TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie

Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *Escherichia coli*-Stämme

Jasmin Gundlach

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) 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 29.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.01.2013 angenommen.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Dr. Jeannette Winter für das ausgesprochen spannende und anspruchsvolle Thema meiner Doktorarbeit, für ihre Motivation und Unterstützung, die vielen anregenden Gespräche und Diskussionen sowie die zahlreichen Möglichkeiten, an vielen interessanten Konferenzen und Seminaren teilzunehmen.

Ich danke auch Prof. Johannes Buchner für die Möglichkeit, meine Arbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie in einem ausgezeichneten Arbeitsumfeld durchführen zu können.

Den Gutachtern dieser Arbeit danke ich für die Begutachtung und somit für ihren Beitrag zu einem bedeutenden Abschnitt meines akademischen Lebens.

Dem Doktorandenprogramm „*Protein Dynamics in Health and Disease*“ des Elitenetzwerk Bayerns und seinen Mitgliedern danke ich sowohl für die finanzielle Unterstützung, als auch für die vielen interessanten fachlichen sowie privaten Gespräche und die diversen ausgezeichneten Seminare.

Für die finanzielle Unterstützung bei Konferenzkosten und verschiedenen Verbrauchsmaterialien für Teilprojekte meiner Arbeit bedanke ich mich bei CIPSMwomen, der Frauenförderung des „*Center for Integrated Protein Science Munich*“.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biotechnologie der TU München danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Vor allem den Büro 5-Kolleginnen und -Kollegen bin ich für ihre vielseitige Unterstützung sehr dankbar. Insbesondere Bettina Richter, Sébastien Dupont und den vielen lieben Praktikantinnen danke ich zudem für ihre Unterstützung bei der Durchführung verschiedener Experimente.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dabei ausdrücklich dafür, dass sie immer an mich glauben und mir vor allem emotional stets eine unfassbar große Stütze sind. Meinem Ehemann, Sebastian, danke ich von ganzem Herzen für seine unglaubliche Geduld, sein unfassbares Verständnis, seine umfangreiche Unterstützung und seine unendliche Liebe.

Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis V

Tabellenverzeichnis VIII

Abkürzungen IX

1. Einleitung 1

1.1 Bakterielle Evolution 1

1.1.1 Genetische Grundlagen der bakteriellen Evolution 1

1.1.2 Epigenetische Grundlagen der bakteriellen Evolution 2

1.2 Bakterielle Stressantworten 3

1.3 Die bakterielle äußere Membran als erste Schutzbarriere 4

1.4 Die generelle Stressantwort 5

1.5 Osmotischer Stress 6

1.6 Hitzestress 8

1.6.1 Die Wachstumsrate von *E. coli* unter verschiedenen Temperaturen 8

1.6.2 Grundlagen der Hitzeschockantwort 8

1.6.3 Die Regulation der Hitzeschockantwort in *E. coli* 10

1.6.4 Zusammenwirken der Hitzeschockantwort mit anderen Stressantworten 11

1.6.5 Evolution Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme 12

1.7 Oxidativer Stress und hypochlorige Säure (HOCl) 15

1.7.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress 15

1.7.2 Antworten auf oxidativen Stress 15

1.7.3 Entstehung, Verwendung und Reaktionen von HOCl 16

1.7.4 Bakterielle Resistenzmechanismen gegen HOCl 17

1.8 Zielstellung 18

2. Material und Methoden 20

2.1 Verwendete Materialien 20

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Standards 20

2.1.2 Materialien 21

2.1.3 Medien, Medienzusätze und Puffer 22
2.1.3 Geräte 24
2.1.4 Programme....25
2.1.5 Bakterienstämme 25
2.1.6 Bakteriophagen 28
2.1.7 Plasmide 28
2.1.8 Oligonukleotide....29

2.2 Mikrobiologische Methoden....32

2.2.1 Sterilisation....32
2.2.2 Wachstumsbedingungen 32
2.2.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten 32
2.2.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen....33
2.2.5 P1-Tansduktion 33
2.2.6 Hitze-Platten....34
2.2.7 Hitzeschock....35
2.2.8 Lebensfähigkeits-Test 35
2.2.9 HOCl-Regenerierungs-Test 36
2.2.10 Genomische Überexpressionsbibliothek....36
2.2.11 Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme 38
2.2.12 Dauerhafte Kultivierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme bei 37°C 41
2.2.13 Dauerhafte Kultivierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme ohne HOCl....41
2.2.14 Lichtmikroskopie....42

2.3 Molekularbiologische Methoden....43

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) 43
2.3.2 Agarosegelelektrophorese....43
2.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten 44
2.3.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen....44
2.3.5 Restriktionsverdau....44
2.3.6 Ligation....44
2.3.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 45
2.3.8 Transformation von *E. coli*-Zellen 45
2.3.9 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen....46
2.3.10 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*-Zellen 46
2.3.11 DNA-Fällung....48
2.3.12 DNA-Sequenz-Analyse....48
2.3.13 Isolierung von RNA aus *E. coli*-Zellen....48
2.3.14 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) 49

2.3.15 Kreuzung von *lacZ*-Fusionen in das *E.coli*-Chromosom.....51
2.3.16 Konstruktion von Mutanten 51
2.3.17 Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene mittels Transposoninsertion 51

2.4 Biochemische Methoden 53
2.4.1 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität 53
2.4.2 Messung des H_2O_2-Abbaus in einer Bakterienkultur 53

2.5 Proteinanalytische Methoden 54
2.5.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 54
2.5.2 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE).....55
2.5.3 Massenspektrometrie 56

2.6 Analyse intrazellulärer Eisenmengen 57

2.7 Membranfluiditätsmessungen 58

3. Ergebnisse 59

3.1 Analyse und Charakterisierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme 59
3.1.1 Die *E. coli*-Stämme $BM28^{GroEL+}$ und $BM28^{GroEL-}$ 59
3.1.2 Transposom-vermittelte Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene 61
3.1.3 Sequenzierung der Genome der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme 62
3.1.4 Kontrolle der Genomsequenzierungsergebnisse der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme.....65
3.1.5 Dauerhafte Kultivierung der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme bei 37°C 68

3.2 Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli* 72
3.2.1 Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder *E. coli*-Gene mittels genomischer Überexpressionsbibliothek.....72
3.2.2 *lacZ*-Reportergenfusionen zur Analyse der Expression einzelner Gene 76

3.3 Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme 77
3.3.1 Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme 77
3.3.2 Analyse der Stressresistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme 79
3.3.3 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der RNA-Ebene 84
3.3.4 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der Proteom-Ebene 88
3.3.5 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der Zellebene 100
3.3.6 Sequenzierung der Genome der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme.....101

3.3.7 Dauerhafte Kultivierung der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme ohne HOCl.....110

4. Diskussion 117

4.1 Methoden zur Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme 117

4.2 Neue Erkenntnisse zu Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen 119

4.2 Neue Erkenntnisse zur HOCl-Resistenz in *E. coli* 122

5. Zusammenfassung 126

6. Summary 128

7. Literaturverzeichnis..... 130

8. Anhang 138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Induktion und phänotypische Konsequenzen der generellen Stressantwort. ... 6

Abbildung 2: Hohe Mengen an Hitzeschockproteinen in evolvierten Hitze-resistenten *E. coli*-Zellen. 14

Abbildung 3: Proteomanalyse der *E. coli*-Stämme BM3, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mittels SDS-PAGE. 60

Abbildung 4: Wachstumskurven der *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} bei 48,5°C. 60

Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Ergebnisse der Genomsequenzierung der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25 und BM28^{GroEL-}. 63

Abbildung 6: Wachstumskurven der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+} bei 37°C. 69

Abbildung 7: Analyse der Proteome der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+} mittels SDS-PAGE. 70

Abbildung 8: Hitze-Platte mit Ausstrichen der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+}. 71

Abbildung 9: Übersicht über den Vorgang der Identifizierung von HOCl-Resistenz-vermittelnden *E. coli*-Genen mittels genomischer Überexpressionsbibliothek und die erhaltenen Ergebnisse. 73

Abbildung 10: Translationale Fusionen der putativen *yjiE*-Promotorregion mit *lacZ*. 77

Abbildung 11: HOCl-Regenerierungs-Tests der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9, E 8.3.9, E 8.2.11, E 8.3.11 und des Kontrollstammes E 8.0.11. 79

Abbildung 12: Lebensfähigkeits-Tests zur Analyse der Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen verschiedene Stressbedingungen. 81

Abbildung 13: SDS-PAGE zur Analyse der Proteomveränderungen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9, ihres Ursprungsstammes BB7224 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9 und BB7222 bei einem Hitzeschock bei 45°C. 83

Abbildung 14: Veränderungen der mRNA-Mengen ausgewählter *E. coli*-Gene in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie deren Ursprungsstamm BB7224 nach HOCl-Stress. 86

Abbildung 15: Messungen der intrazellulären freien Eisenmengen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E8.3.9, ihrem Ursprungsstamm BB7224 sowie dem Kontrollstamm E 8.0.9 mittels EPR-Spektroskopie. 87

Abbildung 16: Analyse der Proteomveränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen des Evolutionsprozesses im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm BB7224 und dem Kontrollstamm E 8.0.11 mittels 2D-PAGE. 90

Abbildung 17: Proteomanalyse der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstammes E 8.0.9 und ihres Ursprungsstammes BB7224 mittels SDS-PAGE. 92

Abbildung 18: Messung der Membranfluidität der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224 mittels Fluoreszenzanisotropie mit TMA-DPH. .93

Abbildung 19: Analyse des H_2O_2-Abbaus in Kulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224. 94

Abbildung 20: HOCl-Regenerierungs-Tests zur Analyse der HOCl-Resistenz von *ahpCF*-, *katG*-, *ompA*-Überexpressionsstämmen sowie eines *E. coli*-Stammes mit einem konstitutiv aktiven OxyR im Vergleich zu jener der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie deren Ursprungsstamms BB7224. 97

Abbildung 21: Kontrolle der OmpA-, KatG-, AhpC- und AhpF-Mengen in den *E. coli*-Stämmen E 8.2.9, E 8.3.9, JG175, JG176, JG177, JG178 und JG179. 99

Abbildung 22: Analyse der Zellmorphologie der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstammes E 8.0.9 sowie ihres Ursprungsstammes BB7224 mittels Lichtmikroskopie. 101

Abbildung 23: Mittels Genomsequenzierung detektierte Mutationen mit potentieller Relevanz für die HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme. 103

Abbildung 24: Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels Vereinzelungsausstrichen. 106

Abbildung 25: Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels HOCl-Regenerierungs-Tests. 107

Abbildung 26: Proteomanalysen zur Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels SDS-PAGE. 109

Abbildung 27: Vergleich der HOCl-Resistenz der dauerhaft ohne HOCl kultivierten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 mit jener ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9, E 8.0.9 R7 und BB7224 mittels HOCl-Regenerierungs-Tests. 113

Abbildung 28: Vergleich der Proteome der dauerhaft ohne HOCl kultivierten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 mit jenen ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9, E 8.0.9 R7 und BB7224 mittels SDS-PAGE. 115

Abbildung 29: Modell zur HOCl-Resistenz in *E. coli*. 125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Standards mit deren Bezugsquelle. 20

Tabelle 2: Verwendete Materialien und deren Bezugsquelle.....21

Tabelle 3: Verwendete Medienzusätze, deren Lösungsmittel und Stammlösungskonzentration. 22

Tabelle 4: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung.....23

Tabelle 5: Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle. 24

Tabelle 6: Verwendete Programme und deren Hersteller. 25

Tabelle 7: Liste der verwendeten Bakterienstämme.....25

Tabelle 8: Liste der verwendeten Bakteriophagen. 28

Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide. 28

Tabelle 10: Liste der verwendeten Oligonukleotide.....29

Tabelle 11: Übersicht über die Evolution der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme und ihre Stammbezeichnungen. 40

Tabelle 12: Glycerinkulturen aus der dauerhaften Kultivierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme bei 37°C.....41

Tabelle 13: Glycerinkulturen aus der dauerhaften Kultivierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme ohne HOCl.....42

Tabelle 14: Mittels Transposon-Insertion identifizierte Hitzeresistenz-vermittelnde *E. coli*-Gene.....61

Tabelle 15: Vergleich der Genomsequenzierungen der *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+}. 64

Tabelle 16: Vergleich der chromosomalen Regionen der Gene *groEL/yjeI*, *rfbD*, *yhjY*, *icd*, *ynjI*, *infB* sowie der *icdC*- und *mcrB*-Promotorregionen der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mit jenen des Stammes MG1655.....67

Tabelle 17: Mittels genomischer Überexpressionsbibliothek identifizierte HOCl-Resistenz-vermittelnde *E. coli*-Gene.....74

Abkürzungen

2D-PAGE	zweidimensionale SDS-PAGE
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA (*complementary* DNA)
Cm	Chloramphenicol
DETAPAC	*„Diethylenetriaminepentaacetic acid“*
DFO	Deferoxamin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
HOCl	hypochlorige Säure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Kan	Kanamycin
LB	*„lysogeny broth“*
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mRNA	*messenger* RNA
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
SDS-PAGE	diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SOB	*„super optimal broth“*
Spec	Spectinomycin
Tab.	Tabelle
TMA-DPH	Trimethylammoniumdiphenylhexatrien
TMP	Trimethoprim
TOF	Flugzeit (*time of flight*)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Evolution

Prokaryontische Spezies existieren wahrscheinlich seit rund 3,5 Milliarden Jahren auf der Erde. Aufgrund von evolutionären Prozessen entstanden in dieser Zeit – und entstehen noch – zahlreiche diverse prokaryontische Organismen, welche bereits die verschiedensten Lebensräume besiedelten. So wurden Prokaryonten an Orten auf der Erde gefunden, von denen zunächst angenommen wurde, dass ein Leben dort unmöglich sei, wie unter Salzkrusten ausgetrockneter Seen, in der Tiefsee oder in Geysiren. Da die große Mehrheit der natürlich vorkommenden prokaryontischen Organismen bislang nicht kultiviert werden konnte, ist es bis heute unmöglich, den gesamten Umfang der prokaryontischen Diversität zu erfassen. Es ist offensichtlich, dass Bakterien im evolutionären Sinn der Anpassung durch natürliche Selektion äußerst anpassungsfähig sind. Hierbei spielen sowohl die Genetik als auch die Epigenetik eine wesentliche Rolle.

1.1.1 Genetische Grundlagen der bakteriellen Evolution

Eine Grundlage für die natürliche Selektion ist die erbliche Variation der Individuen einer Population. Bakterien vermehren sich durch binäre Zellteilung. Durch diesen asexuellen Vorgang sind die meisten Nachkommen einer Bakterienzelle genetisch mit dieser identisch.
Genetische Variabilität in einer bakteriellen Population kann jedoch durch das Auftreten von Mutationen sowie horizontalem Gentransfer durch Transformation, Transduktion oder Konjugation mit anschließender Rekombination in das Bakteriengenom entstehen. Auch Transposons, sogenannte „transponierbare genetische Elemente“, können dazu beitragen.
Mutationen entstehen spontan oder werden durch vielfältige physikalische, chemische oder biologische Faktoren induziert. In Bakterienpopulationen können neben Punktmutationen auch spontane Genom-„*Rearrangements*“ wie Duplikationen, Deletionen und Inversionen auftreten, welche die Genexpression, damit den Phänotyp und die Evolution von Bakterien beeinflussen (Sun *et al.*, 2012). Zudem gibt es verschiedene Stress-induzierbare Mutationsmechanismen (Hastings *et al.*, 2004) wie Genamplifikationen, infolge derer ein DNA-Abschnitt in vielen Kopien wiederholt im Genom vorliegt. Wird durch die Vervielfältigung die Expression eines Gens erhöht, welches einen Selektionsvorteil verleiht, trägt dieser Mechanismus zur adaptiven Evolution bei. Man spricht hierbei auch von adaptiven Amplifikationen. In *Escherichia coli* (*E. coli*) treten solche Amplifikationen häufig Stress-induziert, selten spontan auf (Slack *et al.*, 2006). Einen davon unabhängigen

Mechanismus, welcher ebenfalls zur adaptiven Evolution beiträgt, stellt die, als Stress-induzierte Mutagenese oder Stationärphasen- bzw. adaptive Mutagenese bezeichnete, Häufung von Mutationen in nicht wachsenden Zellen dar ((Cohen & Walker, 2010), (Bjedov *et al.*, 2003)). Derzeitig wird angenommen, dass Mutationen nicht gleichmäßig in Populationen verteilt sind, sondern eher in gestressten Individuen und Populationen auftreten (Ram & Hadany, 2012). Ein Vorteil von Mutationen, die nur in einer Subpopulation auftreten, besteht darin, dass nicht die gesamte Population von eventuell schädlichen Mutationseffekten betroffen ist (Gonzalez *et al.*, 2008).

1.1.2 Epigenetische Grundlagen der bakteriellen Evolution

Die phänotypische Variabilität, welche Populationen eine schnelle Anpassung an eine sich ständig verändernde Umwelt ermöglicht, kann nicht nur durch genetische sondern auch epigenetische Ereignisse entstehen. Der Begriff „Epigenetik“ sowie die heute bekannte Metapher der „Epigenetischen Landschaft“ wurde von Conrad Hal Waddington Mitte des 20. Jahrhunderts geprägt (Übersicht in (Huang, 2012)). Lange Zeit fand seine Idee von den nicht-genetischen Beiträgen zur Vererbung von Merkmalen kaum Beachtung. Insbesondere durch die aktuelle Etablierung Genom-weiter Analysen von Genen und Genexpressionen wird jedoch immer deutlicher, dass Zellen mit gleichem Genotyp nicht zwangsläufig denselben Phänotyp zeigen und demnach die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp komplexer ist, als zuvor angenommen.
Heutzutage wird der Begriff „Epigenetik“ verwendet, um vererbbare Veränderungen in der Genexpression, die ohne Veränderungen in der DNA-Sequenz auftreten, zu beschreiben. Epigenetisch bedingte Variationen haben einige Vorteile gegenüber genetischen Veränderungen. So treten sie häufiger auf, können leichter in den vorherigen Zustand zurückgeführt werden und es entstehen keine potentiell ungünstigen Mutationen im Genom (Satory *et al.*, 2011). Mikrobielle epigenetische Mechanismen schließen beispielsweise Prionen ein, welche veränderte Proteinkonformationen weitergeben können. Außerdem „genomisches *Imprinting*“, ein vererbbares DNA-Methylierungsmuster, welches die transkriptionelle Aktivität von Teilen des Genoms regelt ohne die primäre DNA-Sequenz zu verändern. Auch Gen-Regulations-Netzwerke, die in alternativen Expressionszuständen vorliegen können, sofern sie durch positive Rückkopplung aufrecht erhalten werden, gehören dazu. Bei all diesen Mechanismen gibt es jeweils verschiedene stabile Zustände, die über viele Generationen hinweg bestehen bleiben können. Diese Zustände können sich in ihrem Genexpressionsmuster oder der Konformation spezifischer Proteine unterscheiden (Übersicht und Beispiele in (Casadesus & Low, 2006), (Satory *et al.*, 2011)). Insgesamt sind

epigenetische Ereignisse ubiquitär, können alle Ebenen der Genregulation beeinflussen, sind sehr dynamisch und sollten daher neben genetischen Ereignissen als eine weitere Ursache für Diversität betrachtet werden. Vielleicht forcieren epigenetische Mechanismen auch evolutionäre Veränderungen, indem sie die vorübergehende Selektion eines epigenetisch kodierten Phänotyps erlauben, bis (zufällig) die entsprechende genetische Mutation auftritt (Huang, 2012).

1.2 Bakterielle Stressantworten

Bakterien sind nicht nur im evolutionären sondern auch im physiologischen Sinne der Anpassung individueller Zellen an wechselnde Umweltbedingungen sehr anpassungsfähig. Im Laufe der Evolution entwickelten sich daher neben Spezialisten auch Generalisten, die in der Lage sind, sich an unterschiedliche Umweltbedingungen anzupassen. Das Gram-negative γ-Proteobakterium *E. coli* ist ein wahrer Generalist. Es existiert eine große Vielfalt an verschiedenen kommensalen sowie pathogenen *E. coli*-Stämmen. Als Enterobakterium lebt *E. coli* im Darm von Säugetieren, aber auch außerhalb des Wirtes. Für das Überleben von *E. coli* ist es daher zwangsläufig notwendig, sich an sehr verschiedene und wechselhafte Umweltbedingungen anpassen zu können (Hengge, 2011).
Die Bedingungen in den natürlichen Lebensräumen von Bakterien sind meist nicht optimal. Stattdessen werden sie mit diversen Stressfaktoren konfrontiert. Zu diesen gehört beispielsweise die begrenzte Verfügbarkeit verschiedener Nährstoffe, die Konkurrenz um Ressourcen, eine Vielfalt an abiotischen Stressfaktoren, wie nicht optimale Temperatur-, pH oder osmotische Bedingungen, sowie die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies, toxischen Metallionen, Strahlung oder Prädatoren wie Bakteriophagen, anderen Bakterien und Protozoen. Um solche potentiell lebensgefährlichen Bedingungen zu überleben, können Bakterien eine Kombination verschiedener Strategien nutzen. Eine Möglichkeit besteht darin, Stress-spezifische Antworten zu induzieren, durch welche der Stressfaktor beseitigt und der entstandene Schaden repariert wird. Andererseits können zahlreiche verschiedene Stressbedingungen eine komplexe generelle Stressantwort induzieren, durch welche die Bakterien gegen diverse Stressfaktoren resistent werden und Schäden nicht repariert werden müssen, da sie eher im Voraus verhindert werden (Hengge-Aronis, 2000). Hierbei kommt es auch zur sogenannten Kreuzprotektion, die bewirkt, dass einem Stress ausgesetzte Zellen auch gegen andere Stressfaktoren, denen sie noch nie begegnet sind, resistent werden (Jenkins *et al.*, 1988). Die generelle Stressantwort dient nicht nur als fein abgestimmte, längerfristige Anpassung an widrige Bedingungen, welche lediglich langsames oder gar kein Wachstum zulassen, sondern liefert auch eine Notfallreaktion auf diverse

Stresse, die schnell und parallel zu spezifischen Stressantworten aktiviert wird ((Hengge-Aronis, 1996b), (Hengge-Aronis, 2000)). Stellt sich heraus, dass die spezifischen Stressantworten ausreichen, um mit den gegenwärtigen Bedingungen umgehen zu können, wird die generelle Stressantwort wieder abgeschaltet (Hengge, 2011).

1.3 Die bakterielle äußere Membran als erste Schutzbarriere

Gram-negative Bakterien besitzen eine Zellhülle bestehend aus einer inneren Membran, dem Periplasma und der äußeren Membran. Die äußere Membran ist eine asymmetrische Lipiddoppelschicht, die auf der periplasmatischen Seite Phospholipide sowie Lipoproteine und auf der extrazellulären Seite Lipopolysaccharide besitzt. Zudem befinden sich zahlreiche Proteine in der äußeren Membran. Viele von diesen sind integrale Proteine mit einer tonnenförmigen β-*barrel*-Konformation und unterschiedlichem Durchmesser. Zu Proteinen solcher Konformation gehören spezifische und unspezifische Porine, die als Diffusionskanäle durch die äußere Membran dienen. Proteine der äußeren Membran können ferner der Signalwahrnehmung, der Verankerung von Zellanhängen oder Transportprozessen dienen. Die äußere Membran übernimmt demnach diverse Aufgaben. Insbesondere dient sie aber einerseits der Aufnahme von Nährstoffen, andererseits dem Ausschluss von schädlichen Substanzen (Übersicht zur bakteriellen Zellhülle in (Silhavy *et al.*, 2010)).
Die Zusammensetzung der äußeren Membran ist variabel. Durch eine Regulation der Herstellung von Porinen kann die Permeabilität der äußeren Membran und somit der Kompromiss zwischen Aufnahme und Ausschluss von Substanzen beeinflusst werden. Die Grenzen dieser Regulationsmöglichkeit der Permeabilität der äußeren Membran sind unterschiedlich - sogar in verschiedenen *E. coli* K-12-Stämmen (Ferenci, 2005). In *E. coli* wird die Permeabilität der äußeren Membran generell durch das Verhältnis der Porine reguliert. Hierbei spielen vor allem die Außenmembranproteine OmpC und OmpF eine Rolle. Durch einen OmpF-Kanal können größere Substanzen diffundieren als durch OmpC. Die Regulation der Mengen von OmpC und OmpF erfolgt auf transkriptionaler Ebene durch das OmpR-EnvZ-Zweikomponentensystem. Die OmpF-Menge wird zusätzlich post-transkriptional durch die kleine „*antisense* RNA“ *micF* reguliert (Nikaido, 2003). Grundsätzlich wird die Permeabilität der äußeren Membran durch vermehrte OmpF-Produktion erhöht. Zum Beispiel kann Glukosemangel zu stark erhöhten OmpF-Mengen führen, wodurch die Permeabilität für gering konzentrierte Substrate verbessert wird (Liu & Ferenci, 2001). Ungünstige Umweltbedingungen, detektiert durch verschiedene Sensoren, führen hingegen zu geringeren OmpF-Mengen, sodass Substrate überwiegend über den kleineren Kanal, OmpC, aufgenommen werden. So kann *E. coli* beispielsweise in seinem natürlichen Habitat,

dem Säugetierdarm, das Eindringen von Gallensalzen in die Zelle verhindern (Nikaido, 2003). Auch eine physiologische Anpassung an Antibiotika, wie beispielsweise Tetracyclin, ist in *E. coli* durch eine post-translationale Regulation von Proteinen, welche für die Permeabilität von Bedeutung sind, zusammen mit der transkriptionalen Regulation von Genen, die für Membranproteine kodieren, möglich (Viveiros *et al.*, 2007). Demzufolge kann die äußere Membran Gram-negativer Bakterien als schützende Barriere dienen, indem sie das Einströmen lebensbedrohlicher Substanzen verhindert.

Eine weitere Membran-vermittelte Strategie Gram-negativer Bakterien, sich vor schädlichen Komponenten, wie Antibiotika, zu schützen, ist das aktive Herauspumpen dieser Substanzen mittels „*Efflux*pumpen“ über die äußere Membran hinweg (Nikaido, 2001). Die Überexpression solcher Effluxpumpen kann zur Resistenz gegen diverse schädliche Substanzen führen (Piddock, 2006).

Die Regulation der Außenmembranpermeabilität über die Porin-Mengen und die Kontrolle der Produktion von Effluxpumpen können auch gekoppelt sein. Beispielsweise wird die Herstellung wichtiger Effluxpumpensysteme in *E. coli* durch Transkriptionsregulatoren wie MarA, SoxS und Rob kontrolliert. Sowohl MarA als auch SoxS und Rob können außerdem die Transkription von *micF* aktivieren, der kleinen antisense RNA, welche durch Bindung die Translation der *ompF* mRNA verhindert. So kontrollieren MarA, SoxS und Rob nicht nur die Produktion von Effluxpumpensystemen, sondern auch die Porin-Regulation. Auf diese Weise können globale Transkriptionsregulatoren, induziert durch oxidativen Stress oder Chemikalien in der Umgebung, die Resistenz von Enterobakterien gegen eine Vielzahl von Antibiotika und schädlichen Substanzen erhöhen (zusammengefasst in (Nikaido, 2003), (Viveiros *et al.*, 2007)).

1.4 Die generelle Stressantwort

Zur Induktion der generellen Stressantwort in *E. coli* und verwandten Gram-negativen Bakterien wird der „*Master*regulator“ σ^S (RpoS, σ^{38}) benötigt. σ^S ist eine Sigmauntereinheit der RNA-Polymerase und ähnelt stark dem vegetativen Sigmafaktor σ^{70} (RpoD). Beide Sigmafaktoren erkennen ähnliche, aber nicht identische Promotorsequenzen.

Während der post-exponentiellen Wachstumsphase und des Übergangs in die Stationärphase wird σ^S durch eine fein abgestimmte Kombination aus transkriptionaler, translationaler sowie proteolytischer Kontrolle induziert. Doch auch wenn schnell wachsende Zellen plötzlich mit potentiell lebensbedrohlichen Stressbedingungen konfrontiert werden, kann es zu einer schnellen und starken Induktion der generellen Stressantwort kommen. Hierbei akkumulieren exponentiell wachsende *E. coli*-Zellen σ^S als Antwort auf Hitze-Schock,

DNA-Schäden, den plötzlichen Mangel an einer Nährstoffquelle, plötzlich erhöhte Osmolarität oder niedrigen pH. In Zellen, die mit niedrigeren Temperaturen (unter 30°C, aber höher als bei typischen Kälte-Schock-Bedingungen) konfrontiert werden, wird σ^S in einem langsameren Prozess induziert (Abb. 1 und (Hengge, 2011)).

σ^S aktiviert in *E. coli* direkt oder indirekt über 500 Gene (Weber *et al.*, 2005). Von diesen werden viele durch zusätzliche Signale reguliert, da σ^S mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren kooperieren kann und viele Zielgene in komplexen Kaskaden und „*feed-forward loops*“ kontrolliert. σ^S-regulierte Genexpression führt vor allem zu morphologischen Veränderungen, wobei die Zellen eher kürzer und runder als stäbchenförmig werden, Veränderungen des Metabolismus‘ sowie der Membran, Entwicklung diverser, starker Stressresistenzen und Zelladhäsion mittels „*Curli*-Fimbrien“ in Vorbereitung der Biofilmbildung. Demzufolge ermöglicht die Akkumulation von σ^S in Stationärphasenzellen sowie in schnell wachsenden, gestressten Zellen von *E. coli* das Überleben unter diversen Stressbedingungen, welche sonst für wachsende Zellen letal wären. Dies geschieht durch die Vermittlung von umfangreichen Stressresistenzen und Kreuzprotektion (Überblick in Abb. 1 und (Hengge, 2011)).

