barker, MM, Gaal, T, Josaitis, CA, Gourse, RL (2001b) Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J.Mol.Biol.* 305, 673-688.

- Barth, E, Gora, KV, Gebendorfer, KM, Settele, F, Jakob, U, Winter, J (2009) Interplay of cellular cAMP levels,  $\sigma^S$  activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology* 155, 1680-1689.
- Belitsky, BR, Janssen, PJ, Sonenshein, AL (1995) Sites required for GltC-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase expression. *J.Bacteriol.* 177, 5686-5695.
- Blanchard, JL, Wholey, WY, Conlon, EM, Pomposiello, PJ (2007) Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS.One.* 2, e1186-.
- Blazey, DL und Burns, RO (1980) Gene *ilvY* of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* 142, 1015-1018.
- Bohannon, DE und Sonenshein, AL (1989) Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 171, 4718-4727.
- Brookes, E, Cao, W, Demeler, B (2010) A two-dimensional spectrum analysis for sedimentation velocity experiments of mixtures with heterogeneity in molecular weight and shape. *Eur.Biophys.J.* 39, 405-414.
- Browning, DF und Busby, SJ (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat.Rev.Microbiol.* 2, 57-65.
- Browning, DF, Cole, JA, Busby, SJ (2000) Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli* *nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Mol.Microbiol.* 37, 1258-1269.
- Bsat, N, Herbig, A, Casillas-Martinez, L, Setlow, P, Helmann, JD (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol.Microbiol.* 29, 189-198.
- Budisa, N, Steipe, B, Demange, P, Eckerskorn, C, Kellermann, J, Huber, R (1995) High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 230, 788-796.
- Burgess, RR (1969) Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J.Biol.Chem.* 244, 6168-6176.
- Byrne, GA, Russell, DA, Chen, X, Meijer, WG (2007) Transcriptional regulation of the *virR* operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *J.Bacteriol.* 189, 5082-5089.
- Cao, H, Krishnan, G, Goumnerov, B, Tsongalis, J, Tompkins, R, Rahme, LG (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 14613-14618.
- Carmel-Harel, O und Storz, G (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu.Rev.Microbiol.* 54, 439-461.

- Celis, RT (1999) Repression and activation of arginine transport genes in *Escherichia coli* K 12 by the ArgP protein. *J.Mol.Biol.* 294, 1087-1095.
- Chang, M und Crawford, IP (1990) The roles of indoleglycerol phosphate and the TrpI protein in the expression of *trpBA* from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 18, 979-988.
- Chatterji, D und Ojha, AK (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr.Opin.Microbiol.* 4, 160-165.
- Chen, PR, Bae, T, Williams, WA, Duguid, EM, Rice, PA, Schneewind, O, He, C (2006) An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat.Chem.Biol.* 2, 591-595.
- Chen, PR, Nishida, S, Poor, CB, Cheng, A, Bae, T, Kuechenmeister, L, Dunman, PM, Missiakas, D, He, C (2009) A new oxidative sensing and regulation pathway mediated by the MgrA homologue SarZ in *Staphylococcus aureus*. *Mol.Microbiol.* 71, 198-211.
- Cherepanov, PP und Wackernagel, W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Choi, H, Kim, S, Mukhopadhyay, P, Cho, S, Woo, J, Storz, G, Ryu, SE (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103-113.
- Ciorba, MA, Heinemann, SH, Weissbach, H, Brot, N, Hoshi, T (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 9932-9937.
- Clark, T, Haddad, S, Neidle, E, Momany, C (2004) Crystallization of the effector-binding domains of BenM and CatM, LysR-type transcriptional regulators from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60, 105-108.
- Cox, J und Mann, M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat.Biotechnol.* 26, 1367-1372.
- Craven, SH, Ezezika, OC, Haddad, S, Hall, RA, Momany, C, Neidle, EL (2009) Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol.Microbiol.* 72, 881-894.
- Dale JW und Park SF (2004) *Molecular Genetics of Bacteria*. 4. Auflage, John Wiley & Sons, Hoboken.
- Darwin, AJ und Stewart, V (1996) The Nar modulon systems: nitrate and nitrite regulation of anaerobic gene expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Edited by Lynch AS and Lin ECC, R.G. Landes, Austin.
- Datsenko, KA und Wanner, BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 6640-6645.
- Davies, MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim.Biophys.Acta* 1703, 93-109.

- Deghmane, AE, Giorgini, D, Larribe, M, Alonso, JM, Taha, MK (2002) Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol.Microbiol.* *43*, 1555-1564.
- Deghmane, AE, Petit, S, Topilko, A, Pereira, Y, Giorgini, D, Larribe, M, Taha, MK (2000) Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *EMBO J.* *19*, 1068-1078.
- Delaunay, A, Pflieger, D, Barrault, MB, Vinh, J, Toledano, MB (2002) A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* *111*, 471-481.
- Demple, B (1996) Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon--a review. *Gene* *179*, 53-57.
- Duane, PG, Rubins, JB, Weisel, HR, Janoff, EN (1993) Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect.Immun.* *61*, 4392-4397.
- Dukan, S, Dadon, S, Smulski, DR, Belkin, S (1996) Hypochlorous acid activates the heat shock and soxRS systems of *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* *62*, 4003-4008.
- Dukan, S und Touati, D (1996) Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J.Bacteriol.* *178*, 6145-6150.
- Dunn, JJ und Bautz, EK (1969) DNA-dependent RNA polymerase from *E. coli*: studies on the role of sigma in chain initiation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *36*, 925-930.
- Erickson, JR, Joiner, ML, Guan, X, Kutschke, W, Yang, J, Oddis, CV, Bartlett, RK, Lowe, JS, O'Donnell, SE, Aykin-Burns, N et al. (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* *133*, 462-474.
- Eschenbach, DA, Davick, PR, Williams, BL, Klebanoff, SJ, Young-Smith, K, Critchlow, CM, Holmes, KK (1989) Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J.Clin.Microbiol.* *27*, 251-256.
- Etienne, F, Spector, D, Brot, N, Weissbach, H (2003) A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *300*, 378-382.
- Ezezika, OC, Haddad, S, Clark, TJ, Neidle, EL, Momany, C (2007) Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J.Mol.Biol.* *367*, 616-629.
- Fairbanks, G, Steck, TL, Wallach, DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* *10*, 2606-2617.
- Fernandes, AP und Holmgren, A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid.Redox.Signal.* *6*, 63-74.

- Flint, DH, Tuminello, JF, Emptage, MH (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J.Biol.Chem.* 268, 22369-22376.
- Fuangthong, M und Helmann, JD (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 6690-6695.
- Gaal, T, Bartlett, MS, Ross, W, Turnbough, CL, Jr., Gourse, RL (1997) Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* 278, 2092-2097.
- Gao, J, Yin, DH, Yao, Y, Sun, H, Qin, Z, Schoneich, C, Williams, TD, Squier, TC (1998) Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys.J.* 74, 1115-1134.
- Gerstel, U, Park, C, Romling, U (2003) Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. *Mol.Microbiol.* 49, 639-654.
- Gibson, KE und Silhavy, TJ (1999) The LysR homolog LrhA promotes RpoS degradation by modulating activity of the response regulator sprE. *J.Bacteriol.* 181, 563-571.
- Goethals, K, Van Montagu, M, Holsters, M (1992) Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 1646-1650.
- Goss, TJ (2008) The ArgP protein stimulates the *Klebsiella pneumoniae* gdhA promoter in a lysine-sensitive manner. *J.Bacteriol.* 190, 4351-4359.
- Graf, PC, Martinez-Yamout, M, VanHaerents, S, Lilie, H, Dyson, HJ, Jakob, U (2004) Activation of the redox-regulated chaperone Hsp33 by domain unfolding. *J.Biol.Chem.* 279, 20529-20538.
- Grallert, H und Buchner, J (2001) Review: a structural view of the GroE chaperone cycle. *J.Struct.Biol.* 135, 95-103.
- Graumann, J, Hubner, NC, Kim, JB, Ko, K, Moser, M, Kumar, C, Cox, J, Scholer, H, Mann, M (2008) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5,111 proteins. *Mol.Cell Proteomics.* 7, 672-683.
- Griffith, KL, Shah, IM, Wolf, RE, Jr. (2004) Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol.Microbiol.* 51, 1801-1816.
- Grossman, AD, Erickson, JW, Gross, CA (1984) The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 38, 383-390.
- Guisbert, E, Yura, T, Rhodius, VA, Gross, CA (2008) Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 72, 545-554.

- Gurmu, D, Lu, J, Johnson, KA, Nordlund, P, Holmgren, A, Erlandsen, H (2009) The crystal structure of the protein YhaK from *Escherichia coli* reveals a new subclass of redox sensitive enterobacterial bicupins. *Proteins* 74, 18-31.
- Ha, EM, Oh, CT, Bae, YS, Lee, WJ (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847-850.
- Habdas, BJ, Smart, J, Kaper, JB, Sperandio, V (2010) The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 192, 3699-3712.
- Hawkins, CL, Pattison, DI, Davies, MJ (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino.Acids* 25, 259-274.
- Hayes, DB und Stafford, WF (2010) SEDVIEW, real-time sedimentation analysis. *Macromol.Biosci.* 10, 731-735.
- Heil, G, Stauffer, LT, Stauffer, GV (2002) Glycine binds the transcriptional accessory protein GcvR to disrupt a GcvA/GcvR interaction and allow GcvA-mediated activation of the *Escherichia coli* gcvTHP operon. *Microbiology* 148, 2203-2214.
- Henikoff, S, Haughn, GW, Calvo, JM, Wallace, JC (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 6602-6606.
- Hengge-Aronis, R (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 66, 373-95, table.
- Henle, ES, Han, Z, Tang, N, Rai, P, Luo, Y, Linn, S (1999) Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J.Biol.Chem.* 274, 962-971.
- Hernandez-Lucas, I, Gallego-Hernandez, AL, Encarnacion, S, Fernandez-Mora, M, Martinez-Batallar, AG, Salgado, H, Oropeza, R, Calva, E (2008) The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J.Bacteriol.* 190, 1658-1670.
- Heroven, AK und Dersch, P (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene rovA, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* 62, 1469-1483.
- Hidalgo, E, Bollinger, JM, Jr., Bradley, TM, Walsh, CT, Demple, B (1995) Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J.Biol.Chem.* 270, 20908-20914.
- Hidalgo, E, Ding, H, Demple, B (1997) Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell* 88, 121-129.
- Hoenke, S, Schmid, M, Dimroth, P (1997) Sequence of a gene cluster from *Klebsiella pneumoniae* encoding malonate decarboxylase and expression of the enzyme in *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 246, 530-538.

- Hoffmann, JH, Linke, K, Graf, PC, Lilie, H, Jakob, U (2004) Identification of a redox-regulated chaperone network. *EMBO J.* 23, 160-168.
- Hryniewicz, MM und Kredich, NM (1994) Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* 176, 3673-3682.
- Huffman, JL und Brennan, RG (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 12, 98-106.
- Hughes, KT und Mathee, K (1998) The anti-sigma factors. *Annu.Rev.Microbiol.* 52, 231-286.
- Ilbert, M, Horst, J, Ahrens, S, Winter, J, Graf, PC, Lilie, H, Jakob, U (2007) The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 14, 556-563.
- Imlay, JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu.Rev.Microbiol.* 57, 395-418.
- Imlay, JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu.Rev.Biochem.* 77, 755-776.
- Imlay, JA, Chin, SM, Linn, S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640-642.
- Ishihama, A (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu.Rev.Microbiol.* 54, 499-518.
- Jakob, U, Eser, M, Bardwell, JC (2000) Redox switch of hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J.Biol.Chem.* 275, 38302-38310.
- Janes, BK, Rosario, CJ, Bender, RA (2003) Isolation of a negative control mutant of the nitrogen assimilation control protein, NAC, in *Klebsiella aerogenes*. *J.Bacteriol.* 185, 688-692.
- Jang, S und Imlay, JA (2007) Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J.Biol.Chem.* 282, 929-937.
- Jordi, BJ und Higgins, CF (2000) The downstream regulatory element of the proU operon of *Salmonella typhimurium* inhibits open complex formation by RNA polymerase at a distance. *J.Biol.Chem.* 275, 12123-12128.
- Jorgensen, C und Dandanell, G (1999) Isolation and characterization of mutations in the *Escherichia coli* regulatory protein XapR. *J.Bacteriol.* 181, 4397-4403.
- Jourdan, AD und Stauffer, GV (1998) Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression, and DNA binding. *J.Bacteriol.* 180, 4865-4871.
- Jourlin-Castelli, C, Mani, N, Nakano, MM, Sonenshein, AL (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J.Mol.Biol.* 295, 865-878.
- Kabsch, W (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J.Appl.Cryst.* 26, 795-800.

- Kehres, DG, Janakiraman, A, Slauch, JM, Maguire, ME (2002) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. *J.Bacteriol.* *184*, 3151-3158.
- Kiley, PJ und Storz, G (2004) Exploiting thiol modifications. *PLoS.Biol.* *2*, e400
- Kim, HJ, Jourlin-Castelli, C, Kim, SI, Sonenshein, AL (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* *ccpC* gene by *ccpA* and *ccpC*. *Mol.Microbiol.* *43*, 399-410.
- Kim, J, Kim, JG, Kang, Y, Jang, JY, Jog, GJ, Lim, JY, Kim, S, Suga, H, Nagamatsu, T, Hwang, I (2004) Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol.Microbiol.* *54*, 921-934.
- Kim, SI, Jourlin-Castelli, C, Wellington, SR, Sonenshein, AL (2003) Mechanism of repression by *Bacillus subtilis* CcpC, a LysR family regulator. *J.Mol.Biol.* *334*, 609-624.
- Klebanoff, SJ (1999) Myeloperoxidase. *Proc.Assoc.Am.Physicians* *111*, 383-389.
- Korshunov, S und Imlay, JA (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* *188*, 6326-6334.
- Koschubs, T, Seizl, M, Lariviere, L, Kurth, F, Baumli, S, Martin, DE, Cramer, P (2009) Identification, structure, and functional requirement of the Mediator submodule Med7N/31. *EMBO J.* *28*, 69-80.
- Kovacikova, G, Lin, W, Skorupski, K (2004) *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the *tcpPH* promoter. *Mol.Microbiol.* *53*, 129-142.
- Kovacikova, G und Skorupski, K (1999) A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J.Bacteriol.* *181*, 4250-4256.
- Kuge, S, Arita, M, Murayama, A, Maeta, K, Izawa, S, Inoue, Y, Nomoto, A (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol.Cell Biol.* *21*, 6139-6150.
- Kullik, I, Stevens, J, Toledano, MB, Storz, G (1995a) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J.Bacteriol.* *177*, 1285-1291.
- Kullik, I, Toledano, MB, Tartaglia, LA, Storz, G (1995b) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J.Bacteriol.* *177*, 1275-1284.
- Kuo, CF, Mashino, T, Fridovich, I (1987) alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. *J.Biol.Chem.* *262*, 4724-4727.
- Lee, J, Godon, C, Lagniel, G, Spector, D, Garin, J, Labarre, J, Toledano, MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J.Biol.Chem.* *274*, 16040-16046.

- Lee, JW und Helmann, JD (2006) The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* *440*, 363-367.
- Lee, JW, Soonsanga, S, Helmann, JD (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *104*, 8743-8748.
- Lesniak, J, Barton, WA, Nikolov, DB (2003) Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci.* *12*, 2838-2843.
- Levine, RL, Moskovitz, J, Stadtman, ER (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB.Life* *50*, 301-307.
- Li, W, Bottrill, AR, Bibb, MJ, Buttner, MJ, Paget, MS, Kleanthous, C (2003) The Role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*. *J.Mol.Biol.* *333*, 461-472.
- Lochowska, A, Iwanicka-Nowicka, R, Plochocka, D, Hryniewicz, MM (2001) Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. *J.Biol.Chem.* *276*, 2098-2107.
- Lochowska, A, Iwanicka-Nowicka, R, Zaim, J, Witkowska-Zimny, M, Bolewska, K, Hryniewicz, MM (2004) Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Mol.Microbiol.* *53*, 791-806.
- Loschi, L, Brox, SJ, Hills, TL, Zhang, G, Bertero, MG, Lovering, AL, Weiner, JH, Strynadka, NC (2004) Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase. *J.Biol.Chem.* *279*, 50391-50400.
- Lu, Z, Takeuchi, M, Sato, T (2007) The LysR-type transcriptional regulator YofA controls cell division through the regulation of expression of *ftsW* in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* *189*, 5642-5651.
- Ludtke, SJ, Jakana, J, Song, JL, Chuang, DT, Chiu, W (2001) A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN. *J.Mol.Biol.* *314*, 253-262.
- Maddocks, SE und Oyston, PC (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* *154*, 3609-3623.
- Maeda, H, Fujita, N, Ishihama, A (2000) Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* *28*, 3497-3503.
- Masse, E und Gottesman, S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *99*, 4620-4625.
- Masse, E, Vanderpool, CK, Gottesman, S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* *187*, 6962-6971.

- McHugh, JP, Rodriguez-Quinones, F, Abdul-Tehrani, H, Svistunenko, DA, Poole, RK, Cooper, CE, Andrews, SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J.Biol.Chem.* 278, 29478-29486.
- McLeod, SM und Johnson, RC (2001) Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr.Opin.Microbiol.* 4, 152-159.
- Messner, KR und Imlay, JA (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 274, 10119-10128.
- Monferrer, D, Tralau, T, Kertesz, MA, Dix, I, Sola, M, Uson, I (2010) Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol.Microbiol.* 75, 1199-1214.
- Moskovitz, J, Bar-Noy, S, Williams, WM, Requena, J, Berlett, BS, Stadtman, ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12920-12925.
- Moskovitz, J, Berlett, BS, Poston, JM, Stadtman, ER (1999) Methionine sulfoxide reductase in antioxidant defense. *Methods Enzymol.* 300, 239-244.
- Müller-Hill B. (1996) *The lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm. 1. Auflage*, de Gruyter, New York.
- Mullis, KB und Faloona, FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Muraoka, S, Okumura, R, Ogawa, N, Nonaka, T, Miyashita, K, Senda, T (2003a) Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J.Mol.Biol.* 328, 555-566.
- Muraoka, S, Okumura, R, Urugami, Y, Nonaka, T, Ogawa, N, Miyashita, K, Senda, T (2003b) Purification and crystallization of a LysR-type transcriptional regulator CBNR from *Ralstonia eutropha* NH9. *Protein Pept.Lett.* 10, 325-329.
- Nagaraj, N, D'Souza, RC, Cox, J, Olsen, JV, Mann, M (2010) Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *J.Proteome.Res.* 9, 6786-6794.
- Nakano, S, Erwin, KN, Ralle, M, Zuber, P (2005) Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx. *Mol.Microbiol.* 55, 498-510.
- Ogawa, N, McFall, SM, Klem, TJ, Miyashita, K, Chakrabarty, AM (1999) Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *J.Bacteriol.* 181, 6697-6705.
- Outten, FW, Djaman, O, Storz, G (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* 52, 861-872.

- Paget, MS und Buttner, MJ (2003) Thiol-based regulatory switches. *Annu.Rev.Genet.* 37, 91-121.
- Pareja, E, Pareja-Tobes, P, Manrique, M, Pareja-Tobes, E, Bonal, J, Tobes, R (2006) ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC.Microbiol.* 6, 29
- Park, S, You, X, Imlay, JA (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 9317-9322.
- Parsek, MR, Ye, RW, Pun, P, Chakrabarty, AM (1994) Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *J.Biol.Chem.* 269, 11279-11284.
- Perez-Rueda, E und Collado-Vides, J (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28, 1838-1847.
- Perez-Rueda, E und Collado-Vides, J (2001) Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *J.Mol.Evol.* 53, 172-179.
- Peters, JE, Thate, TE, Craig, NL (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J.Bacteriol.* 185, 2017-2021.
- Petersen, C, Moller, LB, Valentin-Hansen, P (2002) The cryptic adenine deaminase gene of *Escherichia coli*. Silencing by the nucleoid-associated DNA-binding protein, H-NS, and activation by insertion elements. *J.Biol.Chem.* 277, 31373-31380.
- Picossi, S, Belitsky, BR, Sonenshein, AL (2007) Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. *J.Mol.Biol.* 365, 1298-1313.
- Pitt, AR und Spickett, CM (2008) Mass spectrometric analysis of HOCl- and free-radical-induced damage to lipids and proteins. *Biochem.Soc.Trans.* 36, 1077-1082.
- Plumbridge, J (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr.Opin.Microbiol.* 5, 187-193.
- Pomposiello, PJ und Demple, B (2001) Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109-114.
- Porrua, O, Garcia-Jaramillo, M, Santero, E, Govantes, F (2007) The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol.Microbiol.* 66, 410-427.
- Pruess, M, Kersey, P, Apweiler, R (2005) The Integr8 project--a resource for genomic and proteomic data. *In Silico.Biol.* 5, 179-185.
- Ranish, JA und Hahn, S (1991) The yeast general transcription factor TFIIA is composed of two polypeptide subunits. *J.Biol.Chem.* 266, 19320-19327.

- Rappsilber, J, Ishihama, Y, Mann, M (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal.Chem.* 75, 663-670.
- Rhee, KY, Opel, M, Ito, E, Hung, S, Arfin, SM, Hatfield, GW (1999) Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 14294-14299.
- Rosario, CJ, Frisch, RL, Bender, RA (2010) The LysR-type nitrogen assimilation control protein forms complexes with both long and short DNA binding sites in the absence of coeffectors. *J.Bacteriol.* 192, 4827-4833.
- Rudolph, B, Gebendorfer, KM, Buchner, J, Winter, J (2010) Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *J.Biol.Chem.* 285, 19029-19034.
- Russell, DA, Byrne, GA, O'Connell, EP, Boland, CA, Meijer, WG (2004) The LysR-type transcriptional regulator *VirR* is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *J.Bacteriol.* 186, 5576-5584.
- Sainsbury, S, Lane, LA, Ren, J, Gilbert, RJ, Saunders, NJ, Robinson, CV, Stuart, DI, Owens, RJ (2009) The structure of *CrgA* from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 37, 4545-4558.
- Sainsbury, S, Ren, J, Nettleship, JE, Saunders, NJ, Stuart, DI, Owens, RJ (2010) The structure of a reduced form of *OxyR* from *Neisseria meningitidis*. *BMC.Struct.Biol.* 10, 10
- Schell, MA (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu.Rev.Microbiol.* 47, 597-626.
- Schneider, DA, Gaal, T, Gourse, RL (2002) NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 8602-8607.
- Schneider, DA, Ross, W, Gourse, RL (2003) Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Microbiol.* 6, 151-156.
- Schneider, TR und Sheldrick, GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 58, 1772-1779.
- Schnetz, K (1995) Silencing of *Escherichia coli* *bgl* promoter by flanking sequence elements. *EMBO J.* 14, 2545-2550.
- Schuck, P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys.J.* 78, 1606-1619.
- Smirnova, IA, Dian, C, Leonard, GA, McSweeney, S, Birse, D, Brzezinski, P (2004) Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator *DntR*. *J.Mol.Biol.* 340, 405-418.
- Spector, D, Etienne, F, Brot, N, Weissbach, H (2003) New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 302, 284-289.

- Sperandio, B, Gautier, C, McGovern, S, Ehrlich, DS, Renault, P, Martin-Verstraete, I, Guedon, E (2007). Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J.Bacteriol.* 189, 7032-7044.
- Stadtman, ER, Moskovitz, J, Levine, RL (2003) Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid.Redox.Signal.* 5, 577-582.
- Stec, E, Witkowska, M, Hryniewicz, MM, Brzozowski, AM, Wilkinson, AJ, Bujacz, GD (2004) Crystallization and preliminary crystallographic studies of the cofactor-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator Cbl from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60, 1654-1657.
- Stec, E, Witkowska-Zimny, M, Hryniewicz, MM, Neumann, P, Wilkinson, AJ, Brzozowski, AM, Verma, CS, Zaim, J, Wysocki, S, Bujacz, GD (2006) Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *J.Mol.Biol.* 364, 309-322.
- Stock, AM, Robinson, VL, Goudreau, PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* 69, 183-215.
- Storz G. und Spiro S. (2010) Sensing and responding to reactive oxygen and nitrogen species. In *Bacterial Stress Responses*. Edited by Storz G and Hengge R, John Wiley & Sons, Hoboken.
- Storz, G, Tartaglia, LA, Ames, BN (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248, 189-194.
- Stragier, P und Patte, JC (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. III. Nucleotide sequence and regulation of the lysR gene. *J.Mol.Biol.* 168, 333-350.
- Stragier, P, Richaud, F, Borne, F, Patte, JC (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a lysR gene encoding an activator of the lysA gene. *J.Mol.Biol.* 168, 307-320.
- Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. (2002) *Biochemistry*. 5. Auflage, W. H. Freeman, New York.
- Sun, J und Klein, A (2004) A lysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol.Microbiol.* 52, 563-571.
- Tanner, JA, Wright, M, Christie, EM, Preuss, MK, Miller, AD (2006) Investigation into the interactions between diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate and two proteins: molecular chaperone GroEL and cAMP receptor protein. *Biochemistry* 45, 3095-3106.
- Tao, K, Fujita, N, Ishihama, A (1993) Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol.Microbiol.* 7, 859-864.
- Tartaglia, LA, Gimeno, CJ, Storz, G, Ames, BN (1992) Multidegenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator. *J.Biol.Chem.* 267, 2038-2045.

- Tomoyasu, T, Mogk, A, Langen, H, Goloubinoff, P, Bukau, B (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol.Microbiol.* *40*, 397-413.
- Tropel, D und van der Meer, JR (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* *68*, 474-500.
- Tyrrell, R, Verschueren, KH, Dodson, EJ, Murshudov, GN, Addy, C, Wilkinson, AJ (1997) The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure.* *5*, 1017-1032.
- van Heel, M, Harauz, G, Orlova, EV, Schmidt, R, Schatz, M (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J.Struct.Biol.* *116*, 17-24.
- van Keulen, G, Girbal, L, van den Bergh, ER, Dijkhuizen, L, Meijer, WG (1998) The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO<sub>2</sub> fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J.Bacteriol.* *180*, 1411-1417.
- van Keulen, G, Ridder, AN, Dijkhuizen, L, Meijer, WG (2003) Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J.Bacteriol.* *185*, 1245-1252.
- Vecerek, B, Moll, I, Blasi, U (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J.* *26*, 965-975.
- Verschueren, KH, Addy, C, Dodson, EJ, Wilkinson, AJ (2001) Crystallization of full-length CysB of *Klebsiella aerogenes*, a LysR-type transcriptional regulator. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *57*, 260-262.
- Verschueren, KH, Tyrrell, R, Dodson, EJ, Murshudov, GN, Addy, C, Wilkinson, AJ (1998) An unexpected symmetry in the LysR-type transcriptional activator, CysB. *Gen.Physiol Biophys.* *17 Suppl 1*, 43-46.
- Viswanathan, P, Ueki, T, Inouye, S, Kroos, L (2007) Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *104*, 7969-7974.
- Vogt, W (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic.Biol.Med.* *18*, 93-105.
- Vogt, W und Hesse, D (1994) Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5. *Immunobiology* *192*, 1-9.
- von Lintig, J, Zanker, H, Schroder, J (1991) Positive regulators of opine-inducible promoters in the nopaline and octopine catabolism regions of Ti plasmids. *Mol.Plant Microbe Interact.* *4*, 370-378.
- Wang, S, Deng, K, Zaremba, S, Deng, X, Lin, C, Wang, Q, Tortorello, ML, Zhang, W (2009) Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl.Environ.Microbiol.* *75*, 6110-6123.
- Wang, X, Deng, Z, Kemp, RG (1998) An essential methionine residue involved in substrate binding by phosphofructokinases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *250*, 466-468.

- Weber, A, Kogl, SA, Jung, K (2006) Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* *188*, 7165-7175.
- Weber, H, Polen, T, Heuveling, J, Wendisch, VF, Hengge, R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J.Bacteriol.* *187*, 1591-1603.
- Weissbach, H, Etienne, F, Hoshi, T, Heinemann, SH, Lowther, WT, Matthews, B, St John, G, Nathan, C, Brot, N (2002) Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch.Biochem.Biophys.* *397*, 172-178.
- Wilson, RL, Urbanowski, ML, Stauffer, GV (1995) DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the gcv and gcvA control regions of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* *177*, 4940-4946.
- Winter, J, Ilbert, M, Graf, PC, Ozcelik, D, Jakob, U (2008) Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* *135*, 691-701.
- Winter, J, Linke, K, Jatzek, A, Jakob, U (2005) Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol.Cell* *17*, 381-392.
- Winterbourn, CC, Hampton, MB, Livesey, JH, Kettle, AJ (2006) Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J.Biol.Chem.* *281*, 39860-39869.
- Wood, MJ, Storz, G, Tjandra, N (2004) Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* *430*, 917-921.
- Wu, J, Dunham, WR, Weiss, B (1995) Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* *270*, 10323-10327.
- Wu, J und Weiss, B (1991) Two divergently transcribed genes, soxR and soxS, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* *173*, 2864-2871.
- Yao, Y, Yin, D, Jas, GS, Kuczer, K, Williams, TD, Schoneich, C, Squier, TC (1996) Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* *35*, 2767-2787.
- Yura, T und Nakahigashi, K (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr.Opin.Microbiol.* *2*, 153-158.
- Zheng, HY, Alcorn, TM, Cohen, MS (1994) Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J.Infect.Dis.* *170*, 1209-1215.
- Zheng, M, Aslund, F, Storz, G (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* *279*, 1718-1721.
- Zheng, M, Doan, B, Schneider, TD, Storz, G (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. *J.Bacteriol.* *181*, 4639-4643.

- Zheng, M und Storz, G (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem.Pharmacol.* 59, 1-6.
- Zheng, M, Wang, X, Templeton, LJ, Smulski, DR, LaRossa, RA, Storz, G (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J.Bacteriol.* 183, 4562-4570.
- Zhou, X, Lou, Z, Fu, S, Yang, A, Shen, H, Li, Z, Feng, Y, Bartlam, M, Wang, H, Rao, Z (2010) Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J.Mol.Biol.* 396, 1012-1024.
- Zuber, P (2009) Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu.Rev.Microbiol.* 63, 575-597.

## 9 Anhang

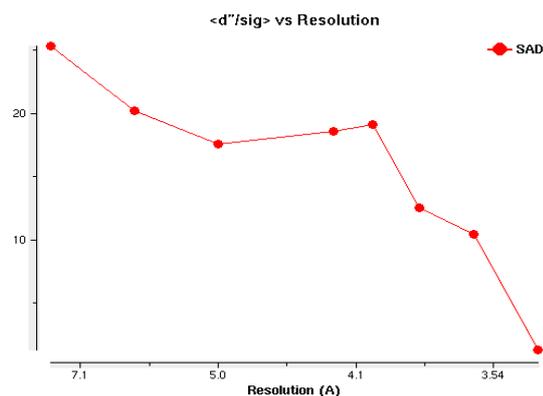
**Tabelle A1:** Gene, die unter HOCl-Stress in *E. coli* durch YjiE reguliert werden (YjiE-Regulon). Fußnoten kennzeichnen Gene die zum <sup>1</sup>RpoS-Regulon (Weber et al., 2005) oder zum <sup>2</sup>Fur-Regulon (McHugh et al., 2003) gehören.

Gene	Function	pathway	induction ratio in:	
			<i>yjiE</i> <sup>+</sup>	<i>yjiE</i> <sup>-</sup>
up-regulated genes				
<i>cysH</i>	3'-phospho-adenylylsulfate reductase	metabolism	6.4	1.8
<i>metB</i>	O-succinylhomoserine lyase	metabolism	3.4	0.9
<i>metK</i>	methionine adenosyltransferase	metabolism	2.8	1.6
<i>metN</i>	component of methionine uptake ABC permease	transport	6.7	1.2
<i>tnaC</i>	<i>tna</i> operon leader peptide	metabolism	2.2	1.1
<i>yedY</i>	periplasmic reductase	unknown	6.5	2.2
<i>yjfO</i>	conserved protein	stress	2.2	1.2
<i>ykgA</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator	transcription	2.3	1.0
down-regulated genes				
<i>adhE</i> <sup>1</sup>	alcohol dehydrogenase	metabolism	25	10
<i>cydA</i>	cytochrome bd-I terminal oxidase subunit I	metabolism	39	13
<i>entC</i> <sup>2</sup>	isochorismate synthase 1	Fe acquisition	8.4	2.7
<i>entH</i> <sup>2</sup>	thioesterase in enterobactin biosynthesis	Fe acquisition	4.4	2.1
<i>fabB</i>	β-ketoacyl-ACP synthases I	metabolism	3.1	1.3
<i>fecC</i> <sup>2</sup>	component of iron dicitrate ABC transporter	Fe acquisition	5.2	2.4
<i>fecD</i> <sup>2</sup>	component of iron dicitrate ABC transporter	Fe acquisition	5.3	1.3
<i>fecE</i> <sup>2</sup>	component of iron dicitrate ABC transporter	Fe acquisition	2.8	1.4
<i>fecR</i> <sup>2</sup>	regulator for <i>fec</i> operon	Fe acquisition	11	5.0
<i>flgG</i>	flagellar basal-body rod protein	motility	4.4	2.0
<i>fnt</i>	methionyl-tRNA formyltransferase	translation	2.0	0.5
<i>fruA</i>	component of fructose PTS transporter	transport	7.2	2.6
<i>infA</i>	protein chain initiation factor IF-1	translation	10	4.4
<i>ispA</i>	geranyl / farnesyl diphosphate synthase	metabolism	2.7	0.6
<i>ksgA</i>	16S rRNA dimethyltransferase	RNA related	4.1	1.8
<i>lola</i>	periplasmic lipoprotein chaperone	metabolism	2.5	1.0
<i>lpxK</i>	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	metabolism	3.0	1.0
<i>manY</i>	component of mannose PTS permease	transport	2.7	1.3
<i>manZ</i>	component of mannose PTS permease	transport	2.4	0.8
<i>oppB</i>	component of murein tripeptide ABC transporter	transport	3.8	1.8
<i>oppD</i>	component of murein tripeptide ABC transporter	transport	5.5	2.2
<i>pdxA</i>	4-hydroxy-L-threonine phosphate dehydrogenase	metabolism	5.5	2.6
<i>pflB</i>	pyruvate formate-lyase	metabolism	4.2	1.6
<i>potC</i>	component of putrescine ABC transporter	transport	2.7	1.2
<i>proP</i> <sup>1</sup>	osmosensory MFS transporter	transport	6.9	2.4
<i>proV</i> <sup>1</sup>	component of proline ABC transporter	transport	9.4	3.2
<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	metabolism	4.1	1.9
<i>rne</i>	ribonuclease E	RNA related	4.8	1.8
<i>rnpA</i>	RNase P protein component	RNA related	5.1	2.0
<i>rseP</i>	zinc protease	proteolysis	2.1	1.0
<i>rsmB</i>	16S rRNA methyltransferase	RNA related	2.1	0.7
<i>rttR</i>	small RNA	regulation	33	12
<i>ryhB</i> <sup>2</sup>	small regulatory RNA involved in iron homeostasis	Fe homeostasis	10	2.4
<i>thyA</i>	thymidylate synthase	metabolism	2.4	1.2
<i>truB</i>	tRNA pseudouridine 55 synthase	RNA related	3.7	1.2
<i>ybgT</i>	small membrane protein	unknown	4.5	2.0
<i>yceD</i>	conserved protein	unknown	2.6	1.2
<i>yicC</i>	predicted protein	unknown	2.5	1.1
<i>yigZ</i>	predicted elongation factor	unknown	2.2	1.0
<i>yncE</i> <sup>2</sup>	conserved protein; probable role in Fe acquisition	Fe acquisition	4.3	2.1