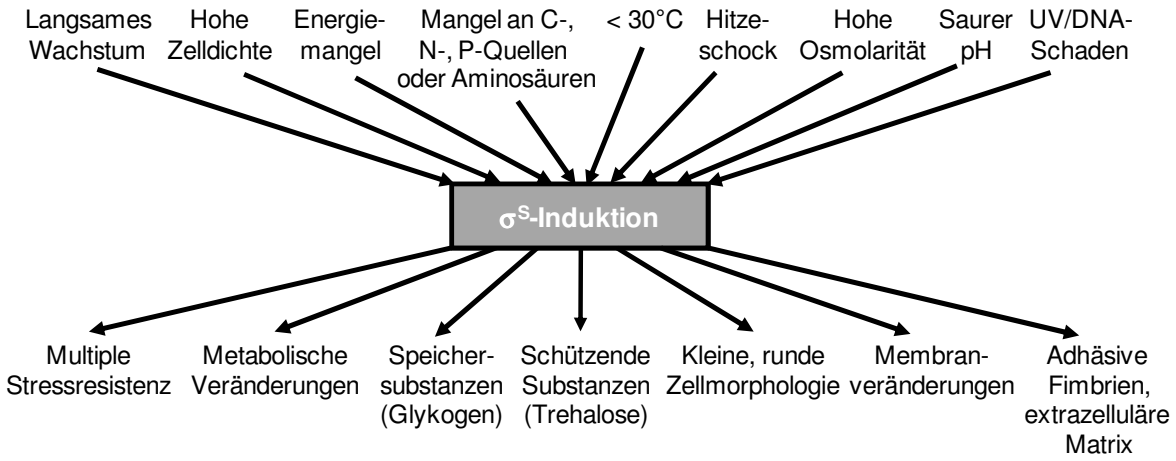


Abbildung 1: Induktion und phänotypische Konsequenzen der generellen Stressantwort. Aufgeführt sind die Stressbedingungen, welche zu einer Akkumulation von σ^S in der Zelle führen, sowie die phänotypischen Veränderungen aufgrund von erhöhten σ^S-Mengen (nach (Hengge, 2011)).

1.5 Osmotischer Stress

Osmotischer Stress entsteht für Bakterien, wenn der osmotische Druck ihrer Umgebung variabel, extrem niedrig oder extrem hoch ist. Der osmotische Druck ist abhängig von der Gesamtkonzentration der gelösten Substanzen in einer Lösung und wird oft genauer als „Osmolalität“ angegeben, dem osmotischen Druck bei einer bestimmten Temperatur mit der

Einheit osmol/kg des Lösungsmittels. Die Osmolalität der Umgebung kann durch diverse lösliche Substanzen, wie Zucker oder Salze, beispielsweise NaCl, erhöht werden. Bakterielle Cytoplasmamembranen sind semipermeabel. Dadurch kann Wasser bei niedriger Osmolalität der Umgebung in eine Zelle hinein und bei erhöhter Umgebungsosmolalität aus der Zelle heraus fließen. Die Volumenzunahme der Zelle durch das Einströmen von Wasser wird durch die Elastizität der Zellwand begrenzt. Dabei entsteht ein Turgordruck. Eine Abnahme des Cytoplasmavolumens durch das Ausströmen von Wasser kann zum Schrumpfen der Zelle, Ablösen und Auffalten der Cytoplasmamembran und Plasmolyse führen. Auch biochemische Prozesse im Cytoplasma werden behindert. Infolge der sinkenden Membranspannung werden membranassoziierte Systeme, wie Transportsysteme und die Atmungskette, funktionsunfähig (Überblick über osmotischen Stress in (Wood, 2011)).

E. coli ist moderat halotolerant und kann sich daher gut an verschiedene Osmolalitäten anpassen. Die Antwort auf verringerte Umgebungsosmolalität besteht vor allem im Öffnen mechanosensitiver Kanäle, wie MscS und MscL, infolge steigenden Turgors und erhöhter Membranspannung ((Martinac *et al.*, 1987), (Martinac *et al.*, 1990), (Sukharev *et al.*, 1999), (Sukharev, 2002)). Beim Öffnen dieser Kanäle entstehen große, nicht-selektive Poren mit bis zu etwa 4nm Durchmesser (Cruickshank *et al.*, 1997). Durch jene werden verschiedene Moleküle aus der Zelle abgegeben, das Wasser folgt und eine Zelllyse ist verhindert (Levina *et al.*, 1999). Wird *E. coli* mit hoher Umgebungsosmolalität konfrontiert, kommt es schnell zur Plasmolyse, der Turgor sinkt und die Zelle schrumpft. Innerhalb kurzer Zeit hört die Atmung auf (Meury, 1994), während die intrazelluläre ATP-Konzentration ansteigt (Ohwada & Sagisaka, 1987). Als eine erste Antwort auf Hyperosmolarität erfolgt eine verstärkte Aufnahme von Kalium (Dinnbier *et al.*, 1988). Nach der anfänglichen Akkumulation von Kaliumionen, setzen verschiedene sekundäre Anpassungsmechanismen ein. Dazu gehören die Akkumulation von Glutamat als Gegenion (McLaggan *et al.*, 1994), die Synthese von Trehalose (Strom & Kaasen, 1993) und die Abgabe von Putrescin (Schiller *et al.*, 2000). Sind sogenannte „*Osmoprotectants*“, wie Glycin-Betain oder Prolin, in der Umgebung verfügbar, werden diese aufgenommen, um den Innendruck der *E. coli*-Zelle wieder zu erhöhen. Die Aufnahme erfolgt dabei hauptsächlich über zwei osmotisch regulierte Permeasen, ProP und ProU (Grothe *et al.*, 1986).

Ein wichtiger „Osmoregulator“ ist σ^S. So akkumuliert σ^S in wachsenden *E. coli*-Zellen unter hyperosmotischem Stress (Hengge-Aronis, 1996a) und es erfolgt eine σ^S-abhängige Expression von 326 Genen. 186 dieser Gene wurden nicht unter anderen Bedingungen, unter denen σ^S akkumuliert, exprimiert (Weber *et al.*, 2005) . Unter anderem aktiviert σ^S das *otsBA*-Operon, in welchem Gene für die Enzyme der Trehalose-Herstellung kodiert werden (Hengge-Aronis *et al.*, 1991). Eine Reihe von Genen, die unter hyperosmotischem Stress

stark aktiviert werden, wird auch durch σ^S kontrolliert und in Stationärphasenzellen induziert. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *osmC*, welches eine Peroxidase mit Präferenz für organische Hydroperoxide kodiert und deren Verlust zu erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führt ((Gordia & Gutierrez, 1996), (Conter *et al.*, 2001), (Lesniak *et al.*, 2003)). Interessanterweise sind einige der unter hyperosmotischem Stress hochregulierten Proteine unter oxidativem Stress von großer Bedeutung. Viele der Proteine, die unter erhöhter Umgebungsosmolalität verstärkt exprimiert werden, spielen demnach eher eine generellere Rolle, indem sie die Bakterienzelle durch Kreuzprotektion gegen diverse Stressbedingungen schützen (Weber *et al.*, 2006).

1.6 Hitzestress

1.6.1 Die Wachstumsrate von *E. coli* unter verschiedenen Temperaturen

E. coli ist ein mesophiles Bakterium. Normales Wachstum erfolgt bei Temperaturen zwischen etwa 25°C und 37°C. Beim Wachstum innerhalb dieses Temperaturbereichs wird in *E. coli* weder eine Hitzeschockantwort noch eine Kälteschockantwort ausgelöst und die zelluläre Zusammensetzung bleibt relativ konstant. Unter sukzessiv höheren oder niedrigeren Temperaturen hingegen, nimmt die Wachstumsrate ab, bis entweder eine letal hohe Temperatur (rund 47°C - 50°C, abhängig vom Stamm und Medium) oder die niedrigste Temperatur für kontinuierliches Wachstum (ca. 8°C) erreicht ist. Bei Temperaturen über 37°C wird in *E. coli* eine Hitzeschockantwort ausgelöst. Bei 15°C oder weniger erfolgt eine klassische Kälteschockantwort. Unter beiden Bedingungen verändert sich die zelluläre Zusammensetzung (zusammengefasst in (Lim & Gross, 2011)).

1.6.2 Grundlagen der Hitzeschockantwort

Das Grundprinzip der Hitzeschockantwort ist im Allgemeinen für alle Organismen gültig. Unter nicht-normalen, aber nicht-letalen Temperaturen, aktivieren ein oder mehrere Signaltransduktionssysteme einen oder mehrere Transkriptionsfaktor(en), welcher bzw. welche die Transkription sogenannter „Hitzeschockgene“ verstärkt bzw. verstärken. Dies führt zur Überproduktion von Hitzeschockproteinen. Der jeweilige, aktivierte Transkriptionsfaktor ist spezifisch für den entsprechenden Organismus. In *E. coli* ist dies der alternative Sigmafaktor σ^{32} (RpoH, σ^H), welcher auch als „Hitzeschock-Sigmafaktor“ bezeichnet wird. Ein Teil der Hitzeschockproteine wird in allen Organismen durch Hitzestress

induziert. Dies betrifft Chaperone und Proteasen, welche die native Konformation von Proteinen schützen bzw. herstellen oder irreversibel geschädigte Proteine abbauen. Die Allgemeingültigkeit dieser Antwort deutet darauf hin, dass alle Organismen aufgrund erhöhter Temperatur mit Proteinfaltungsstress konfrontiert werden (Überblick in (Lim & Gross, 2011)).

Unter letal hohen Temperaturen wird die maximale Produktion von Hitzeschockproteinen solange fortgesetzt wie die Zelle Proteine synthetisieren kann. Im Gegensatz dazu verläuft die Hitzeschockantwort unter nicht-letal hohen Temperaturen in distinkten Phasen. Zuerst erfolgt die Induktionsphase, in welcher die Aktivierung des Transkriptionsfaktors zu einem schnellen Anstieg der zellulären Konzentration an Hitzeschockproteinen führt. Als nächstes folgt die Anpassungsphase, in welcher die Antwort entsprechend in Anpassung an die jeweilige neue, hohe Wachstumstemperatur herunter reguliert wird (Straus *et al.*, 1987). Zuletzt tritt die Dauerzustandsphase ein, in welcher die Hitzeschockproteine in einer der Wachstumstemperatur angemessenen Menge beibehalten werden (Straus *et al.*, 1989). Sind Zellen „vorangepasst“ an eine hohe, nicht-letale Temperatur bevor sie einer letalen Temperatur ausgesetzt werden, setzt ein schützender Effekt ein, der als „Thermotoleranz“ bezeichnet wird und zu einer lag-Phase führt bevor der Zelltod einsetzt (VanBogelen *et al.*, 1987). Begegnen Zellen nach hohen, nicht-letalen Temperaturen niedrigeren Temperaturen, wird die Produktion der Hitzeschockproteine gehemmt, sodass jene wieder in der Menge vorliegen, in welcher sie bei dieser Temperatur benötigt werden (Lim & Gross, 2011).

Letale Temperaturen führen unter anderem zu Brüchen in der DNA sowie Schäden der Cytoplasmamembran, Ribosomen und rRNA. Trotzdem ist bis heute nur die Menge an ungefalteten Proteinen als Signal zur Kontrolle der Hitzeschockantwort bekannt. Da jedoch noch einige Verständnislücken bestehen, ist es sehr wahrscheinlich, dass zusätzliche Signale existieren, die im komplexen Kontrollnetzwerk der Hitzeschockantwort eine Rolle spielen (Lim & Gross, 2011).

Die Funktionen der Gene des σ^{32}-Regulons befassen sich mit den zahlreichen schädlichen Konsequenzen des Hitzestresses. Gene dieses Regulons tragen daher zur Proteinhomöostase bei, schützen vor Schäden der DNA, Ribosomen und rRNA. Ein großer Teil der Gene des σ^{32}-Regulons dient zudem dem Schutz und Ausbessern der inneren Membran. Ferner werden im σ^{32}-Regulon viele Transkriptionsfaktoren kodiert. Demzufolge kann σ^{32} nicht nur direkt die Gene seines Regulons sondern zusätzlich viele weitere Gene auf indirekte Weise regulieren. Dies ermöglicht ein Ineinandergreifen der Hitzeschockantwort mit weiteren Antworten in der Zelle (Übersicht in (Lim & Gross, 2011)).

1.6.3 Die Regulation der Hitzeschockantwort in *E. coli*

E. coli kann Temperaturen sehr genau wahrnehmen. Dies wird durch zwei verschiedene Strategien ermöglicht.

Zum einen existiert eine „*feed-forward*"-Antwort, welche die Translationsrate von σ^{32} kontrolliert. Die für σ^{32} kodierende *rpoH*-mRNA besitzt eine inhibitorische Struktur, welche die Translation bei niedrigen Temperaturen einschränkt. Unter höheren Temperaturen schmilzt diese mRNA-Struktur auf, wodurch eine verstärkte σ^{32}-Produktion erfolgt, noch bevor sich Hitzeschäden in der Zelle anhäufen ((Morita *et al.*, 1999a), (Morita *et al.*, 1999b)). Dies macht einen Teil der schnellen Induktionsphase der Hitzeschockantwort aus.

Zum anderen existieren homöostatische Kontrollmechanismen als Antwort auf Hitzeschäden in der Zelle. Diese regeln die Aktivität und Stabilität von σ^{32} und werden zumindest teilweise durch σ^{32}-kontrollierte Hitzeschockproteine vermittelt. Die zwei wichtigsten ATP-abhängigen Chaperonsysteme in *E. coli* sind das DnaK/DnaJ/GrpE-System und das GroEL/S-System. Beide kontrollieren die Aktivität von σ^{32}. Dabei sind beide Chaperonsysteme nicht nur für die Rückfaltung von Proteinen verantwortlich, sondern binden auch natives σ^{32} ((Gamer *et al.*, 1996), (Tatsuta *et al.*, 2000), (Guisbert *et al.*, 2004)). DnaJ verstärkt die Bindung von DnaK an σ^{32}, indem DnaJ σ^{32} bindet und dabei eine Region von σ^{32}, nahe der DnaK-Bindestelle, destabilisiert (Rodriguez *et al.*, 2008). GrpE ist der Nukleotidaustauschfaktor für DnaK und DnaJ ((Skowyra & Wickner, 1995), (Packschies *et al.*, 1997)). Eine Aktivitätskontrolle erfolgt, wenn σ^{32} und folglich σ^{32}-transkribierte Chaperone im Überschuss vorhanden sind. Diese Situation tritt während der Anpassungsphase der Hitzeschockantwort ein sowie unter verringerten Temperaturen und, wenn σ^{32} in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, da es überexprimiert oder sein Abbausystem ausgeschaltet wurde ((Tomoyasu *et al.*, 1998), (Guisbert *et al.*, 2004)). Eine Aktivitätskontrolle wird wahrscheinlich auch in der Dauerzustandsphase benötigt, um unumgängliche Schwankungen der σ^{32}-Menge auszugleichen. Es wird angenommen, dass das Aktivitätskontrollsystem die Menge an ungefalteten Proteinen in der Zelle relativ zur Menge der aktiven Chaperone misst. Die meisten Chaperone sind in Interaktionen mit ungefalteten Proteinen involviert und binden daher unter normalen Bedingungen nicht mehr an σ^{32}. Sind im Verhältnis zu ungefalteten Proteinen überschüssige Chaperone vorhanden, sind mehr freie Chaperone verfügbar, die länger an σ^{32} binden und dieses somit inaktivieren. Mittlerweile wird angenommen, dass die Aktivitätskontrolle komplexer ist als eine Konkurrenz von Chaperonen und RNA-Polymerase um die Bindung von σ^{32}. Der genaue Mechanismus ist jedoch bislang nicht bekannt (Lim & Gross, 2011). Die Stabilität von σ^{32} wird durch die an und in der inneren Membran lokalisierte Protease FtsH kontrolliert. Diese baut sowohl σ^{32} als auch nicht-assemblierte oder

beschädigte Proteine der inneren Membran ab (Ito & Akiyama, 2005). Das DnaK/DnaJ-Chaperonsystem trägt zum schnellen σ^{32}-Abbau durch FtsH bei ((Straus *et al.*, 1990), (Tomoyasu *et al.*, 1998)). Bislang wurde die hauptsächliche σ^{32}-Abbaukontrolle unter erhöhten Temperaturen beobachtet. Unter diesen Bedingungen wurde das sonst sehr instabile σ^{32} vorübergehend stabilisiert (Straus *et al.*, 1987). Auch dies trägt zur schnellen Induktionsphase der Hitzeschockantwort bei, wobei eine σ^{32}-Abbaukontrolle zum Ausgleich unumgänglicher Schwankungen der σ^{32}-Mengen in der Dauerzustandsphase ebenso wahrscheinlich ist. Viele Details des σ^{32}-Abbaus und dessen Regulation sind bisher noch ungeklärt (Lim & Gross, 2011).
Die Hitzeschockantwort ist eine unmittelbare und robuste Antwort auf hohe Temperaturen. Diverse molekulare Details der Hitzeschockantwort und ihrer Regulation sind jedoch noch unbekannt und demzufolge Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.6.4 Zusammenwirken der Hitzeschockantwort mit anderen Stressantworten

σ^{32} spielt die zentrale Rolle in der Hitzeschockantwort sowie hinsichtlich der Fähigkeit einer Zelle unter hohen Temperaturen zu wachsen. So sind die σ^{32}-kontrollierten Gene für die unmittelbare Antwort auf Hitzestress verantwortlich, werden mehrere Minuten nach dem Auftreten der erhöhten Temperatur maximal exprimiert und werden stärker Temperatur-abhängig induziert als andere Genklassen, die durch Hitzestress reguliert werden. Zellen, denen σ^{32} fehlt, sind nicht in der Lage bei Temperaturen über 20°C zu wachsen und Zellen mit suboptimalen σ^{32}-Mengen können unter erhöhten Temperaturen nur begrenzt wachsen (Zhou *et al.*, 1988). In einem Stamm, dem σ^{32} fehlt, ermöglicht die Produktion der beiden Chaperonsysteme DnaK/DnaJ/GrpE und GroEL/S wieder ein Wachstum bei Temperaturen von bis zu 42°C (Kusukawa & Yura, 1988). Ferner kann ein Stamm, dem σ^{32} fehlt, aufgrund eines Insertionselementes in der Promotorregion von *groES groEL* und infolgedessen erhöhten GroEL/S-Mengen (Stamm BB7224), wenn auch nur langsam, bei Temperaturen von bis zu 40°C wachsen. Trotzdem dieser *E. coli*-Stamm nur über geringe Mengen aller σ^{32}-kontrollierten Proteasen und Chaperone, mit Ausnahme von GroEL/S, verfügt, kann er bei einer Temperatur von 30°C kultiviert werden (Tomoyasu *et al.*, 2001).
Trotzdem vermittelt σ^{32} nicht ganz allein das Überleben von Zellen unter Hitzestress. Auch die beiden Sigmafaktoren σ^{E} und σ^{S} werden durch erhöhte Temperaturen induziert. Dies erfolgt jedoch langsamer und weniger stark als für σ^{32}. Ihre Regulons steuern wichtige Stress-relevante Funktionen bei. σ^{E} (RpoE, σ^{24}) vermittelt in *E. coli* die Antwort auf Stress, welcher die Zellhülle betrifft. Die Gene des σ^{E}-Regulons werden daher insbesondere für die

Aufrechterhaltung der Homöostase der äußeren Membran benötigt (Überblick über die σ^E-vermittelte Stressantwort in (Ades *et al.*, 2011)). Eine Kopplung von σ^{32}- und σ^E-vermittelter Stressantwort besteht darin, dass einer der Promotoren, die zur Expression von σ^{32} führen, durch σ^E transkribiert wird. Hierbei nimmt der Transkriptionsanteil dieses Promotors an der σ^{32}-Expression mit steigender Temperatur zu. Auch der Masterregulator der generellen Stressantwort, σ^S, wird durch Hitze induziert und Zellen, denen σ^S fehlt, überleben schlechter unter sehr hohen Temperaturen. Mindestens zwei σ^S-vermittelte Funktionen sind vermutlich zum Überleben von Hitzestress wichtig. Zum einen ist dies die Produktion von Enzymen, wie Katalase, welche freie Radikale beseitigen und infolgedessen die Wahrscheinlichkeit der Schädigung von Makromolekülen, insbesondere der DNA, verringern. Zum anderen kann die σ^S-vermittelte Herstellung von Trehalose dem besseren Überleben unter Hitzestress dienen. Trehalose ist ein Zucker, der Proteine und Membranen sowohl unter osmotischem Stress als auch bei Hitze schützen kann. Neben σ^S trägt unter hohen Temperaturen auch σ^{32} zur Trehalosesynthese bei. Zusätzlich gibt es eine Verbindung zwischen der σ^{32}-, σ^E- und σ^S-vermittelten Stressantwort. Alle drei Stressantworten werden beim Übergang in die stationäre Phase und durch Hitze induziert, wobei σ^S und σ^E beim Übergang in die Stationärphase stärker induziert werden als σ^{32} (Überblick über das Zusammenwirken der σ^{32}-vermittelten Stressantwort mit anderen Stressantworten in (Lim & Gross, 2011)). Demzufolge liegt auch hier ein Beispiel dafür vor, dass verschiedene Stressantworten kooperieren, um das Überleben von *E. coli* unter Stressbedingungen zu ermöglichen.

1.6.5 Evolution Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme

Mit dem Prozess und dem Mechanismus der evolutionären Anpassung von Bakterien an Hitze befasst sich die Arbeit von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010). Hier wird der *E. coli*-Stamm MG1655 betrachtet, welcher in LB-Flüssigkulturen eine maximale Wachstumstemperatur von 45,5°C besitzt. MG1655-Zellen wurden entweder kontinuierlich bei 37°C (BM3) oder bei sukzessiv höheren Temperaturen, wie 42°C (BM15), 45°C (BM16), 48°C (BM25) und 48,5°C (BM28), kultiviert. Die maximale Wachstumstemperatur von 48,5°C (BM28) wurde nach schrittweiser Erhöhung der Temperatur über 620 Generationen erreicht. Eine weiterführende, kontinuierliche Kultivierung bei 48,5°C für weitere ca. 600 Generationen führte zu keiner zusätzlich erhöhten Hitzeresistenz. Der für nahezu 3000 Generationen bei 37°C kultivierte BM3-Stamm weist mit 45,5°C dieselbe maximale Wachstumstemperatur auf wie der Ursprungsstamm. Die relative Fitness und demnach die Wachstumsrate eines evolvierten Stamms im Verhältnis zu jener des Ursprungsstamms bei 37°C ist für BM15

(42°C) höher, für BM16 (45°C), BM25 (48°C) und BM28 (48,5°C) jedoch geringer. Die verringerte Fitness der an höhere Temperaturen angepassten Zellen deutet darauf hin, dass im Laufe des Evolutionsprozesses Mutationen entstanden sind. Betrachtungen der Proteome zeigen, dass in den Hitze-resistenten Stämmen im Vergleich zum Kontrollstamm, BM3, insbesondere Hitzeschockproteine, wie ClpB, DnaK, GroEL, GroES, HtpG und YedU, sowie die Lysyl-tRNA-Synthetase, LysU, vermehrt produziert werden (Abb. 2). Die GroEL/S-Menge ist dabei im Hitze-resistenten BM28-Stamm 16-fach höher als in ungestressten Wildtypzellen. Sequenzierungen der Gene *rpoH*, *dnaK*, *groEL*, *groES*, *htpG* und *yedU* inklusive ihrer Promotorbereiche ergaben, dass weder der Kontrollstamm noch die Hitze-resistenten Stämme in diesen Regionen Mutationen aufweisen. Insgesamt zeigen die Daten von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010), dass für die Hitzeresistenz nur die erhöhten GroEL/S-Mengen in Anwesenheit von LysU benötigt werden. Vermutlich besteht die wesentliche Rolle von GroEL/S in den evolvierten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen darin, die Faltung thermolabiler oder mutierter Proteine zu ermöglichen und diese somit aktiv zu halten. Die extreme Hochregulierung von GroEL/S scheint demnach von zentraler Bedeutung für die Evolution der Hitzeresistenz in *E. coli* zu sein.

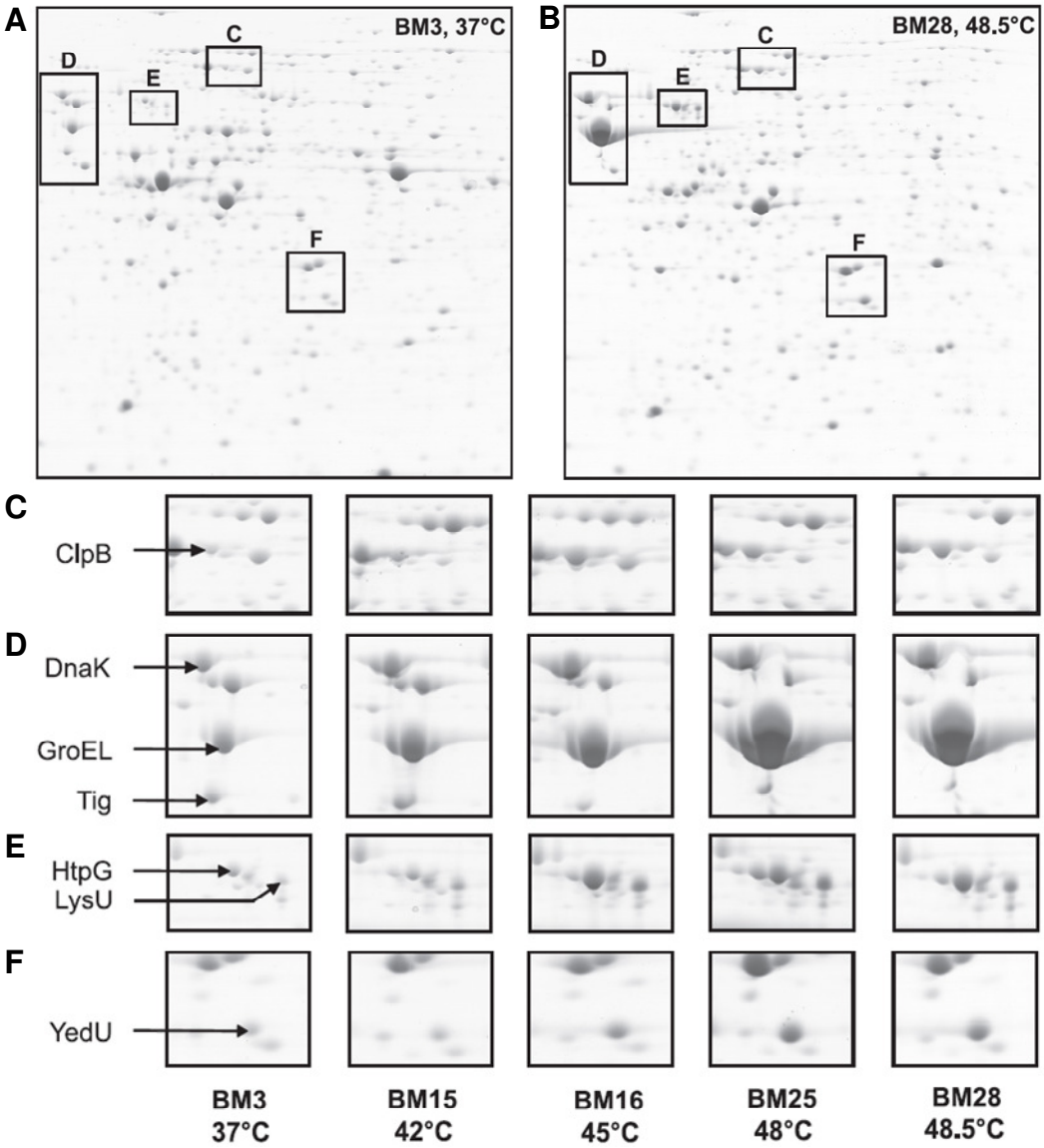


Abbildung 2: Hohe Mengen an Hitzeschockproteinen in evolvierten Hitze-resistenten *E. coli*-Zellen. Übernachtkulturen von BM3, BM15, BM16, BM25 und BM28, die bei ihrer jeweils spezifischen Wachstumstemperatur gewachsen waren, wurden auf 2D-Gelen analysiert. Abgebildet sind die 2D-Gele von BM3 (A) und BM28 (B), wobei die Regionen mit Hitzeschockproteinen jeweils mit Boxen markiert sind. Die aufgetrennten Proteine weisen einen isoelektrischen Punkt von 3 - 10 (von links nach rechts) und ein Molekulargewicht zwischen 150 und 10 kDa (von oben nach unten) auf. In C - F sind ausgewählte Regionen von 2D-Gelen abgebildet, welche Veränderungen in den Spot-Intensitäten der Hitzeschockproteine (mit Pfeilen markiert) zeigen (übernommen aus (Rudolph *et al.*, 2010)).

1.7 Oxidativer Stress und hypochlorige Säure (HOCl)

1.7.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Im aeroben Stoffwechsel entsteht aus molekularem Sauerstoff (O_2) durch Übertragung von vier Elektronen in der Atmungskette Wasser (H_2O). Wird der molekulare Sauerstoff nicht vollständig zu Wasser reduziert, entstehen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Bei der Reduktion des molekularen Sauerstoffs mit einem Elektron entsteht Superoxid (O_2^-). Die Reduktion molekularen Sauerstoffs mit zwei Elektronen führt zur Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und werden drei Elektronen übertragen, entsteht ein Hydroxylradikal ($^{\cdot}OH$). ROS entstehen demnach unweigerlich als Nebenprodukte der aeroben Atmung und sind sehr reaktiv (Imlay, 2008). ROS entstehen auch in Anwesenheit redoxaktiver Verbindungen, wie Paraquat, oder werden vom Immunsystem des Wirtes als Antwort auf eine Entzündung oder bakterielle Infektion generiert. Aufgrund ihrer oxidierenden Eigenschaften können ROS viele Makromoleküle stark schädigen. Die Anhäufung von ROS und infolgedessen von oxidativen Schäden führt zum sogenannten oxidativen Stress, welcher bereits mit Alterungsprozessen und Krankheiten, wie Diabetes, Krebs, Herzerkrankungen sowie chronischen Entzündungskrankheiten und verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, beispielsweise Alzheimer- und Parkinson-Krankheit, in Verbindung gebracht wurde ((Markesbery, 1997), (Kyselova *et al.*, 2002), (Calabrese *et al.*, 2003), (Jenner, 2003), (Maritim *et al.*, 2003), (Popov *et al.*, 2003), (Bandyopadhyay *et al.*, 2004), (Pashkow, 2011)).