**Tabelle A2:** Gene, die ausschließlich in  $\Delta yjiE$ -Zellen durch HOCl reguliert werden.

gene	function	pathway	induction ratio in:	
			<i>yjiE</i> <sup>+</sup>	<i>yjiE</i> <sup>-</sup>
up-regulated				
<i>acpD</i>	NADH-azoreductase, FMN-dependent	metabolism	106	415
<i>alr</i>	alanine racemase 1	metabolism	0.9	2.1
<i>alx</i>	putative membrane-bound redox modulator	adaptation	1.1	2.4
<i>avtA</i>	valine-pyruvate aminotransferase	metabolism	1.7	3.5
<i>bhsA</i>	involved in stress resistance and biofilm formation	adaptation/stress	102	292
<i>bssS</i>	regulator of biofilm formation	biofilm	1.9	4.7
<i>clpA</i>	protease specificity component and chaperone	folding/proteolysis	1.6	5.6
<i>clpP</i>	serine protease	folding/proteolysis	1.8	5.6
<i>cysK</i>	cysteine synthase A	metabolism	32	123
<i>cysN</i>	component of sulfate adenylyltransferase	metabolism	10.4	27
<i>cysP</i>	component of thiosulfate ABC transporter	metabolism	107	232
<i>cysU</i>	component of sulfate & thiosulfate ABC transporter	metabolism	7.8	27
<i>dadX</i>	alanine racemase 2	metabolism	6.0	13
<i>erpA</i>	essential respiratory protein A	metabolism	1.3	3.5
<i>fkpB</i>	peptidylprolyl isomerase	folding/proteolysis	0.8	2.0
<i>frdD</i>	fumarate reductase membrane protein	metabolism	1.9	4.4
<i>ftsA</i>	essential cell division protein	cell division	0.8	2.1
<i>ftsE</i>	cell division protein	cell division	0.9	2.3
<i>fumC</i>	fumarase C	metabolism	1.7	4.0
<i>glpE</i>	thiosulfate sulfurtransferase	metabolism	5.5	11
<i>glpG</i>	intramembrane serine protease	folding/proteolysis	1.3	3.7
<i>glpQ</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	metabolism	1.6	3.4
<i>hemF</i>	coproporphyrinogen III oxidase	metabolism	1.0	2.8
<i>hemH</i>	ferrochelataase	metabolism	4.3	21
<i>iaaA</i>	asparaginase III	metabolism	2.3	5.9
<i>ibpB</i>	small heat shock protein	adaptation/stress	3.2	10
<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase	metabolism	1.4	3.1
<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA synthetase	translation	1.0	2.5
<i>ilvE</i>	branched-chain amino-acid aminotransferase	metabolism	2.3	18
<i>ilvM</i>	component of acetohydroxybutanoate synthase	metabolism	16	37
<i>inaA</i>	involved in stress response, pH-inducible	adaptation	1.5	3.0
<i>insA</i>	transposase	transposition	1.1	4.0
<i>ivbL</i>	ilvB operon leader peptide	metabolism	1.2	5.9
<i>kefF</i>	regulator of KefC-mediated potassium transport	ion transport	3.9	17
<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	metabolism	4.8	18
<i>lldP</i>	lactate transporter	transport	51	131
<i>lptG</i>	component of LptABCFG ABC transporter	transport	0.8	2.3
<i>marR</i>	transcriptional repressor of <i>marRAB</i> operon	transcription	133	325
<i>nemA</i>	N-ethylmaleimide reductase	metabolism	10	40
<i>oxyS</i>	OxyS RNA/oxidative stress regulator	adaptation/stress	6.1	21
<i>panD</i>	aspartate 1-decarboxylase	metabolism	1.7	3.6
<i>pheL</i>	<i>pheA</i> regulatory leader peptide	metabolism	1.1	4.2
<i>proA</i>	glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	metabolism	1.5	3.1
<i>proB</i>	$\gamma$ -glutamyl kinase	metabolism	1.8	3.8
<i>puuA</i>	glutamate-putrescine ligase	metabolism	1.9	6.1
<i>puuD</i>	$\gamma$ -glutamyl- $\gamma$ -aminobutyrate hydrolase	metabolism	1.1	3.7
<i>recA</i>	involved in DNA strand exchange and recombination	DNA repair	0.7	2.6
<i>rlmE</i>	RNA methyltransferase	RNA related	1.9	4.1
<i>sbp</i>	component of sulfate ABC transporter	Metabolism	45	319
<i>sdhC</i>	component of succinate dehydrogenase	Metabolism	4.2	12
<i>sufA</i>	involved in Fe-S transport/Fe-S cluster assembly	metabolism	1.5	3.3
<i>tatD</i>	comp. of Tat-linked protein quality control system	transport	1.6	3.9
<i>thrL</i>	<i>thr</i> operon leader peptide	metabolism	1.5	5.2
<i>trxC</i>	reduced thioredoxin 2	adaptation/stress	69	143
<i>xthA</i>	exonuclease III	DNA repair	1.1	3.7
<i>yaaA</i>	conserved protein	unknown	1.8	14
<i>ybeZ</i>	predicted protein	unknown	1.4	3.5

<i>yceA</i>	conserved protein	unknown	1.4	3.2
<i>ydeN</i>	putative sulfatase	unknown	1.2	2.6
<i>yebA</i>	predicted peptidase	unknown	2.6	6.5
<i>yeeD</i>	conserved protein	unknown	40	91
<i>yeeE</i>	putative transport system permease protein	unknown	94	327
<i>yhaK</i>	probably involved in chloride binding	unknown	92	261
<i>yhhL</i>	conserved inner membrane protein	unknown	1.0	2.2
<i>yhhW</i>	pirin-like protein	unknown	191	451
<i>yhiI</i>	predicted HlyD family secretion protein	unknown	0.8	3.1
<i>yijE</i>	predicted permease	unknown	1.1	11
<i>yjeI</i>	conserved protein	unknown	2.0	5.0
<i>yjgH</i>	predicted mRNA endoribonuclease	unknown	125	255
<i>ypfH</i>	esterase	metabolism	11	27
<i>yqjF</i>	predicted quinol oxidase subunit	unknown	220	1254
<i>znuA</i>	component of <i>znuABC</i> ABC transporter	metabolism	1.4	4.7
down-regulated				
<i>dhaM</i>	dihydroxyacetone kinase subunit M	metabolism	1.7	3.4
<i>hypE</i>	hydrogenase maturation protein	metabolism	0.9	2.0
<i>matA</i>	predicted regulator	transcription	1.0	2.3
<i>ygjN</i>	translation-dependent mRNA interferase	translation	0.8	2.0



**Abbildung A1:** Durch  $\text{YjiE}^{94-303}$  mit Selenomethionin generiertes anomales Signal. Das Signal ist bis zu einer Auflösung von ca. 3,5 Å sehr stark. Die Abbildung wurde mit dem Programm shelxC erstellt.

**Tabelle A3:** Tabelle, die das Molekulargewicht von  $\text{YjiE}^{94-303}$  in Abhängigkeit vom prozentualen Lösungsmittelanteil im Kristall darstellt.

N(mol)	Prob(N) for resolution	Prob(N) overall	$V_m$ Å <sup>3</sup> /Da	$V_s$ % solvent	$M_w$ Da
1	0.0567	0.1429	4.05	69.64	24359.00
2	0.9433	0.8571	2.03	39.29	48718.00

**Tabelle A4:** Koordinaten der 8 Selenomethionine mit der höchsten Besetzungswahrscheinlichkeit wie sie mit dem Programm shelxD berechnet wurden.

	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>Occupancy</b>
<b>1</b>	35.071	61.342	17.911	0.60
<b>2</b>	37.694	37.382	4.911	0.59
<b>3</b>	35.379	36.297	28.253	0.52
<b>4</b>	37.188	60.872	41.010	0.48
<b>5</b>	34.960	49.412	26.552	0.54
<b>6</b>	54.358	61.938	34.912	0.52
<b>7</b>	34.937	47.891	19.550	0.41
<b>8</b>	54.977	33.644	10.874	0.43

**Tabelle A5:** Daten der Röntgenstrukturanalysen von YjiE<sup>94-303</sup> und YjiE

	<b>YjiE<sup>94-303</sup></b>	<b>YjiE</b>	<b>YjiE<sup>94-303</sup> selenomethionine</b>	
			<b>peak</b>	<b>inflection</b>
Space group	C2(5)	p222(16)	p222 (16)	p222 (16)
Cell dimensions <i>a, b, c</i> (Å)	131.70, 37.62, 98.06	97.93, 107.92, 132.81	37.13, 96.93, 109.73	37.13, 96.93, 109.73
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 125.25, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Wavelength (Å)	1	1	0.9796	0.9797
Resolution (Å)	10-2.5 (2.6- 2.5)	10-2.9 (3.0-2.9)	10-2.8 (2.9-2.8)	10-3.1 (3.2-3.1)
<i>R</i> merge (%)	5.3 (18.4)	6.8 (46.7)	6.9 (36.6)	9.6 (39.4)
Mean <i>I</i> / $\sigma I$	11.34 (4.37)	20.23 (4.07)	17.43 (4.26)	16.21 (4.02)
No. of observations	54435 (6022)	212614 (21189)	144876 (14872)	116957 (9538)
No. of unique reflections	25407 (2851)	31906 (3036)	18894 (1924)	15363 (1234)
Completeness (%)	95.2 (98.2)	99.9 (100)	100 (100)	100 (100)

# Interplay of cellular cAMP levels, $\sigma^S$ activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*

Evelyn Barth,<sup>1†</sup> Katherine V. Gora,<sup>2†</sup> Katharina M. Gebendorfer,<sup>1,3†</sup>  
Florian Settele,<sup>2‡</sup> Ursula Jakob<sup>2</sup> and Jeannette Winter<sup>1,3</sup>

## Correspondence

Jeannette Winter  
jeannette.winter@ch.tum.de

<sup>1</sup>Department Chemie, Biotechnologie, Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Germany

<sup>2</sup>Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-1048, USA

<sup>3</sup>Center for Integrated Protein Science Munich (CiPS<sup>M</sup>), 81377 Munich, Germany

Hypochlorous acid (HOCl), the active ingredient of household bleach, functions as a powerful antimicrobial that is used not only in numerous industrial applications but also in mammalian host defence. Here we show that multicopy expression of *cpdA*, encoding the cAMP phosphodiesterase, leads to a dramatically increased resistance of *Escherichia coli* to HOCl stress as well as to the unrelated hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stress. This general oxidative stress resistance is apparently caused by the CpdA-mediated decrease in cellular cAMP levels, which leads to the partial inactivation of the global transcriptional regulator cAMP receptor protein (CRP). Downregulation of CRP in turn causes the derepression of *rpoS*, encoding the alternative sigma factor  $\sigma^S$ , which activates the general stress response in *E. coli*. We found that these highly oxidative stress-resistant cells have a substantially increased capacity to combat HOCl-mediated insults and to degrade reactive oxygen species. Mutational analysis revealed that the DNA-protecting protein Dps, the catalase KatE, and the exonuclease III XthA play the predominant roles in conferring the high resistance of *rpoS*-overexpressing strains towards HOCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Our results demonstrate the close regulatory interplay between cellular cAMP levels,  $\sigma^S$  activity and oxidative stress resistance in *E. coli*.

Received 19 November 2008

Revised 31 January 2009

Accepted 5 February 2009

## INTRODUCTION

Challenge of bacteria with reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radicals and hypochlorous acid (HOCl) causes a stress condition generally termed oxidative stress (Storz & Imlay, 1999). ROS arise endogenously as byproducts of respiration, and are often released by animals, plants and insects as a defence against microbial pathogens (Imlay, 2003; Apel & Hirt, 2004). HOCl is one of the most potent physiological antimicrobials, a property that arises from its ability to cause oxidative unfolding of cellular proteins (Winter *et al.*, 2008). It is produced by neutrophils, which

kill bacteria by ingesting them into phagosomes, where large amounts of HOCl are generated, and plays an important role in mucosal barrier epithelia, where HOCl apparently inhibits bacterial colonization (Ha *et al.*, 2005; Winterbourn *et al.*, 2006). Owing to their high reactivity, ROS cause oxidative damage to macromolecules, eventually leading to genome-wide mutations, protein inactivation and/or aggregation, and perturbations in membrane structure and function (reviewed by Imlay, 2003; Davies, 2005). Not surprisingly, a hallmark of the *Escherichia coli* response to oxidative stress is the induction of genes encoding ROS scavenger proteins as well as proteins involved in DNA and protein repair (Zheng *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2007). In addition to the ROS-mediated activation of transcription factors such as OxyR and the concomitant induction of antioxidant genes, other proteins are activated by oxidative stress. One such example in *E. coli* is the redox-regulated heat-shock protein Hsp33 (Jakob *et al.*, 1999), whose function as molecular chaperone becomes activated upon oxidative stress (Graf *et al.*, 2004; Ilbert *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2008). Active Hsp33 is an efficient chaperone holdase, protecting a large number of cellular proteins from stress-induced

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Deutsches Krebsforschungszentrum, Department Cell Cycle Control and Carcinogenesis, Im Neuenheimer Feld 242, 69121 Heidelberg, Germany.

Abbreviations: CRP, cAMP receptor protein; ROS, reactive oxygen species; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy; WT, wild-type.

Supporting supplementary material is available with the online version of this paper.

aggregation, which is pivotal for the survival of cells (Winter *et al.*, 2005, 2008).

In this study, we set out to identify novel genes whose multicopy expression protects *E. coli* against HOCl-induced oxidative stress. We used a genomic expression library to screen for oxidative stress-resistant clones. In one clone, which conferred high resistance towards either HOCl or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, the observed resistance was found to be connected to decreased cAMP levels, which led to the partial inactivation of the cAMP receptor protein (CRP) and the accumulation of the general stress transcription factor RpoS (i.e.  $\sigma^S$ ) in exponentially growing *E. coli* cells. We demonstrated that the high oxidative stress resistance is entirely mediated by  $\sigma^S$ , as the deletion of *rpoS* in these strains completely abolishes the oxidative stress resistance. Mutant studies revealed that while XthA and the  $\sigma^S$ -mediated overexpression of *katE* are responsible for the increased ROS-detoxifying capacity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress resistance of these strains, overexpression of *dps* appears to be most critical for their exquisite HOCl stress resistance.

## METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** *E. coli* strains used in this study are listed in Supplementary Table S1. Detailed protocols on the generation of strains, plasmids and the genomic library are given in the supplementary material.

**Culture conditions.** Strains were cultivated in Luria–Bertani (LB) or M9 medium supplemented with appropriate antibiotics. Overnight cultures were diluted and cultivated at 30 or 37 °C to OD<sub>600</sub> 0.5 (LB) or OD<sub>600</sub> 0.3 (M9), unless otherwise indicated. For detailed information on the oxidative stress treatment, see supplementary material.

**Determination of intracellular cAMP concentration.** The concentration of cAMP was analysed using the cAMP EIA kit (Cayman Chemical Company). A 200  $\mu$ l volume of cells cultivated in M9 medium to OD<sub>600</sub> 0.6–0.7 was transferred into pre-heated tubes and boiled for 5 min. The lysate was centrifuged (1200 g, 5 min, 4 °C), and the supernatant was treated and assayed according to the manufacturer's instructions. Samples were analysed in duplicate.

**Determination of  $\sigma^S$  levels.** *E. coli* strains were cultivated in M9 or LB medium at 37 °C. Samples were removed during exponential or stationary growth and cell pellets were analysed by Western blotting with monoclonal antibodies to  $\sigma^S$  (NeoClone Biotechnology International).

**Electron microscopy.** Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were performed on *E. coli* strains growing exponentially in M9 medium. For details, see supplementary material.

**Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cultivation medium.** A 500  $\mu$ l volume of *E. coli* culture grown at 37 °C in M9 medium was diluted in 10 ml fresh M9 medium. Then, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added, and growth was continued for 2 h at 37 °C. Samples were removed before and during the stress, and the remaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined using the FOX method (Wolff, 1994). For details, see supplementary material.