1.7.2 Antworten auf oxidativen Stress

Es gibt verschiedene Enzyme zum Abbau von ROS. So wird O_2^- durch Superoxiddismutase in H_2O_2 überführt. H_2O_2 wiederum kann mittels Katalase oder Alkylhydroperoxidreduktase unter Entstehung von Wasser abgebaut werden oder aber mit einem reduzierten Eisenion (Fe^{2+}) reagieren. Letzteres erfolgt in der Fenton-Reaktion, in welcher ein Hydroxylradikal entsteht. Die sehr reaktiven Hydroxylradikale können im Gegensatz zu O_2^- und H_2O_2 nicht enzymatisch abgebaut werden. Auch die Enzyme Thioredoxin und Glutaredoxin, welche oxidierte Thiole reduzieren, tragen wesentlich zum Schutz von Proteinen und Zellen gegen oxidativen Stress bei. In *E. coli* existieren zudem verschiedene induzierbare Antworten auf oxidativen Stress. Beispielsweise aktivieren redoxaktive Verbindungen wie Paraquat oder Menadion und erhöhte Mengen von O_2^- den Transkriptionsfaktor SoxR ((Imlay, 2008), (Gu & Imlay, 2011)). Die Aktivierung von SoxR erfolgt dabei durch die Oxidation der beiden Eisen-

Schwefel-Cluster eines SoxR-Dimers (Hidalgo *et al.*, 1997). Das oxidierte SoxR aktiviert die Expression des Transkriptionsregulators SoxS, welcher die Transkription der Gene des SoxRS-Regulons initiiert ((Amabile-Cuevas & Demple, 1991), (Wu & Weiss, 1991)). Unter anderem wird in diesem Regulon Superoxiddismutase kodiert. Insgesamt dienen die Gene des SoxRS-Regulons vor allem dem Schutz vor redoxaktiven Verbindungen, O_2^--vermittelten Schäden, der Beseitigung sowie Regeneration beschädigter Makromoleküle und der Wiederherstellung des NADPH-Pools der Zelle ((Blanchard *et al.*, 2007), (Gu & Imlay, 2011)). Erhöhte H_2O_2-Mengen hingegen aktivieren den Transkriptionsfaktor OxyR. OxyR bildet Tetramere und wird aktiviert, indem H_2O_2 zwei invariante Cysteinreste der OxyR-Monomere oxidiert, wodurch intramolekulare Disulfidbrücken entstehen ((Storz *et al.*, 1990), (Zheng *et al.*, 1998), (Choi *et al.*, 2001)). Das oxidierte OxyR initiiert die Transkription der Gene des OxyR-Regulons. In diesem Regulon werden beispielsweise die Katalase KatG, die Komponenten der Alkylhydroperoxidreduktase, AhpC und AhpF, das DNA- sowie Eisen-bindende Protein Dps, Glutaredoxin (Grx1) und Glutathion-Reduktase (Gor) kodiert (Zheng *et al.*, 2001). Die Gene des OxyR-Regulons dienen hauptsächlich dem Schutz vor H_2O_2-vermittelten Schäden, der Beseitigung sowie Regenerierung beschädigter Makromoleküle, der Wiederherstellung des NADPH-Pools der Zelle und der Autoregulation über das Glutathion-Glutaredoxin-1-System. Außerdem vermittelt σ^S in der stationären Phase Resistenz gegen oxidativen Stress ((Lange & Hengge-Aronis, 1991b), (McCann *et al.*, 1991)). Demnach verfügt *E. coli* über diverse Mechanismen und Stressantworten zum Schutz vor oxidativen Schäden und Überleben unter oxidativem Stress.

1.7.3 Entstehung, Verwendung und Reaktionen von HOCl

Hypochlorige Säure (HOCl) ist eine weitere, sehr reaktive und bakterizide ROS. Die bakterizide Wirkung von HOCl machen sich Natur und Mensch zu Nutze. Bei einer bakteriellen Infektion zum Beispiel schließen Neutrophile die Bakterien in Phagosomen ein und produzieren, im Rahmen eines ihrer antimikrobiellen Systeme, mittels Myeloperoxidase aus H_2O_2 und Chloridionen HOCl ((Klebanoff, 2005), (Winterbourn *et al.*, 2006)). In *Drosophila* generiert Myeloperoxidase HOCl in Darmepithelzellen, um die bakterielle Besiedlung zu kontrollieren (Ha *et al.*, 2005). Ferner ist HOCl auch als „Bleiche“ bekannt und findet als starkes Desinfektionsmittel weltweit im Haushalt, in Krankenhäusern, bei der Wasseraufbereitung und in der Lebensmittelindustrie Anwendung (Rutala & Weber, 1997).
HOCl ist sehr reaktiv und kann direkt oder indirekt mit zellulären Makromolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden reagieren und infolgedessen zu Mutationen, Beeinträchtigungen von Protein- sowie Membranfunktionen führen ((Dukan & Touati, 1996), (Hawkins *et al.*, 2003),

(Davies, 2005)). In Proteinen reagiert HOCl am häufigsten mit den Seitenketten der Aminosäuren Methionin und Cystein. Bei der Reaktion von HOCl mit Methioninresten entsteht hauptsächlich Methioninsulfoxid, während bei der Reaktion mit Cysteinresten vor allem Disulfidbrücken und, durch Oxidation, Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäuren entstehen ((Hawkins *et al.*, 2003), (Davies, 2005)).

1.7.4 Bakterielle Resistenzmechanismen gegen HOCl

Da HOCl sehr reaktiv sowie bakterizid ist und sowohl vom Wirt generiert als auch als Desinfektionsmittel eingesetzt wird, ist es für Bakterien von großer physiologischer Bedeutung. Trotzdem sind die Mechanismen der bakteriziden Wirkung von HOCl bislang nur ungenau beschrieben und Resistenz- sowie Schutzmechanismen gegen HOCl nur wenig untersucht.

Bekannt ist, dass HOCl in *E. coli* Gene der Hitzeschockantwort und des SoxRS-Regulons induziert ((Dukan *et al.*, 1996), (Wang *et al.*, 2009)). Teilweise wird in *E. coli* die HOCl-Resistenz durch Gene vermittelt, welche der Resistenz gegen H_2O_2 dienen oder die durch H_2O_2-Stress induziert werden. Dem liegt vermutlich zugrunde, dass HOCl und H_2O_2 die gleichen ROS generieren können. Da sich HOCl und H_2O_2 jedoch insbesondere in ihren reaktiven Eigenschaften unterscheiden, sind die Schutzmechanismen gegen diese beiden ROS, auch wenn sie zum Teil die gleichen Gene involvieren, verschieden (Dukan & Touati, 1996). In der stationären Phase sowie in Zellen mit erhöhten σ^S-Mengen wird die HOCl-Resistenz von *E. coli*-Zellen durch σ^S vermittelt, wobei insbesondere das DNA-bindende Protein Dps und zu einem geringeren Anteil Katalasen eine Rolle zu spielen scheinen. Wodurch Dps die HOCl-Resistenz vermittelt ist noch unbekannt. Es wird angenommen, dass dies auf DNA-schützende Funktionen von Dps zurückzuführen ist ((Dukan & Touati, 1996), (Barth *et al.*, 2009)).

Dem Schutz vor Aggregation entfalteter Proteine unter HOCl-Stress dient in *E. coli* das redox-regulierte Chaperon Hsp33. Im Gegensatz zu den meisten Zellproteinen, die durch HOCl inaktiviert werden, wird Hsp33 und somit seine Chaperonfunktion durch oxidative Entfaltung unter HOCl-Stress oder oxidativem Stress bei hohen Temperaturen aktiviert. So erhöht auch Hsp33 die HOCl-Resistenz von *E. coli* ((Jakob *et al.*, 1999), (Winter *et al.*, 2005), (Winter *et al.*, 2008)).

Mit Hilfe einer genomischen Expressionsbibliothek konnte YjiE, ein HOCl-spezifischer Transkriptionsfaktor, identifiziert werden. YjiE ist in Proteobakterien und Eukaryonten konserviert. Es handelt sich um einen LysR-Typ-Transkriptionsregulator (LTTR), der ringförmige Dodekamer-Strukturen und unter HOCl-Stress überwiegend kleinere Oligomere,

wie Dimere und Tetramere, bildet. Unter HOCl-Stress reguliert YjiE zahlreiche Gene. Beispielsweise werden durch YjiE unter HOCl-Stress Gene der Cystein- und Methionin-Biosynthese sowie des Schwefelmetabolismus‘ hoch und Gene der Eisenaufnahme sowie Eisenhomöostase herunter reguliert. Insbesondere indem YjiE so die intrazellulären Eisen-Mengen und somit auch die Bildung weiterer intrazellulärer ROS reduziert, vermittelt es eine HOCl-Resistenz von *E. coli*-Zellen (Gebendorfer *et al.*, 2012).
All diese Mechanismen tragen anteilig zur HOCl-Resistenz in *E. coli* bei. Trotz dieser Erkenntnisse ist bislang kein Mechanismus zur spezifischen Inaktivierung oder dem Abbau von HOCl in Bakterien bekannt. Aufgrund der enormen physiologischen Bedeutung von HOCl für Bakterien, ist es daher sehr wahrscheinlich, dass ihnen weitere, bisher unbekannte, hochentwickelte Resistenz- und Schutzmechanismen gegen diese sehr reaktive und bakterizide ROS zur Verfügung stehen.

1.8 Zielstellung

HOCl ist eine sehr reaktive, bakterizide ROS und für Bakterien von außergewöhnlicher physiologischer Bedeutung. Infolge des weitverbreiteten Einsatzes als Desinfektionsmittel und der Verwendung zur Abtötung von Bakterien im Wirt, werden Bakterien häufig mit HOCl konfrontiert. Im starken Kontrast dazu stehen die bislang sehr limitierten Erkenntnisse über bakterielle Schutz- und Resistenzmechanismen gegen HOCl. Das Verständnis von bakteriellen Mechanismen zum Schutz vor und zur Resistenz gegen HOCl-Stress würde jedoch Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von HOCl ermöglichen. Erst mit diesem Wissen ist es möglich, zu verstehen, wie bakterielle Infektionen von einem Wirt bekämpft werden und neue Desinfektionsstrategien zu entwickeln. Das Ziel dieser Arbeit besteht daher in der Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme, um neue Erkenntnisse über bakterielle HOCl-Resistenzmechanismen zu erhalten.
Zunächst sollten zu diesem Zweck mit Hilfe einer genomischen Expressionsbibliothek Gene identifiziert werden, die eine erhöhte HOCl-Resistenz vermitteln. Hierfür stand jene genomische Expressionsbibliothek zur Verfügung, mit welcher bereits ein σ^S-vermittelter Schutz vor HOCl-Schäden (Barth *et al.*, 2009) sowie der erste HOCl-spezifische Transkriptionsfaktor, YjiE (Gebendorfer *et al.*, 2012), identifiziert werden konnte. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die bakterielle HOCl-Resistenz auf der Interaktion diverser Gene innerhalb komplexer Netzwerke beruht. Eine genomische Bibliothek eignet sich jedoch nicht dafür, solche zu identifizieren. Sie ermöglicht lediglich die Identifizierung einzelner Resistenz-vermittelnder Gene. Aus diesem Grund sollten zusätzlich HOCl-resistente *E. coli*-Stämme evolviert werden. Die anschließende Analyse und Charakterisierung der evolvierten Stämme

sollte zur Identifizierung von HOCl-Resistenz-vermittelnden Genen und Mechanismen führen. Um Methoden zur Analyse und Charakterisierung der evolvierten *E. coli*-Stämme zu etablieren, sollten parallel zur Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme bereits vorhandene Hitze-resistente *E. coli*-Stämme betrachtet werden. Von den Hitze-resistenten Stämmen ist bekannt, dass sie erhöhte GroEL/S-Mengen besitzen. Jene werden in Anwesenheit der Lysyl-tRNA-Synthetase, LysU, für die Hitzeresistenz benötigt (Rudolph *et al.*, 2010). Die Ursache für die im Zuge der Anpassung an hohe Temperaturen erhöhten GroEL/S-Mengen ist bisher ungeklärt. Diese Frage sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich beantwortet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Standards

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Standards sowie deren Bezugsquellen findet sich in Tabelle 1. Alle weiteren Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und besaßen in der Regel den Reinheitsgrad „p. a.“. Das Wasser für die Herstellung von Lösungen und Puffern war Reinstwasser aus einem TKA-GenPure Wasseraufbereitungssystem.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Standards mit deren Bezugsquelle.

Chemikalie/Enzym/Standard	Bezugsquelle
2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agar-Agar	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Arabinose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bacto Trypton	Becton Dickinson (Sparks, USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Chloramphenicol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Diamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Größenstandard (peqGOLD 1kb Leiter Orange G)	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Ethanol (p. a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GoTaq DNA Polymerase	Promega (Madison, USA)
H_2O_2 (Wasserstoffperoxid, 30 Gew.-% Lsg. in Wasser, ACS-Reagenz)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HOCl (Sodium hypochlorite solution, reagent grade, available chlorine 10-15%)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Immersionsöl Immersol 518 F	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium, Powder	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumchlorid	VWR International (Darmstadt, Deutschland)

Pfu DNA Polymerase	Promega (Madison, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Proteinstandard (Mark 12 unstained standard)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RNaseZAP	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
SERVA DNA Stain Clear G	Serva (Heidelberg, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Promega (Madison, USA)

2.1.2 Materialien

Tabelle 2 enthält eine Auflistung verwendeter Materialien, inklusive der verwendeten Kits, sowie deren Bezugsquellen.

Tabelle 2: Verwendete Materialien und deren Bezugsquelle.

Materialien	Bezugsquelle
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix	Agilent (Kalifornien, USA)
Elektroporationsküvetten (0,2cm, 0,1cm)	Bio-Rad (München, Deutschland)
EPR-Röhrchen (727-SQ-250M 4 mm Medium Wall Suprasil EPR Sample Tube 250 mm L mit Kappen aus Polyethylen)	Wilmad-LabGlass (New Jersey, USA)
epT.I.P.S. Pipettenspitzen (für RNA)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp Transposome Kit	Epicentre Biotechnologies (Madison, USA)
GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PCR-Mikroplatte (PCR-96-FLT-C)	Axygen (Kalifornien, USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Petrischalen, 94x16mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Petrischalen, quadratisch (120x120x16mm)	nerbe plus (Winsen/Luhe, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Plastik-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße (2ml, 1,5ml, 0,5ml)	nerbe plus (Winsen/Luhe, Deutschland)
Safe-Lock Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Serva-Gel Neutral pH 7,4 Gradient	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Spritzenfilter (0,22µm)	Merck Millipore (Billerica, USA)
Sterile Kryoröhrchen (2ml)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sterile Mikotiterplatten (96 wells)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterile Röhrchen/Mehrzweckgefäße (50ml, 15ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
SV Total RNA Isolation System	Promega (Madison, USA)
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega (Madison, USA)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Madison, USA)

2.1.3 Medien, Medienzusätze und Puffer

Als komplexes Nährmedium wurde zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen LB-Medium (*lysogeny broth*) verwendet. In der Regel wurden hierfür 20 g/l LB-Medium-Pulver in Wasser angesetzt. SOB-Medium (*super optimal broth*) enthielt 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$ gelöst in Wasser. Alle Medienkomponenten wurden eingewogen, gelöst und autoklaviert (30 min, 121°C). Die Zugabe von Antibiotika oder anderen Medienzusätzen erfolgte erst kurz vor der Verwendung des Mediums.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 15 g/l Agar-Agar zugefügt. Das Medium wurde autoklaviert, anschließend auf eine Temperatur von unter 50°C abgekühlt und gegebenenfalls mit einem Medienzusatz versetzt. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

Top-Agar für P1-Transduktionen enthielt zunächst LB-Medium mit 7,5 g/l Agar-Agar. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden 5 mM $CaCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$ hinzugefügt.

Tabelle 3 enthält eine Auflistung der Medienzusätze und den Konzentrationen der Stammlösungen.

Tabelle 3: Verwendete Medienzusätze, deren Lösungsmittel und Stammlösungskonzentration.

Medienzusatz	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin	Wasser	200 mg/ml
Chloramphenicol	Ethanol	25 mg/ml
Kanamycin	Wasser	100 mg/ml
Spectinomycin	Wasser	50 mg/ml
Trimethoprim	N,N-Dimethylformamid	10 mg/ml
X-Gal	N,N-Dimethylformamid	40 mg/ml

Eine Liste der verwendeten Puffer und ihrer jeweiligen Zusammensetzung befindet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
2D-Gelpuffer	1,5 M Tris pH 8,6 0,4% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Natriumazid
2D-Laufpuffer	24 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
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
DNA-Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 0,025% (w/v) Xylencyanol 0,025% (w/v) Bromphenolblau
Fairbanks A	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Serva Blau R-250
Fairbanks D	10% (v/v) Essigsäure
Lämmli-Auftragspuffer (5x)	300 mM Tris/HCl pH 7,5 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
Phosphatpuffer	100 mM NaH_2PO_4 pH 7,5
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris pH 8,8 2 M Glycin 1% (w/v) SDS
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt
TB-Puffer	10 mM HEPES 15 mM $CaCl_2$ 250 mM KCl in Wasser gelöst, pH-Wert auf 6,7 mit KOH oder HCl eingestellt, 55 mM $MnCl_2$ hinzugefügt, auf finales Volumen aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Z-Puffer	60 mM Na_2HPO_4 40 mM NaH_2PO_4 10 mM KCl 1 mM $MgSO_4$

2.1.3 Geräte

Tabelle 5 enthält eine Auflistung der verwendeten Geräte und deren Bezugsquelle.

Tabelle 5: Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle.

Gerät	Bezugsquelle
-80°C-Tiefkühlschrank U725 Innova	New Brunswick Scientific (Connecticut, USA)
45-2020 Gelelektrophoreseeinheit (für Agarosegele)	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Avanti J-26XP (JA-10 Rotor)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Axiovert 200-Mikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Brutschränke APT.line BD	BINDER (Tuttlingen, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
EPS 3500, GPS 200/400 (Spannungsquellen)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
EPS 601, 1001 (Spannungsquellen)	GE Healthcare (Amersham, UK)
Gene Pulser Xcell Elektroporationsgerät	Bio-Rad (München,Deutschland)
Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
ImageQuant 300	GE Healthcare (Amersham, UK)
Laborwaage SI-4002	Denver Instrument (Göttingen, Deutschland)
Laborwaagen 1601 004, 1409 MP, AC 211 S, BL 310, BL 1500 S, BP 121 S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke (Staufen, Deutschland)
Mikrotiterplatteninkubator ELx808	BioTek Instruments (Vermont, USA)
MS2 Minishaker (Vortexgerät)	IKA Werke (Staufen, Deutschland)
Mytron-Brutschränke WB	mytron Bio-und Solartechnik (Heilbad Heiligenstadt, Deutschland)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Novaspec II Spectrophotometer	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
PCR Thermocycler Primus 25	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter Multical pH 538	WTW (Weilheim, Deutschland)
SANOclav-Autoklav St-MCS-203	Adolf Wolf SANOclav (Bad Überkingen-Hausen, Deutschland)
Schüttelinkubator Certomat BS-1	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland)
Schüttelinkubator Unimax 1010 mit Inkubator 1000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Stratagene Mx3000P Real-Time PCR-Gerät	Agilent Technologies (Kalifornien, USA)
Thermoblock TB1	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ThermoStat plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
TKA GenPure-Wasseraufbereitungssystem	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Ultrospec 1100 pro UV/visible spectrophotometer	GE Healthcare (Amersham, UK)
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)

Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
XCell SureLock Mini-Cell-Elektrophoresesystem	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zentrifuge Fresco17	Heraeus (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Zentrifuge Mikro20	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Universal 16R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.1.4 Programme

Eine Liste der verwendeten Programme und deren Herstellern findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Verwendete Programme und deren Hersteller.

Programm	Hersteller
Adobe Photoshop CS2 Version 9.0	Adobe Systems (Kalifonien, USA)
Adobe Reader 9.0	Adobe Systems (Kalifonien, USA)
EndNote X5	Thomson Reuters (New York, USA)
Gen5 Version 1.10	BioTek Instruments (Vermont, USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft (Washington, USA)
Origin 8.0	OriginLab (Massachusetts, USA)

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 7 enthält eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Herkunft
BB7222	MC4100 *araD*$^{+}$	(Tomoyasu *et al.*, 2001)
BB7224	MC4100 *rpoH*::Kan *zhf*::Tn10 *suhX401* Tc^{s} *araD*$^{+}$	(Tomoyasu *et al.*, 2001)
BM3	MG1655 *zba*::*kan* 2937 Generationen bei 37°C	(Rudolph *et al.*, 2010)
BM15	MG1655 *zba*::*kan* evolviert bis 42°C	(Rudolph *et al.*, 2010)
BM16	MG1655 *zba*::*kan* evolviert bis 45°C	(Rudolph *et al.*, 2010)
BM25	MG1655 *zba*::*kan* evolviert bis 48°C	(Rudolph *et al.*, 2010)
BM28^{GroEL+}	MG1655 *zba*::*kan* evolviert bis 48,5°C	(Rudolph *et al.*, 2010)
BM28^{GroEL-}	MG1655 *zba*::*kan* evolviert bis 48,5°C	Laborsammlung AG Winter
BM3 R1	BM3 + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM3 R2	BM3 + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM3 R3	BM3 + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM3 R4	BM3 + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM3 R5	BM3 + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM3 R6	BM3 + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit

BM3 R7	BM3 + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R1	BM25 + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R2	BM25 + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R3	BM25 + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R4	BM25 + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R5	BM25 + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R6	BM25 + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
BM25 R7	BM25 + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R1	$BM28^{GroEL+}$ + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R2	$BM28^{GroEL+}$ + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R3	$BM28^{GroEL+}$ + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R4	$BM28^{GroEL+}$ + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R5	$BM28^{GroEL+}$ + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R6	$BM28^{GroEL+}$ + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL+}$ R7	$BM28^{GroEL+}$ + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R1	$BM28^{GroEL-}$ + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R2	$BM28^{GroEL-}$ + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R3	$BM28^{GroEL-}$ + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R4	$BM28^{GroEL-}$ + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R5	$BM28^{GroEL-}$ + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R6	$BM28^{GroEL-}$ + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
$BM28^{GroEL-}$ R7	$BM28^{GroEL-}$ + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
C600	*thr leu thi lac4 rpsL supE* (F^-)	*E. coli* stock center
E 8.0.1	BB7224 + 3 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.2	BB7224 + 6 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.3	BB7224 + 9 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.4	BB7224 + 12 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.5	BB7224 + 14 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.6	BB7224 + 16 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.7	BB7224 + 18 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.8	BB7224 + 21 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9	BB7224 + 24 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.10	BB7224 + 27 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.11	BB7224 + 30 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.1	BB7224 + 3 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.2	BB7224 + 6 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.3	BB7224 + 9 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.4	BB7224 + 12 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.5	BB7224 + 14 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.6	BB7224 + 16 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.7	BB7224 + 18 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.8	BB7224 + 21 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.9	BB7224 + 24 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.10	BB7224 + 27 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.1.11	BB7224 + 30 Nicht-Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.1	BB7224 + 3 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.2	BB7224 + 6 Stresszyklen	diese Arbeit

E 8.2.3	BB7224 + 9 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.4	BB7224 + 12 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.5	BB7224 + 14 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.6	BB7224 + 16 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.7	BB7224 + 18 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.8	BB7224 + 21 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9	BB7224 + 24 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.10	BB7224 + 27 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.2.11	BB7224 + 30 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.1	BB7224 + 3 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.2	BB7224 + 6 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.3	BB7224 + 9 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.4	BB7224 + 12 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.5	BB7224 + 14 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.6	BB7224 + 16 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.7	BB7224 + 18 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.8	BB7224 + 21 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9	BB7224 + 24 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.10	BB7224 + 27 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.3.11	BB7224 + 30 Stresszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R1	E 8.0.9 + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R2	E 8.0.9 + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R3	E 8.0.9 + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R4	E 8.0.9 + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R5	E 8.0.9 + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R6	E 8.0.9 + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.0.9 R7	E 8.0.9 + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R1	E 8.2.9 + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R2	E 8.2.9 + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R3	E 8.2.9 + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R4	E 8.2.9 + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R5	E 8.2.9 + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R6	E 8.2.9 + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.2.9 R7	E 8.2.9 + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R1	E 8.3.9 + 4 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R2	E 8.3.9 + 7 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R3	E 8.3.9 + 9 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R4	E 8.3.9 + 13 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R5	E 8.3.9 + 17 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R6	E 8.3.9 + 21 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
E 8.3.9 R7	E 8.3.9 + 24 Überimpfungszyklen	diese Arbeit
genomische Bibliothek	BB7224 pUC18 mit JW138 (MG1655 *hslO*::Kan)-Fragmenten	(Barth *et al.*, 2009)
JG10	C600 pKD46	diese Arbeit
JG140	JG39 *yjiE*::*lacZ*	(Gebendorfer *et al.*, 2012)
JG141	JG59 *yjiE*::*lacZ*	(Gebendorfer *et al.*, 2012)

JG175	BB7224 pGS058	diese Arbeit
JG176	BB7224 pJG1	diese Arbeit
JG177	BB7224 pJG2	diese Arbeit
JG178	BB7224 pJG3	diese Arbeit
JG179	BB7224 pJW1	diese Arbeit
JG34	KMG214 (C600 *yjiE*::Cm) pKD46	diese Arbeit
JG39	C600 *lacZ*::Kan	(Gebendorfer *et al.*, 2012)
JG59	C600 *lacZ*::Kan *yjiE*::Cm	(Gebendorfer *et al.*, 2012)
JW212	BB7224 pUC18	Laborsammlung AG Winter
MG1655	F^- I^- *ilvG*$^-$ *rfb*-50 *rph*-1	Laborsammlung AG Winter
XL1-Blue		Laborsammlung AG Winter

2.1.6 Bakteriophagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakteriophagen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Bakteriophagen.