## RESULTS AND DISCUSSION

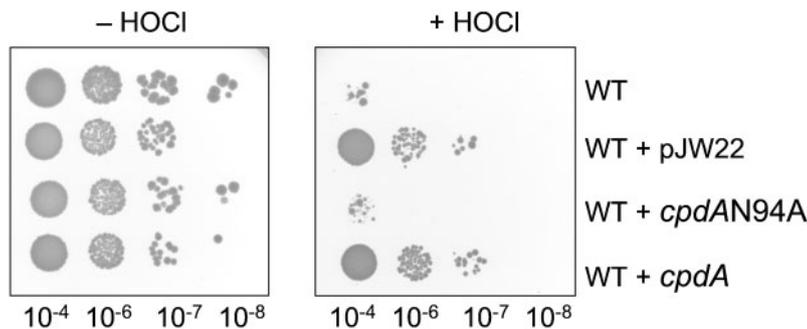
### Multicopy expression of *cpdA* confers resistance to oxidative stress

HOCl is one of the most potent physiological antimicrobials. Despite the prominent role of HOCl, little is known about the bacterial response system(s) towards this potent oxidant. Recent experiments have revealed that expression of Hsp33 confers increased resistance upon *E. coli* cells towards HOCl treatment at both non-stress and elevated temperatures (Winter *et al.*, 2005, 2008). This became especially evident when Hsp33 was overexpressed in the  $\Delta$ *rpoH* strain BB7224, which lacks the alternative sigma factor  $\sigma^{32}$  and is devoid of the general heat-shock response. In an attempt to identify other genes that, when expressed from a multicopy plasmid, are able to confer HOCl resistance to  $\Delta$ *rpoH* cells, we used a genomic overexpression library and selected for clones that survived exposure to 6 mM HOCl in LB medium at 43 °C. We identified several clones, but one was particularly resistant to this oxidative heat treatment, and from this clone, the corresponding plasmid pJW22 was isolated. We retransformed pJW22 into  $\Delta$ *rpoH* and the corresponding wild-type (WT) strain MC4100 (KG27), and analysed their resistance on HOCl-containing LB plates at various temperatures. The presence of pJW22 resulted in an approximately 700-fold increase in viable titre for both strains (data not shown for  $\Delta$ *rpoH*) compared with control cells (Fig. 1). This confirmed that the observed HOCl resistance in the original library clone was due to pJW22 and not due to a chromosomal mutation. It furthermore showed that pJW22 also conferred HOCl resistance at non-stress temperatures that was independent of the presence or absence of the heat-shock sigma factor  $\sigma^{32}$ .

Sequence analysis of pJW22 revealed the presence of a ~3 kb insert with two complete ORFs, *yqiB* and *cpdA*. Upon cloning of both genes separately into pUC18 and comparison of their HOCl resistance, it became obvious that only multicopy expression of *cpdA* conferred HOCl resistance. Importantly, only one of the two tested transformants expressing *cpdA* from the multicopy plasmid pKG2 (KG5) showed the same high resistance to HOCl treatment as pJW22 (Fig. 1). The second clone (KG4), however, was as sensitive to HOCl treatment as the WT (Fig. 1), supposedly due to a point mutation at base 281 in *cpdA* that fortuitously resulted in the replacement of Asp94 with Ala. Notably, Asn94 is one of the most highly conserved amino acids in CpdA, forming part of its predicted metal-binding site (Richter, 2002) and being essential for the catalytic activity of CpdA in *Mycobacterium tuberculosis* (Shenoy *et al.*, 2005). These results strongly indicated that the catalytic activity of CpdA is responsible for the increased oxidative stress resistance observed in KG5.

### Multicopy expression of *cpdA* leads to partial inactivation of CRP

The cellular concentration of cAMP is regulated by the adenylate cyclase CyaA, which synthesizes cAMP, and by



**Fig. 1.** Multicopy expression of *cpdA* confers oxidative stress resistance upon *E. coli*. *E. coli* strains WT (BB7222), WT+pJW22 (KG27), WT+*cpdAN94A* (KG4) and WT+*cpdA* (KG5) were cultivated in LB medium at 37 °C. Aliquots were removed, serially diluted, spotted onto LB plates containing either no HOCl or 4 mM HOCl, and incubated for 24 h at 37 °C.

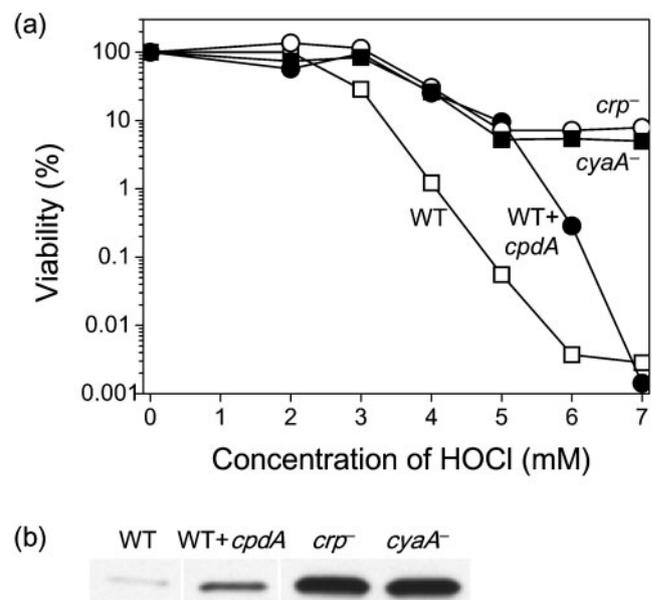
the phosphodiesterase CpdA, which hydrolyses cAMP. To investigate whether the pUC18-driven multicopy expression of *cpdA* affects cellular cAMP levels, we determined the cAMP concentration in WT and KG5 strains. While the WT strain MC4100 had the expected cAMP concentration of  $10.0 \pm 1.3$  pmol ml<sup>-1</sup> (Lengeler & Postma, 1999), multicopy expression of *cpdA* led to a 10-fold reduction in cAMP levels ( $1.0 \pm 0.1$  pmol ml<sup>-1</sup>). This was similar to the findings of earlier reports, which show that multicopy expression of *cpdA* decreases the relative cAMP levels to about 10% and significantly downregulates transcription of the *lac* operon (Imamura *et al.*, 1996). To investigate whether these reduced cAMP levels affect the activity of CRP, we tested the WT and KG5 strains for growth on alternative carbon sources. We found that multicopy expression of *cpdA* led to a reduced ability of cells to use glycerol and lactose, strongly suggesting that CRP is at least partially inactivated (data not shown). *E. coli* cells lacking *crp* (KG24) or *cyaA* (FS16) are completely unable to grow on these carbon sources (data not shown; Shah & Peterkofsky, 1991; Botsford & Harman, 1992).

### Strains lacking cAMP-CRP are highly resistant to oxidative stress

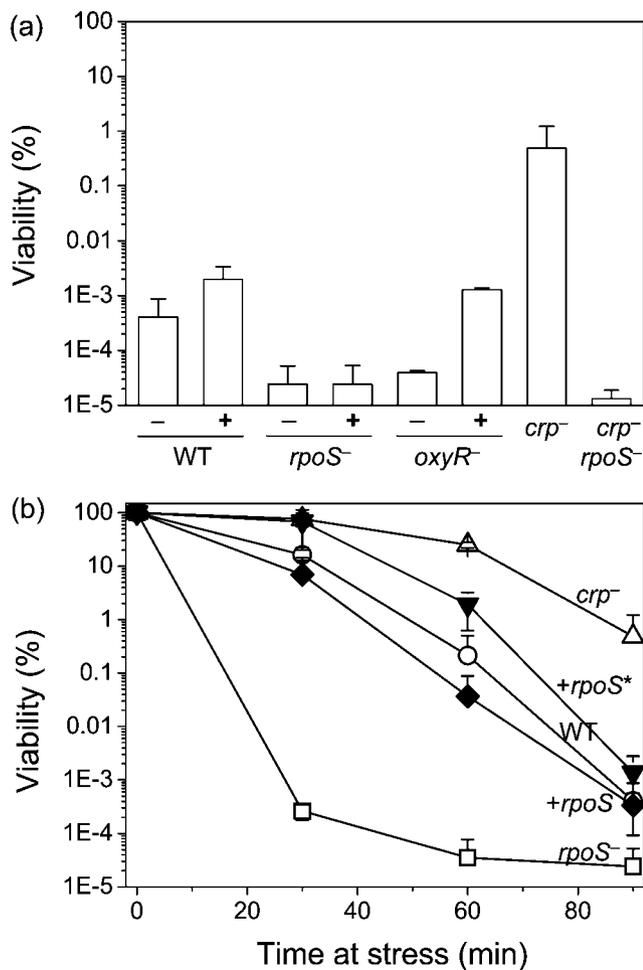
To investigate whether the increased HOCl resistance of the WT+*cpdA* strain is directly due to altered cAMP levels or indirectly due to the inactivation of CRP, we decided to analyse and compare its oxidative stress resistance with the oxidative stress resistance of  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  strains. Although both strains lack a functional CRP system,  $\Delta crp$  has very high cAMP levels ( $437 \pm 52$  pmol ml<sup>-1</sup>), while  $\Delta cyaA$  is unable to synthesize cAMP (Shah & Peterkofsky, 1991). As shown in Fig. 2(a), both strains were highly resistant to oxidative stress treatment and showed an almost 10 000-fold higher viable titre on LB+HOCl plates than the isogenic WT strain. Similar results were obtained when these strains were exposed to HOCl in liquid LB medium (data not shown). These strains were similarly resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in either M9 medium (Fig. 3a and data not shown for  $\Delta cyaA$ ) or LB medium (data not shown). A more than 1000-fold higher viable titre was observed for  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  strains after exposure to 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as compared with the WT. Although the WT+*cpdA* strain was significantly more resistant to HOCl (Fig. 2a) and

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 3a) than WT *E. coli*, it never reached the high oxidative stress resistance observed in  $\Delta crp$  or  $\Delta cyaA$  cells. This suggested that the residual amount of cAMP present in this strain is sufficient to confer partial CRP activity. Notably, WT and WT+*cpdA* cells showed a very similar growth rate; we can therefore exclude the possibility that the higher oxidative stress resistance of WT+*cpdA* cells results from an altered growth rate.

Our results demonstrated that cells lacking active cAMP-CRP are resistant to at least two different oxidative stressors, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOCl, both of which are effective



**Fig. 2.** Strains with non-functional cAMP-CRP are highly resistant to oxidative stress. (a) *E. coli* strains BB7222 (WT), WT+*cpdA* (KG5),  $\Delta crp$  (KG24) and  $\Delta cyaA$  (FS16) were cultivated in LB medium at 37 °C. The viability of cells was analysed by spotting serial dilutions of cultures onto LB plates containing the indicated amounts of HOCl. The viability of cells without stress was taken as 100%. The result of one representative experiment is shown. (b)  $\sigma^S$  levels of *E. coli* strains as in (a) cultivated in LB medium at 37 °C were analysed by Western blotting using antibodies against  $\sigma^S$ .



**Fig. 3.** Oxidative stress resistance is mediated by  $\sigma^S$ . (a) *E. coli* strains BB7222 (WT), WT+*cpdA* (KG5),  $\Delta rpoS$  (JW367),  $\Delta rpoS$ +*cpdA* (JW393),  $\Delta oxyR$  (JW303),  $\Delta oxyR$ +*cpdA* (JW308),  $\Delta crp$  (KG24) and  $\Delta crp rpoS$  (JW368) were cultivated at 37 °C in M9 medium. Plasmid-encoded expression of *cpdA* is indicated by '+'. Cultures were challenged with 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 90 min, and samples were removed, serially diluted and spotted onto LB plates. The viability of non-stressed cells was taken as 100%. The mean and SD of at least three independent experiments are shown. (b) *E. coli* strains BB7222 (WT),  $\Delta rpoS$  (JW367),  $\Delta crp$  (KG24) and  $\Delta rpoS$ +*rpoS* (JW443) without arabinose (+*rpoS*) or with 0.4% arabinose (+*rpoS*<sup>\*</sup>) were cultivated and stressed for the indicated time points as described in (a).

antimicrobials. Notably, WT + *cpdA* cells and cells lacking active cAMP-CRP were also more resistant to heat stress at 49 °C than WT cells (data not shown). Although it has been shown before that  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  strains are resistant to stress conditions such as high temperature and gamma and UV radiation (Kumar, 1976), no increased resistance towards oxidative stress has been reported. On the contrary, Jenkins and co-workers have reported that a  $\Delta cyaA$  strain is as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive as the WT (Jenkins *et al.*, 1988), whereas others have found that  $\Delta crp cyaA$  or  $\Delta cyaA$

strains are actually more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment than the corresponding WT (Gonzalez-Flecha & Demple, 1997). These discrepancies cannot be imputed to differences in growth conditions because those authors used LB or M9 medium, in which we observe stress resistance of  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  strains. To exclude the possibility that our results were allele- or strain background-specific, we also tested MG1655 and BW25113 strains lacking *crp* and found a similarly high increase in oxidative stress resistance (data not shown). At this time, we are unable to rationalize the difference between our observations and those of Gonzalez-Flecha & Demple (1997). It should be noted that although  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  cells grow more slowly than WT cells, they have a similar number of cells per OD unit as WT cells, and all strains reach the same final OD in stationary phase (data not shown).

### Oxidative stress resistance in cAMP-CRP-deficient cells is due to increased $\sigma^S$ levels

What is the underlying mechanism of the oxidative stress resistance that we observe in cells lacking functional CRP? The global regulator CRP has been shown to positively affect the expression of the gene that encodes the oxidative stress transcription factor OxyR (Gonzalez-Flecha & Demple, 1997), and has been suggested to have an indirect, negative effect on the expression of *rpoS*, which encodes the alternative sigma factor  $\sigma^S$  that regulates the general stress response in *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002). Recently, in *Vibrio vulnificus*, it has been shown that CRP binds directly to upstream regions of *rpoS*, resulting in the repression of *rpoS* expression (Lee *et al.*, 2008). Because lack of *oxyR* induction in a  $\Delta crp$  strain would decrease rather than increase the oxidative stress resistance of cells, we investigated whether the lack of *rpoS* repression could account for the increased oxidative stress resistance.

To test whether the partial inactivation of CRP in WT + *cpdA* cells is sufficient to increase the intracellular  $\sigma^S$  concentration during exponential growth to a degree that would explain the observed oxidative stress resistance, we compared the concentration of  $\sigma^S$  in exponentially growing WT, WT + *cpdA* and the corresponding  $\Delta crp$  and  $\Delta cyaA$  strains. We found that the cellular concentration of  $\sigma^S$  in exponentially growing cells cultivated in either LB medium (Fig. 2b) or M9 medium (data not shown) was about three times higher in the WT + *cpdA* strain than in the corresponding WT strain. In cells lacking functional CRP, the  $\sigma^S$  levels were about 10-fold higher than in WT cells (Fig. 2b) and very similar to  $\sigma^S$  levels observed in stationary-phase *E. coli* cells (data not shown). Once the stationary growth phase was reached, however, the  $\sigma^S$  levels became very similar in all strains. These results suggest that partial or complete inactivation of CRP causes the derepression of *rpoS* transcription during exponential growth and leads to the accumulation of  $\sigma^S$  in exponentially growing cells. Similarly, increased  $\sigma^S$  levels have been observed in a *cya* mutant (Lange & Hengge-Aronis, 1994),

which is as oxidative stress-resistant as the  $\Delta crp$  strain (Fig. 2a). That the  $\sigma^S$  response might be responsible for the observed oxidative stress resistance in CRP-deficient cells correlates well with earlier findings that show that the high  $H_2O_2$  resistance of *E. coli* cells in the stationary growth phase depends on increased *rpoS* expression (McCann *et al.*, 1991; Lange & Hengge-Aronis, 1991b; Altuvia *et al.*, 1994; Loewen & Hengge-Aronis, 1994). Our results suggest that cells with high  $\sigma^S$  levels induced by multicopy expression of *cpdA*, inactive CRP or growth in stationary phase (data not shown) are highly resistant to oxidative stress.

### The increased oxidative stress resistance in *cpdA*-expressing strains is mediated by $\sigma^S$

The  $\sigma^S$  regulon exhibits an extensive regulatory overlap with the cAMP-CRP regulon and about 55 % of all  $\sigma^S$ -controlled genes exhibit putative cAMP-CRP-binding sites in their 200 bp upstream regions (Weber *et al.*, 2005). To test directly whether the oxidative stress resistance observed in WT + *cpdA* cells, which have partially inactive CRP, is indeed mediated by  $\sigma^S$ , we analysed the  $H_2O_2$  sensitivity of  $\Delta rpoS$  cells in the presence or absence of the *cpdA* plasmid pKG2.  $\Delta rpoS$  cells showed a very high sensitivity to oxidative stress treatment, which was rescued by *rpoS* expression (pJW25, Fig. 3b) but, more importantly, no longer by pKG2 (Fig. 3a). Similarly, we found that  $\Delta crp$  *rpoS* cells were as sensitive to oxidative stress as the  $\Delta rpoS$  strain (Fig. 3a). This result clearly demonstrated that the CRP-mediated upregulation of  $\sigma^S$  and the concomitant increase in  $\sigma^S$ -dependent gene expression are responsible for the observed oxidative stress resistance in our mutant strains. This acquired oxidative stress resistance was independent of the peroxide-specific transcription factor OxyR, because multicopy expression of *cpdA* was fully able to restore the oxidative stress resistance of the  $\Delta oxyR$  strain to WT levels (Fig. 3a). Although our results are contrary to the study by Gonzalez-Flecha and coworkers, who showed that overexpression of *rpoS* increases the  $H_2O_2$  sensitivity of *E. coli* (Gonzalez-Flecha & Demple, 1997), they are in line with other studies that show that high levels of *rpoS* in stationary phase confer oxidative stress resistance (see above). Furthermore, it has been suggested that  $\sigma^S$  also contributes to cellular HOCl resistance (Dukan & Touati, 1996).