Bakteriophage	Referenz/Herkunft
λRS45	(Simons *et al.*, 1987)
λRS74	(Simons *et al.*, 1987)
$P1_{vir}$	Laborsammlung AG Winter

2.1.7 Plasmide

In Tabelle 9 befindet sich eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz/Herkunft
pGS058	Plamid mit mutiertem *oxyR,* welches überexprimiert wird	Cm	AG Imlay
pJG1	pJW1-*ompA*	Amp	diese Arbeit
pJG2	pJW1-*katG*	Amp	diese Arbeit
pJG3	pJW1-*ahpCF*	Amp	diese Arbeit
pJL28	Vektor zur Herstellung von *lacZ*-Fusionen	Amp	(Lucht *et al.*, 1994)
pJW1	pBAD30 mit MCS von pJW2	Amp	AG Winter
pKD3	Templat-Plasmid für Cm-Resistenzkassette	Amp, Cm	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	λ Red-Helferplasmid (Temperatur-sensitiv)	Amp	(Datsenko & Wanner, 2000)

2.1.8 Oligonukleotide

In Tabelle 10 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) aufgeführt. Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz in 5' - 3' - Richtung
DHFR-1 RP-1 Reverse Primer	GACACTCTGTTATTACAAATCG
pUC18_Fw	CACGACGTTGTAAAACGACGG
pUC18_Rv	CAGGAAACAGCTATGACCATG
GATC-pUC18-F2	GTTTTCCCAGTCACGACGTTG
GATC-pUC18-R2	GTGGAATTGTGAGCGGATAAC
Z12-Fw304yjiE22	CGGGATCCGAAACCGTGCAGGTGCTGGTC
Z13-Rv304yjiE22	CCCAAGCTTGCAAAATCGCACCACAGTCATC
arcA_3_Fw	GCAGACCCCGCACATTCTTATCGTTGAAG
arcA_300_Rv	GTAGTCATCTGCACCGATTTCGAGGCCG
baeR_3_Fw	GACCGAGTTACCAATCGACGAAAACACAC
baeR_300_Rv	CAGCCCCAGCAGGCGATCGATCTCTTC
cpxR_12_Fw	CCTGTTAGTTGATGATGACCGAGAGCTG
cpxR_310_Rv	CATTAAACGGTTTCGGGAGATAGTCATC
degP_339_Rv	CAGCGCCATGAATTTCTGTTGCTGGCCG
degP_41_Fw	GTTTAGGTTTGGCGTTATCTCCGCTCTC
dps_299_Rv	CTGTTGATAACTTGAGTGGTCCCCAGAG
dps_3_Fw	GAGTACCGCTAAATTAGTTAAATCAAAAGC
fecD301-Rv	GTAGAGCCCCCACAGAGGCCAGGC
fecD3-Fw	GAAAATTGCGCTGGTTATTTTCATCACCC
fecI_3_Fw	GTCTGACCGCGCCACTACCACAGCTTCC
fecI_301_Rv	GTGAAGGCGCTCCCCCCTCCGGCATAAG
FecR300-rv	CTGCCAGAGCTGCCAGCCTCCGCCAGC
FecR3-fw	GAATCCTTTGTTAACCGATTCCCGCCGTC
Fur301-rv	CGATAACCTTGCCGCAGTCGAGGCAGATC
Fur3-fw	GACTGATAACAATACCGCCCTAAAGAAAG
gadB_3_Fw	GGATAAGAAGCAAGTAACGGATTTAAGGTC
gadB_301_Rv	CGCAACGCAGGTCGATGGCTGCGGATTG
lexA_3_Fw	GAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGG
lexA_301_Rv	CGACCTGATAATGACCTTCAATATGCTGTTG
MetB303-RV	GTAGCAGTCGTGCGGCGCAACCAGC
MetB5-Fw	CGCGTAAACAGGCCACCATCGCAGTGC
otsB_3_Fw	GACAGAACCGTTAACCGAAACCCCTGAAC
otsB_301_Rv	CATCCGGCAGATGAACGATATGTGTTTTAC
pspA_14_Fw	CTCGCTTTGCCGACATCGTGAATGCCAAC

pspA_313_Rv	CCAGGGACTTAATCAGATCGGTCAGTTTC
rcsB_3_Fw	GAACAATATGAACGTAATTATTGCCGATG
rcsB_301_Rv	GATCCAATACCGCACTAAGAATCGCCG
recA_3_Fw	GGCTATCGACGAAAACAAACAGAAAGCGTTG
recA_301_Rv	CCAGCGCGTGTTCAGCATCGATAAACGCAC
rpoD_3_Fw	GGAGCAAAACCCGCAGTCACAGCTGAAAC
rpoD_300_Rv	CATGCGTACCGGGTCAGTCGTGCGCC
rpoE_3_Fw	GAGCGAGCAGTTAACGGACCAGGTCCTG
rpoE_300_Rv	GGCATCCACATCACTGGAAGGTGGACGAC
rpoF_3_Fw	GAATTCACTCTATACCGCTGAAGGTGTAATGG
rpoF_301_Rv	CCACTTCACGCGCGTTGCGTCGCACGCTG
rpoH_362_Rv	CAGTTACGCAGAACGTATTCGTGGATCTC
rpoH_63_Fw	GGCAGCTAACGCGTGGCCGATGTTGTCG
rpoN_304_Rv	CGCTGGTGCCGGATGGTGTACCAGCGG
rpoN_6_Fw	GCAAGGTTTGCAACTCAGGCTTAGCCAAC
rpoS_301_Rv	GACGCAAGTTACTCTCGATCATCCGGCGGC
rpoS_5_Fw	GTCAGAATACGCTGAAAGTTCATGATTTAAATG
rseA_104_Fw	GCTATCACTTAATCCGTGACTCAATGCGG
rseA_400_Rv	GCGTTTCGGGCTGCTGGGACGTTTCAG
sodA_3_Fw	GAGCTATACCCTGCCATCCCTGCCGTATG
sodA_301_Rv	CTTTCAGGTCACCCTGCAGGGTGGTGCC
soxS_3_Fw	GTCCCATCAGAAAATTATTCAGGATCTTATC
soxS_302_Rv	CTGGGAGTGCGATCAAACTGCCGACGG
TufB301-Rv	CGTC CAT CTG CGC AGC ACC GGT GATC
TufB3-Fw	GTCTAAAGAAAAGTTTGAACGTACAAAACCG
ahpCF_Fw	GGAATTCCATATGTCCTTGATTAACACC
ahpCF_Rv	CCCAAGCTTTTATGCAGTTTTGGTGCG
katG_Fw	GGAATTCCATATGAGCACGTCAGACGATATCC
katG_Rv	CCCAAGCTTTTACAGCAGGTCGAAACGGTCG
ompA_Fw	GGAATTCCATATGAAAAAGACAGCTATCGCG
ompA_Rv	CCCAAGCTTTTAAGCCTGCGGCTGAGTTAC
pBAD_Fw	CTGACGCTTTTTATCGCAACTCTC
pBAD_Rv	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG
Ctr1-Fw_icd	GTATTTTCAGAGATTATGAATTG
Ctr2-Rv_icd	CCGCCAGCAATAATAAAAAGC
Fw icd	GGCCATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTC
Fw_icd_167	GCCTAATAACGCGCATCTTTC
Fw_yhjY_119	CCGCTTTTCTTGACGCATC
Rv icd	CCCAAGCTTGGATCCTTACATGTTTTCGATGATCGC
Rv_icd_129	CCAGCCTACCCCAAAACTAC
Rv_yhjY_195	CTCTGCCGACAACCATAAC
1009_icd_do_rv	CTTAGATATTCTGATGAATTAATC
109_n_infBmu	AAGGGCTGTTCACGTTGACCTG
1112_katG_fw	GATCCGTCGAAGAAACGTAAACC

1112_katG_rv	GGTTTACGTTTCTTCGACGGATC
1206_ahpCF_fw	CGCTCTCTTGCCACAACTGCCC
1206_ahpCF_rv	GGGCAGTTGTGGCAAGAGAGCG
122_n_rfbDmu	ATCAGCCAGCAGTTCAGCAC
127_n_yhjY	GGAATGAAATGCCTTAGTTCAGG
138_v_mcrBmu	GCCGGTAAACAGAAAGTCGC
150_n_icd	GTAGAACTACCACCTGACCG
163_v_infBmu	GTTCTGCGTGACAACGTGGTTATC
166_n_ynjImu	TCTAATGTAGGCCGGGCAAG
175_v_yhjY	CCAGCCGCAACGTTCCATACTTTC
178_v_ynjImu	TCATGGATGATCTCGATATCAAGC
179_n_rfbD	AGCGGGTAATAGATCATCGG
181_n_mcrBmu	TGCAAACCAGGGAATAGACG
188_n_icdC	AGTGTCCTCCAGGAGAAAGC
203_v_ynjI	AAAGGCTGCACCGCGTAAAC
211_v_yhjY	CCTGTGGATGTGACCAGCAGTATG
222_v_rfbD	CGTGAGCAAATCACTTATGTTG
230_v_infB	ACAAACCGGCTGACGATCTG
239_v_rfbDmu	GAATCAGAACCGGAGTTTGCAC
269_katG_up_fw	GCTGCCTCGAAATGAGGGCGG
3061_yegE	ATATGGCAGATTACCTGCTACTTG
367_v_yegE	GATGCGCCAGCGATACCGATAATG
384_v_icdC	CCTGTCTTCAGGTGGTGCTGATAC
481_ahpCF_up_fw	GTTTTGATGATTGTAATGCCC
485_in_groELIns	GCCTATATCGCCGACATCAC
502_icdCmu_do_rev	GTATCAATCTACTATATTTCTCCC
504_ompA_up_rv	CTTGAAAGCGGTTGGAAATGGAAG
513_ompA_do_fw	GTTGGCAGATGATTTGACTGAAG
96_n_mcrB	TGGCTTCAAGGTTTGCCTGC
ahpCF_fw	ATGTCCTTGATTAACACC
ahpCF_rv	TTATGCAGTTTTGGTGCG
E2_1_fw	GCCACCCTGCAATGGCATATTGC
E2_1_rv	CGTGGCTCCCTCACTTTCTGGC
E2_2_fw	GCATAAGGCTGACAGCCTGATTGC
E2_2_rv	GGCATTTATACTCCGCTGGAAGCG
E3_1_fw	GGTTATCGAAGGTAAGGTCTGGCG
E3_1_rv	GCTGATGTGCTGGAGATCGAATTTC
E3_1N_fw	GTTATCGAAGGTAAGGTCTGG
E3_1N_rv	GGCCTGCGATTACCAGCAG
E3_1NN_fw	GCTACCAGGGAAGAACGGGAAGGAAAG
E3_1NN_rv	GTTATTAGCTCAGTAATGTAGATGG
fw_groEL_promote	CATCGTTATTTTCAACGATGGC
groL_raus	CACCGAATGCATGGTTACCGACC
icd_533 _fw	CCTGCGTGAAGAGATGGGGG
icd_raus	CAGCGCAGGTTGGCGGTATCG
katG_fw	ATGAGCACGTCAGACGATATCC
katG_rv	TTACAGCAGGTCGAAACGGTCG

ompA_fw	ATGAAAAAGACAGCTATCGCG
ompA_rv	TTAAGCCTGCGGCTGAGTTAC
P_icd_1195260	CGGTGACTACATTTCTGACG
yhjY_680_rv	CCCATCGTATACAGATAGTCGC
yjeI_rv	GCGGCACCGACAATCCCTGCTAAG

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Medien, Lösungen und Pipettenspitzen wurden 30 min bei 121°C feucht autoklaviert. Glaswaren wurden für mindestens 24 h bei 180°C trocken sterilisiert. Die Sterilfiltration Hitze-empfindlicher Lösungen erfolgte mit Hilfe von sterilen Spritzenfiltern (0,22 µm Porendurchmesser). In der Regel wurde in dieser Arbeit stets mit sterilen Materialien gearbeitet.

2.2.2 Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen in Flüssigkulturen erfolgte in zu höchstens 20% gefüllten Glasgefäßen. Die Kulturen wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus einer Glycerinkultur oder mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 37°C oder 30°C im Reagenzglas-Rollinkubator, Wasserbadschüttler oder Schüttelinkubator bei 140 rpm inkubiert. So wurde eine ausreichende Sauerstoffzufuhr während des Wachstums gewährleistet. Dem Medium wurden, wenn nötig, entsprechende Antibiotika zur Selektion hinzugefügt.
Auf Agarplatten erfolgte die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen bei der jeweils erforderlichen Temperatur im Brutschrank.

2.2.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen und Bakteriophagenlysaten

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden in der Regel 700 µl einer Übernachtkultur zu 1 ml 20% (v/v) Glycerin gegeben. Dies wurde vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.
Bakteriophagenlysate wurden zur Aufbewahrung mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert.

2.2.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Anhand der Zelldichte einer Flüssigkultur konnte deren Wachstum verfolgt werden. Die Bestimmung der Zelldichte in einer Flüssigkultur erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm (OD_{600}) mit Hilfe eines Fotometers. Ein lineares Verhältnis von Bakterienkonzentration und OD_{600} besteht bei Messwerten von weniger als 0,5. Um demzufolge Messwerte von weniger als 0,5 zu erhalten, wurden die Kulturproben gegebenenfalls entsprechend mit Medium verdünnt. Der korrekte Wert einer Probe wurde durch Einberechnung des Verdünnungsfaktors ermittelt. Als Referenz diente steriles Medium.

2.2.5 P1-Tansduktion

Als Transduktion wird die Übertragung von DNA aus einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle mittels Bakteriophagen bezeichnet. Für eine P1-Transduktion muss zunächst ein Spenderbakterienstamm mit P1-Phagen infiziert und ein P1-Lysat hergestellt werden. Die Phagen dieses P1-Lysats enthalten neben der eigenen DNA auch DNA des Spenderbakterienstamms. Bei einer Infizierung eines Empfängerbakterienstamms mit dem P1-Lysat kann DNA des Spenderstamms in das Chromosom des Empfängerstamms rekombinieren.

Für die Herstellung eines P1-Lysats wurde zuerst eine Übernachtkultur des Spenderbakterienstamms in LB-Medium mit 5 mM $CaCl_2$ und 5 mM $MgSO_4$ angesetzt. Je 100 µl der Übernachtkultur wurden mit 100 µl, 10 µl oder 1 µl eines P1-Lysats versetzt und für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Lysat. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 2 - 3 ml warmem Top-Agar vermischt und jeweils auf eine LB-Platte gegossen. Nachdem der Top-Agar fest war, wurden die Platten für 4 - 6 h bei 37°C inkubiert bis Lyse-Plaques sichtbar wurden. Die Zellen sollten nicht komplett lysiert sein. Daraufhin wurde der Top-Agar mit 2 - 3 ml 5 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ abgekratzt, zerkleinert und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz für 1 min gevortext und anschließend für 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Kryoröhrchen überführt und nach Zugabe von 100 µl Chloroform bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Phagentiters eines Lysats wurden 100 µl einer Übernachtkultur eines beliebigen *E. coli*-Stamms mit 2 - 3 ml warmem Top-Agar vermischt und auf eine LB-Platte gegossen. Die Platte wurde daraufhin bis zu 30 min lang trocknen gelassen. Anschließend wurden je 5 µl einer seriellen Verdünnung (unverdünnt, 10^{-2}-, 10^{-4}-, 10^{-6}- und 10^{-8}-

Verdünnung) des entsprechenden Lysats auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm umwickelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der Phagen-Plaques wurde für die Verdünnungsstufen gezählt und mit Hilfe des jeweiligen Verdünnungsfaktors und Auftragsvolumens die Anzahl der Phagen pro µl Lysat errechnet. Der Wert sollte mindestens $5 \cdot 10^6$ Phagen/µl betragen.
Für die P1-Transduktion wurden 10 ml der Übernachtkultur des zu transduzierenden Empfängerbakterienstamms durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 20°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml 5 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. 100 µl dieses Ansatzes wurden daraufhin mit 100 µl des entsprechenden P1-Lysats versetzt und für 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Als Kontrollen dienten 100 µl Bakterienzellen ohne Lysat und 100 µl Lysat ohne Bakterienzellen. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 1 ml LB-Medium mit 100 mM Natriumcitrat, pipettiert. Nach 3 h Inkubation bei 37°C unter Schütteln, wurde je 1 ml der Ansätze auf eine LB-Platte mit 100 mM Natriumcitrat und dem zur Selektion erforderlichen Antibiotikum gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diesen Platten wuchsen lediglich die Transduktanten mit dem entsprechenden Gen des Spenderstamms. Die Transduktanten wurden mittels PCR kontrolliert und zwei weitere Male auf LB-Platten mit Natriumcitrat und Antibiotikum ausgestrichen, bevor Glycerinkulturen hergestellt wurden.

2.2.6 Hitze-Platten

Um die Hitze-Resistenz bzw. Hitze-Sensitivität von *E. coli*-Stämmen zu überprüfen, wurden Hitze-Platten angefertigt. Hierfür wurde der zu betrachtende *E. coli*-Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen und, je nach Stamm, über Nacht bei 30°C oder 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde je mit einer Pipettenspitze Zellmaterial des *E. coli*-Stamms von der LB-Platte auf neue LB-Platten übertragen und ausgestrichen. Sollten verschiedene Stämme verglichen werden, wurde vergleichbar viel Zellmaterial der Stämme übertragen und die Stämme möglichst vergleichbar sowie auf derselben LB-Platte ausgestrichen. Eine der neuen LB-Platten wurde zur Kontrolle erneut bei 37°C inkubiert. Da sich die Selektion durch erhöhte Temperaturen als nicht sehr einfach reproduzierbar herausstellte, wurden in der Regel mehrere Hitze-Platten angefertigt und parallel bei verschiedenen erhöhten Temperaturen inkubiert. Die jeweilige Selektionstemperatur musste für jeden Inkubator und meist in Anpassung an die Jahreszeit bzw. die tatsächliche Raumtemperatur etabliert werden. Während eine 37°C-Kontroll-Platte am nächsten Tag bereits ausgewertet und gescannt werden konnte, wurden die Hitze-Platten so lange inkubiert, bis eindeutig die Hitze-Resistenz oder -Sensitivität der betrachteten Stämme festgestellt werden konnte.

2.2.7 Hitzeschock

Für die Durchführung eines Hitzeschocks wurde eine Hauptkultur mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,45 - 0,5 bei 30°C und 140 rpm wachsen gelassen. Dann wurde zum einen 1 ml der Kultur als Vor-Stress-Probe entnommen, für 5 min bei 13300 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und die Probe bei -20°C gelagert. Zum anderen wurden 5 ml der Kultur zu 5 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben und für 15 min bei 45°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurde auch aus diesem Ansatz 1 ml entnommen, für 5 min bei 13300 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und die Probe bei -20°C gelagert. Waren alle Proben eines Experiments auf diese Weise genommen, wurden sie für die Analyse mittels SDS-PAGE vorbereitet.

2.2.8 Lebensfähigkeits-Test

Mit Hilfe des Lebensfähigkeits-Tests wurde die Lebendzellzahl eines *E. coli*-Stamms nach einem Stress und somit die Lebensfähigkeit oder das Überleben ermittelt. Grundsätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit folgendes Vorgehen für einen HOCl-, H_2O_2-, Diamid-, NaCl- oder Hitze-Stress etabliert.

Zunächst wurde die Hauptkultur eines zu untersuchenden *E. coli*-Stamms mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und je nach *E. coli*-Stamm bei 30°C oder 37°C und 140 rpm inkubiert. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von 0,45 - 0,5, wurden wie folgt je 500 µl der Kultur in je 10 ml LB-Medium pipettiert.

Für einen HOCl-, H_2O_2-, Diamid- oder NaCl-Stress wurden 500 µl der *E. coli*-Kultur in 10 ml LB-Medium pipettiert, zu welchem daraufhin der Stressfaktor zu einer bestimmten Endkonzentration hinzugegeben wurde. Gleichzeitig wurden 500 µl der Kultur zu 10 ml LB-Medium ohne Zugabe eines Stressfaktors gegeben. Die Stress-Kultur wurde für 20 h bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 100 µl der Kultur entnommen. Aus dem Ansatz ohne Stressfaktor wurde die 100 µl-Probe für den 0 min-Wert entnommen.

Bei einem Hitze-Stress wurden 500 µl der *E. coli*-Kultur zu 10 ml auf 48,5°C vorgewärmtem LB-Medium und weitere 500 µl der Kultur zu 10 ml LB-Medium mit Raumtemperatur gegeben. Die 48,5°C-Kultur wurde für 20 h bei 48,5°C und 140 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 100 µl der Kultur entnommen. Dabei wurde die Kultur stets so schnell wie möglich wieder zu 48,5°C zurück gestellt. Aus dem Ansatz mit dem LB-Medium bei Raumtemperatur wurde die 100 µl-Probe für den 0 min-Wert entnommen.

Die je entnommenen 100 µl wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und seriell 1:20 verdünnt. Je 5 µl der unverdünnten Probe sowie der verdünnten Proben wurden auf eine LB-Platte pipettiert. Diese wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 30°C inkubiert. In der Regel konnte am nächsten Tag die Anzahl der Kolonien bei den verschiedenen Verdünnungen der aufgetragenen Proben bestimmt werden. Die Berechnung der Lebensfähigkeit erfolgte für jeden Zeitpunkt der Probennahme in Bezug auf den 0 min-Wert und in %.

2.2.9 HOCl-Regenerierungs-Test

Zur Analyse der Fähigkeit eines *E. coli*-Stamms, sich nach einem HOCl-Stress zu regenerieren und somit weiter zu wachsen, wurden HOCl-Regenerierungs-Tests („*recovery*"-Analysen) durchgeführt. Dieser Test wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Hierzu wurden verschiedene Mikrotiterplatteninkubatoren getestet und der Mikrotiterplatteninkubator ELx808 von der Firma BioTek Instruments (Vermont, USA) ausgewählt.
Für den HOCl-Regenerierungs-Test wurde eine *E. coli*-Hauptkultur mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und, je nach *E. coli*-Stamm, bei 30°C bzw. 37°C und 140 rpm inkubiert. Während der Inkubationszeit, wurden HOCl-LB-Stammlösungen frisch mit den erforderlichen HOCl-Konzentrationen angesetzt und in einem Volumen von je 50 µl in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von 0,45 - 0,5, wurden je 100 µl der Kultur zur jeweiligen HOCl-LB-Lösung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 20 min bei 30°C bzw. 37°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurden zum Quenchen des HOCl-Stresses zu jedem Ansatz in der Mikrotiterplatte je 75 µl 5-fach konzentriertes LB-Medium pipettiert. Daraufhin wurde der Deckel der Mikrotiterplatte mit kurzen Klebebandstreifen an einigen Stellen der Mikrotiterplatte fixiert und die Platte in den Mikrotiterplatteninkubator gestellt. Dort wurde die Mikrotiterplatte für 20 - 30 h bei 30°C bzw. 37°C und unter kontinuierlichem, mittel starkem Schütteln inkubiert. Alle 10 min erfolgte eine OD-Messung bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm. Abschließend wurde die Mikrotiterplatte betrachtet und die Daten mittels Gen5-Software (BioTek Instruments) ausgewertet.

2.2.10 Genomische Überexpressionsbibliothek

Um Gene zu identifizieren, die in *E. coli*-Zellen eine HOCl-Resistenz vermitteln, wenn sie von einem mehrfach in einer Zelle vorhandenen Plasmid exprimiert werden, wurde eine

genomische Überexpressionsbibliothek verwendet. Eingesetzt wurde eine genomische Bibliothek, bei welcher die genomische DNA des Stammes JW138 (MG1655 *hslO*::Kan) fragmentiert in einem pUC18-Plasmid vorlag. Demnach stammt die genomische DNA der Bibliothek aus einem Hsp33-defizienten *E. coli*-Stamm. Die genomische Bibliothek lag im *E. coli*-Stamm BB7224 vor, einem MC4100-Stamm, welchem der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt ((Barth *et al.*, 2009), (Gebendorfer *et al.*, 2012)).

Zur Selektion HOCl-resistenter *E. coli*-Klone wurden die BB7224-Zellen mit der genomischen Bibliothek einem HOCl-Stress ausgesetzt. Der Stress erfolgte in Phosphatpuffer. Hierzu wurden 10 ml einer Kultur der Zellen mit der Bibliothek bei einer OD_{600} von 0,45 - 0,5 durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm und 25°C geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal in Phosphatpuffer gewaschen. Dabei wurden stets 10 ml Phosphatpuffer eingesetzt und es wurde für je 5 min bei 5000 rpm und 25°C zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 ml Phosphatpuffer resuspendiert. 250 µl dieser Zellsuspension wurden in einen 1,5 ml-Ansatz mit 1 ml Phosphatpuffer und 250 µl HOCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 0 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM, 10 µM, 12 µM oder 14 µM HOCl gegeben. Nach der Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 30°C und 700 rpm, wurden je 200 µl auf einer LB-Platte, die zur Selektion Ampicillin enthielt (LB_{Amp}), ausplattiert. Anhand der verschiedenen eingesetzten HOCl-Konzentrationen konnte abgeschätzt werden, bei welcher HOCl-Konzentration die Zellen gestresst waren. Zellen, die den HOCl-Stress überlebten, wurden in eine Kolonie-PCR mit pUC18-Primern zur Identifizierung der jeweiligen *Insert*größe eingesetzt. War das Insert und somit das Fragment der genomischen DNA aus der Bibliothek mindestens 400bp groß, wurde es als wahrscheinlich angenommen, dass mindestens ein vollständiges Gen enthalten war. Solche Plasmide wurden isoliert und zum Sequenzieren mit pUC18-Primern an die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt. Zudem wurden die Plasmide je in BB7222- und BB7224-Zellen transformiert. Daraufhin wurde die HOCl-Resistenz dieser transformierten Stämme mit jener des ursprünglich isolierten Bibliotheksklons sowie jener der Stämme BB7222 und JW212 (BB7224 pUC18) verglichen. Durch diese Vergleiche war die Feststellung möglich, ob die beobachtete HOCl-Resistenz eines isolierten Bibliotheksklons Plasmid-kodiert ist und eventuell vom Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} abhängt. Für diese HOCl-Resistenz-Tests wurde von jedem zu testenden *E. coli*-Stamm eine Flüssigkultur bis zu einer OD_{600} von 0,45 wachsen gelassen. Daraufhin wurden je 250 µl der Kultur in einen 1,5 ml-Ansatz mit 1 ml LB-Medium und 250 µl HOCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 0 mM, 4 mM, 6mM oder 8 mM HOCl gegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 30°C und 700 rpm inkubiert und anschließend wurden je 200 µl des Ansatzes auf einer LB-Platte ausplattiert. Interessant für weiterführende Betrachtungen waren diejenigen isolierten Bibliotheksklone, welche die folgenden Kriterien erfüllten. Der BB7224-Stamm mit dem Plasmid des isolierten Bibliotheksklons sollte

mindestens doppelt so resistent gegen HOCl sein wie JW212. Der BB7222-Stamm mit dem Plasmid des isolierten Bibliotheksklons sollte mindestens doppelt so resistent gegen HOCl sein wie BB7222. Im Insert des Plasmids des isolierten Bibliotheksklons sollte mindestens ein vollständiges Gen kodiert werden. Eine Übersicht über das gesamte Vorgehen zeigt Abbildung 9. Das gesamte Vorgehen wurde insgesamt fünfmal durchgeführt.

2.2.11 Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme

Ein erfolgreiches Vorgehen zur Herstellung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen mittels Evolution wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die am stärksten gegen HOCl resistenten *E. coli*-Zellen wurden dabei ausgehend vom Ursprungsstamm BB7224 (Tomoyasu *et al.*, 2001), einem MC4100-Stamm, welchem der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt, erhalten.

Während des gesamten Evolutionsprozesses wurde das LB-Medium zum zusätzlichen Schutz vor Kontaminationen stets mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Kanamycin (LB_{Kan50}) versetzt. Der Evolutionsprozess begann damit, dass mit dem Ursprungsstamm BB7224 10 ml LB_{Kan50}-Medium angeimpft wurden. Daraufhin wurde dieser Stamm in mehreren Stresszyklen einer sukzessiv erhöhten HOCl-Konzentration ausgesetzt.

Im Evolutionsprozess begann jeder Stresszyklus mit dem parallelen Animpfen von vier Kulturkolben mit je 10 ml LB_{Kan50}-Medium mit einer Übernachtkultur eines evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stamms auf eine OD_{600} von 0,015. Das Wachstum der Kulturen erfolgte bei 30°C und 140 rpm. Erreichten die Kulturen eine OD_{600} von etwa 0,45 - 0,5, wurde HOCl zu einer bestimmten Endkonzentration unter Schwenken hinzu pipettiert. Hierbei wurden die Zellen der vier parallelen Kulturen unterschiedlichen HOCl-Konzentrationen ausgesetzt. Nach einer Inkubation der Kulturen für 20 min bei 30°C und 140 rpm mit dem HOCl, wurde das HOCl durch die Zugabe von 5 ml 5-fach konzentriertem LB-Medium in jeden Ansatz gequencht. Anschließend wurden die Kulturen über Nacht bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Mit jener der vier parallelen, gestressten Kulturen, welche den stärksten HOCl-Stress überlebte und deren OD_{600} daher über Nacht zunahm, wurden die nächsten vier parallelen Kulturen für einen weiteren Stresszyklus angeimpft. Dies alles geschah im Doppelansatz, sodass zwei Stämme parallel evolviert wurden. Außerdem wurden zwei Kulturen als ungestresste Kontrollen parallel zu den evolvierten Stämmen kultiviert. Diese parallel ungestressten Kulturen wurden grundsätzlich genauso behandelt, wie die evolvierten Stämme. Jedoch wurden sie nie mit HOCl konfrontiert. Demzufolge wurde jeder neue Stresszyklus mit vier verschiedenen Kulturen begonnen: mit zwei parallelen, evolvierten, HOCl-resistenten Stämmen und zwei parallelen, ungestressten Kontrollstämmen. Die

doppelten Ansätze dienten zunächst als eine Art Sicherheitskopie. Davon wurde beim vierten Stresszyklus des Evolutionsprozesses Gebrauch gemacht, indem nur aus einem der beiden parallelen, evolvierten Stämme sämtliche weiterführenden Stress-Kulturen angeimpft wurden. Ab dann wurden beide Stämme jedoch getrennt voneinander evolviert.

Die ersten fünf Stresszyklen unterschieden sich von den anderen insofern, als dass in ihnen die zu evolvierenden Kulturen jedes Mal ausschließlich mit 5 mM HOCl gestresst wurden. Im 29. Und 30. Stresszyklus wurde das HOCl mit 7,5 ml anstatt der sonst 5 ml 5-fach konzentriertem LB-Medium gequencht.

Nach einigen Stresszyklen wurden von allen vier Kulturen Glycerinkulturen angelegt und zudem je 10 µl auf LB_{Kan50}-Platten zur Kontrolle ausplattiert. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Entstehung der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme im Zuge des Evolutionsprozesses und ihre Stammbezeichnungen.

Tabelle 11: Übersicht über die Evolution der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme und ihre Stammbezeichnungen. Aufgeführt sind die durchgeführten Stresszyklen mit der jeweils verwendeten HOCl-Konzentration sowie die Bezeichnung der *E. coli*-Stämme, von denen Glycerinkulturen angelegt wurden.

Stresszyklus	**parallel ungestresste *E. coli*-Kontrollstämme**		**parallele, evolvierte, HOCl-resistente *E. coli*-Stämme**	
Ursprungsstamm:	BB7224	BB7224	BB7224	BB7224
1. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl	
2. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	ohne Stress wachsen gelassen	
3. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl	
4. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl	
5. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl
6. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl	Stress mit 5 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.2	E 8.1.2	E 8.2.2	E 8.3.2
7. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5,6 mM HOCl	Stress mit 5,6 mM HOCl
8. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5,6 mM HOCl	Stress mit 5,6 mM HOCl
9. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 5,8 mM HOCl	Stress mit 5,8 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.3	E 8.1.3	E 8.2.3	E 8.3.3
10. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 6 mM HOCl	Stress mit 6,2 mM HOCl
11. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 6,2 mM HOCl	Stress mit 6,2 mM HOCl
12. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 6,2 mM HOCl	Stress mit 6,2 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.4	E 8.1.4	E 8.2.4	E 8.3.4
13. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 6,6 mM HOCl	Stress mit 6,6 mM HOCl
14. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 6,8 mM HOCl	Stress mit 6,8 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.5	E 8.1.5	E 8.2.5	E 8.3.5
15. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 7 mM HOCl	Stress mit 7 mM HOCl
16. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 7,4 mM HOCl	Stress mit 7,4 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.6	E 8.1.6	E 8.2.6	E 8.3.6
17. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 7,4 mM HOCl	Stress mit 7,4 mM HOCl
18. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 7,6 mM HOCl	Stress mit 7,6 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.7	E 8.1.7	E 8.2.7	E 8.3.7
19. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 8 mM HOCl	Stress mit 8 mM HOCl
20. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 8,2 mM HOCl	weiter wachsen gelassen
21. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 8,2 mM HOCl	Stress mit 8,2 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.8	E 8.1.8	E 8.2.8	E 8.3.8
22. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 8,6 mM HOCl	Stress mit 8,6 mM HOCl
23. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 8,8 mM HOCl	Stress mit 8,8 mM HOCl
24. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 9,2 mM HOCl	Stress mit 9,2 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.9	E 8.1.9	E 8.2.9	E 8.3.9
25. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 9,4 mM HOCl	Stress mit 9,4 mM HOCl
26. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 9,6 mM HOCl	Stress mit 9,6 mM HOCl
27. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 10 mM HOCl	Stress mit 10 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.10	E 8.1.10	E 8.2.10	E 8.3.10
28. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 10,4 mM HOCl	Stress mit 10,4 mM HOCl
29. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 0 mM HOCl	Stress mit 0 mM HOCl
30. Stresszyklus	0 mM HOCl	0 mM HOCl	Stress mit 10,4 mM HOCl	Stress mit 0 mM HOCl
Glycerinkultur:	E 8.0.11	E 8.1.11	E 8.2.11	E 8.3.11

2.2.12 Dauerhafte Kultivierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme bei 37°C

Um festzustellen, ob und gegebenenfalls wie schnell evolvierte Hitze-resistente *E. coli*-Stämme (Rudolph *et al.*, 2010) ihre Hitze-Resistenz verlieren, wurden sie dauerhaft bei 37°C kultiviert. Begonnen wurde hierbei mit den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM25, $BM28^{GroEL+}$ und $BM28^{GroEL-}$ sowie dem Hitze-sensitiven Kontrollstamm BM3. Zu Beginn wurden daher je 10 ml LB_{Kan50}-Medium mit diesen Stämmen angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Mit je 50 µl von diesen Übernachtkulturen wurden je 10 ml LB_{Kan50}-Medium angeimpft und wiederum über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wiederholte sich dieses Vorgehen. Auf diese Weise wurden insgesamt 24 Überimpfungszyklen durchgeführt. Während dieses Prozesses wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Glycerinkulturen der Stämme angelegt und zur Kontrolle je 5 µl der jeweiligen Kultur auf eine LB- sowie eine LB_{Kan50}-Platte aufgetragen und ausgestrichen. In Tabelle 12 findet sich eine Übersicht über die verschiedenen erhaltenen Glycerinkulturen und deren Bezeichnungen. Die Hitze-Resistenz dieser Stämme wurde mit Hilfe von Hitze-Platten überprüft.

Tabelle 12: Glycerinkulturen aus der dauerhaften Kultivierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme bei 37°C. Aufgeführt sind die Anzahl der Überimpfungszyklen und die Bezeichnung der angelegten Glycerinkulturen.

Überimpfungs -zyklus	**Bezeichnung der Glycerinkulturen der dauerhaft bei 37°C kultivierten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme**			
Ursprungsstamm:	BM3	BM25	$BM28^{GroEL+}$	$BM28^{GroEL-}$
nach 4 Zyklen:	BM3 R1	BM25 R1	$BM28^{GroEL+}$ R1	$BM28^{GroEL-}$ R1
nach 7 Zyklen:	BM3 R2	BM25 R2	$BM28^{GroEL+}$ R2	$BM28^{GroEL-}$ R2
nach 9 Zyklen:	BM3 R3	BM25 R3	$BM28^{GroEL+}$ R3	$BM28^{GroEL-}$ R3
nach 13 Zyklen:	BM3 R4	BM25 R4	$BM28^{GroEL+}$ R4	$BM28^{GroEL-}$ R4
nach 17 Zyklen:	BM3 R5	BM25 R5	$BM28^{GroEL+}$ R5	$BM28^{GroEL-}$ R5
nach 21 Zyklen:	BM3 R6	BM25 R6	$BM28^{GroEL+}$ R6	$BM28^{GroEL-}$ R6
nach 24 Zyklen:	BM3 R7	BM25 R7	$BM28^{GroEL+}$ R7	$BM28^{GroEL-}$ R7

2.2.13 Dauerhafte Kultivierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme ohne HOCl

Um festzustellen, ob und gegebenenfalls wie schnell die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme ihre HOCl-Resistenz wieder verlieren, wurden sie dauerhaft ohne HOCl kultiviert. Begonnen wurde hierbei mit den beiden evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie dem parallel ungestressten Kontrollstamm E 8.0.9. Zu

Beginn wurden daher je 10 ml LB_{Kan50}-Medium mit diesen Stämmen angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Mit je 50 µl von diesen Übernachtkulturen wurden je 10 ml LB_{Kan50}-Medium angeimpft und wiederum über Nacht bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wiederholte sich dieses Vorgehen. Auf diese Weise wurden insgesamt 24 Überimpfungszyklen durchgeführt. Während dieses Prozesses wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Glycerinkulturen der Stämme angelegt und zur Kontrolle je 5 µl der jeweiligen Kultur auf eine LB- sowie eine LB_{Kan50}-Platte aufgetragen und ausgestrichen. Tabelle 13 enthält eine Übersicht über die verschiedenen erhaltenen Glycerinkulturen und deren Bezeichnungen. Die HOCl-Resistenz dieser Stämme wurde mittels HOCl-Regenerierungs-Test überprüft.

Tabelle 13: Glycerinkulturen aus der dauerhaften Kultivierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme ohne HOCl. Aufgeführt sind die Anzahl der Überimpfungszyklen und die Bezeichnung der angelegten Glycerinkulturen.

Überimpfungs -zyklus	**Bezeichnung der Glycerinkulturen der dauerhaft ohne HOCl kultivierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme**		
Ursprungsstamm:	E 8.0.9	E 8.2.9	E 8.3.9
nach 4 Zyklen:	E 8.0.9 R1	E 8.2.9 R1	E 8.3.9 R1
nach 7 Zyklen:	E 8.0.9 R2	E 8.2.9 R2	E 8.3.9 R2
nach 9 Zyklen:	E 8.0.9 R3	E 8.2.9 R3	E 8.3.9 R3
nach 13 Zyklen:	E 8.0.9 R4	E 8.2.9 R4	E 8.3.9 R4
nach 17 Zyklen:	E 8.0.9 R5	E 8.2.9 R5	E 8.3.9 R5
nach 21 Zyklen:	E 8.0.9 R6	E 8.2.9 R6	E 8.3.9 R6
nach 24 Zyklen:	E 8.0.9 R7	E 8.2.9 R7	E 8.3.9 R7

2.2.14 Lichtmikroskopie

Zur Analyse der Zellmorphologie verschiedener *E. coli*-Stämme, wurden Kulturen mit Hilfe eines Lichtmikroskops betrachtet. Hierzu wurden Zellen einer Flüssigkultur eines zu betrachtenden *E. coli*-Stamms in der exponentiellen Wachstumsphase sowie in der stationären Phase mit einem Axiovert 200-Mikroskop von der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) angesehen und dabei fotografiert. Unter Verwendung der ImageJ (Wayne Rasband)-Software und mit Angaben von Christoph Kaiser wurde eine entsprechende Maßstabsleiste in jedes Bild eingefügt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) kann DNA vervielfältigt werden. Dabei amplifiziert eine DNA-Polymerase ein DNA-Fragment eines Templates, welches von zwei entgegengesetzt orientierten Oligonukleotiden (Primern) begrenzt wird. Die Vervielfältigung erfolgt in mehreren Zyklen, von denen sich jeder aus drei Schritten zusammensetzt. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge des Templates aufgeschmolzen. Die Anlagerung der Primer an komplementäre Einzelstrangsequenzen, das sogenannte „*Annealing*“, erfolgt bei einer Primer-abhängigen Temperatur im zweiten Schritt. Beginnend am freien 3‘-Ende der Primer, synthetisiert die DNA-Polymerase im dritten Schritt, der „*Elongation*“, komplementäre DNA-Stränge. Die Elongationstemperatur richtet sich nach der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten DNA-Polymerase und die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments.
Für diese Arbeit wurde vor allem die GoTaq- aber auch die Phusion High-Fidelity- und *Pfu*-DNA-Polymerase je nach Anweisung des Herstellers verwendet.
Für eine Kolonie-PCR wurde ein Teil einer Kolonie mittels steriler Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in den PCR-Ansatz gegeben.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden zu präparativen, analytischen und Kontrollzwecken mittels Agarosegelelektrophorese elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Für ein Agarosegel wurde, je nach Größe der erwarteten Fragmente, meist 1%, 1,5% oder 1,8% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur von weniger als 60°C und vor dem Gießen des Gels wurden entweder ca. 0,4 µg/ml Ethidiumbromid oder 0,004 - 0,008% (v/v) SERVA DNA Stain Clear G hinzugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V in 1x TAE-Puffer. Als Längenstandard wurde eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die Visualisierung der Banden erfolgte unter UV-Licht mit einem ImageQuant 300 Geldokumentationssystem.

2.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen wurden mit dem „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ aufgereinigt.

2.3.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von Nukleinsäurenkonzentrationen erfolgte spektrophotometrisch mit Hilfe des NanoDrops. Hierbei wurden je 2 µl einer DNA- oder RNA-Lösung vermessen.

2.3.5 Restriktionsverdau

Unter einem Restriktionsverdau wird das Schneiden von DNA durch Restriktionsenzyme verstanden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Die Zugabe der Enzyme erfolgte im Überschuss. Dabei lag die gesamte eingesetzte Enzymmenge nie über 10% (v/v) des Ansatzes. Es wurde stets ein Puffer des Herstellers verwendet, in welchem die Restriktionsenzyme eine hohe Aktivität zeigen. In der Regel erfolgte der Verdau innerhalb von 1 - 2 h bei 37°C.

2.3.6 Ligation

Bei einer Ligation werden Nukleinsäurensegmente in einer Reaktion, die durch das Enzym Ligase katalysiert wird, durch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den freien Enden miteinander verbunden. Für eine Ligation wurden ein Vektor (Plasmid) und ein Insert (DNA-Fragment, welches in den Vektor eingefügt werden soll) im molaren Verhältnis 1:3 und 1:10 eingesetzt. Zusätzlich wurde stets eine Religationskontrolle angesetzt, die lediglich den Vektor ohne Insert enthielt. In einen 20 µl-Ligationsansatz wurden neben Vektor und Insert 1 µl T4 DNA Ligase und 2 µl des mitgelieferten 10x Ligase-Puffers eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.3.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich elektrokompetente *E. coli*-Zellen hergestellt. Hierfür wurden 50 ml LB-Medium mit der Übernachtkultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms auf einen OD_{600}-Wert von 0,025 angeimpft. Diese Kultur wurde, je nach Stamm, bei 30°C oder 37°C unter Schütteln inkubiert. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von 0,4 - 0,5, wurden 30 ml durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 8°C geerntet. Das Zellpellet wurde daraufhin zuerst mit 30 ml, dann mit 10 ml und in einem dritten Waschschritt mit 5 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Bei jedem der Waschschritte wurde das Zellpellet im Glycerin resuspendiert und anschließend für 10 min bei 5000 rpm und 8°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, zu 100 µl-Ansätzen in auf Eis vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.
Da elektrokompetente Hitze-resistente *E. coli*-BM25 und -BM28^{GroEL-}-Zellen eine geringe Transformationseffizienz aufwiesen, wurden zudem ultra-kompetente Zellen für die Transformation mittels Hitzeschritt hergestellt. Hierzu wurden Zellen des entsprechenden *E. coli*-Stamms in 10 ml SOB-Medium bei 16°C - 19°C unter sehr starkem Schütteln inkubiert. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von 0,5, wurde sie zunächst für 10 min auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 8°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 8 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurde der Ansatz erneut für 10 min bei 5000 rpm und 8°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml eiskaltem TB-Puffer und 70 µl DMSO (zuvor über Nacht bei -20°C gelagert) resuspendiert, zu 200 µl-Ansätzen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.8 Transformation von *E. coli*-Zellen

Mittels Transformation können kompetente Bakterienzellen freie DNA aus der Umwelt aufnehmen.
Zur Transformation von DNA in einen elektrokompetenten *E. coli*-Stamm wurden 0,5 - 5 µl einer DNA-Lösung oder die gefällte DNA zu 50 µl elektrokompetenten Zellen, gegebenenfalls verdünnt mit eiskaltem 10% (v/v) Glycerin, in ein Reaktionsgefäß auf Eis gegeben. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 30 min, wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1mm oder 2mm) pipettiert. Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines vorprogrammierten Programms (200 Ohm, 25 µF, 1,8 kV) in einem Elektroporationsgerät. Daraufhin wurde der Ansatz so schnell wie möglich bei Raumtemperatur in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl vorgelegtem LB-Medium überführt und für ca. 1 - 2 h bei 30°C bzw. 37°C, je nach Stamm, und 300 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend

wurden 200 - 250 µl des Ansatzes auf einer LB-Platte mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert. Nachdem die Platte bei Raumtemperatur getrocknet war, wurde sie über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Auf der Platte wuchsen lediglich die Transformanten, welche die freie DNA aufgenommen hatten. Als Kontrolle diente stets ein Ansatz, der ausschließlich die elektrokompetenten Zellen und nicht die zu transformierende DNA enthielt.
Für die Transformation ultra-kompetenter *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschritt wurden 200 µl der ultra-kompetenten Zellen mit der zu transformierenden DNA bzw. dem Transposom vermischt und 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Nachdem der Ansatz für 45 s bei 42°C einem Hitzeschritt unterzogen wurde, erfolgte eine Abkühlung auf Eis. Daraufhin wurde 1 ml LB-Medium hinzu pipettiert und der Ansatz bei 37°C und 300 rpm für etwa 30 - 60 min im Thermomixer inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet im restlichen Medium resuspendiert und auf einer LB-Platte mit den zur Selektion benötigten Medienzusätzen ausplattiert. Die Platte wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Auf der Platte wuchsen ausschließlich Transformanten, welche die freie DNA aufgenommen hatten. Zur Kontrolle wurde stets ein Ansatz, der lediglich die ultra-kompetenten Zellen ohne die zu transformierende DNA enthielt, dem Transformationsprozess unterzogen.

2.3.9 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen

Plasmide wurden mit Hilfe des „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems“ aus Zellen einer Übernachtkultur isoliert.

2.3.10 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*-Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA aus *E. coli*-Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Vorgehensweise etabliert, welche zu hohen Ausbeuten an reiner chromosomaler DNA führt.
Hierfür wurde zunächst eine Vorkultur mit 10 ml LB-Medium und dem entsprechenden *E. coli*-Stamm, von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur, angesetzt. Nach einer Inkubation bei 30°C bzw. 37°C, je nach Stamm, und 140 rpm für ca. 5 - 6 h wurde die Vorkultur zu 40 ml LB-Medium gegeben und über Nacht weiter inkubiert. In den Kulturen war stets ein entsprechendes Antibiotikum enthalten, um einer Kontamination vorzubeugen. Von der Übernachtkultur wurden 100 µl zur Kontrolle des *E. coli*-Stamms mittels SDS-PAGE und

12 - 24 ml für die Isolierung der genomischen DNA entnommen. Letztere wurden für 10 min bei 5000 rpm und 25°C abzentrifugiert.

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des „GenElute Bacterial Genomic DNA Kits“. Je 2 ml geerntete Zellen entsprachen einem Ansatz des DNA-Isolierungskits. Demzufolge wurde ein Pellet aus 12 ml geernteten Zellen in 1080 µl „Lysis Solution T“ und ein Pellet aus 24 ml geernteten Zellen in 2160 µl „Lysis Solution T“ sorgfältig resuspendiert (Schritt 2a. des Kit-Protokolls). Daraufhin wurden die resuspendierten Zellen auf die entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen (6 - 12) aufgeteilt. Grundsätzlich wurde den Anweisungen des Protokolls zum Kit gefolgt. Abweichungen und Besonderheiten, die etabliert wurden, sind im Folgenden beschrieben. Der optionale RNase A-Behandlungsschritt wurde durchgeführt. Zur Vorbereitung der Zelllyse (Schritt 3a.) wurden in jedem Ansatz 10 µl alkalische Protease-Lösung des „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems“ verwendet. Nach der Zugabe von „Lysis Solution C“ für die Zelllyse (Schritt 4a.) wurden die Ansätze nicht gevortext sondern mittels Auf- und Abpipettieren möglichst homogen vermischt. Die Inkubation der Ansätze während der Zelllyse (Schritt 4a.) erfolgte bei 55°C in einem Wasserbad im Brutschrank, welches mit Aluminiumfolie abgedeckt wurde, für etwa 20 - 40 min. In Vorbereitung der Proben auf die Bindung an das Säulenmaterial (Schritt 6.) wurde 100% (v/v) Ethanol (p. a.) verwendet und die Ansätze wurden nicht gevortext, sondern invertiert und im nächsten Schritt (Schritt 7.) auf- und abpipettiert. Immer, wenn in den folgenden Schritten des Protokolls stand, dass bei 6500 x g zentrifugiert werden sollte, wurde stattdessen bei 12000 x g zentrifugiert. Befand sich nach einem Zentrifugationsschritt noch Überstand über dem Säulenmaterial, wurde erneut, aber bei 13300 rpm für 1 - 5 min, zentrifugiert. Der optionale Zentrifugationsschritt zum Entfernen des restlichen Ethanols nach dem zweiten Waschen (Schritt 9.) wurde stets durchgeführt. Die Elution der DNA (Schritt 10.) erfolgte mit der „Elution Solution“ oder Wasser in zwei Schritten. Dabei wurden jedes Mal 200 µl „Elution Solution“ oder Wasser auf das Säulenmaterial pipettiert, der Ansatz ca. 5 - 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 1 min bei 13300 rpm zentrifugiert.

Die eluierte genomische DNA wurde anschließend mittels Ethanol-Fällung aufkonzentriert und die je 6 - 12 Ansätze pro Stamm vereinigt. Dies geschah, indem je ein DNA-Pellet in 50 - 100 µl „Elution Solution“ oder Wasser durch Inkubation bei 25°C und 300 rpm im Thermomixer für ca. 15 min - 2 h gelöst und die DNA-Lösung anschließend auf das nächste DNA-Pellet gegeben wurde usw., bis alle Ansätze eines Stamms vereint waren. Die Messung der DNA-Konzentration und ihrer Reinheit erfolgte mit Hilfe des NanoDrops. Gelagert wurde die genomische DNA kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C.

2.3.11 DNA-Fällung

Zur Fällung von DNA in einer Lösung, wurde 1/10 des Ansatzvolumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,5) und das 2,5-fache Ansatzvolumen an 100% (v/v) Ethanol (p. a.) zugegeben und alles vermischt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -20°C für mindestens 1 h, in der Regel jedoch über Nacht. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 4°C und 13300 rpm zentrifugiert und das DNA-Pellet dreimal mit je 100 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Dabei wurde jedes Mal für 10 min bei 4°C und 13300 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand komplett entfernt und das Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß bei 37°C innerhalb von 30 min getrocknet. Mit dem DNA-Pellet wurde erst weitergearbeitet, wenn kein Ethanol mehr im Reaktionsgefäß vorhanden war.

2.3.12 DNA-Sequenz-Analyse

Zur Sequenzierung von DNA, sei es ein Plasmid, ein PCR-Produkt oder genomische DNA, wurden DNA-Lösungen und gegebenenfalls die erforderlichen Primer, den jeweiligen Anforderungen entsprechend, an die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte vor allem mit Hilfe der verschiedenen BLAST-Programme auf der Internetseite http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI).

2.3.13 Isolierung von RNA aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung von RNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des „SV Total RNA Isolation Systems“. Es wurden „epT.I.P.S.“-Pipettenspitzen und „Safe-Lock“-Reaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Sämtliche Oberflächen, wie jene des Arbeitsplatzes, der Pipetten, der Pipettenspitzenboxen sowie der Reaktionsgefäßständer und Schutzhandschuhe, wurden mit „RNase Zap“ behandelt, um eine Kontamination der Proben mit Ribonukleasen (RNasen) zu vermeiden.
Für die Isolierung von RNA wurde mit geringen Abweichungen grundsätzlich dem Protokoll des Kits gefolgt. Verfahren wurde wie folgt. Das jeweilige Zellpellet wurde zuerst mit 100 µl einer 0,4 mg/ml Lysozym-TE-Puffer-Lösung vermischt und für 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 75 µl „RNA Lysis Buffer“, 350 µl „RNA

Dilution Buffer“ und 200 µl 95% (v/v) Ethanol, wurde der Ansatz auf die Säule aufgetragen und für 1 min bei 13300 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 600 µl „RNA Wash Solution“ auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 13300 rpm zentrifugiert. Der „DNase incubation mix“ wurde frisch angesetzt und von diesem wurden sofort 50 µl zur Probe hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert bevor 200 µl „DNase Stop Solution“ dazu gegeben und für 1 min bei 13300 rpm zentrifugiert wurde. Es folgte ein Waschschritt mit 600 µl „RNA Wash Solution“ und Zentrifugation für 1 min bei 13300 rpm und ein zweiter Waschschritt mit 200 µl „RNA Wash Solution“ und Zentifugation für 2 min bei 13300 rpm. Die Elution der RNA erfolgte mit 100 µl Nuklease-freiem Wasser in ein neues Reaktionsgefäß durch Zentrifugation für 1 min bei 13300 rpm.
Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrops gemessen. Die RNA-Lösung eines Ansatzes wurde auf 4 Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.14 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) kann die Expression einzelner Gene analysiert werden.
Die Primer für qRT-PCRs wurden nach folgenden Kriterien designt. Das Produkt sollte eine Größe von etwa 299 bp aufweisen. Idealerweise sollte der Vorwärtsprimer dabei am Transkriptionsstart bzw. Start-Codon des jeweiligen Gens annealen. Die Primer waren etwa 30 bp lang und besaßen eine Schmelztemperatur von ungefähr 70°C - 75°C. Sie wurden mit Hilfe einer PCR auf ihre Spezifität getestet. Das Programm dieser Test-PCR war an das spätere qRT-PCR-Programm angelehnt. Der Ansatz und das Programm der Test-PCR waren wie folgt:

Ansatz (10 µl):
1 µl Templat
0,2 µl dNTPs
0,04 µl Vorwärtsprimer
0,04 µl Rückwärtsprimer
0,1 µl DMSO
2 µl 5x GoTaq-Puffer
6,57 µl Wasser
0,05 µl GoTaq DNA Polymerase

Programm:

95°C 3 min
95°C 20 s
60°C 30 s } 40x
72°C 30 s
72°C 5 min
4°C ∞ .

Es wurden letztendlich lediglich jene Primerpaare für qRT-PCR-Experimente verwendet, die ein spezifisches PCR-Produkt erzeugten. Für jedes Primerpaar wurde ein Primermix aus je 2,8 µl Primer und 165 µl Nuklease-freiem Wasser hergestellt und bei -20°C gelagert. Um zu testen, welche RNA-Konzentration für optimale Ergebnisse in die qRT-PCR-Experimente eingesetzt werden sollte, wurde mit jedem Primerpaar unter Einsatz verschiedener RNA-Konzentrationen ein Test-qRT-PCR-Experiment durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Test-qRT-PCRs wurden daraufhin stets 50 ng RNA in einen 20 µl-qRT-PCR-Ansatz eingesetzt.

Für die qRT-PCR-Experimente wurde das „Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QRT-PCR Master Mix"-Kit verwendet. In der Regel wurden 96 Ansätze gleichzeitig für ein qRT-PCR-Experiment angesetzt. Hierbei wurde zuerst ein Reagenzienmix aus 1 ml „SYBR Green QRT-PCR master mix" (2x), 20 µl 100mM DTT, 30 µl 1:500 in Nuklease-freiem Wasser verdünntem „reference dye" und 460 µl Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Pro Reaktionsansatz wurden je 15,625 µl dieses Reagenzienmix' mit 2,1375 µl Primermix versetzt. Die Volumina des einzusetzenden Reagenzienmix' und des Primermix' erscheinen so sehr genau, da tatsächlich nie nur ein Reaktionsansatz für ein Primerpaar hergestellt wurde. In der Regel wurde für ein Primerpaar ein Mastermix für mehrere Ansätze mit verschiedenen RNA-Proben angesetzt. Pro Reaktionsansatz wurde anschließend 1 µl „RT/RNase block" hinzupipettiert. Als Kontrolle für einen Ansatz konnte ein sonst identischer Ansatz ohne „RT/RNase block" dienen. Je 18 µl eines Ansatzes aus Reagenzienmix, Primermix und „RT/RNase block" wurden mit 2 µl RNA-Lösung vermischt und in das qRT-PCR-Experiment eingesetzt. Die benötigte RNA-Probe wurde hierfür auf Eis aufgetaut, ihre Konzentration gemessen und gegebenenfalls eine Verdünnung in Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Es wurde stets ein Kontrollansatz, welcher statt RNA Nuklease-freies Wasser enthielt, angesetzt. All diese Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nach dem Herunterzentrifugieren der Ansätze für 5 min bei 500 rpm, wurden sie in das Stratagene Mx3000P-Gerät gestellt. Darin erfolgte die cDNA-Synthese innerhalb von 10 min bei 50°C und anschließend ihre Denaturierung für 3 min bei 95°C. Es folgten 40 Zyklen zur Amplifikation der cDNA. In jedem Zyklus erfolgte die Denaturierung für 20 s bei 95°C, das

Annealing der Primer und die Elongation für 30 s bei 60°C. Indem nach der Amplifikation die Inkubationstemperatur von 25°C auf 95°C erhöht wurde, konnten unspezifische Produkte oder Primer-Dimere detektiert werden. Die Amplifikationseffizienz wurde mit Hilfe von Standardkurven für jedes Primerpaar betrachtet. Als eine interne Kontrolle wurde das Gen *tufB* verwendet. Dadurch konnte eine Normierung, das heißt ein Ausgleich von Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA zwischen verschiedenen Proben, erfolgen.

2.3.15 Kreuzung von *lacZ*-Fusionen in das *E.coli*-Chromosom

Das Gen *lacZ* kodiert das Enzym β-Galaktosidase. Die Expression eines Gens kann durch die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität einer *lacZ*-Gen-Fusion verfolgt werden.
Als Ausgangsplasmid für die Konstruktion von translationalen *lacZ*-Fusionen wurde pJL28 (Lucht *et al.*, 1994) verwendet. PCR-Produkte mit *lacZ*-Fusionskonstrukten wurden in den pJL28-Vektor kloniert und anschließend nach Simons *et al.* (Simons *et al.*, 1987) in das bakterielle Chromosom transferiert. Dabei wurden die Konstrukte zunächst vom Plasmid auf λRS45- oder λRS74-Phagen, durch Rekombination zwischen den Plasmid-kodierten Genen *bla* und *lacZ* und den Phagen-kodierten Genen *bla'* und *lacZ'*, übertragen. Indem sich der Phage anschließend an der *att*-site eines ausgewählten Bakterienstamms integrierte, wurde die *lacZ*-Fusion stabil in das bakterielle Chromosom eingebaut. Um eine mehrfache Integration des Phagen in das Chromosom auszuschließen, erfolgte ein Test auf Einzellysogenie mittels PCR nach Powell *et al.* (Powell *et al.*, 1994).

2.3.16 Konstruktion von Mutanten

Deletionsmutanten wurden mit Hilfe der „One-Step"-Inaktivierung von chromosomalen Genen, wie von Datsenko und Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) beschrieben, hergestellt. Hierbei wurde das zu deletierende chromosomale Gen durch eine Antibiotikumsresistenzkassette ersetzt. Die korrekte Insertion der Resistenzkassette wurde mittels PCR kontrolliert.

2.3.17 Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene mittels Transposoninsertion

Die Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene kann durch die Insertion von Transposons in jene Gene erfolgen. Eine Vorgehensweise zur Nutzung dieser Methode wurde mit Hilfe

des „EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp Transposome“-Kits anhand von Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen (Rudolph *et al.*, 2010) optimiert.