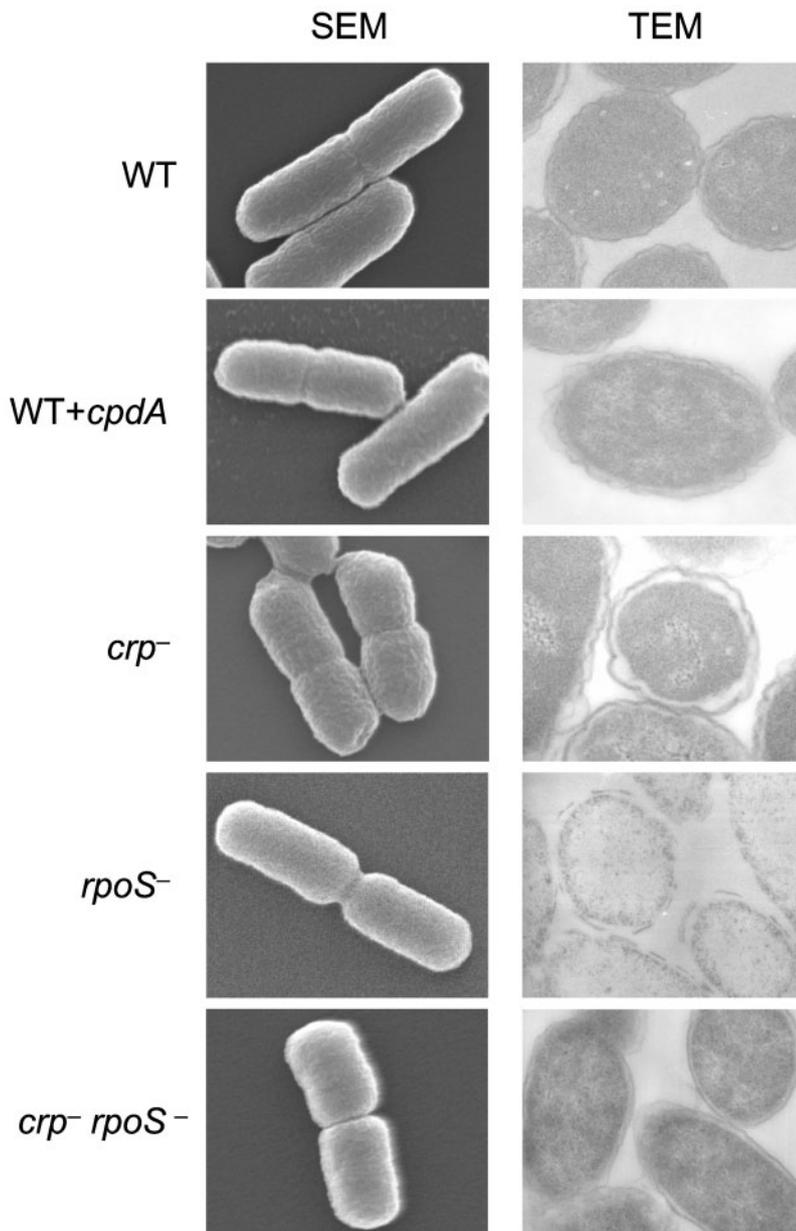
### *E. coli* cells with high $\sigma^S$ levels have thicker cell walls

HOCl and  $H_2O_2$  are two chemically distinct oxidants. While HOCl is highly reactive and rapidly and largely non-selectively reacts with all biological macromolecules (Hawkins *et al.*, 2003),  $H_2O_2$  shows relatively slow reaction rates, even with preferred targets such as the sulfur-containing amino acids cysteine and methionine (Imlay, 2003). In response to HOCl, bacteria appear to induce the heat-shock and SoxR response (Dukan *et al.*, 1996), while  $H_2O_2$  induces the OxyR response. These considerations

raised the question of how the  $\sigma^S$  response can mediate the high oxidative stress resistance towards two seemingly unrelated oxidants. Because changes in the cell surface, shape and cell wall are typical properties of stress-resistant stationary-phase *E. coli* cells (Lange & Hengge-Aronis, 1991b; Santos *et al.*, 2002), we compared the morphology of our WT, the oxidative stress-sensitive ( $\Delta rpoS$ ,  $\Delta crp$  *rpoS*) and the stress-resistant ( $\Delta crp$ , WT + *cpdA*) *E. coli* strains during exponential growth by SEM and TEM (Fig. 4; Supplementary Table S2). While the cell surface of all strains looked similar, the individual strains differed substantially in their cell shape (Fig. 4, left panels). *E. coli* cells with increased  $\sigma^S$  were substantially shorter but also wider than WT cells, while stress-sensitive  $\Delta rpoS$  cells were elongated with increased cell volume, which is consistent with earlier observations (Lange & Hengge-Aronis, 1991a). Surprisingly, however, the stress-sensitive  $\Delta crp$  *rpoS* cells had a cell shape similar to that of the oxidative stress-resistant  $\Delta crp$  cells. This suggests that the observed changes in cell shape are likely to be mediated by CRP and do not directly correlate with  $\sigma^S$  levels or with the oxidative stress resistance of *E. coli* cells. To analyse potential morphological changes in more detail, we analysed ultrathin sections of exponentially growing, embedded *E. coli* cells by TEM (Fig. 4, right panels, Supplementary Table S2). We focused on the cell wall (dark contrast) and the adjacent periplasm (light contrast) and estimated their dimensions. In WT *E. coli*, the cell wall and periplasm had a combined volume of about 5–10 % of the total cell volume. This was very similar in  $\Delta rpoS$  (5–8 %) and  $\Delta crp$  *rpoS* (3–11 %) cells, suggesting that decreased resistance to oxidative stress does not correlate to changes in cell wall and periplasmic dimensions. In contrast, however, we found that increased resistance to oxidative stress was directly correlated with increased cell wall thickness. WT + *cpdA* cells had a twofold larger combined cell wall/periplasmic volume (10–14 % of the total cell volume), while the  $\Delta crp$  strain showed an even larger volume (12–37 %) that was similar to that of  $\Delta cyaA$  cells and WT cells in stationary phase (Supplementary Fig. S1). Neither the cell volume (Supplementary Table S2) nor the total protein amount (not shown) was significantly altered in these cells. These results suggest that the observed morphological changes correlate with increased  $\sigma^S$  levels and an increased oxidative stress resistance.

### Increased peroxide stress resistance due to rapid intracellular ROS detoxification

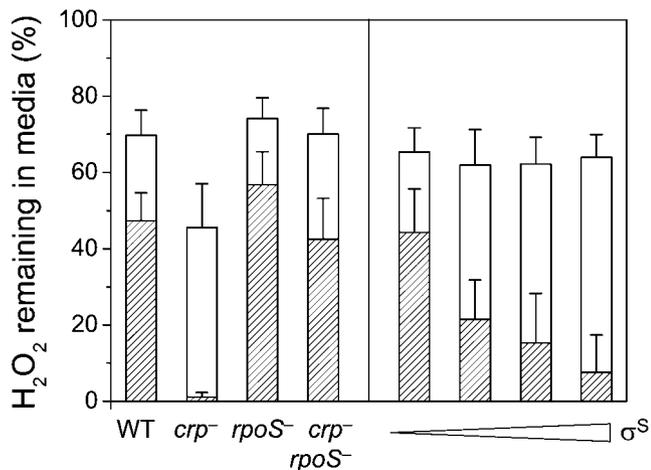
The morphological changes that we observed correlated well with increased RpoS levels and oxidative stress resistance and suggested that thicker cell walls provide more efficient physical barriers against ROS and prevent ROS from effectively penetrating cells. Because correlations do not necessarily reflect a causal relationship, we analysed the ability of our cells to degrade exogenously added  $H_2O_2$  (Fig. 5). This is indicative of the amount of  $H_2O_2$  diffusing into cells and being degraded by cytoplasmic hydroperoxidases such as catalase. We found that WT,  $\Delta rpoS$  and  $\Delta crp$



**Fig. 4.** Electron microscopic images of *E. coli* WT and mutant cells. Cultures of BB7222 (WT), WT + *cpdA* (KG5),  $\Delta$ *crp* (KG24),  $\Delta$ *rpoS* (JW367) and  $\Delta$ *crp rpoS* (JW368) were grown in M9 medium at 37 °C to OD<sub>600</sub> 0.3. Whole cells were analysed by SEM (left panels) and ultrathin sections of cells were analysed by TEM (right panels).

*rpoS* strains degraded about 30 % of the initial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within the first 30 min and 45–60 % 2 h after addition of the oxidant. The stress-resistant  $\Delta$ *crp* cells, in contrast, removed more than 50 % of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within the first 30 min and nearly all of it within 2 h of incubation. This presumably explains why  $\Delta$ *crp* cells, in contrast to WT and *rpoS* mutant cells, can resume growth after this point (data not shown). The high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation capacity of the  $\Delta$ *crp* strain appears to be largely mediated by the catalase KatE, because a  $\Delta$ *crp katE* strain degraded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly more slowly, and the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not decrease to the very low level produced by the  $\Delta$ *crp* cells (data not shown). Multicopy expression of *rpoS* increased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation capacity (Fig. 5), although even maximal  $\sigma^S$  induction did not confer the same high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation

activity observed in  $\Delta$ *crp* cells. This result is consistent with our earlier observation, in which maximal  $\sigma^S$  levels were not able to confer the high oxidative stress resistance observed in  $\Delta$ *crp* strains. It suggests either that not all of the expressed RpoS is active or that CRP negatively controls additional factor(s) that increase the oxidative stress resistance of bacteria in an RpoS-independent manner (see Fig. 3b). In summary, our results suggest that the oxidative stress resistance observed in  $\Delta$ *crp* strains is not, at least primarily, due to thicker cell walls that could serve as an ROS barrier. This is in contrast to the case in *Vibrio cholerae*, which upon shifting from its normal translucent to rugose colony morphology in response to nutrient starvation, is found to produce exopolysaccharide material on its surface that significantly promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance



**Fig. 5.** Effect of  $\sigma^S$  on ROS degradation capacity. *E. coli* strains BB7222 (WT),  $\Delta crp$  (KG24),  $\Delta rpoS$  (JW367),  $\Delta crp rpoS$  (JW368) and  $\Delta rpoS+rpoS$  (JW443) supplemented with 0, 0.2, 0.4 or 1% arabinose were cultivated at 37 °C in M9 medium. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation capacity of WT and mutant cells was determined by measuring the residual amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultures supplemented with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 30 min (white bars) or 2 h (striped bars). The mean and SD of at least three independent experiments are presented.

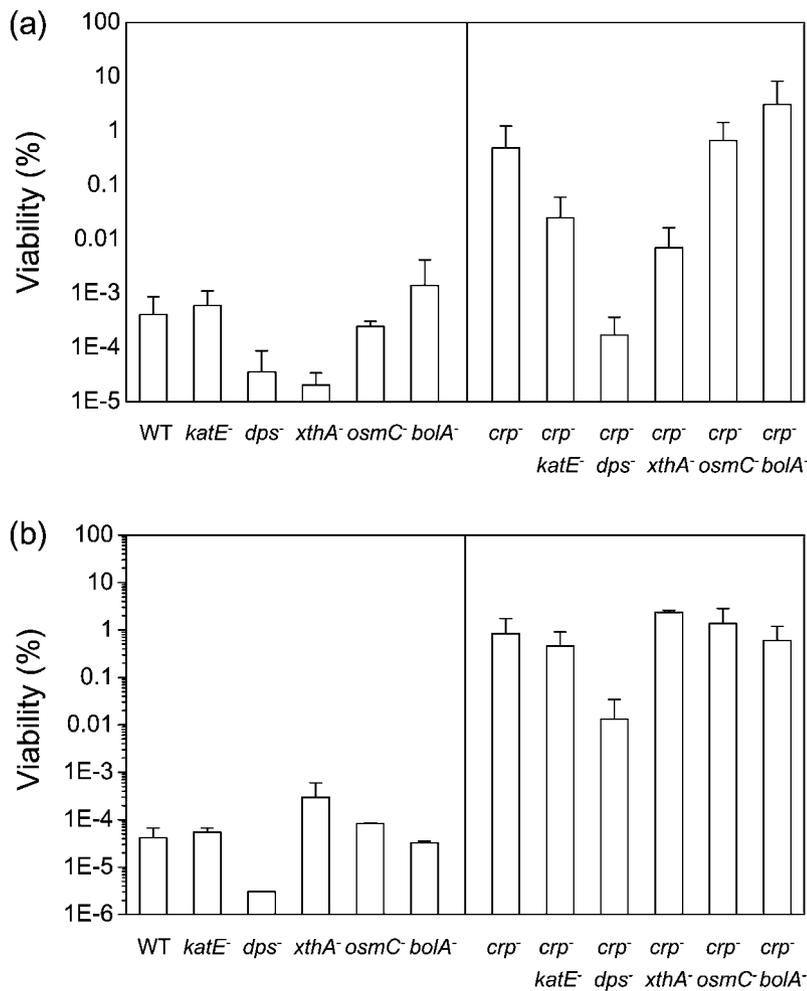
(Wai *et al.*, 1998). Our results, on the other hand, suggest that the resistance observed in  $\Delta crp$  strains is mediated by increased detoxification of ROS.

### Which $\sigma^S$ -regulated genes are involved in oxidative stress resistance?

About 150 genes are considered to be the core genes of the  $\sigma^S$  regulon. Their expression is induced under salt stress, pH stress and entry into stationary phase (Weber *et al.*, 2005). To identify  $\sigma^S$ -regulated genes that confer oxidative stress resistance in  $\Delta crp$  cells, we generated a series of gene deletions in WT and  $\Delta crp$  cells. We focused primarily on those  $\sigma^S$ -dependent genes that are involved in cell morphology (*bolA*) or are suggested to be involved in oxidative stress resistance (*katE*, *dps*, *xthA*, *osmC*). Both the catalase KatE and the DNA-binding protein Dps play a role in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance of stationary-phase growing or starving *E. coli* cells (Almiron *et al.*, 1992; Dukan & Touati, 1996; Nair & Finkel, 2004). In addition, *dps* expression is also under OxyR control and is massively increased in exponentially growing *E. coli* cells upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress treatment (Altuvia *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2001). *xthA* does not seem to be a member of the RpoS regulon (Weber *et al.*, 2005); however, it has been shown to be upregulated in a  $\Delta oxyR$  suppressor strain that has increased  $\sigma^S$  levels. Such increased  $\sigma^S$  levels are able to reverse the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hypersensitivity of  $\Delta oxyR$  mutants (Ivanova *et al.*, 1997). OsmC, which is primarily important under salt stress, is able to degrade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* (Lesniak *et al.*, 2003; Weber

*et al.*, 2006), and starving  $\Delta osmC$  cells seem more H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive than the corresponding WT (Conter *et al.*, 2001). *bolA* is induced upon oxidative stress and is a morphogene whose overexpression causes the round cell morphology observed in stationary-phase growing cells and presumably in our  $\Delta crp$  cells (see Fig. 4) (Aldea *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 1999).