Das EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp-Transposom ist ein stabiler Komplex aus dem Enzym EZ-Tn5-Transposase und dem Transposon EZ-Tn5 <DHFR-1>. Das Transposon besitzt ein Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Gen, welches in *E. coli* eine Trimethoprim (TMP)-Resistenz vermittelt. Dieses Gen wird im EZ-Tn5-Transposon von hyperaktiven 19 bp „Mosaic End (ME) EZ-Tn5 Transposase“-Erkennungssequenzen flankiert. Das EZ-Tn5-Transposom wird in Bakterienzellen transformiert. Dort wird die EZ-Tn5-Transposase durch Mg^{2+} aktiviert, wodurch das EZ-Tn5-Transposon zufällig in die genomische DNA eines Bakteriums inseriert. Infolge der Insertion des Transposons wird eine Zelle resistent gegen TMP. Durch die Sequenzierung mit Transposon-spezifischen Primern kann die Position der Transposoninsertion im bakteriellen Chromosom ermittelt werden. Demzufolge sollte eine Sequenzierung mit den Transposon-spezifischen Primern aus dem Transposon heraus in die chromosomale DNA eines, infolge der Transposoninsertion Hitze-sensitiven, *E. coli*-BM25- oder BM28-Klons, die Insertionsposition des Transposons bestimmt und damit gegebenenfalls ein Gen identifiziert werden, welches in BM25 oder BM28 zur Hitze-Resistenz führt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die *E. coli*-Stämme BM3, BM25 und BM28 auf LB-Platten mit TMP-Konzentrationen von mehr als 0,2 µg/ml nicht wachsen können. Mit dem EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp-Transposom transformierte BM25- und BM28-Zellen wuchsen hingegen auch noch auf LB-Platten mit TMP-Konzentrationen von 30 µg/ml. Für die weiterführenden Versuche wurden daher stets 10 µg/ml TMP verwendet. Laut den Anweisungen des Kits hatten die verwendeten kompetenten *E. coli*-Zellen eine Transformationseffizienz von mindestens 10^7 Kolonien pro µg DNA aufzuweisen. Auch wenn die BM25- und BM28-Zellen mehrmals dem Prozess zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen unterzogen oder ultra-kompetent gemacht wurden, konnte diese minimal erforderliche Transformationseffizienz nicht erreicht werden. Trotzdem wurde mit dem EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp-Transposom transformiert. Das Volumen an eingesetztem Transposom konnte dabei zwischen 0,25 - 1 µl je 50 µl kompetente Zellen und das Volumen der kompetenten Zellen zwischen 50 - 200 µl im Transformationsansatz variiert werden. Nach Inkubation auf LB-TMP-Platten bei 37°C über Nacht wurden TMP-resistente Kolonien auf LB-Platten ausgestrichen, die anschließend bei 37°C oder 47,5°C - 47,6°C inkubiert wurden. Die Selektion auf Hitze-Sensitivität stellte sich als schwierig heraus. Offenbar führten diverse Faktoren zu Schwankungen der Selektionstemperatur, sodass die Ergebnisse nur teilweise reproduziert werden konnten. Die Hitze-Sensitivität von Kolonien, die auf den LB-Platten bei 37°C aber nicht bei hohen Temperaturen wuchsen, wurde daher mehrfach wiederholt durch Ausstreichen und Inkubation bei 47,6°C überprüft. Die genomische DNA von Zellen, welche

letztendlich Hitze-sensitiv zu sein schienen, wurde isoliert und von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) mit dem Transposon-spezifischen „DHFR-1 RP-1 Reverse Primer“ sequenziert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Die quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Miller (Miller, 1972). Hierbei wurde o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG) als Substrat eingesetzt. Die Aktivität wurde in µmol gespaltenes Substrat (o-Nitrophenol) pro min pro mg Zellprotein angegeben.
Mit Hilfe von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktopyranosid)-Platten war ein schneller Test auf β-Galaktosidase-Aktivität in einem Bakterienstamm möglich. Das Enzym β-Galaktosidase hydrolysiert X-Gal. Dabei entsteht ein Indigofarbstoff. Kolonien, die eine intakte β-Galaktosidase exprimieren, färben sich daher auf Agarplatten mit X-Gal blau. Dieser Test ist sehr sensitiv und eher als qualitativer Test geeignet.

2.4.2 Messung des H_2O_2-Abbaus in einer Bakterienkultur

Die Messung des Abbaus von H_2O_2 in einer Bakterienkultur erfolgte mittels FOX-Assay. Hierfür wurde zuerst die FOX I-Lösung (125 µM Xylenolorange und 100 mM D-Sorbitol in Wasser) frisch hergestellt. 100 ml der FOX I-Lösung wurden daraufhin mit 1 ml FOX II-Lösung (25 mM Ammoniumeisen(II)-sulfat in 2,5 M H_2SO_4) zur Arbeitsreagenz (AR) vermischt. Vor der Verwendung der AR sollten mindestens 3 min vergehen.
Für die Erstellung einer H_2O_2-Kalibrierungskurve wurde ein 0,2 mM H_2O_2-Standard in Wasser hergestellt. Die H_2O_2-Standardlösung wurde so in Wasser verdünnt, dass je 100 µl H_2O_2-Lösung für eine Endkonzentration von 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM bzw. 35 µM in eine Plastikküvette gegeben werden konnten. Die Ansätze wurden mit je 1 ml AR vermischt. Bevor die Ansätze bei einer Wellenlänge von λ = 560 nm vermessen wurden, standen sie für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur. Mit Hilfe der Messwerte wurde eine Eichgerade erstellt und deren Anstieg ermittelt.
Um den H_2O_2-Abbau in einer Bakterienkultur zu betrachten, wurden 500 µl der Kultur bei einer OD_{600} von 0,45 - 0,5 in 10 ml LB-Medium verdünnt und mit 0,5 mM H_2O_2 versetzt. Das im Medium verbleibende H_2O_2 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Zudem

wurde eine Probe aus einem Ansatz ohne H_2O_2 entnommen. Es wurden je 5 µl, 10 µl, 15 µl oder 20 µl Probe mit dem entsprechenden Volumen an Wasser in einem Gesamtvolumen von 100 µl in eine Küvette pipettiert. Dabei wurde mit zunehmender Zeit das Probenvolumen erhöht. In jede Küvette wurde 1 ml AR hinzupipettiert und der gesamte Ansatz gemischt. Nachdem die Ansätze für mindestens 30 min bei Raumtemperatur standen, wurde die Absorption im Fotometer bei λ = 560 nm gegen einen Ansatz aus 1 ml AR mit 95 µl Wasser und 5 µl LB-Medium gemessen.
Jede einzelne Messung erfolgte in Doppelbestimmung. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Hierfür wurden zunächst Zellen durch Zentrifugation geerntet. Um den Vergleich verschiedener Proben miteinander zu ermöglichen, wurde das Pellet nach der Formel $OD_{600} \cdot 200 \cdot$ Probenvolumen in µl in 1x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe für mindestens 15 min bei 95°C inkubiert und konnte bei -20°C bis zum nächsten Arbeitsschritt gelagert werden. Die Proben wurden gegebenenfalls aufgetaut, bei 95°C für etwa 15 min inkubiert und 20 min bei 13300 rpm zentrifugiert. Je 10 µl einer Probe wurden neben 10 µl des Mark 12-Standards auf ein Neutral-Gradienten-Gel geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 35 mA pro Gel.
Die Proteine wurden auf dem SDS-Gel mittels Coomassie gefärbt. Zum Färben wurde das Gel in Fairbanks A aufgekocht und für mindestens 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Entfärben erfolgte durch Aufkochen des Gels in Fairbanks D und anschließender Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur. Das Gel wurde so lange entfärbt, bis der Farbstoff Coomassie lediglich die Proteinbanden deutlich färbte. Anschließend wurde das Gel gescannt.

2.5.2 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-PAGE)

Bei der zweidimensionalen SDS-PAGE (2D-PAGE) werden Proteine in der ersten Dimension durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) anhand ihres isoelektrischen Punkts und anschließend in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Mittels 2D-PAGE war es möglich, das Proteom von *E. coli*-Zellen zu analysieren. Einzelne Proteine konnten nach dem Ausstechen aus dem Gel und darauf folgendem Trypsinverdau mit Hilfe des MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers identifiziert werden.
Für die 2D-Gel-Proben wurden 500 µl oder 1ml der Übernachtkultur eines *E. coli*-Stamms durch Zentrifugation für 5 min bei 13300 rpm und 20°C geerntet. Das Zellpellet wurde daraufhin bis zu viermal mit je 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Dabei wurde stets für 6 min bei 13300 rpm und 20°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand sorgfältig vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 2D-Lysepuffer resuspendiert und für 1 h bei 1000 rpm und 20°C im Thermomixer inkubiert. Das jeweilige Volumen des 2D-Lysepuffers für eine Probe wurde nach der Formel 450 µl Lysepuffer · 1 ml OD 0,9 berechnet. Im Anschluss an die Inkubation im 2D-Lysepuffer, wurde die Probe viermal zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei 1000 rpm und 20°C wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 45 min bei 13300 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 45 min bei 13300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Probe bei -80°C gelagert.
Die IEF erfolgte als erste Dimension der 2D-PAGE auf einem vorgefertigten, auf einer Plastikfolie polymerisierten isoelektrischen Fokussierungsgradienten (IEF-Streifen). Dafür wurde die Probe in ein Keramikschiffchen vorgelegt, ein IEF-Streifen blasenfrei darüber gelegt und mit Silikonöl überschichtet. Nach der IEF wurde der IEF-Streifen für je 15 min in DTT-Lösung (1% (w/v) DTT in 2D-Äquilibrierungspuffer) und IAA-Lösung (4% (w/v) Iodacetamid in 2D-Äquilibrierungspuffer) äquilibriert, kurz in 2D-Laufpuffer gewaschen und für die zweite Dimension der 2D-PAGE auf ein 2D-Gel aufgelegt und in 2D-Agaroselösung (0,5% (w/v) Agarose und 0,25% (w/v) Bromphenolblau in 2D-Laufpuffer) eingebettet.
Die Färbung eines 2D-Gels erfolgte mittels Colloidal-Coomassie. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst kurz mit Wasser gewaschen und über Nacht in Colloidal-Coomassie-Lösung (10% (w/v) Ammoniumsulfat, 0,1% (w/v) Serva Blau G-250, 2% (v/v) Phosphorsäure und 20% (v/v) Methanol) gefärbt. Nach kurzem Waschen in Wasser erfolgte die Entfärbung mit 1% (v/v) Essigsäure. Das Gel wurde gescannt und konnte einige Zeit in Wasser aufbewahrt werden. Die Inkubationsschritte wurden alle unter Raumtemperatur und Schütteln durchgeführt. Die Durchführung der 2D-PAGE und das Färben des Gels erfolgten durch Bettina Richter.

2.5.3 Massenspektrometrie

Um ein Protein aus einem SDS- oder 2D-Gel mittels Massenspektrometrie zu identifizieren, wurde ein kleines Gelstück aus der Proteinbande bzw. dem Proteinspot ausgestochen. Die weitere Probenvorbereitung für die Massenanalyse erfolgte durch Bettina Richter. Bei der Probenvorbereitung wurden Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) sowie Massenspektrometrie-taugliches Wasser verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde das Gelstück zweimal für 10 min mit 100 µl einer 10 mM NH_4HCO_3-Lösung inkubiert, welche anschließend wieder entfernt wurde. Es folgte eine Inkubation für 10 min mit 100 µl einer 1:1-Mischung aus Acetonitril und 10 mM NH_4HCO_3. Anschließend wurden 100 µl Reduktionslösung (0,1 mM Tris/HCl pH 8,2, 0,5 mM Guanidiniumchlorid, 0,8 mM EDTA und 80 mM DTT) hinzugegeben und für 30 min bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Es wurden 10 µl Iodacetamid-Lösung (0,5 M in 0,1 M Tris pH 8,2) zugegeben und für 15 min im Dunkeln weiter geschüttelt. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen, 100 µl 10 mM NH_4HCO_3 und 5 µl 1 mM β-Mercaptoethanol zugegeben und für 5 min geschüttelt. Das Gelstück wurde daraufhin in 5 Schritten jeweils für 10 min in je 100 µl 10 mM NH_4HCO_3, dann Acetonitril mit 10 mM NH_4HCO_3 1:1 vermischt, dann 10 mM NH_4HCO_3, dann Acetonitril mit 10 mM NH_4HCO_3 1:1 vermischt und abschließend 10 mM NH_4HCO_3 gewaschen. Mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge wurde das Gelstück vollständig getrocknet. Anschließend wurden 2 µl Trypsin-Lösung (Trypsin, *sequencing grade modified*, Promega, 20 µg in 350 µl des mitgelieferten Puffers) zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 10 µl 10 mM NH_4HCO_3, 5 µl Acetonitril, 0,1% (v/v) TFA zugefügt und für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Die sich anschließende Analyse der Probe am Massenspektrometer erfolgte durch Helmut Krause. Hierbei wurde ein ZipTip mit 10 µl 50% (v/v) Acetonitril und danach mit 10 µl 0,1% (v/v) TFA gespült. Die Probe wurde daraufhin fünf- bis sechsmal aufgezogen und dann mit 10 µl 0,1% (v/v) TFA gewaschen. Anschließend wurden 1,3 µl der Matrix (α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure) aufgezogen und die Probe mit der Matrix auf das Target aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Probe im Massenspektrometer analysiert. Es wurde ein MALDI-TOF/TOF-Spektrometer verwendet, bei welchem die Ionisation der Probe durch Laserpulse auf die in die Matrix eingebettete Probe (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, MALDI) erfolgte. Die Ionen wurden beschleunigt und in einer feldfreien Driftstrecke nach ihrer Flugzeit (*time of flight*, TOF) aufgetrennt. Das verwendete Massenspektrometer verfügt über zwei in Serie geschaltete TOF-Analysatoren. Am Ende des Analysators wurden die Ionen durch Sekundärelektronenvervielfachung detektiert und ihr Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) ausgewertet. Die Datenanalyse erfolgte mit der BioTools- (Bruker Daltonics) und Mascot- (Matrix Science) Software.

2.6 Analyse intrazellulärer Eisenmengen

Die Analyse intrazellulärer Eisemengen erfolgte mittels Messung freien intrazellulären Eisens (Fe^{3+}) durch EPR (Elektronen-Paramagnetische-Resonanz)-Spektroskopie.
Für eine zu analysierende Probe wurde eine Übernachtkultur mit 50 ml LB-Medium angesetzt, um mit dieser am nächsten Tag 1 l LB-Medium auf eine OD_{600} von 0,05 anzuimpfen. Das verwendete LB-Medium wurde stets aus 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid in 1 l Wasser und für alle Kulturen eines Experiments zusammen angesetzt. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 30°C und 140 rpm. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von 0,45 - 0,5, wurde sie durch Zentrifugation für 5 min bei 7500 x g und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 8 ml vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 ml 100 mM DETAPAC (*Diethylenetriaminepentaacetic acid*, pH 7,0) wurde der Ansatz gut gemischt und anschließend mit 1 ml frisch hergestelltem 200 mM Deferoxamin (DFO, pH 8,0) versetzt und gemischt. Daraufhin folgte ein Inkubationsschritt bei 30°C in einem Wasserbad für 15 min unter Schütteln. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 5 ml eiskaltem 20 mM Tris-Cl mit 10% (v/v) Glycerin gewaschen und dann in 150 µl eiskaltem 20 mM Tris-Cl mit 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Für die erhaltene Zellpaste wurde in dreifacher Bestimmung die OD_{600} von 1000-fachen Verdünnungen in Wasser gemessen und der Mittelwert berechnet. Mindestens 300 µl der Zellpaste wurden in ein EPR-Röhrchen transferiert und die Probe langsam auf Trockeneis eingefroren. Die EPR-Röhrchen wurden mit einem Deckel versehen und bei -80°C gelagert. Die EPR-Röhrchen wurden vor dem Gebrauch mehrmals mit Aceton und Wasser gespült und anschließend getrocknet.
Um eine Standardkurve erstellen zu können, wurde 10 mM $FeCl_3$, gelöst in 1 mM DFO, in 20mM Tris-Cl (pH 7,4) mit 10% (v/v) Glycerin und 1 mM DFO zu Konzentrationen von 0 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM verdünnt. Die jeweilige Absorption dieser Standardansätze wurde bei einer Wellenlänge von λ = 420 nm gemessen. Indem die erhaltenen Messwerte jeweils durch den Extinktionskoeffizienten ε = 2865 M^{-1} cm^{-1} dividiert wurden, konnte für jeden Standardansatz die exakte Konzentration an $FeCl_3$ berechnet werden. Je mindestens 300 µl der Standardansätze wurden in EPR-Röhrchen transferiert, die Röhrchen langsam auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Standardansätze wurden am Tag der EPR-Messung frisch vorbereitet.
Die EPR-Messungen erfolgten mit Hilfe von Adrian Drazic und Dr. Carmen Haeßner am Spektrometer der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Köhler unter folgenden Messbedingungen: 10 mW Leistung, etwa 9,06 - 9,07 GHz Frequenz, 0,25 mT Modulation, 0,1 s Zeitkonstante und einer Temperatur von -125°C.

2.7 Membranfluiditätsmessungen

Die Betrachtung der Membranfluidität erfolgte mittels Fluoreszenzpolarisation (Fluoreszenzanisotropie) mit TMA-DPH (Trimethylammoniumdiphenylhexatrien) und wurde von Sébastien Dupont des UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (Équipe PMB, Dijon, Frankreich) durchgeführt. Hierfür wurden Glycerinkulturen der zu untersuchenden *E. coli*-Stämme auf Trockeneis nach Frankreich geschickt. Für die Messungen wurde eine 1 mM Stammlösung von TMA-DPH in Tetrahydrofuran (THF) angesetzt. Je 3 ml der Flüssigkultur eines zu betrachtenden *E. coli*-Stamms mit einer OD_{600} von 0,5 wurden mit 1 µl TMA-DPH-Lösung versetzt. Nach dem Rühren der Probe für 15 min bei 30°C im Dunkeln, wurde die TMA-DPH-Anisotropie in einem Fluorolog-3-Spektrometer gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug λ = 360 nm und die Emissionswellenlänge λ = 450 nm. Für jede Probe wurden mindestens zehn Wiederholungen mit je mindestens 50 Messungen bei 30°C durchgeführt. Im Anschluss an einen Messdurchgang wurde die Temperatur auf 5°C verringert, um den Einbau des TMA-DPH in die Membran zu überprüfen. Dabei sollte der Anisotropiewert mit sinkender Temperatur steigen. Änderte sich der Anisotropiewert jedoch nicht, wurde das TMA-DPH nicht in die Membran eingebaut. Grundsätzlich galt, je niedriger der Anisotropiewert, desto fluider ist die Membran.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse und Charakterisierung Hitze-resistenter *E. coli*-Stämme

Die Etablierung von Methoden zur Analyse und Charakterisierung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen erfolgte zunächst anhand der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010). Es handelt sich um MG1655-Zellen, welche entweder kontinuierlich bei 37°C (BM3) oder bei sukzessiv höheren Temperaturen, wie 42°C (BM15), 45°C (BM16), 48°C (BM25) und 48,5°C (BM28), kultiviert wurden. Über diese Stämme ist bekannt, dass im Zuge ihrer evolutiven Anpassung an hohe Temperaturen vor allem ihre Mengen an GroEL und GroES anstiegen (Abb. 2). Die erhöhten GroEL/S-Mengen sowie die Anwesenheit der Lysyl-tRNA-Synthetase, LysU, werden laut Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) für die Hitze-Resistenz benötigt. Bislang blieb jedoch die Ursache für die erhöhten GroEL/S-Mengen ungeklärt. Um diese Frage zu beantworten und gleichzeitig Methoden zur Analyse und Charakterisierung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen zu etablieren, wurden mit Hilfe der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme eine Transposon-vermittelte Methode optimiert, Genomsequenzierungen durchgeführt und die Stämme dauerhaft ohne den Stress, unter welchem sie evolviert wurden, kultiviert.

3.1.1 Die *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL+} und BM28^{GroEL-}

Unter den Glycerinkulturen der Stämme des Evolutionsprozesses unter erhöhten Temperaturen von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) befanden sich zwei verschiedene BM28-Glycerinkulturen. Bei einer der beiden Glycerinkulturen handelte es sich um den BM28-Stamm, welcher für die Arbeit von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) verwendet wurde. Dieser konnte bei einer Temperatur von 48,5°C wachsen, wies stark erhöhte GroEL/S-Mengen auf und wurde demnach in dieser Arbeit als BM28^{GroEL+} bezeichnet. Der andere BM28-Stamm entstand spontan, ohne weitere Selektion, konnte ebenfalls bei einer Temperatur von 48,5°C wachsen, wies jedoch keine erhöhten GroEL/S-Mengen auf und wurde daher in dieser Arbeit als BM28^{GroEL-} bezeichnet. In den Abbildungen 3 und 4 ist dieser Sachverhalt veranschaulicht. Hierbei zeigte die Betrachtung der Proteome der *E. coli*-Stämme BM3, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mittels SDS-PAGE, dass die GroEL/S-Mengen in den Stämmen BM25 und BM28^{GroEL+} deutlich höher waren als in BM28^{GroEL-} und BM3 (Abb. 3). Trotz der unterschiedlich hohen GroEL/S-Mengen wuchsen die beiden Stämme BM28^{GroEL+} und BM28^{GroEL-} bei einer Temperatur von 48,5°C nahezu identisch (Abb.

4). Demnach scheinen hohe GroEL/S-Mengen nicht direkt für die Hitzeresistenz verantwortlich zu sein.

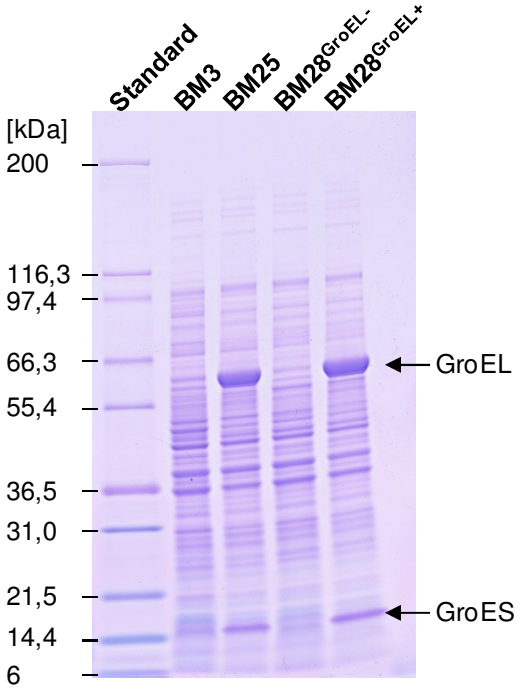


Abbildung 3: Proteomanalyse der *E. coli*-Stämme BM3, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mittels SDS-PAGE. Aufgetrennt wurden Proben aus einer Übernachtkultur des jeweiligen Stammes nach Wachstum bei 37°C. Markiert sind die GroEL-Bande (57 kDa) und die GroES-Bande (10 kDa). Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

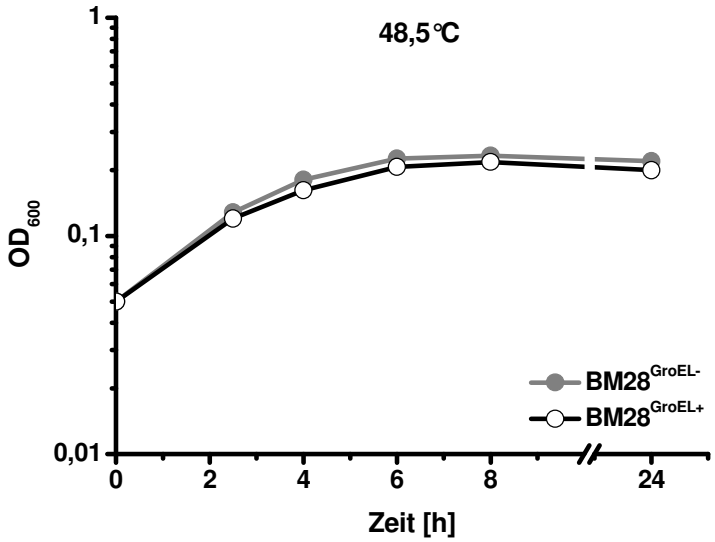


Abbildung 4: Wachstumskurven der *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} bei 48,5°C. Über einen Zeitraum von 24 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte (OD_{600}) der BM28^{GroEL-} (grau) - und BM28^{GroEL+} (weiß) - Kultur bestimmt.

3.1.2 Transposom-vermittelte Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene

Um Resistenz-vermittelnde Gene zu identifizieren, wurde eine Transposom-vermittelte Methode mit Hilfe des „EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp Transposome“-Kits anhand der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme optimiert (siehe 2.3.17). Insgesamt wurden dabei 1122 BM25- und BM28^{GroEL-}-Insertionsklone erhalten. Für eine statistische Absicherung sind 10^4 Transformanten nötig. Demnach wurden nicht ausreichend viele Insertionsklone hergestellt, um sicher gehen zu können, dass sich das Transposon statistisch mindestens einmal in jedes Gen des *E. coli*-Stamms inserierte. Dies lag vor allem an der sehr geringen Transformationseffizienz der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme, die auch nach umfangreichen Optimierungsversuchen nicht erhöht werden konnte.

Aus zwei BM28^{GroEL-}- und drei BM25-Insertionsklonen, die aufgrund der Transposon-Insertion Hitze-sensitiv waren, wurde die chromosomale DNA isoliert und mit einem Transposon-spezifischen Primer sequenziert. Die Sequenzierungen ergaben, dass Insertionen in den Genen *hcr*, *yjcC*, *aroB*, *nrdD* und *tolA* vorlagen (Tab. 14). Keines dieser Gene ist bisher dafür bekannt, Hitzeresistenz zu vermitteln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Insertionen einen indirekten Einfluss auf die Hitzeresistenz ausüben.

Insgesamt stellte sich die hier betrachtete Transposom-vermittelte Methode zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene aufgrund der sehr geringen Transformationseffizienz der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme sowie der sehr anfälligen und aufwändigen Selektion auf Hitzesensitivität als nur sehr bedingt geeignet heraus. Sie wurde nicht auf die HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme angewandt.

Tabelle 14: Mittels Transposon-Insertion identifizierte Hitzeresistenz-vermittelnde *E. coli*-Gene. Aufgelistet ist der jeweilige Hitze-resistente *E. coli*-Stamm, welcher durch eine Transposon-Insertion in das je aufgeführte Gen Hitze-sensitiv wurde. Zudem sind das jeweils kodierte Protein und dessen Funktion genannt.

Stamm	Gen	kodiertes Protein	Proteinfunktion
BM28^{GroEL-}	*hcr*	NADH-Oxidoreduktase	unbekannt, katalysiert Reduktion des Hybrid-Cluster-Proteins HCP
BM28^{GroEL-}	*yjcC*	vermutlich c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterase	vermutlich Rolle in der Biofilmbildung
BM25	*aroB*	3-Dehydroquinate-Synthase	Shikimatweg
BM25	*nrdD*	Ribonukleosid-Triphosphat-Reduktase	DNA-Biosynthese, aktiv unter anaeroben Bedingungen
BM25	*tolA*	Komponente des Tol/Pal-Systems	Aufrechterhaltung der Integrität der Zellhülle, Transport

3.1.3 Sequenzierung der Genome der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme

Eine weitere Methode zur Analyse der genetischen Ursachen für eine Stressresistenz ist die Sequenzierung der chromosomalen DNA von Stress-resistenten *E. coli*-Stämmen im Vergleich zum Ausgangsstamm. Die Sequenzierung der Genome der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme und deren Vorläuferzellen erfolgte in zwei Sequenzierungsprojekten.
Im ersten Projekt sollten durch den Vergleich der Genomsequenzen der Stämme BM3, BM15, BM16, BM25 und BM28^{GroEL-} zum einen Mutationen, welche zu den erhöhten GroEL/S-Mengen in den Hitze-resistenten Stämmen im Vergleich zu den weniger resistenten Stämmen führten, zum anderen potentiell Hitzeresistenz-vermittelnde Gene identifiziert werden. Hierfür wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) von der genomischen DNA der fünf *E. coli*-Stämme „*tagged paired-end*"-Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem Illumina HiSeq 2000 hergestellt. Dabei wurden ca. 350 bp große Fragmente der genomischen DNA erstellt. Die fünf getaggten Bibliotheken wurden zu einer Probe *gepoolt*. Die *Read*länge betrug 2 · 46 Basen. Das „*Mapping*" der Sequenzen gegen die Sequenz des Referenzgenoms des *E. coli*-Stamms MG1655 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/48994873?report=fasta) wurde ebenfalls von GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierung musste aufgrund von technischen Problemen für BM15 wiederholt werden. Erhalten wurde letztendlich eine Tabelle mit allen Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) und kleinen (bis zu 5 bp) Insertionen sowie Deletionen. Die Auswertung ergab, dass im Vergleich zum MG1655-Referenzgenom 33 Mutationen im BM3-, 12 Mutationen im BM15-, 27 Mutationen im BM16-, 113 Mutationen im BM25- und 263 Mutationen im BM28^{GroEL-}-Stamm vorlagen (Abb. 5). Jene Mutationen, welche nicht nur in den Hitze-resistenten Stämmen BM25 und BM28^{GroEL-} sondern auch im Kontrollstamm BM3 und den nur gering Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM15 und BM16 auftraten, wurden als irrelevant für die Vermittlung einer Hitzeresistenz betrachtet. Mutationen, die ausschließlich in den Hitze-resistenten Stämmen BM25 und BM28^{GroEL-} vorlagen, wurden als relevant für die Hitzeresistenz dieser Stämme angenommen. Für Mutationen, welche ausschließlich im maximal Hitze-resistenten BM28^{GroEL-}-Stamm auftraten, war es sehr wahrscheinlich, dass diese für die maximale Hitzeresistenz von Bedeutung sind. Von den letzteren Mutationen waren sieben Regionen des BM28^{GroEL-}-Genoms massiv betroffen. So lagen 4 Mutationen im Promotorbereich des Gens *icdC*, 5 Mutationen im Gen *rfbD*, 7 Mutationen im Gen *icd*, 9 Mutationen im Gen *ynjI*, 13 Mutationen im *mcrB*-Promotorbereich, 14 Mutationen im Gen *infB* und 14 Mutationen im Gen *yhjY* vor. Insbesondere diese Regionen standen daher im Verdacht, eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der maximalen Hitzeresistenz zu spielen.

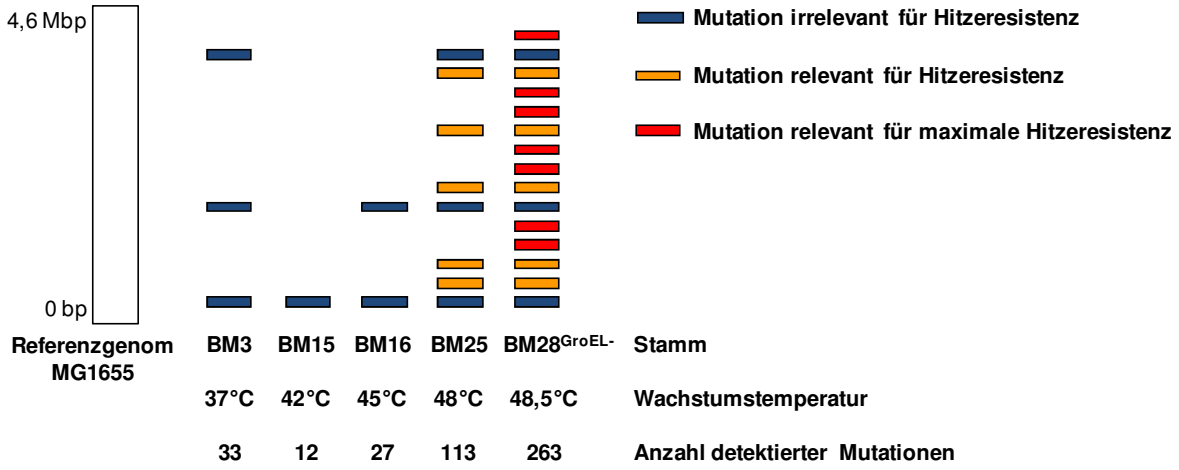


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Ergebnisse der Genomsequenzierung der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25 und BM28^{GroEL-}. Aufgeführt sind die fünf betrachteten *E. coli*-Stämme mit ihrer jeweiligen maximalen Wachstumstemperatur und der jeweils im Vergleich zum Referenzgenom des *E. coli*-Stamms MG1655 detektierten Anzahl an Mutationen. Diejenigen Mutationen, welche auch in den Stämmen BM3, BM15 bzw. BM16 auftraten, wurden als irrelevant für die Hitzeresistenz eingestuft (blau). Mutationen, welche nur in den Hitze-resistenten Stämmen BM25 und BM28^{GroEL-} auftraten, wurden als relevant für die Hitzeresistenz betrachtet (gelb). Ausschließlich im maximal Hitze-resistenten BM28^{GroEL-} auftretende Mutationen wurden als relevant für eine maximale Hitzeresistenz angesehen (rot).

Im zweiten Sequenzierungsprojekt sollten die Genomsequenzen der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} verglichen werden. Hierfür wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) zwei 3 kb „*mate-pair*“-Bibliotheken für die paired end-Sequenzierung mit dem Illumina HiSeq 2000 erstellt. Dabei wurden 3 kb große Fragmente der genomischen DNA hergestellt. Die beiden getaggten Bibliotheken wurden gepoolt. Die Readlänge betrug 50 Basen. Das Mapping der Sequenzen gegen die Sequenz des Referenzgenoms von MG1655 (Link zur Sequenz siehe oben) erfolgte ebenfalls durch GATC Biotech (Konstanz, Deutschland). Letztendlich wurde eine Tabelle mit allen SNPs und kleinen (bis zu 5 bp) Insertionen sowie Deletionen erhalten. Die Auswertung ergab, dass 15 Mutationen ausschließlich im BM28^{GroEL-} und 48 Mutationen nur im BM28^{GroEL+}-Stamm vorlagen. 202 Mutationen wurden in beiden Hitze-resistenten Stämmen detektiert (Tab. 15). Besonders auffällig war, dass in der Region zwischen den benachbarten Genen *groEL* und *yjeI* des BM28^{GroEL+}-Genoms 6 Positionen innerhalb von 8 bp von Mutationen betroffen waren. Dies kann potentiell die Ursache für den Unterschied in den GroEL/S-Mengen der beiden Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} sein.

Tabelle 15: Vergleich der Genomsequenzierungen der *E. coli*-Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+}. Aufgeführt ist die Anzahl der detektierten Mutationen, welche ausschließlich in BM28^{GroEL-} oder BM28^{GroEL+} oder in beiden Stämmen auftraten.

Anzahl der nur in BM28^{GroEL-} detektierten Mutationen	Anzahl der nur in BM28^{GroEL+} detektierten Mutationen	Anzahl der in BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} detektierten Mutationen
15	48	202

Die beiden Sequenzierungsprojekte wurden mit einigen Monaten Abstand durchgeführt und unterschieden sich daher in einigen Aspekten. Die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) hatte in der Zeit zwischen den beiden Projekten vor allem die Auswertungs-Software erneuert. Die neue Software war jedoch noch nicht ausreichend für den Einsatz in der Auswertung von Genomsequenzierungen für *E. coli* validiert. Nach diversen, umfangreichen Auswertungsversuchen wurde letztendlich die Software des ersten Projektes (Lasergene von DNASTAR) mit den dort verwendeten Parametern zur Auswertung der Daten des zweiten Projektes herangezogen. Da sich in der Zwischenzeit auch bei der Datengewinnung einige Änderungen vollzogen hatten, wurden im zweiten Projekt mehr Daten erhalten als die Auswertungs-Software des ersten Projektes verarbeiten konnte. Daher konnten nur maximal 40% der Rohdaten für das Mapping verwendet werden. Letztendlich wurden ca. $5 \cdot 10^6$ Readpaare je getaggter Bibliothek verwendet. Ferner wurden in beiden Projekten verschiedene Bibliotheken erstellt und unterschiedliche Readlängen verwendet. Beim Vergleich der Sequenzierungsergebnisse für den Stamm BM28^{GroEL-} aus den beiden Projekten fiel auf, dass einige Mutationen nur im Rahmen des einen oder des anderen Projektes detektiert wurden. Dass sich die Ergebnisse aus den beiden Projekten unterschieden, wurde auch dadurch deutlich, dass im ersten Projekt 263 Mutationen (Abb. 5) und im zweiten Projekt 217 Mutationen (Tab. 15) in BM28^{GroEL-} detektiert wurden. Zudem wurden für das Gen *icd* im zweiten Sequenzierungsprojekt zusätzlich zu den Mutationen, die im ersten Projekt detektiert wurden, weitere Mutationen identifiziert. Von den Mutationen in den Genen *yhjY*, *rfbD* und der Promotorregion von *icdC* wurden zumindest einige in beiden Sequenzierungsprojekten detektiert. In den Genen *ynjI*, *infB* sowie der *mcrB*-Promotorregion wurde im Gegensatz zum ersten Sequenzierungsprojekt, im zweiten keine einzige Mutation detektiert. Daher wurden die insgesamt acht Regionen, welche in Bezug auf die erhöhten GroEL/S-Mengen in den Hitze-resistenten Stämmen oder die Vermittlung von Hitzeresistenz in *E. coli* von Bedeutung zu sein schienen, noch einmal näher betrachtet.

3.1.4 Kontrolle der Genomsequenzierungsergebnisse der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme

Um die Ergebnisse der beiden Genomsequenzierungsprojekte bezüglich der Region zwischen *groEL* und *yjeI* sowie der Gene *icd*, *ynjI*, *rfbD*, *infB*, *yhjY* und der Promotorregionen von *icdC* und *mcrB* zu kontrollieren, wurde die chromosomale DNA der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mit spezifischen Primern durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Für *icd* und *yhjY* erfolgten zusätzliche Kontroll-PCRs und Sequenzierungen von PCR-Produkten.
Den zusammengetragenen Informationen zufolge waren die betrachteten Regionen in den untersuchten *E. coli*-Stämmen so beschaffen wie in Tabelle 16 aufgeführt. Wie aufgrund der Ergebnisse des ersten Genomsequenzierungsprojektes erwartet, wiesen die acht betrachteten Regionen in den Stämmen BM3, BM15 und BM16 im Vergleich zur Sequenz des *E. coli*-Stammes MG1655 keine Mutationen auf. Die Ergebnisse der Genomsequenzierungsprojekte bezüglich der acht betrachteten Regionen in den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} konnten überwiegend nicht oder nur teilweise bestätigt werden. So trat im Gegensatz zu den erwarteten Punktmutationen in den Genen *yhjY*, *ynjI*, *infB* und dem *mcrB*-Promotorbereich, je eine ca. 1300 bp lange DH10B-Insertion auf. Die Sequenz dieser DH10B-Insertion war in den betroffenen Genen nahezu identisch. Es handelt sich um eine Sequenz, welche im Genom des *E. coli*-Stamms DH10B mehrmals (jeweils zwischen den Genen *mltC* und *pppA*, *yjhA* und *yjjA* sowie *speC* und *glcA*; Sequenz siehe Anhang) vorliegt und eigentlich nicht im *E. coli*-Stamm MG1655 vorkommt. Vielleicht handelt es sich um ein mobiles genetisches Element. Die DH10B-Insertion in den Genen *ynjI*, *infB* und in der *mcrB*-Promotorregion trat bei den Hitze-resistenten Stämmen BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+}, nicht aber im Kontrollstamm BM3 und den geringer Hitze-resistenten Stämmen BM15 und BM16 auf. Das legt die Vermutung nahe, dass diese drei Gene für die Hitzeresistenz von Bedeutung sind. Die DH10B-Insertion in *yhjY* trat nur in den maximal Hitze-resistenten Stämmen BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} auf und könnte demnach für die maximale Hitzeresistenz eine Rolle spielen. Die Sequenz des *icdC*-Promotorbereichs und *icd*-Gens in den Stämmen BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} sowie des *rfbD*-Gens in den Stämmen BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Ebenso konnte die Sequenz zwischen den Genen *groEL* und *yjeI* in den Stämmen BM25 und BM28^{GroEL+} nicht eindeutig aufgeklärt werden. Auffällig war jedoch, dass von letzterem nur die beiden Stämme betroffen waren, welche über deutlich erhöhte GroEL/S-Mengen verfügen (Abb. 3). Diese mutierte Region war daher vermutlich für die hohen GroEL/S-Mengen in den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen verantwortlich.

Um all dies eindeutig aufklären zu können, sollten die betrachteten Genome erneut sequenziert werden. Zuvor erschien die Herstellung von Deletions- und Überexpressionsstämmen, womit bereits begonnen wurde, als wenig sinnvoll. Erneute Genomsequenzierungen sollten erst dann erfolgen, wenn das diesbezügliche Know-how bereits weiter entwickelt ist als bisher. Zudem sollte die Verwendung einer anderen Sequenzierungsmethode bzw. einer anderen Art der Bibliothek und Auswertung in Betracht gezogen werden, um auch Reorganisationen größerer Bereiche des Chromosoms oder das mehrmalige Vorliegen bestimmter Regionen im Chromosom detektieren zu können. Am besten wäre es, die Genome einer *de novo*-Sequenzierung zu unterziehen.

Insgesamt sollte die Methode der Genomsequenzierung zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli* bislang mit Vorsicht eingesetzt werden. Die Ergebnisse sollten unbedingt durch weitere Experimente überprüft werden. Hierfür stellte sich vor allem die Sequenzierung der chromosomalen DNA mit spezifischen Primern als geeignet heraus.

Tabelle 16: Vergleich der chromosomalen Regionen der Gene *groEL/yjeI*, *rfbD*, *yhjY*, *icd*, *ynjI*, *infB* sowie der *icdC*- und *mcrB*-Promotorregionen der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} mit jenen des Stammes MG1655. Aufgeführt sind die zusammengetragenen Ergebnisse zur jeweiligen Sequenz aus Kontroll-PCRs, der Sequenzierung von PCR-Produkten und Sequenzierungen der chromosomalen DNA der sechs Stämme mit spezifischen Primern. Entsprach die Sequenz einer betrachteten Region in einem der analysierten Stämme jener des Stammes MG1655, wurde dies als Wildtyp-Sequenz (WT) angesehen. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die MG1655-Genomsequenz.

Gen/Region	BM3	BM15	BM16	BM25	BM28^{GroEL-}	BM28^{GroEL+}
groEL/yjeI	WT	WT	WT	wie BM28^{GroEL+}	WT	nach *groEL,* ab Position 4370731 Bereich mit unbekannter Sequenz
rfbD	WT	WT	WT	WT	uneindeutig, vermutlich *insH*-Insertion bei Position 2109546	
yhjY	WT	WT	WT	WT	DH10B-Insertion in *yhjY* zwischen Position 3710483 und 3710492	
icd	WT	WT	WT	*icd* ist in voller Länge, aber mit zahlreichen Mutationen im Genom vorhanden, die Region stromabwärts von *icd* ist im Vergleich zu BM3 verändert, wie genau ist jedoch uneindeutig		
icdC-Promotor	WT	WT	WT	uneindeutig		
ynjI	WT	WT	WT	DH10B-Insertion in *ynjI* zwischen Position 1841961 und 1841972		
infB	WT	WT	WT	DH10B-Insertion in Stopp-Region des Gens *infB* zwischen Position 3311362 und 3311370		
mcrB-Promotor	WT	WT	WT	DH10B-Insertion in Region des *mcrB*-Promotors zwischen Position 4577374 und 4577387		

3.1.5 Dauerhafte Kultivierung der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme bei 37°C

Als eine weitere Methode zur Analyse und Charakterisierung evolvierter Stress-resistenter *E. coli*-Stämme wurde eine dauerhafte Kultivierung dieser Stämme ohne den Stress, unter welchem sie evolviert wurden, durchgeführt. Dies sollte die Feststellung ermöglichen, ob und gegebenenfalls wie schnell die evolvierte Stressresistenz wieder verloren geht. Anhand dessen sollte abgeschätzt werden, wie stabil die genetischen Determinanten für die Stressresistenz im Genom des Stress-resistenten *E. coli*-Stamms bestehen bleiben oder, ob es sich um schnell reversible epigenetische Ereignisse handelt, die zur Stressresistenz führten. Die Durchführung der dauerhaften Kultivierung der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme bei 37°C wurde unter Abschnitt 2.2.12 beschrieben.

Zur Analyse der dauerhaft bei 37°C kultivierten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme wurde zunächst deren Wachstum mit dem Wachstum ihrer Ursprungsstämme, den Hitze-resistenten Stämmen BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} sowie dem Kontrollstamm BM3, bei 37°C verglichen (Abb. 6). Bei den betrachteten *E. coli*-Stämmen BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7 und BM28^{GroEL+} R7 handelte es sich um Stämme, die für insgesamt 24 Überimpfungszyklen bei einer Wachstumstemperatur von 37°C kultiviert wurden. Das Wachstum der Stämme BM3 und BM3 R7 unterschied sich bei 37°C kaum. Die Hitze-resistenten Stämme BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} wuchsen bei 37°C langsamer als der Kontrollstamm BM3. Dies stimmte mit der Feststellung von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) überein, dass die relative Fitness bei 37°C für BM25 und BM28 geringer ist als jene des Ursprungsstamms. Die Stämme BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7 und BM28^{GroEL+} R7 wuchsen bei 37°C schneller als ihre Ursprungsstämme BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+}, aber noch etwas langsamer als die Kontrollstämme BM3 und BM3 R7. Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) führten die verringerte Fitness der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme auf Mutationen zurück, die im Laufe des Evolutionsprozesses entstanden waren. Wie in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 festgestellt, lagen in den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen tatsächlich diverse Mutationen vor. Handelt es sich beispielsweise bei der DH10B-Insertion in der Tat um ein mobiles genetisches Element, könnte es sein, dass die Hitze-resistenten Stämme dieses bei der dauerhaften Kultivierung bei 37°C wieder verloren, da so die relative Fitness wieder verbessert werden konnte. Eventuell gingen aber auch andere Mutationen oder bislang nicht identifizierte epigenetische Faktoren der evolvierten Stämme verloren, wodurch die relative Fitness verbessert wurde.

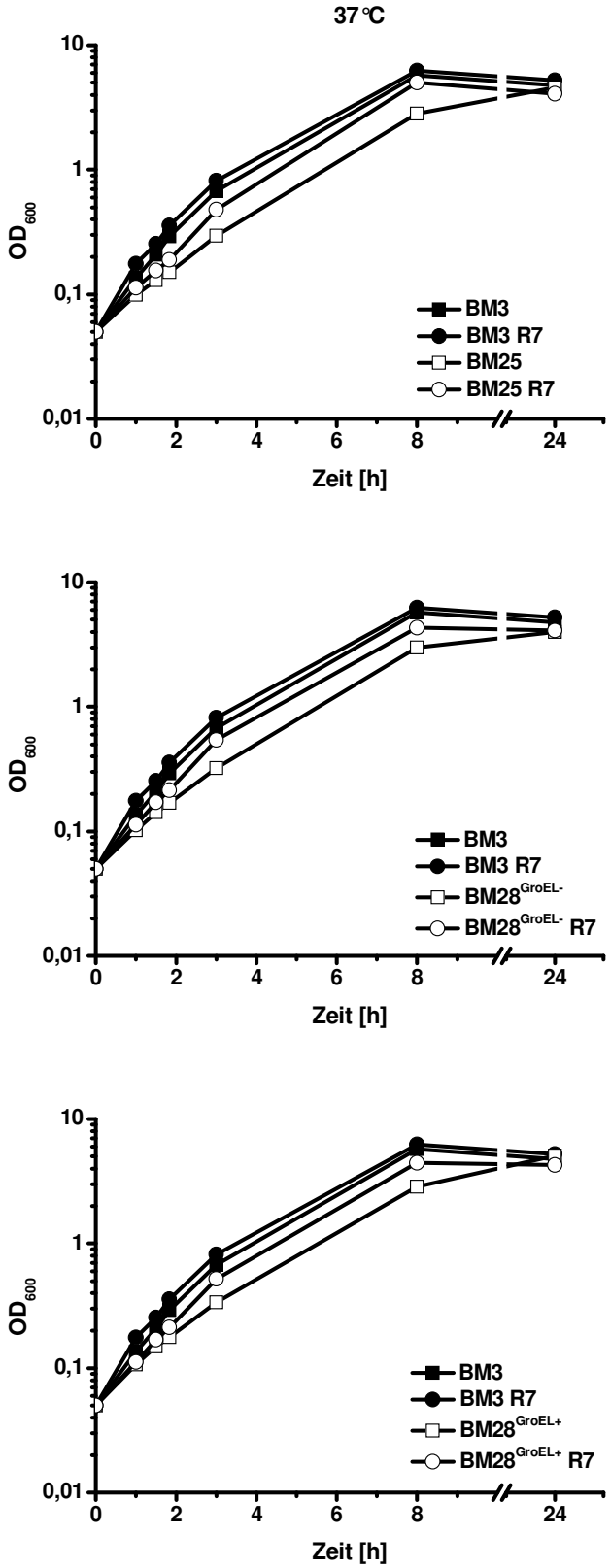


Abbildung 6: Wachstumskurven der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+} bei 37°C. Über einen Zeitraum von 24 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte (OD_{600}) der Kulturen bestimmt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde stets je ein dauerhaft bei 37°C kultivierter Stamm (weißer Kreis) und dessen Ursprungsstamm (weißes Quadrat) neben den Kontrollstämmen BM3 (schwarzes Quadrat) und BM3 R7 (schwarzer Kreis) in einem Diagramm dargestellt.

Es folgte die Betrachtung der Proteome der für 24 Überimpfungszyklen bei 37°C kultivierten Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7 und BM28^{GroEL+} R7 im Vergleich zu jenen der Hitze-resistenten Stämme BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} sowie des Kontrollstamms BM3 mittels SDS-PAGE (Abb. 7). Interessanterweise wiesen die Stämme BM25 R7 und BM28^{GroEL+} R7 nicht mehr die erhöhten GroEL/S-Mengen ihrer Ursprungsstämme BM25 bzw. BM28^{GroEL+} auf. Die GroEL/S-Mengen der übrigen betrachteten Stämme waren ungefähr miteinander vergleichbar und deutlich niedriger als jene der Stämme BM25 und BM28^{GroEL+}.

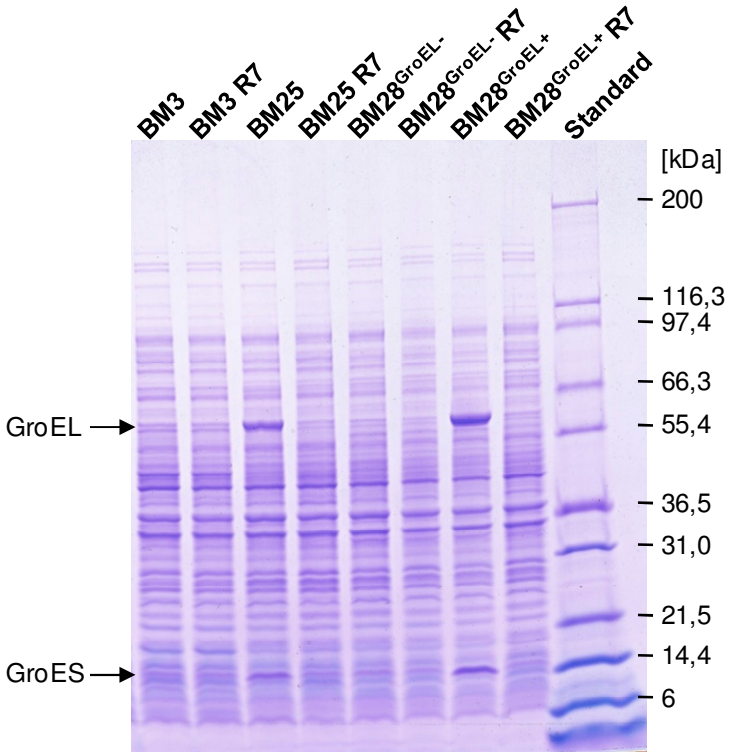


Abbildung 7: Analyse der Proteome der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+} mittels SDS-PAGE. Aufgetrennt wurden Proben aus einer Übernachtkultur des jeweiligen Stamms nach Wachstum bei 37°C. Markiert sind die GroEL-Bande (57 kDa) und die GroES-Bande (10 kDa). Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Die Hitzeresistenz der für 24 Überimpfungszyklen bei 37°C kultivierten Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7 und BM28^{GroEL+} R7 im Vergleich zu jener der Hitze-resistenten Stämme BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} sowie der Kontrollstämme BM3 und MG1655 wurde mit Hilfe von Hitze-Platten überprüft (Abb. 8). Wie erwartet zeigten die Kontrollstämme MG1655, BM3 und BM3 R7 ihre Hitzesensitivität, indem sie bei 48°C kaum wuchsen. Der BM25 R7-Stamm wuchs ebenfalls kaum bei 48°C, während BM25 bei Hitze wuchs. Der Hitze-resistente Stamm BM25 hatte demnach bei der dauerhaften Kultivierung bei 37°C und somit ohne Hitzestress seine Hitzeresistenz verloren. Für die maximal Hitze-resistenten

Stämme BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} schien dies nicht der Fall zu sein. Die Stämme BM28^{GroEL-} R7 und BM28^{GroEL+} R7 wuchsen bei 48°C im Vergleich zu BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} nahezu identisch. Obwohl BM28^{GroEL+} R7 im Zuge der dauerhaften Kultivierung bei 37°C die hohen GroEL/S-Mengen seines Hitze-resistenten Ursprungsstamms BM28^{GroEL+} verloren hatte (Abb. 7), war er noch Hitze-resistent (Abb. 8). Dies bestätigt, dass hohe GroEL/S-Mengen nicht direkt für die Hitzeresistenz benötigt werden.

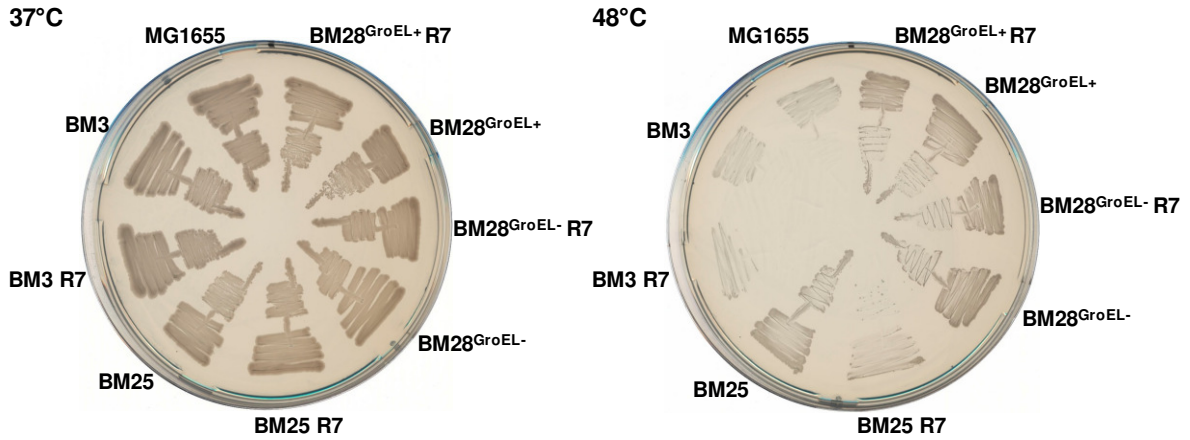


Abbildung 8: Hitze-Platte mit Ausstrichen der dauerhaft bei 37°C kultivierten *E. coli*-Stämme BM3 R7, BM25 R7, BM28^{GroEL-} R7, BM28^{GroEL+} R7 und deren Ursprungsstämmen BM3, BM25, BM28^{GroEL-} bzw. BM28^{GroEL+}. Die 37°C-Platte diente als Kontrolle. Die Hitze-Platte wurde bei 48°C inkubiert.

Insgesamt zeigte sich, dass grundsätzlich zwischen einer Hitzeresistenz und der maximalen Hitzeresistenz in *E. coli* unterschieden werden muss. Aufgrund der enormen Unterschiede in den GroEL/S-Mengen, sollten die Genome der Stämme BM25 R7 und BM28^{GroEL+} R7 unbedingt sequenziert und die Sequenzen mit jenen ihrer Hitze-resistenten Ursprungsstämme BM25 und BM28^{GroEL+} verglichen werden, sobald die Methode der *E. coli*-Genomsequenzierung entsprechend weiterentwickelt wurde. Auch wenn die GroEL/S-Mengen offenbar nicht direkt im Zusammenhang mit der Hitzeresistenz stehen, scheint es wahrscheinlich, dass die erhöhten GroEL/S-Mengen für den Evolutionsprozess an sich benötigt wurden. Dies bestärkt die Annahmen zur Rolle von GroEL/S in der Evolution der Hitzeresistenz von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010). Indem GroEL/S während des Evolutionsprozesses die Faltung thermolabiler oder mutierter Proteine ermöglichte, konnten Mutationen oder auch epigenetische Ereignisse auftreten, ohne dass die Zellen sterben mussten. Auf diese Weise wurde den *E. coli*-Zellen eine allmähliche Anpassung an erhöhte Temperaturen ermöglicht.

Die dauerhafte Kultivierung evolvierter Stress-resistenter *E. coli*-Zellen ohne den Stress, unter welchem sie evolviert wurden, kann daher interessante Erkenntnisse liefern. Zu deren

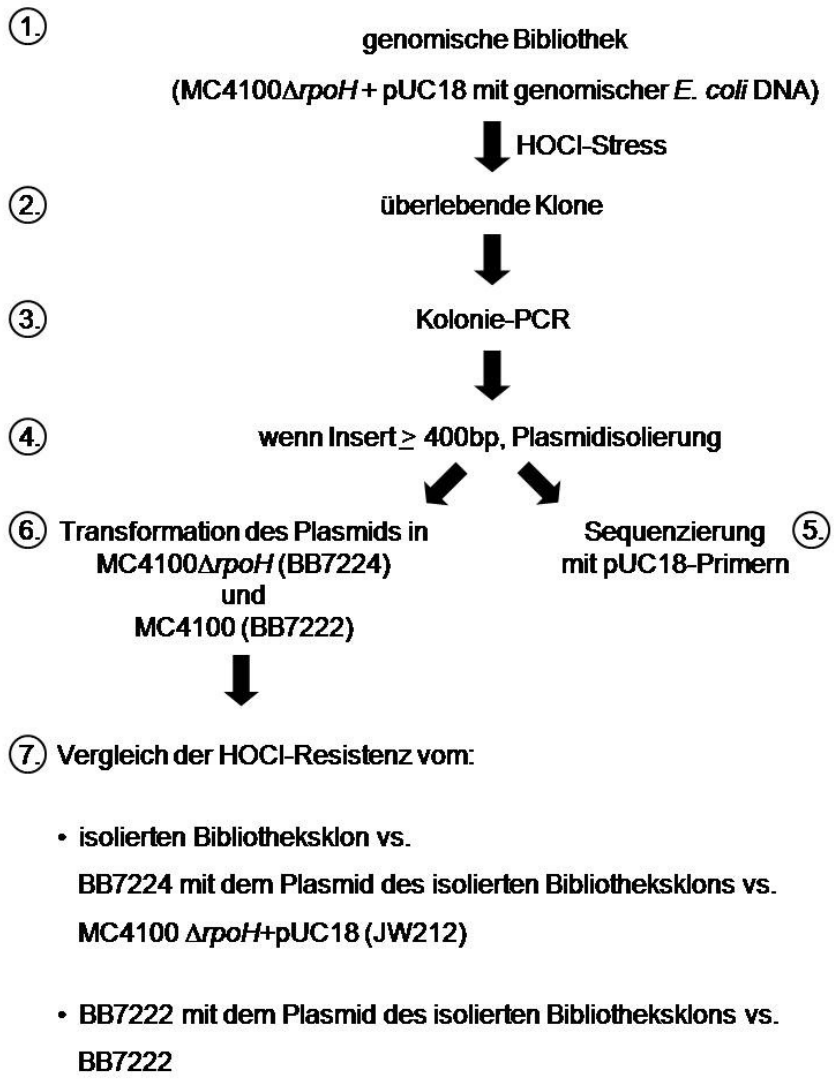
Bestätigung müssen jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden. So kann zum Beispiel nach epigenetischen Veränderungen gesucht werden. Hierfür bietet sich beispielsweise eine DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit-Sequenzierung an. Zumindest im Fall der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme sollten zudem zur gegebenen Zeit erneute Genomsequenzierungen aufschlussreiche Informationen liefern. Erst mit diesen Erkenntnissen können angemessene Mutanten erstellt und betrachtet werden, um die Determinanten für die (maximale) Hitzeresistenz in *E. coli* eindeutig zu identifizieren und die Rolle der erhöhten GroEL/S-Mengen in Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen endgültig aufzuklären.

3.2 Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli*

Eine Herangehensweise, um neue Erkenntnisse über HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli* zu erhalten, ist die Identifizierung von HOCl-Resistenz-vermittelnden Genen.