To determine whether any of these proteins contribute to the increased oxidative stress resistance of  $\Delta crp$  strains, we deleted the individual genes in both the WT and  $\Delta crp$  backgrounds and analysed their viability in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6a) or HOCl (Fig. 6b) treatment. Deletion of *osmC* or *bolA* did not significantly alter the viability of WT or  $\Delta crp$  cells during either stress treatment, confirming our previous observations that changes in cell morphology do not contribute to increased oxidative stress resistance. In contrast, KatE protects  $\Delta crp$  but not WT cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress only (Fig. 6). These results agreed with the facts that the *katE* gene is solely RpoS-controlled and that  $\Delta crp$  cells have a higher ROS-detoxifying activity than WT cells (Fig. 5). At the same time, however, this result excluded the possibility that RpoS-mediated *katE* expression is responsible for the observed HOCl-stress resistance of  $\Delta crp$  strains. This is in line with earlier data showing that a *katE* deletion mutant survives HOCl stress with the same viability as the corresponding WT strain (Dukan & Touati, 1996). The exonuclease III XthA is clearly involved in mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance but not resistance towards HOCl (Fig. 6). Deletion of *xthA* renders WT and  $\Delta crp$  cells sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, and the viability of the mutant strains is reduced up to 100-fold compared with the respective controls (Fig. 6a). This is in line with the observation that increased  $\sigma^S$  levels and increased *xthA* transcription in a suppressor mutant reverse the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hypersensitivity of a  $\Delta oxyR$  strain (Ivanova *et al.*, 1997). The protective effect of XthA, however, is restricted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, as deletion of *xthA* does not alter the HOCl resistance of *E. coli* cells (Fig. 6b). In contrast, deletion of the *dps* gene significantly affected both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOCl stress resistance in WT and  $\Delta crp$  strains (Fig. 6a, b). That Dps confers oxidative stress resistance in exponentially growing WT cells indicates that the amount of  $\sigma^S$  made during exponential growth is high enough to promote constitutive *dps* expression. A similar observation has been made in *E. coli* O157:H7, in which Dps levels during exponential growth are sufficient to confer some of the observed acid tolerance (Jeong *et al.*, 2006). The viability of the  $\Delta crp dps$  strain upon exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or HOCl was at least two to three orders of magnitude lower than that of the isogenic  $\Delta crp$  strain (Fig. 6), indicating that Dps indeed plays a central role in the general defence of *E. coli* cells against oxidative stress. Yet  $\Delta crp dps$  cells are still several orders of magnitude more resistant to HOCl than WT cells, indicating that other, yet to be identified factors serve to protect *E. coli* from HOCl-mediated killing. Considering that HOCl causes oxidative unfolding and aggregation of proteins (Winter *et al.*, 2008), an unfolded protein response that upregulates chaperones



**Fig. 6.** Effect of the deletion of selected genes on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOCl stress resistance of WT and  $\Delta crp$  strains. (a) *E. coli* strains BB7222 (WT),  $\Delta katE$  (JW437),  $\Delta dps$  (JW404),  $\Delta xthA$  (KMG197),  $\Delta osmC$  (JW409),  $\Delta bolA$  (JW320),  $\Delta crp$  (KG24),  $\Delta crp katE$  (JW330),  $\Delta crp dps$  (JW416),  $\Delta crp xthA$  (KMG199),  $\Delta crp osmC$  (JW422) and  $\Delta crp bolA$  (JW323) were cultivated at 37 °C in M9 medium. The viability after stress with 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 90 min was determined as described in the legend to Fig. 3(a). (b) Strains as in (a) were cultivated in LB medium at 37 °C. The viability was analysed by preparing serial dilutions of cultures and spotting them onto LB plates containing 6 mM HOCl (WT,  $\Delta katE$ ,  $\Delta dps$ ,  $\Delta xthA$ ,  $\Delta osmC$ ,  $\Delta bolA$ ) or 7 mM HOCl ( $\Delta crp$ ,  $\Delta crp katE$ ,  $\Delta crp dps$ ,  $\Delta crp xthA$ ,  $\Delta crp osmC$ ,  $\Delta crp bolA$ ). The viability of non-stressed cells was taken as 100%. The means and SDS of up to five individual experiments are shown.

and proteases would be ideally suited to alleviate the stress caused by HOCl. The two known functions of Dps during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress are the oxidation of Dps-bound iron, which effectively prevents the formation of the highly toxic hydroxyl radicals, and the formation of protective Dps–DNA co-crystals (Wolf *et al.*, 1999). How Dps protects against HOCl stress is not yet known. We found that *E. coli* cells lacking *dps* ( $\Delta dps$  and  $\Delta crp dps$ ) undergo a significantly higher extent of spontaneous and HOCl-induced mutagenesis than the respective isogenic controls (data not shown), suggesting that the DNA-protective function of Dps also extends to HOCl stress. Our results demonstrate that the RpoS-mediated upregulation of both *katE* and *dps* is predominantly responsible for the acquired oxidative stress resistance observed in  $\Delta crp$  strains and in strains with increased *rpoS* levels in general.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Fred Blattner, University of Wisconsin, Madison, and Bernd Bukau, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, for strains, and Drs Jim Bardwell, Janine Maddock and Robert Bender, and members of the Jakob, Bardwell and Buchner

laboratories, for discussions. Furthermore, we thank Ryan Frisch for technical assistance, Drs Ken Balazovich and Sonja Bardy as well as Bettina Richter and Christoph Kaiser for assistance with electron microscopy, and Dr Sevil Weinkauff for the use of the electron microscopes. This work was supported by National Institute of Health Grant GM065318 and the Burroughs Wellcome Fund Career Award (to U. J.), and by the Elitenetzwerk Bayern (to K. M. G.), the Leopoldina Gesellschaft Deutscher Naturforscher, and the Emmy-Noether program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (to J. W.).

## REFERENCES

- Aldea, M., Hernandez-Chico, C., de la Campa, A. G., Kushner, S. R. & Vicente, M. (1988). Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 5169–5176.
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D. & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 2646–2654.
- Altuvia, S., Almiron, M., Huisman, G., Kolter, R. & Storz, G. (1994). The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol Microbiol* **13**, 265–272.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373–399.

- Blanchard, J. L., Wholey, W. Y., Conlon, E. M. & Pomposiello, P. J. (2007). Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One* 2, e1186.
- Botsford, J. L. & Harman, J. G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* 56, 100–122.
- Conter, A., Gangneux, C., Suzanne, M. & Gutierrez, C. (2001). Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Res Microbiol* 152, 17–26.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 1703, 93–109.
- Dukan, S. & Touati, D. (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 178, 6145–6150.
- Dukan, S., Dadon, S., Smulski, D. R. & Belkin, S. (1996). Hypochlorous acid activates the heat shock and *soxRS* systems of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62, 4003–4008.
- Gonzalez-Flecha, B. & Demple, B. (1997). Transcriptional regulation of the *Escherichia coli oxyR* gene as a function of cell growth. *J Bacteriol* 179, 6181–6186.
- Graf, P. C., Martinez-Yamout, M., VanHaerents, S., Lilie, H., Dyson, H. J. & Jakob, U. (2004). Activation of the redox-regulated chaperone Hsp33 by domain unfolding. *J Biol Chem* 279, 20529–20538.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S. & Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847–850.
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I. & Davies, M. J. (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 25, 259–274.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373–395.
- Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P. C., Lilie, H. & Jakob, U. (2007). The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nat Struct Mol Biol* 14, 556–563.
- Imamura, R., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., Fujita, N., Ishihama, A. & Niki, H. (1996). Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 25423–25429.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57, 395–418.
- Ivanova, A. B., Glinsky, G. V. & Eisenstark, A. (1997). Role of *rpoS* regulon in resistance to oxidative stress and near-UV radiation in  $\Delta oxyR$  suppressor mutants of *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med* 23, 627–636.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341–352.
- Jenkins, D. E., Schultz, J. E. & Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170, 3910–3914.
- Jeong, K. C., Baumler, D. J. & Kaspar, C. W. (2006). *dps* expression in *Escherichia coli* O157:H7 requires an extended -10 region and is affected by the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* 1759, 51–59.
- Kumar, S. (1976). Properties of adenylyl cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 125, 545–555.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991a). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* 173, 4474–4481.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991b). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5, 49–59.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* 8, 1600–1612.
- Lee, H. J., Park, S. J., Choi, S. H. & Lee, K. H. (2008). *Vibrio vulnificus rpoS* expression is repressed by direct binding of cAMP-cAMP receptor protein complex to its two promoter regions. *J Biol Chem* 283, 30438–30450.
- Lengeler, J. W. & Postma, J. W. (1999). Global regulatory networks and signal transduction pathways. In *Biology of the Prokaryotes*, pp. 499–505. Edited by J. W. Lengeler, G. Drews & H. G. Schlegel. Stuttgart, Germany: Blackwell Publishing.
- Lesniak, J., Barton, W. A. & Nikolov, D. B. (2003). Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci* 12, 2838–2843.
- Loewen, P. C. & Hengge-Aronis, R. (1994). The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* 48, 53–80.
- McCann, M. P., Kidwell, J. P. & Matin, A. (1991). The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 4188–4194.
- Nair, S. & Finkel, S. E. (2004). Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* 186, 4192–4198.
- Richter, W. (2002). 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins* 46, 278–286.
- Santos, J. M., Freire, P., Vicente, M. & Arraiano, C. M. (1999). The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol* 32, 789–798.
- Santos, J. M., Lobo, M., Matos, A. P., De Pedro, M. A. & Arraiano, C. M. (2002). The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45, 1729–1740.
- Shah, S. & Peterkofsky, A. (1991). Characterization and generation of *Escherichia coli* adenylyl cyclase deletion mutants. *J Bacteriol* 173, 3238–3242.
- Shenoy, A. R., Sreenath, N., Podobnik, M., Kovacevic, M. & Visweswariah, S. S. (2005). The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry* 44, 15695–15704.
- Storz, G. & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2, 188–194.
- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I. & Yoshida, S. I. (1998). *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 64, 3648–3655.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187, 1591–1603.
- Weber, A., Kogl, S. A. & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 7165–7175.
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. & Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* 17, 381–392.

**Winter, J., Ilbert, M., Graf, P. C., Özcelik, D. & Jakob, U. (2008).** Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **135**, 691–701.

**Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H. & Kettle, A. J. (2006).** Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J Biol Chem* **281**, 39860–39869.

**Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R. & Minsky, A. (1999).** DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **400**, 83–85.

**Wolff, S. P. (1994).** Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* **233**, 182–189.

**Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2001).** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562–4570.

---

Edited by: M. S. Paget

# Evolution of *Escherichia coli* for Growth at High Temperatures\*

Received for publication, January 12, 2010, and in revised form, April 1, 2010. Published, JBC Papers in Press, April 20, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.103374

Birgit Rudolph, Katharina M. Gebendorfer, Johannes Buchner, and Jeannette Winter<sup>1</sup>

From the Center for Integrated Protein Science Munich, Department Chemie, Technische Universität München, 85747 Garching, Germany

Evolution depends on the acquisition of genomic mutations that increase cellular fitness. Here, we evolved *Escherichia coli* MG1655 cells to grow at extreme temperatures. We obtained a maximum growth temperature of 48.5 °C, which was not increased further upon continuous cultivation at this temperature for >600 generations. Despite a permanently induced heat shock response in thermoresistant cells, only exquisitely high GroEL/GroES levels are essential for growth at 48.5 °C. They depend on the presence of lysyl-tRNA-synthetase, LysU, because deletion of *lysU* rendered thermoresistant cells thermosensitive. Our data suggest that GroEL/GroES are especially required for the folding of mutated proteins generated during evolution. GroEL/GroES therefore appear as mediators of evolution of extremely heat-resistant *E. coli* cells.

Extended stress favors mutations that fuel evolution of resistance mechanisms (1–3). Bacteria have evolved to grow under a habitat-defined temperature regime. Yet, specific stress responses, genome instability, and cellular adaptability to environmental challenges may expand their biotope. For instance, a sudden increase in cultivation temperature induces the evolutionary highly conserved heat shock response upon which heat shock proteins (Hsps)<sup>2</sup> are increasingly synthesized (for review, see Ref. 4). Hsps include chaperones, which assist the folding of newly synthesized proteins, prevent stress-induced unfolding and irreversible aggregation of proteins, as well as proteases, which degrade cellular proteins that are damaged beyond repair (5–8). Both mechanisms, degradation and prevention of aggregation, ensure protein homeostasis that is essential for the viability of cells. The importance of chaperones is most intriguingly demonstrated for GroE, which is the only indispensable chaperone system in *Escherichia coli* because it assists the folding of several essential *E. coli* proteins (9).

Growth of laboratory *E. coli* strains is, depending on the respective strain and cultivation medium, inhibited above 44 °C–46 °C (10–12). This is due to limitations of membrane permeability (13) and protein stability (12, 14). The synthesis of Hsps following exposure to elevated temperatures confers thermotolerance

beyond the duration of stress. However, simple overexpression of heat shock genes is not sufficient (15), suggesting that additional factors are required for thermotolerance. Here, we cultivated *E. coli* MG1655 cells for several hundreds of generations and evolved them for growth at 48.5 °C. This temperature represents the absolute maximum at which growth of this *E. coli* strain is possible and exceeds the maximum growth temperature of MG1655 in LB medium by 3 °C. We show that adaptation to high temperatures is accompanied by an increase in steady-state levels of Hsps and lysyl-tRNA-synthetase, LysU. However, only high GroEL/GroES levels, which exceed the nonstress level in wild-type cells by 16-fold, in combination with the presence of LysU are required for thermoresistance.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Bacterial Strains and Plasmids**—*E. coli* MG1655 *zba::kan* (10) was used for evolution. BM3 *lysU::cam* and BM28 *lysU::cam* were generated by P1 transduction with MC4100 *lysU::cam* as donor. BM3 cells were transformed with pBB541 (16); GroESL levels similar to BM28 were obtained upon induction with 25 μM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside contained in the overnight culture.

**Generation of Heat-adapted Strains**—Three lines of *E. coli* were founded from one common ancestor (MG1655 *zba::kan*). All cultivations during adaptation were performed in 10-ml test tubes filled with 7 ml of LB medium. Ten serial transfers into fresh LB medium were done at 37 °C to allow regeneration from freezing. The ancestor was continued to propagate for a total of 2,937 generations at 37 °C for comparative experiments (BM3). The three replicate lines were adapted to high temperature in a stepwise manner. First, cultures were gradually shifted to 45 °C; cells were propagated for 104 generations at 42 °C and 104 generations at 45 °C. After all periods of adaptation, samples of each culture were stored as glycerol stocks at –80 °C thereby conserving different stages of adaptation. Cells were then directly shifted to 47 °C. After 24 generations the three lines stopped growing and had to be propagated for 15 generations again at lower temperature (46 °C). Then, cells were transferred for 45 generations at 47 °C, 126 generations at 47.5 °C, and 84 generations at 48 °C. It took a total of 620 generations and about 2 years to reach the actual highest growth temperature of 48.5 °C. In total, cells were propagated for 1,256 generations at high temperature. Some cultures stopped growing and were lost at high temperatures and had to be restored from existing lines or glycerol stocks. During the process of adaptation to high temperature the cells were always incubated for 48 h to reach late stationary phase. This is a growth phase with a high deleterious genomic mutation rate (17) promoting evolution and

\* This work was supported by the Elitenetzwerk Bayern (to K. M. G.), the Fonds der chemischen Industrie and Sonderforschungsbereich 594 (to J. B.), and the Emmy-Noether program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J. W.).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: CiPS<sup>M</sup>, Dept. Chemie, TU München, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany. Fax: 49 (0)8928913345; E-mail: jeannette.winter@ch.tum.de.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: Hsp, heat shock protein; LysU, lysyl-tRNA-synthetase; Chaps, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid.

## GroE as Mediator of Evolution of Heat Resistance

adaptation to new growth conditions. At temperatures above 45 °C, cells cultivated in test tubes were not able to reach high densities (maximum OD<sub>600</sub> 2.0) or to grow after high dilutions (optimal dilution factor 1:8). The strains BM3 (2,937 generations at 37 °C), BM15 (evolved at 42 °C), BM16 (45 °C), BM25 (48 °C), and BM28 (48.5 °C) were used for further characterization.

**Culture Conditions and Heat Stress Treatment**—Strains were cultivated in 10–20 ml of LB medium containing kanamycin (50 µg/ml) at the indicated temperature in 125-ml flasks with baffles until stationary phase (total of 16 h). For growth curves, cultures were diluted to OD<sub>600</sub> 0.2 and further incubated at their specific growth temperature or at 37 °C. Relative fitness was calculated from the doubling times of heat-evolved strains at the given temperature compared with that of the control strain BM3 at the same temperature. For the analysis of viability at 49 °C, 300 µl of overnight cultures were transferred into 1.5-ml tubes and incubated for 3 h at 1,000 rpm. Samples were removed, serially diluted, and spotted onto LB plates, and colony-forming units were counted after 24 h at 37 °C.

**Analysis of Proteins on Two-dimensional Gels**—Strains were cultivated in LB medium at the indicated temperature in flasks with baffles until stationary phase (16 h). Cells were harvested (5 min, 5,000 rpm, 8 °C) and washed once with ice-cold water. Cell pellets corresponding to OD<sub>600</sub> 2 were resuspended in 1 ml of two-dimensional sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 1% (w/v) Serdolite MB-1, 1% (w/v) dithiothreitol, 4% (w/v) Chaps, and 0.5% (v/v) Pharmalyte 3–10), incubated at 20 °C, 1,000 rpm for 1 h and then lysed by repeated freeze-thawing (four times). Samples were centrifuged (13,300 rpm, 45 min, 4 °C), the supernatant was transferred to a new tube and the centrifugation repeated. For the first dimension (*i.e.* isoelectric focusing), identical protein amounts (450-µl samples corresponding to 0.9 × OD) were applied onto 24-cm IPG strips (pH 4–7; GE Healthcare). Two-dimensional gel electrophoresis was performed exactly as described previously (18, 19). Two-dimensional gels were stained with Coomassie Blue and destained with 10% acetic acid and subsequently scanned. The spot intensity of elongation factor TU (TufA) was very similar in all cell samples and was used as an internal loading control. Protein spots of interest were excised from the two-dimensional gels, subjected to trypsin digestion (according to Ref. 20), and afterward analyzed using an Ultraflex I ToF/ToF mass spectrometer (Bruker Daltonik). Data analysis was performed using the BioTools (Bruker Daltonik) and Mascot (Matrix Science) software packages.

**Sequencing of Heat Shock Genes**—Chromosomal DNA was extracted from BM3, BM15, BM16, BM25, and BM28 cells (GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit, Sigma-Aldrich), and the heat shock genes were amplified using primers annealing 200 bp downstream and upstream of the respective gene. DNA sequencing was performed using the purified PCR products as template and the mentioned primers.

**Quantitative Western Blot Analysis**—The amount of GroEL and GroES in heat-adapted cells (BM28) and control cells (BM3) was analyzed using cell extracts of overnight cultures grown for 16 h at 37 °C in LB medium. Six different concentrations of cell extracts (BM3: OD 0.001–0.004/lane (for GroEL) and OD 0.0015–0.025/lane (for GroES); BM28: OD 0.00005–0.00025/lane (for GroEL) and OD 0.0001–0.0025/lane (for

GroES)) along with five different concentrations of GroEL (1.3–5 ng/lane) and GroES (2.5–12.5 ng/lane) were separated on Neutral gradient gels (Serva). Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane, and GroEL/GroES was detected using antibodies raised against GroES and GroEL, respectively. The amount of GroEL/GroES in BM3 and BM28 cell extracts was quantified by comparison with the signals in the linear range obtained for the reference proteins. Average values were determined based on five independently repeated analyses.

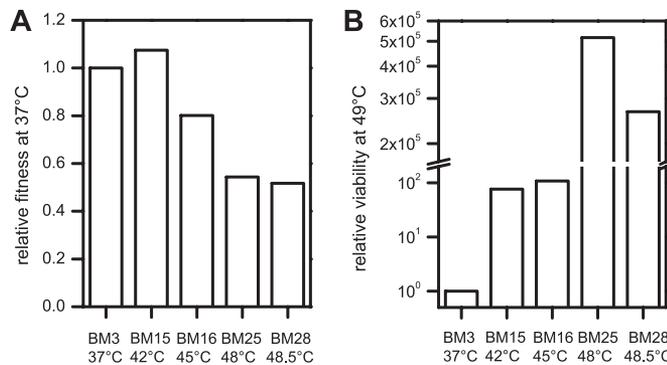
**Analysis of the Maximum Growth Temperature**—BM3, BM3 pBB541, and BM28 cells grown on LB plates containing kanamycin (50 µg/ml) at 37 °C were used to inoculate aerobic or anaerobic LB medium or M9 minimal medium. Anaerobic media were obtained by adding Oxyrase for broth (Oxyrase). Freshly inoculated media were either transferred into 125-ml flasks with baffles (5–10-ml volume, aerobic growth) or into 1.5-ml reaction tubes (filled with 1.5 ml, anaerobic growth) and incubated at 44 °C–49 °C with (aerobic) or without (anaerobic) shaking. After 24 h, growth was analyzed by measuring OD<sub>600</sub>. The temperature at which growth was barely detectable is considered the maximum growth temperature. It should be mentioned that anaerobic media incubated at high temperatures form a slight precipitate, which results in an OD<sub>600</sub> of 0.06 (44 °C) to 0.12 (47 °C) and should be regarded.

**Analysis of the Heat Shock Response**—Overnight cultures grown in LB medium at 37 °C for 16 h were diluted 1:40 into fresh LB medium and cultivated further until an OD<sub>600</sub> of 1.5 was reached. Then, 700 µl of cells was transferred to 1.5-ml tubes and cultivated at 37 °C or 45 °C (1,000 rpm). After 20 min the complete cultures were harvested (5 min, 13,300 rpm, 4 °C), resuspended in two-dimensional sample buffer, and analyzed on two-dimensional gels as described above.

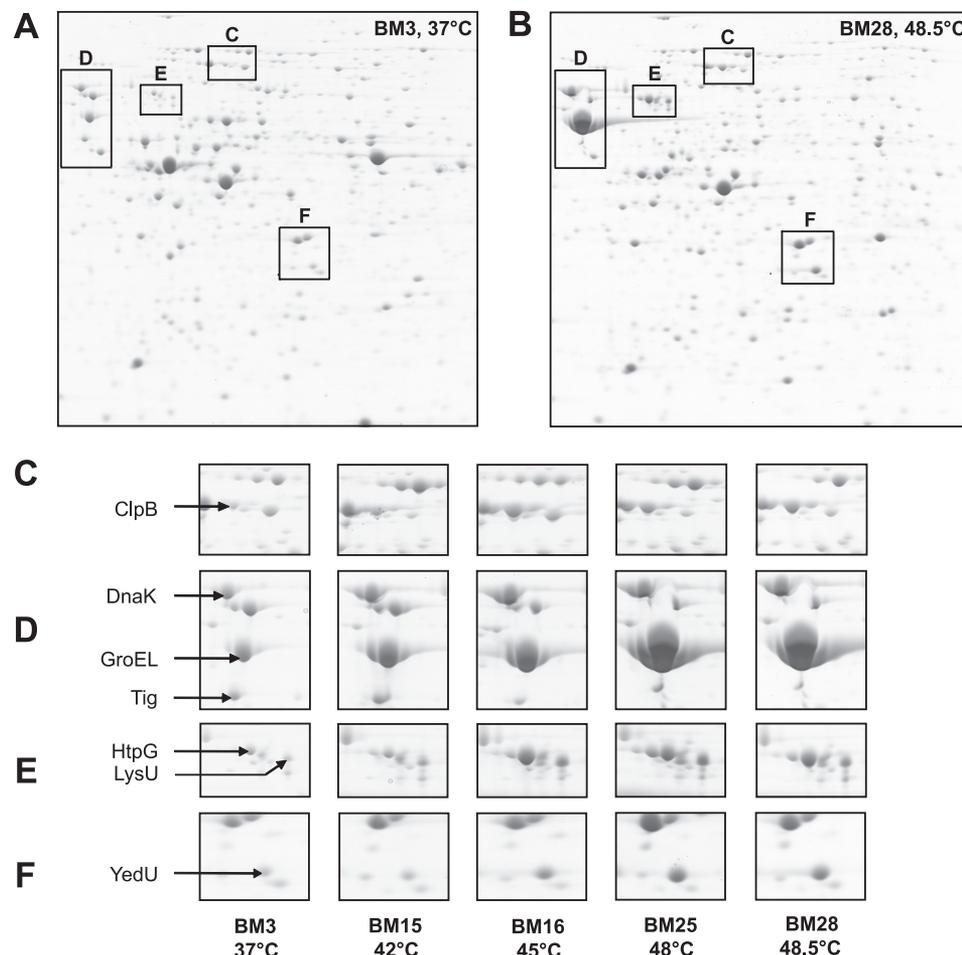
## RESULTS AND DISCUSSION

**Adaptation of *E. coli* MG1655 Cells to Heat**—Nonphysiological conditions induce survival mechanisms, *e.g.* altered transcription or expression patterns or mutations that can result in an increased ability to cope with this stress (2). To study the process and mechanism of evolutionary adaptation of bacteria to heat, we used the *E. coli* strain MG1655. *E. coli* cells were cultivated in LB medium in which genes involved in amino acid biosynthesis, such as of the *met* operon required for methionine biosynthesis, are neither induced nor required and should therefore not limit growth (11). We determined the maximum growth temperature of MG1655 cells in liquid LB medium to 45.5 °C, which is about 1 °C less than on agar plates (10). MG1655 cells were either maintained at 37 °C (BM3) or successively shifted to higher temperatures, *i.e.* 42 °C (BM15), 45 °C (BM16), 48 °C (BM25), and 48.5 °C (BM28). The maximum growth temperature of 48.5 °C (BM28) was reached after a stepwise increase in temperature for 620 generations. Continuous cultivation at 48.5 °C for about 600 generations did not result in a further increase in thermoresistance. For comparison, the maximum growth temperature of BM3 cells, which were cultivated at 37 °C for almost 3,000 generations, was identical to that of the ancestral strain (45.5 °C). The relative fitness at 37 °C (*i.e.* the growth rate of the evolved strain at 37 °C compared with that of the ancestor at 37 °C) increased for cells adapted to 42 °C

(BM15) but decreased for cells continuously cultivated at 45 °C–48.5 °C (BM16, BM25, BM28) (Fig. 1A). This indicates stress-induced mutations and suggests that adaptation to higher temperatures occurs on the expense of generation times.



**FIGURE 1. Fitness of heat-evolved *E. coli* strains.** A, overnight cultures of BM3, BM15, BM16, BM25, and BM28 grown at 37 °C, 42 °C, 45 °C, 48 °C, and 48.5 °C, respectively, were diluted and growth further followed at 37 °C. B, 300- $\mu$ l cultures from A were shifted to 49 °C and the number of viable cells determined after 3 h. Relative fitness/viability was calculated by determining the doubling times/viability of the evolved strain relative to that of BM3, which was set to 1.



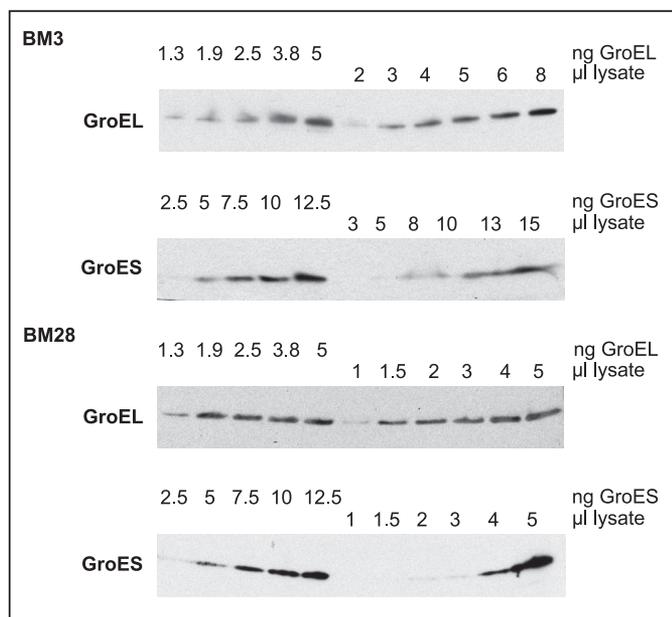
**FIGURE 2. High Hsp levels in heat-evolved *E. coli* cells.** Overnight cultures of BM3, BM15, BM16, BM25, and BM28 grown at their specific growth temperature were analyzed on two-dimensional gels. A and B, two-dimensional gels of BM3 and BM28 with the regions comprising Hsps marked with boxes, respectively. Separated proteins show an isoelectric point of 3–10 (left to right) and a molecular mass from 150 to 10 kDa (upper to lower part). C–F, selected regions of two-dimensional gels showing changes in the spot intensities of Hsps (labeled by an arrow).

Cultivation of cells at 49 °C resulted in a decreased viability, with a decline specific to each culture (Fig. 1B, 3 h). BM3 cells completely lost viability whereas that of BM15 and BM16 cells was reduced to about 0.0006%. BM25 and BM28 cells, in contrast, showed only a small decrease in the number of surviving cells, which corresponded to an at least  $2 \times 10^5$ -fold increased viability at 49 °C compared with the control cells.

All cells grown at their specific growth temperature showed a similar morphology. Cells were analyzed by scanning electron microscopy and showed the typical rod-like shape with a length of  $\sim 1.3$ – $1.5 \mu\text{m}$  and a width of  $\sim 0.5$ – $0.7 \mu\text{m}$  (compare with Ref. 21). Wild-type-like dimensions suggest that heat adaptation is independent of elevated  $\sigma^S$  levels, which would render cells significantly shorter (22). To test whether heat adaptation confers cross-protection against other stresses, we tested the viability of BM3 and BM28 cells upon exposure to hydrogen peroxide (0–8 mM, 37 °C, 3 h). Both strains showed a similar viability during the oxidative stress treatment, suggesting that BM28 cells are only adapted to extreme growth temperatures. This is in line with earlier observations by Cullum and co-workers (23) who showed that adaptation of *E. coli* cells to 42 °C does not confer any cross-protection or preadaptation to other, not yet encountered, stress types.

#### Heat-adapted Cells Show Increased Hsp Levels

—The decreased fitness of BM28 cells at 37 °C suggests that they acquired mutations during adaptation to high temperatures. It has been demonstrated earlier that the level of the Hsp GroEL is increased in mutated bacterial lineages (24, 25). To analyze potential changes in the proteome, we analyzed the control cells (BM3) and heat-adapted cells (BM15, BM16, BM25, BM28) on two-dimensional gels. The most significant differences between BM3 and heat-adapted cells were an increase in steady-state levels of Hsps (*i.e.* ClpB, DnaK, GroEL, GroES, HtpG, YedU) and LysU (Fig. 2). In contrast, the level of the chaperone trigger factor, Tig (Fig. 2A) was reduced. Tig assists the folding of newly synthesized proteins and has been shown to increase the viability of *E. coli* cells at low temperatures (26) but is apparently not required for survival at high temperatures. Also, other proteins with functions unrelated to protein folding show significantly altered steady-state levels. They include the metabolic enzymes tryptophanase, thymidine phosphorylase, deoxyribose-phosphate aldolase, and purine nucleoside phosphorylase with decreased levels and asparaginase II and cysteine synthase A with increased levels (not indicated in the



**FIGURE 3. Quantitative Western blot analysis of GroE levels in BM3 and BM28 cells.** Lysates of overnight cultures were analyzed by immunoblotting using GroEL- and GroES-specific antibodies. Purified GroEL (1.3–5 ng) or GroES (2.5–12.5 ng) was loaded along with lysates of BM3 (OD 0.0005/ $\mu$ l) and BM28 (0.0005/ $\mu$ l), respectively. GroEL and GroES signals in lysates were compared with those of the reference proteins and quantified to 1.2  $\mu$ g/OD (BM3, GroEL, and GroES), 20  $\mu$ g/OD (BM28, GroEL), and 19  $\mu$ g/OD (BM28, GroES).

two-dimensional gels). Because Hsps are vital for survival at high temperatures and are therefore likely to support heat adaptation, we focused only on the cellular levels of the chaperones.

Of note, GroEL/GroES levels in BM15 and BM16 are elevated, and BM25 and BM28 cells show GroEL/GroES levels that largely exceeded the respective amount produced upon heat shock in wild-type cells (27) (compare also Figs. 2D and 5A) and observed in mutated lineages (24, 25). In fact, according to quantitative Western blot analysis, GroEL and GroES levels in BM28 cells are increased 16 times compared with BM3 cells (average of five independent analyses; representative data shown in Fig. 3). Although BM3 cells contained about 1.2  $\mu$ g of GroEL and GroES/OD unit, BM28 cells contained about 20  $\mu$ g of GroEL and 19  $\mu$ g of GroES/OD unit, which corresponds roughly to 20% of the total cellular protein. High GroE (*i.e.* GroEL/GroES) levels during heat adaptation suggest a requirement for a significantly increased protein folding capacity for thermolabile proteins. GroE is a promiscuous, ATP-dependent chaperone system in the *E. coli* cytosol, which entraps proteins during the functional cycle and promotes their folding to the native state (6, 28–31). Upon heat shock conditions, GroE is required to shift the equilibrium of folding intermediates toward a productive folding pathway, whereby it facilitates the native state of thermolabile proteins under usually nonpermissive folding conditions (32).

**High Levels of GroEL/GroES Are Maintained at 37 °C**—Elevated levels of Hsps usually result from increased gene expression in response to stress, mediated by the heat shock transcription factor,  $\sigma^{32}$  (RpoH). To analyze whether mutations caused the high steady-state levels of Hsps in heat-evolved cells, we sequenced the *rpoH*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *htpG*, and *yedU* genes, including their promoter regions. Neither in cells that were maintained at 37 °C nor in any heat-adapted cells did we identify muta-

**TABLE 1**

**Maximum growth temperatures of *E. coli* strains during aerobic and anaerobic growth in LB medium and M9 medium**

Strain	Maximum growth temperature			
	Aerobic growth		Anaerobic growth	
	LB medium	M9 medium	LB medium	M9 medium
BM3	46 °C	45.5 °C	46 °C	46 °C
BM3 pBB541	47.5 °C	46 °C	47.5 °C	47.5 °C
BM28	48.5 °C	47.5 °C	46 °C	46 °C

tions in these genes/promoters. This excludes the possibility of a direct mutation-derived cause for altered transcription/expression of heat shock genes or increased stability/activity of the respective Hsp that could be derived by amino acid substitution. However, we cannot exclude that an unknown factor is responsible for altered transcription, translation, or stability of Hsps.

We reasoned that the high Hsp levels are only induced upon high temperatures and should resume wild-type levels upon return to non-heat shock temperatures. However, GroE levels in BM28 cells remained uniquely high upon cultivation at 37 °C whereas the levels of all other Hsps, Tig, and the metabolic enzymes that showed drastically altered levels returned to wild-type levels (see Fig. 5A and data not shown). Surprisingly, the viability of BM28 cells that were either shifted from 37 °C to 49 °C or from 48.5 °C to 49 °C was very similar (0.5% *versus* 2.2%), indicating that high GroE levels are sufficient for thermoresistance. Therefore, we analyzed the maximum growth temperature and the viability at 49 °C of BM3 cells that expressed *groELS* from a plasmid (BM3 pBB541) to the levels observed in BM28 cells (Table 1 and Fig. 4). High plasmid-derived GroE levels (see Fig. 4, *inset*) increased the maximum growth temperature of BM3 cells from 46 °C to 47.5 °C (Table 1), and their viability at 49 °C compared with BM3 cells by at least 1,000-fold (Fig. 4). Of note, BM3 cells that overexpressed *groELS* to even higher levels showed a viability at 49 °C similar to the above mentioned *groELS* overexpressor (Fig. 4). We conclude that high GroE levels contribute to heat resistance but that additional factors are required for the extreme heat resistance of BM28 cells during aerobic growth in LB medium.

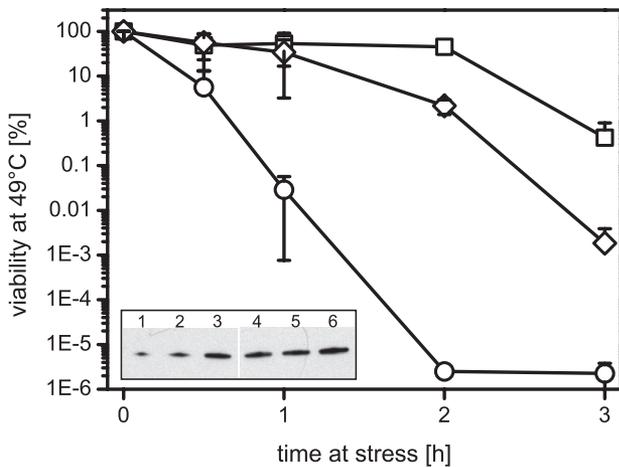
To test whether high GroE levels confer general thermoresistance, we tested the maximum growth temperature of the BM3, BM3 pBB541, and BM28 strains also in M9 minimal medium as well as under anaerobic conditions (Table 1). The maximum growth temperature of the BM3 and BM3 pBB541 strains was 46 °C and 47.5 °C, respectively, with the exception of aerobic growth in M9 medium, which was only possible until 45.5 °C (BM3) and 46 °C (BM3 pBB541). Surprisingly, BM28 cells showed a high maximum growth temperature of 48.5 °C (LB) and 47.5 °C (M9) during aerobic growth, but their growth during anaerobic conditions was very similar to that of the BM3 strain (46 °C). These data indicate that BM28 cells are only evolved for high temperature tolerance during aerobic growth. Supposedly, certain mutations arose in BM28 cells during the time course of heat adaptation that limit anaerobic growth to 46 °C despite very high GroE levels. Given that high GroE levels as observed in BM3 pBB541 enable growth at 47.5 °C during aerobic and anaerobic growth in LB medium, we conclude that high cellular GroE concentrations confer significant thermotolerance to *E. coli* cells.

**Role of LysU in the Heat Resistance of Evolved Cells**—We analyzed the relationship between LysU and GroE to understand the reason for high GroE levels in heat-adapted cells. Neither GroEL nor GroES carries any post-translational modifications that could account for a decreased turnover (data not

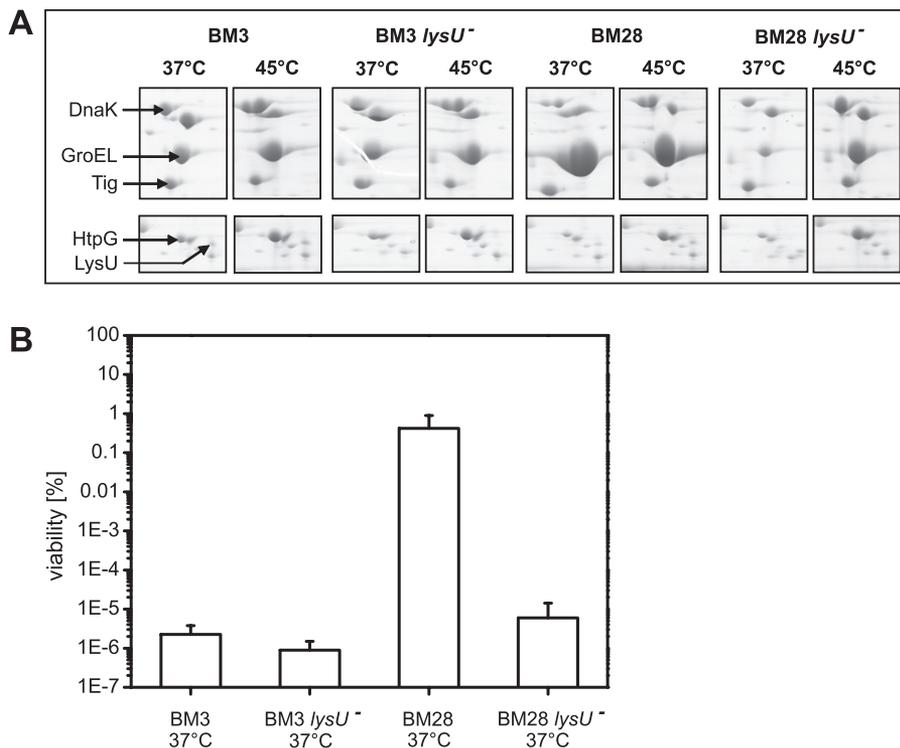
shown). We can also exclude the specific induction of *groESL* because the entire heat shock genes are induced in response to heat shock or accumulating unfolded proteins (33). A gene duplication event as described by Riehle and co-workers in *E. coli* cells evolved at 41.5 °C for 2,000 generations (34) seems an unlikely cause for high GroE levels in our heat-adapted cells as it could not account for the massively increased GroE levels. High GroE levels at high temperatures may result indirectly from increased LysU levels (Fig. 2B). LysU is heat-inducible; it synthesizes a number of adenylylated dinucleotides, such as Ap<sub>4</sub>A (Ap<sub>4</sub>A), which accumulate upon heat shock (35) and were shown to bind to GroEL and other Hsps (36, 37). Ap<sub>4</sub>A may be involved in the expression of *groESL*; it could affect the transcriptional or translational efficiency of *groESL*; however, nothing is known about the effect of Ap<sub>4</sub>A on tRNAs associated with GroE translation. LysU/Ap<sub>4</sub>A could also be involved in controlling the expression of other thermotolerance genes that in turn affect the expression of *groESL*. Although this may apply to 48.5 °C, the situation is different at 37 °C. GroE levels apparently did not directly correlate with LysU levels because GroE levels were identical when BM28 cells were cultivated at 48.5 °C or 37 °C (see above), and LysU levels were elevated at 48.5 °C but wild-type like at 37 °C. We tested whether GroE was LysU-dependently stabilized in cell extracts. For this we tested the trypsin sensitivity of GroES and GroEL in heat-resistant BM28 cells that were either cultivated at 48.5 °C or 37 °C and BM28  $\Delta$ *lysU* cells expressing plasmid-encoded *groESL*. However, GroEL/GroES were similarly degraded by trypsin in both strains at both

temperatures (data not shown), indicating that LysU/Ap<sub>4</sub>A did not or not significantly affect GroE stability.

Dinucleotides, including Ap<sub>4</sub>A, have been proposed to act as modulators of the heat shock response (38); yet, their direct involvement has not been tested so far. Therefore, we analyzed the heat shock response in exponentially growing BM3 *lysU*<sup>+/-</sup> and BM28 *lysU*<sup>+/-</sup> cells. All strains produced similarly increased amounts of Hsps upon heat shock in a LysU-independent manner (Fig. 5A). The only exception was GroE, whose high levels in BM28 cells were not further increased during the heat shock treatment. Therefore, LysU is neither required for nor does it apparently modulate the heat shock response in *E. coli*. In this line, if LysU is required for the production of other thermotolerance proteins, their influence on the heat shock response and heat shock survival is only marginal. Strikingly, BM28 *lysU*<sup>-</sup> cells lack the permanently increased GroE levels (Fig. 5A). We tested whether LysU is also responsible for thermore-



**FIGURE 4. High GroE levels confer heat resistance.** 300- $\mu$ l overnight cultures of BM3 (circles), BM3 pBB541 (diamonds), and BM28 (squares) were shifted to 49 °C, and viability was determined at the indicated time points. The viability of nonstressed cells was set to 100%. Given are the averages  $\pm$  S.D. (error bars) of three to four independent experiments. *Inset*, Western blot analysis of GroEL levels in BM3, BM3 pBB541, and BM28 cells. 10, 20, and 40 ng of GroEL (lanes 1-3) were loaded along with 5  $\mu$ l of lysates of BM3 (lane 4, OD 0.0005/ $\mu$ l), BM3 pBB541 (lane 5, OD 0.00005/ $\mu$ l), and BM28 (lane 6, OD 0.00005/ $\mu$ l). GroEL signals in lysates were quantified to 1.2  $\mu$ g/OD (BM3), 15  $\mu$ g/OD (BM3 pBB541), and 20  $\mu$ g/OD (BM28).



**FIGURE 5. LysU is required for thermoresistance and high GroEL/GroES levels but not the heat shock response.** A, exponentially growing BM3, BM3  $\Delta$ *lysU*, BM28, and BM28  $\Delta$ *lysU* cells were either maintained at 37 °C or shifted to 45 °C for 20 min and analyzed on two-dimensional gels. Selected regions of two-dimensional gels are presented to show changes in the Hsps upon heat shock. B, 300  $\mu$ l of cells as in A were grown to stationary phase and shifted to 49 °C, and viability was determined after 3 h. The viability of nonstressed cells was set to 100%. Given are the averages  $\pm$  S.D. (error bars) of three independent experiments.

## GroE as Mediator of Evolution of Heat Resistance

sistance by analyzing the viability of BM3 *lysU*<sup>+/-</sup> and BM28 *lysU*<sup>+/-</sup> cells at 49 °C. Deletion of *lysU* only slightly reduced the viability of BM3 cells at 49 °C (Fig. 5B). In contrast, deletion of *lysU* in BM28 cells decreased the viability at 49 °C by more than 100,000-fold to a BM3-like viability (Fig. 5B). Therefore, LysU is indispensable for the thermoresistance of BM28 cells. This links the thermoresistance of BM28 cells to both the presence of LysU and permanently increased GroE levels, but, interestingly, not to the permanent heat shock response in general.

What could be the benefit of high GroE levels in heat-evolved cells? Heat-evolved cells (BM16, BM25, BM28 but not BM15) showed a fitness decline at 37 °C (see Fig. 1A), which either could be indicative for the acquisition of mutations or for the prolonged interaction of GroE with cellular proteins. We can exclude the latter possibility because the GroE levels in BM15 and BM16 cells are similarly high, but their relative fitness at 37 °C is largely different. We thus speculate that high GroE levels in heat-evolved cells are primarily required to buffer mutations and stabilize (mutated) cellular proteins at high temperatures. This is in line with previous work by Todd *et al.* who suggested GroE could ameliorate the effects of mutations (39). Besides GroE, the chaperone Hsp90 was also shown to promote evolutionary change. Hsp90 keeps genetic determinants silent in eukaryotes; however, when Hsp90 is mutant or impaired, then genetic variation occurs (40). Tanner *et al.* (37) showed that Ap<sub>4</sub>A binds to GroEL, thereby enhancing its chaperone activity at high temperatures, resulting in a higher folding capacity during stress. This likely applies also to our heat-evolved *E. coli* cells, at least when they were cultivated at 48.5 °C at which a large number of thermolabile cellular proteins require assistance to maintain their active structure. The fact that from all Hsps only GroE is required for heat resistance indicates that some, supposedly mutated, proteins are especially aggregation-prone and now depend on GroE for folding. This is supported by the observation that GroE-dependent substrates (9) show a high propensity to aggregate (41). Further support for the hypothesis that high GroE levels are especially required for the folding of mutated proteins is derived from previous reports showing that GroEL is up-regulated in bacteria encountering a high mutation rate and mitigates the consequences of deleterious mutations (24, 25). Vice versa, elevated GroE levels allow for an increased number of accumulating mutations in proteins and assist their folding even if they carry mutations in the core or mutations that lead to a large destabilization (42, 43). Therefore, the primary role of GroE in heat-evolved cells is to specifically keep thermolabile or mutated proteins active. Taken together, our results imply that the extreme up-regulation of GroEL/GroES is central to the evolution of thermoresistance in *E. coli*.

**Acknowledgments**—We thank Drs. J. Bardwell and B. Bukau for providing strains or plasmids; Dr. S. Gleiter and members of the Winter laboratory for discussion; B. Richter for performing two-dimensional gels and electron microscopy; B. Ludwig and T. Kriehuber for performing mass spectrometry analysis; and P. Baer, J. Kobuch, and K. Ganzing for technical assistance.

## REFERENCES

1. Galhardo, R. S., Hastings, P. J., and Rosenberg, S. M. (2007) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 399–435
2. Matic, I., Taddei, F., and Radman, M. (2004) *Res. Microbiol.* **155**, 337–341
3. McKenzie, G. J., and Rosenberg, S. M. (2001) *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 586–594
4. Guisbert, E., Yura, T., Rhodius, V. A., and Gross, C. A. (2008) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 545–554
5. Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006) *Cell* **125**, 443–451
6. Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002) *Science* **295**, 1852–1858
7. Hinault, M. P., Ben-Zvi, A., and Goloubinoff, P. (2006) *J. Mol. Neurosci.* **30**, 249–265
8. Walter, S., and Buchner, J. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 1098–1113
9. Kerner, M. J., Naylor, D. J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H. C., Stines, A. P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., and Hartl, F. U. (2005) *Cell* **122**, 209–220
10. Bardwell, J. C., and Craig, E. A. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 2977–2983
11. Mordukhova, E. A., Lee, H. S., and Pan, J. G. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7660–7668
12. Ron, E. Z., and Davis, B. D. (1971) *J. Bacteriol.* **107**, 391–396
13. van de Vossenberg, J. L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M. G., Driessen, A. J., and Konings, W. N. (1995) *Mol. Microbiol.* **18**, 925–932
14. Gur, E., Biran, D., Gazit, E., and Ron, E. Z. (2002) *Mol. Microbiol.* **46**, 1391–1397
15. VanBogelen, R. A., Acton, M. A., and Neidhardt, F. C. (1987) *Genes Dev.* **1**, 525–531
16. Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) *Mol. Microbiol.* **40**, 397–413
17. Loewe, L., Textor, V., and Scherer, S. (2003) *Science* **302**, 1558–1560
18. Hiniker, A., and Bardwell, J. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 12967–12973
19. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., and Jakob, U. (2005) *Mol. Cell* **17**, 381–392
20. Schäfer, H., Nau, K., Sickmann, A., Erdmann, R., and Meyer, H. E. (2001) *Electrophoresis* **22**, 2955–2968
21. Barth, E., Gora, K. V., Gebendorfer, K. M., Settele, F., Jakob, U., and Winter, J. (2009) *Microbiology* **155**, 1680–1689
22. Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 4474–4481
23. Cullum, A. J., Bennett, A. F., and Lenski, R. E. (2001) *Evolution* **55**, 2194–2202
24. Fares, M. A., Ruiz-González, M. X., Moya, A., Elena, S. F., and Barrio, E. (2002) *Nature* **417**, 398
25. Maisnier-Patin, S., Roth, J. R., Fredriksson, A., Nyström, T., Berg, O. G., and Andersson, D. I. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 1376–1379
26. Kandror, O., and Goldberg, A. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4978–4981
27. Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999) *EMBO J.* **18**, 6934–6949
28. Beissinger, M., Rutkat, K., and Buchner, J. (1999) *J. Mol. Biol.* **289**, 1075–1092
29. Horwich, A. L., and Fenton, W. A. (2009) *Q. Rev. Biophys.* **42**, 83–116
30. Lilie, H., and Buchner, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8100–8104
31. Thirumalai, D., and Lorimer, G. H. (2001) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 245–269
32. Grallert, H., and Buchner, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20171–20177
33. Parsell, D. A., and Sauer, R. T. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1226–1232
34. Riehle, M. M., Bennett, A. F., and Long, A. D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 525–530
35. Brevet, A., Chen, J., Lévêque, F., Plateau, P., and Blanquet, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 8275–8279
36. Johnstone, D. B., and Farr, S. B. (1991) *EMBO J.* **10**, 3897–3904
37. Tanner, J. A., Wright, M., Christie, E. M., Preuss, M. K., and Miller, A. D. (2006) *Biochemistry* **45**, 3095–3106
38. Lee, P. C., Bochner, B. R., and Ames, B. N. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7496–7500
39. Todd, M. J., Lorimer, G. H., and Thirumalai, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4030–4035
40. Rutherford, S. L., and Lindquist, S. (1998) *Nature* **396**, 336–342
41. Niwa, T., Ying, B. W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., and Taguchi, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 4201–4206
42. Moran, N. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2873–2878
43. Tokuriki, N., and Tawfik, D. S. (2009) *Nature* **459**, 668–673







# Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2006 bis Januar 2011 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Ich möchte mich vor Allem bei meiner Doktormutter Dr. Jeannette Winter für die hervorragende Betreuung in den vergangenen vier Jahren bedanken. Sie hat mir die Arbeit an diesem sehr interessanten Thema ermöglicht und stand mir jederzeit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank!

Prof. Johannes Buchner möchte ich für die Möglichkeit danken meine Arbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie in einem hervorragenden Arbeitsumfeld durchführen zu können.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „oxidativer Stress“ und des Lehrstuhls möchte ich mich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und ihre große Hilfsbereitschaft bedanken.

Dr. Titus Franzmann möchte ich für die Durchführung und Auswertung von vielen UZ-Experimenten und für die Unterstützung bei der Etablierung der Anisotropie-Messungen danken.

Bei Alexander Bepperling möchte ich mich ebenfalls für die Durchführung und Auswertung von zahlreichen UZ-Experimenten bedanken.

Dr. Nathalie Braun, Andreas Kastenmüller und Prof. Sevil Weinkauf möchte ich für die Durchführung und Auswertung der TEM-Analysen sowie die Möglichkeit zu deren Durchführung danken.

Bei Dr. Melissa Poynor und Prof. Michael Groll möchte ich mich für die viele Geduld und Zeitinvestition bei der Kristallisation und Analyse von YjiE bedanken. Am Ende lohnt es sich hoffentlich doch noch!

Martin Seizl und Prof. Patrick Cramer möchte ich für die Unterstützung bei den *in vitro* Transkriptions-Versuchen und für die Möglichkeit diese am Genzentrum durchführen zu können danken.

Bei Dr. Johannes Graumann möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der ESI-MS-Analysen von YjiE bedanken.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie möchte ich dafür danken, dass sie mich während meiner gesamten Zeit an der Universität immer unterstützt haben.

Bei meinem Freund Markus möchte ich mich für die Geduld und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Allen meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt haben.