3.2.1 Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder *E. coli*-Gene mittels genomischer Überexpressionsbibliothek

Zur Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli* wurde eine genomische Überexpressionsbibliothek verwendet. Eingesetzt wurde die genomische Bibliothek, mit welcher bereits ein σ^S-vermittelter Schutz vor HOCl-Schäden (Barth *et al.*, 2009) sowie der erste HOCl-spezifische Transkriptionsfaktor, YjiE (Gebendorfer *et al.*, 2012), identifiziert wurde. Diese Bibliothek enthält die genomische DNA eines Hsp33-defizienten *E. coli*-Stamms in einem pUC18-Plasmid in den Zellen des *E. coli*-Stamms BB7224, einem MC4100-Stamm, dem der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt. Der Vorgang zur Identifizierung von Genen, die in *E. coli* eine HOCl-Resistenz vermitteln, mit Hilfe der genomischen Überexpressionsbibliothek wurde in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Eine Übersicht über den Identifizierungsvorgang und die Ergebnisse der fünf Durchgänge befindet sich in Abbildung 9. Insgesamt wurden 30 HOCl-resistente *E. coli*-Klone isoliert, in deren Bibliotheksplasmid mindestens ein vollständiges Gen kodiert wurde. Die Bezeichnung der *E. coli*-Klone erfolgte bei jedem Durchgang im Zuge der Isolierung der Klone, welche den anfänglichen HOCl-Stress überlebt hatten. Bei der Bezeichnung handelte es sich um eine zweistellige Bezifferung. Die erste Ziffer stand für die Nummer des Durchgangs (1 - 5). Für die zweite Ziffer wurden die Klone durchnummeriert. Die identifizierten HOCl-Resistenz-vermittelnden *E. coli*-Gene der 30 isolierten Klone sind in Tabelle 17 aufgeführt.



Durchgang	1.,2.,3.	4.,5.,6.	7.		7. gilt und Plasmid des isolierten Bibliotheksklons enthält im Insert mindestens ein vollständiges Gen
			BB7224 mit dem Plasmid des isolierten Bibliotheksklons ist > 2x resistenter gegen HOCl als JW212	BB7222 mit dem Plasmid des isolierten Bibliotheksklons ist > 2x resistenter gegen HOCl als BB7222	
1	110	18	10	8	5
2	73	19	11	10	5
3	152	6	2	2	1
4	174	16	8	3	7
5	119	15	6	10	12

Abbildung 9: Übersicht über den Vorgang der Identifizierung von HOCl-Resistenz-vermittelnden *E. coli*-Genen mittels genomischer Überexpressionsbibliothek und die erhaltenen Ergebnisse. Ein Schema zum Vorgang der Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder Gene ist oben dargestellt. Es erfolgten fünf Durchgänge. Die Anzahl der im jeweiligen Durchgang (1 - 5) und Arbeitsschritt (1. - 7., oben und unten) erhaltenen *E. coli*-Klone ist unten aufgeführt.

Tabelle 17: Mittels genomischer Überexpressionsbibliothek identifizierte HOCl-Resistenz-vermittelnde *E. coli*-Gene. Aufgeführt sind die jeweiligen Gene, welche vollständig auf dem Bibliotheksplasmid eines isolierten HOCl-resistenten *E. coli*-Klons kodiert wurden, die Bezeichnung des entsprechenden Klons sowie das kodierte Protein und dessen Funktion.

Klon	Gen(e)	kodiertes Protein	Proteinfunktion
1. 28, 1. 53, 1. 84, 1. 100, 4. 154	*gadX*	Transkriptionsregulator	Transkriptionsregulation, Säureresistenzsystem
1. 95	*potG*	ATP-bindende Untereinheit des Putrescin-ABC-Transporters	Putrescin-Transport
2. 1	*rhaR*	Transkriptionsfaktor	Transkriptionsregulation, Rhamnosemetabolismus
2. 37	*ydiV*	EAL-Domänenprotein	Motilitätskontrolle
2. 39	*metJ*	Transkriptionsrepressor	Transkriptionsregulation, Methioninbiosynthese und -transport
2. 43	*mcrA*	Desoxyribonuklease	5-Methylcytosin-spezifische Restriktion von DNA
2. 48	*ynfK*	vermutlich Dethiobiotin-Synthetase	vermutlich Biotinbiosynthese
3. 112	*murG*	N-Acetylglucosaminyl-Transferase	Peptidoglykanbiosynthese
4. 22	*ftsW*	Lipid II-Flippase	Zellteilung, Transport Lipid-gekoppelter Peptidoglykanvorstufen
4. 85	*yfgM*	konserviertes Protein der inneren Membran	unbekannt, bindet periplasmatisches Chaperon PpiD
4. 96	*wzxE*	Lipid III-Flippase	Transport von Lipid III, Polysaccharidbiosynthese, ECA (*enterobacterial common antigen*)-Biosynthese
	rffT	4-Acetamido-4,6-Dideoxy-D-Galaktose-Transferase	Lipid III-Biosynthese, ECA (*enterobacterial common antigen*)-Biosynthese
4. 163	*kefF*	Regulator des KefC-vermittelten Kaliumtransports und Quinone-Oxidoreduktase	Kaliumtransport, Oxidations-und Reduktionsprozesse
4. 167	*ulaR*	Transkriptionsfaktor	Transkriptionsregulation, L-Ascorbat-Transport und- Verwertung
4. 170	*ygfF*	vermutlich NAD(P)-bindende Oxidoreduktase	vermutlich Oxidations- und Reduktionsprozesse
5. 3	*livM*	Membrankomponente eines Transporters	Transport verzweigtkettiger Aminosäuren
5. 13	*yggP*	vorhergesagte Dehydrogenase	unbekannt
5. 15	*yqiB*	vermutlich eine Dehydrogenase	unbekannt
	cpdA	cAMP-Phosphodiesterase	cAMP-Hydrolyse
5. 31	*hemH*	Ferrochelatase	Häm-Synthese
5. 46	*adk*	Adenylatkinase	Biosynthese von Purin-Ribonukleotiden
5. 48	*entB*	Komponente eines *apo*-EntB-Multimers	Enterobactinbiosynthese
5. 63	*yggI*	konserviertes Protein	unbekannt, Bindung von Metallionen

5. 82	*yghR*	vorhergesagtes Protein mit einer Nukleosidtriphosphathydrolase-Domäne	unbekannt
5. 92	*aroE*	Shikimatdehydrogenase	Shikimatweg (Biosynthese von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan)
	rimN	Komponente eines Komplexes mit Threonylcarbamoyltransferase-Aktivität	Synthese von Threonylcarbamoyladenosin-modifizierter tRNA
5. 99	*yifE*	konserviertes Protein	unbekannt, eventuell Transkriptionsregulation
5. 108	*frlD*	Fructoselysin 6-Kinase	Kohlenhydratkatabolismus
5. 115	*ymiA*	vermutlich ein Membranprotein	unbekannt
	yciX	vorhergesagtes Protein	unbekannt

Von den hier identifizierten HOCl-Resistenz-vermittelnden *E. coli*-Genen wurden die Gene *cpdA* (Barth *et al.*, 2009) und *metJ* (Gebendorfer *et al.*, 2012) bereits mit HOCl-Stress in Verbindung gebracht. Das Gen *yifE* wurde von Yan Le auch als H_2O_2-Resistenz-vermittelndes Gen identifiziert und ist Gegenstand ihrer aktuellen Forschung (bislang unveröffentlichte Daten). Des Weiteren wurden Gene der Eisenaufnahme und Eisenhomöostase gefunden. So ist das Gen *entB* an der Synthese von Enterobactin, einem Fe^{3+}-bindenden, enterobakteriellen Siderophor, beteiligt und das Gen *hemH* kodiert eine Ferrochelatase. Auch Gene der zellulären Eisenregulation wurden in *E. coli* bereits mit HOCl-Stress in Verbindung gebracht (Gebendorfer *et al.*, 2012). Ferner kodieren mehrere der hier identifizierten Gene für Transkriptionsfaktoren und -regulatoren wie *gadX*, *rhaR* und *ulaR*. Zudem wurden Gene, deren Produkte in verschiedene Transportprozesse involviert sind, wie *livM* und *potG* oder Gene, deren Produkte für den Membranaufbau von Bedeutung sind, wie *ftsW*, *murG*, *wzxE* und *rffT*, als HOCl-Resistenz-vermittelnde Gene identifiziert. Eine Desoxyribonuklease, welche die DNA spezifisch bei 5-Methylcytosin schneidet, wird durch *mcrA* kodiert. Da 5-Methylcytosin post-replikativ durch eine Cytosin-Methylierung entsteht, könnte hier ein Hinweis auf epigenetische Ereignisse vorliegen, die zu einer HOCl-Resistenz führen. Der Großteil der identifizierten Gene kodiert für Proteine mit unbekannter oder putativer Funktion. Zu diesen Genen gehören *ydiV*, *ynfK*, *yfgM*, *ygfF*, *yggP*, *yqiB*, *yggI*, *yghR*, *ymiA* und *yciX*. Interessanterweise wurde das Gen *gadX*, ein Transkriptionsregulator eines Säureresistenzsystems in *E. coli*, aus 5 verschiedenen Klonen als HOCl-Resistenz-vermittelnd identifiziert. Insgesamt deutet die Vielfalt der Produktfunktionen der hier als HOCl-Resistenz-vermittelnd identifizierten Gene darauf hin, dass in *E. coli* eine Vielzahl verschiedenster Mechanismen benötigt wird, um einen HOCl-Stress zu überleben. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die HOCl-Resistenz in *E. coli* auf der Interaktion diverser Gene innerhalb komplexer Netzwerke beruht. Mit Hilfe der genomischen

Überexpressionsbibliothek können einzelne Gene identifiziert werden, die durch ihre Überexpression eine HOCl-Resistenz vermitteln. Die durchschnittliche Insertgröße der verwendeten Bibliothek betrug etwa 1,5 kbp (Barth *et al.*, 2009). Demzufolge können weder Gene identifiziert werden, deren verringerte Expression zu einer HOCl-Resistenz führt, noch können große Gene oder Gen-Cluster identifiziert werden. Sollten tatsächlich verschiedene Stressresistenzmechanismen innerhalb komplexer Netzwerke zusammenwirken, um *E. coli*-Zellen das Überleben unter gewissen HOCl-Konzentrationen zu ermöglichen, ist die genomische Bibliothek nicht dafür geeignet, diese zu identifizieren. Zwar konnten mit der genomischen Bibliothek Gene identifiziert werden, von denen aus anderen Untersuchungen bereits bekannt war, dass sie eine Rolle in der HOCl-Resistenz von *E. coli* spielen, aber um neue Erkenntnisse über HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli* zu erhalten, musste eine weitere Herangehensweise hinzugezogen werden. Aus diesem Grund wurde zunächst keines der hier als HOCl-Resistenz-vermittelnd identifizierten Gene für eine weiterführende Charakterisierung ausgewählt.

3.2.2 *lacZ*-Reportergenfusionen zur Analyse der Expression einzelner Gene

Mit Hilfe einer *lacZ*-Reportergenfusion kann die Expression eines Gens verfolgt werden. Um das Vorgehen zur Verfolgung der Expression eines Gens in Anwesenheit von HOCl zu etablieren, wurde exemplarisch eine translationale Fusion der putativen *yjiE*-Promotorregion mit *lacZ* hergestellt und analysiert. Hierbei wurden exponentiell wachsende Zellen eines *E. coli*-Wildtypstamms (JG140) und eines *yjiE*-Deletionsstamms (JG141) bei 37°C in LB-Medium entweder nicht oder mit 1 mM bzw. 2 mM HOCl versetzt. Für die Analyse der *yjiE*-Expression wurden nach 15 min Proben entnommen und die β-Galaktosidase-Aktivität der *yjiE*::*lacZ*-Fusion bestimmt. Die β-Galaktosidase-Aktivität der translationalen Fusionen der putativen *yjiE*-Promotorregion mit *lacZ* war in den ungestressten und HOCl-gestressten Zellen des Wildtyp- und *yjiE*-Deletionsstamms vergleichbar (Abb. 10 und Daten publiziert in (Gebendorfer *et al.*, 2012)). Diese Ergebnisse trugen zu der Annahme bei, dass die *yjiE*-Transkription unter HOCl-Stress nicht verändert wird und YjiE, im Gegensatz zu anderen LTTRs, nicht seine eigene Expression hoch reguliert (Gebendorfer *et al.*, 2012). Die Verfolgung der Expression eines ausgewählten Gens mittels *lacZ*-Reportergenfusion konnte demzufolge als wertvolle Methode zur Analyse der Rolle eines Gens unter HOCl-Stress etabliert werden.

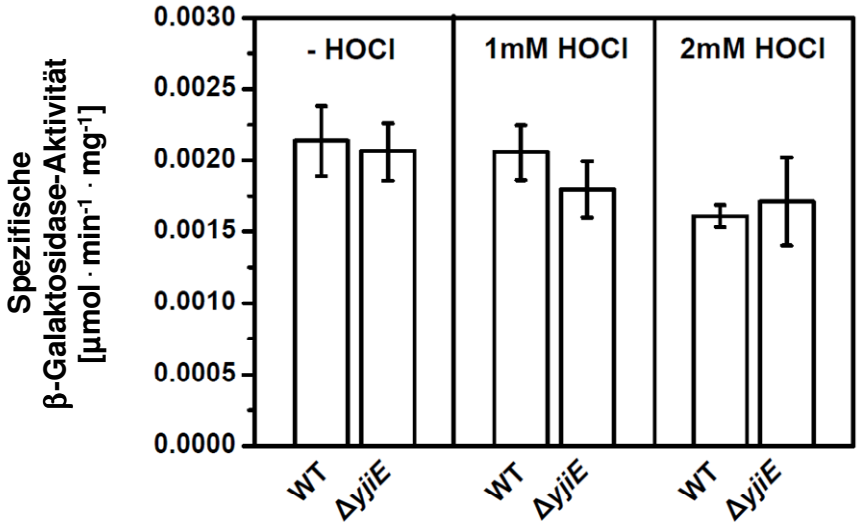


Abbildung 10: Translationale Fusionen der putativen *yjiE*-Promotorregion mit *lacZ*. JG140 (C600 Δ*lacZ yjiE*::*lacZ*; Wildtyp, WT)- und JG141 (C600 Δ*lacZ* Δ*yjiE yjiE*::*lacZ*; Δ*yjiE*)-Zellen wurden bei 37°C in LB-Medium kultiviert und während des exponentiellen Wachstums entweder nicht behandelt oder mit 1 mM bzw. 2 mM HOCl versetzt. Die Proben wurden nach 15 min entnommen. Die Analyse der *yjiE*-Expression erfolgte durch Bestimmung der spezifischen β-Galaktosidase-Aktivität der *yjiE*::*lacZ*-Reporterfusion. Dieses Experiment erfolgte in Triplikaten. Es sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen der Daten dargestellt (Daten publiziert in (Gebendorfer *et al.*, 2012)).

3.3 Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme

Eine weitere Herangehensweise, um neue Erkenntnisse über HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli* zu erhalten, besteht in der Herstellung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme und deren anschließender Analyse und Charakterisierung.

3.3.1 Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme

Die Herstellung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme erfolgte durch einen Evolutionsprozess. Um diesen zu etablieren, wurden diverse Vorgehensweisen und *E. coli*-Stämme getestet. Hierbei wurden auf unterschiedliche Weisen stets Zellen einer Flüssigkultur während des exponentiellen Wachstums mit verschiedenen HOCl-Konzentrationen gestresst. In den ersten Tests geschah dies auf LB-Platten, die verschiedene HOCl-Konzentrationen enthielten, oder mit Hilfe von sterilen Filterpapieren, die mit unterschiedlich konzentrierten HOCl-Lösungen benetzt und zentral auf LB-Platten mit ausplattierten Zellen aufgelegt wurden. Es wurden auch Zellen in Phosphatpuffer oder LB-Medium in Plastik- oder Glasgefäßen mit verschiedenen HOCl-Konzentrationen gestresst und anschließend auf LB-Platten ausplattiert. Gearbeitet wurde dabei mit den *E. coli*-Stämmen MG1655, C600, C600 Δ*lacZ* (JG39), BB7222 und BB7224. Letztendlich konnte ein sehr erfolgreiches Vorgehen zur

Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Zellen etabliert werden. Bei dieser Vorgehensweise wurden Zellen in Flüssigkulturen innerhalb mehrerer Stresszyklen einer sukzessiv erhöhten HOCl-Konzentration ausgesetzt. Das Vorgehen wurde im Abschnitt 2.2.11 beschrieben. Es wurden sowohl Zellen des *E. coli*-Stammes JG39 als auch Zellen des Stammes BB7224 evolviert. Die reproduzierbar am stärksten gegen HOCl resistenten *E. coli*-Stämme wurden ausgehend vom Ursprungsstamm BB7224, einem MC4100-Stamm, welchem der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt, erhalten. Ausschließlich diese Stämme dienten daher der weiterführenden Analyse und Charakterisierung. Eine Übersicht über den Ablauf des Evolutionsprozesses ausgehend vom Ursprungsstamm BB7224 und die erhaltenen HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme findet sich in Tabelle 11.

Die Überprüfung der HOCl-Resistenz der *E. coli*-Stämme des Evolutionsprozesses erfolgte mit Hilfe von HOCl-Regenerierungs-Tests („*recovery*"-Analysen, Abschnitt 2.2.9). Die HOCl-Regenerierungs-Tests wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert und eigneten sich hervorragend für die gleichzeitige Überprüfung der HOCl-Resistenz mehrerer *E. coli*-Stämme. Da diese Tests ergaben, dass die Stämme E 8.2.11 und E 8.3.11, welche nach 30 Stresszyklen erhalten wurden, nicht resistenter gegen HOCl waren als ihre unmittelbaren Vorläuferzellen, wurde der Evolutionsprozess an dieser Stelle beendet. Die Tests ergaben außerdem, dass die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, welche nach 24 Stresszyklen entstanden waren, die am stärksten gegen HOCl resistenten Stämme des Evolutionsprozesses darstellten. Zudem wiesen die beiden Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 ohne HOCl ein weitestgehend normales Wachstum auf. In Abbildung 11 sind diese Tatsachen veranschaulicht. So wuchsen die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 ohne HOCl besser als die Stämme E 8.2.11 und E 8.3.11 (Abb. 11 A, B). Nach einem Stress mit 13 mM HOCl konnten alle vier betrachteten, evolvierten HOCl-resistenten Stämme im Gegensatz zum Kontrollstamm E 8.0.11 weiter wachsen. Beim Kontrollstamm E 8.0.11 handelte es sich um einen während des Evolutionsprozesses für 30 Zyklen parallel kultivierten, stets ungestressten Stamm. Die Stämme E 8.2.11 und E 8.3.11 wuchsen nach dem HOCl-Stress erst nach einer späteren lag-Phase und weniger stark weiter als die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 (Abb. 11 C, D).

Demzufolge wurden die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 als maximal HOCl-resistente *E. coli*-Stämme für die weiterführende Analyse und Charakterisierung ausgewählt. Als Kontrollstamm diente der für 24 Zyklen des Evolutionsprozesses parallel kultivierte, ungestresste *E. coli*-Stamm E 8.0.9. Die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 waren außergewöhnlich und reproduzierbar HOCl-resistent und besaßen daher ein enormes Potential für den Erhalt neuer Erkenntnisse über HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli*.

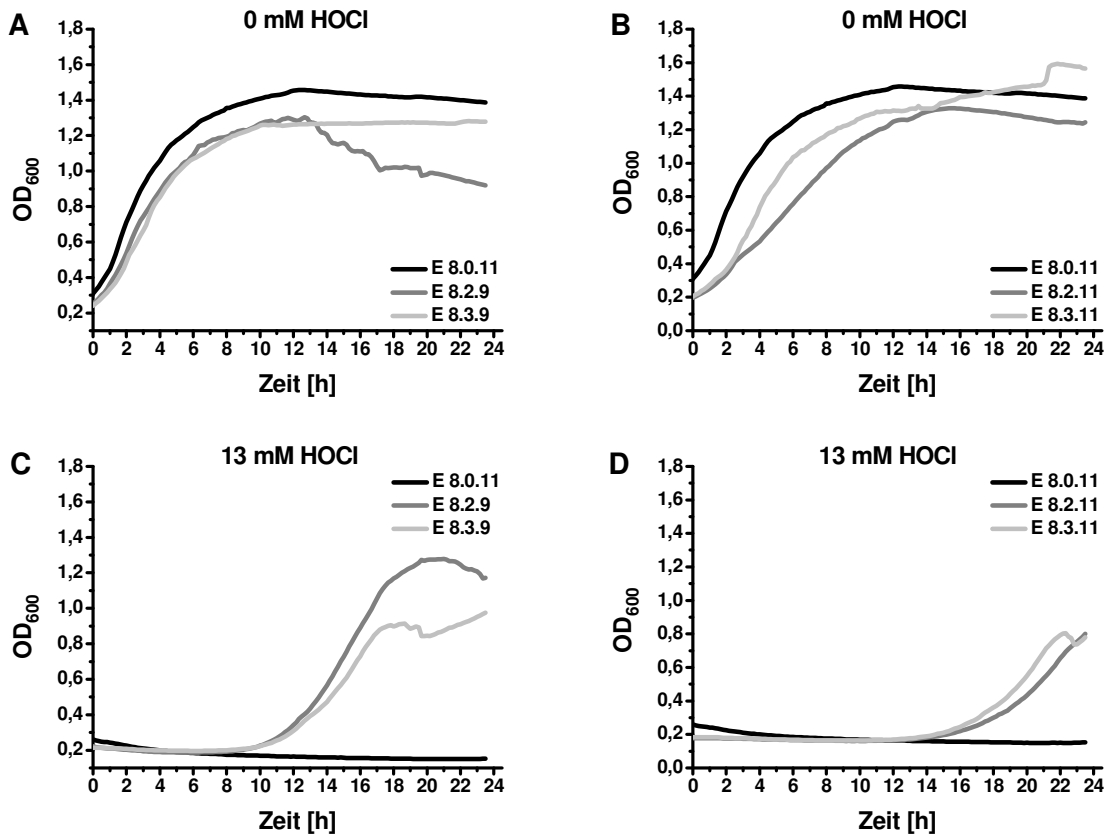


Abbildung 11: HOCl-Regenerierungs-Tests der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9, E 8.3.9, E 8.2.11, E 8.3.11 und des Kontrollstammes E 8.0.11. Die Stämme wurden nicht (A, B) oder mit 13 mM HOCl (C, D) gestresst. Das anschließende Wachstum der Stämme wurde durch Messungen der optischen Dichte (OD_{600}) alle 10 min mit Hilfe eines Mikrotiterplatteninkubators verfolgt. Zur besseren Übersicht sind die Messwerte für die Stämme E 8.2.9 (dunkelgrau) und E 8.3.9 (hellgrau) in A und C sowie E 8.2.11 (dunkelgrau) und E 8.3.11 (hellgrau) in B und D je separat zusammen mit den Messwerten des Kontrollstammes E 8.0.11 (schwarz) abgebildet.

3.3.2 Analyse der Stressresistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme

Um herauszufinden, weshalb die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 so viel resistenter gegen HOCl waren als ihr Ursprungsstamm BB7224 und der parallel kultivierte, ungestresste Kontrollstamm E 8.0.9, wurden sie mit Hilfe diverser Experimente näher analysiert und charakterisiert. Zunächst erfolgte eine Analyse der Stressresistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme.

Zuerst wurden Lebensfähigkeits-Tests durchgeführt. Hierbei wurde als erstes die Resistenz gegen oxidativen Stress überprüft. Es zeigte sich, dass die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 nicht nur gegen HOCl sondern auch gegen andere ROS wie H_2O_2 und Diamid resistenter waren als ihr Ursprungsstamm BB7224 und der Kontrollstamm E 8.0.9 (Abb. 12 A, B, C). Daraufhin wurde die Resistenz gegen andere Stressfaktoren als ROS getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 auch gegen Hitzestress und hyperosmotischen (Salz- bzw. NaCl-) Stress resistenter waren als ihr Ursprungsstamm

BB7224 und der Kontrollstamm E 8.0.9 (Abb. 12 D, E). Da dem Ursprungsstamm der Stämme des Evolutionsprozesses unter HOCl-Stress, BB7224, der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt, wurde für den Hitzestress ein weiterer Kontrollstamm hinzugezogen. Es handelte sich um den Stamm BB7222, einem MC4100-Stamm, welcher den Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} besitzt. Bei einer Wachstumstemperatur von 48,5°C wiesen die HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 zunächst eine ähnliche Lebensfähigkeit auf wie der Kontrollstamm BB7222. Erst bei dem 20 h-Messwert erwies sich der Stamm BB7222 als lebensfähiger als die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 (Abb. 12 D).

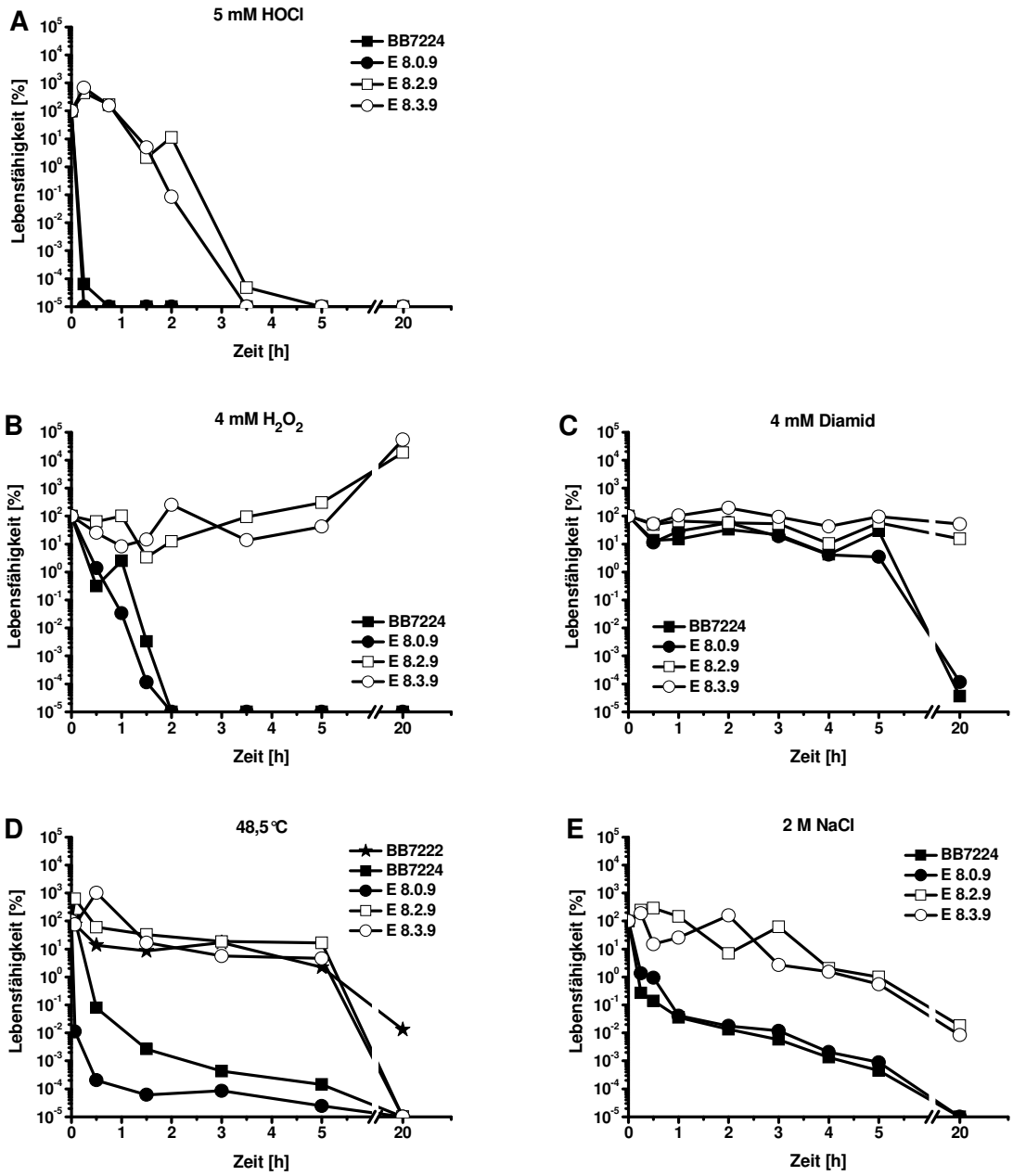


Abbildung 12: Lebensfähigkeits-Tests zur Analyse der Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen verschiedene Stressbedingungen. Überprüft wurde die Lebensfähigkeit der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 (weißes Quadrat) und E 8.3.9 (weißer Kreis), ihres Ursprungsstammes BB7224 (schwarzes Quadrat) sowie des Kontrollstammes E 8.0.9 (schwarzer Kreis) beim Wachstum unter 5 mM HOCl (A), 4 mM H_2O_2 (B), 4 mM Diamid (C), 48,5°C (D) bzw. 2 M NaCl (E). Für den Hitzestress (D) wurde der Stamm BB7222 (schwarzer Stern) als ein weiterer Kontrollstamm hinzugezogen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die repräsentativen Ergebnisse von jeweils einem dieser Experimente sind hier exemplarisch abgebildet.

Da die HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 vom *E. coli*-Stamm BB7224 abstammen, wurde zunächst angenommen, dass sie aufgrund des fehlenden Hitzeschock-Sigmafaktors σ^{32} nur über geringe Mengen aller σ^{32}-kontrollierten Proteasen und Chaperone, mit Ausnahme von GroEL/S, verfügen. Die GroEL/S-Mengen sollten infolge eines Insertionselementes in der Promotorregion von *groES groEL* in BB7224 erhöht sein (Tomoyasu *et al.*, 2001). Es wurde daher erwartet, dass sowohl der Stamm BB7224 als auch die Stämme, deren Ursprung er war, durch den fehlenden Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} die Menge der Hitzeschockproteine wie DnaK und GroEL unter Hitze nicht anpassen können. Da die HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 allerdings resistenter gegen Hitze waren als der Ursprungstamm BB7224 und der Kontrollstamm E 8.0.9 (Abb. 12 D), stellte sich die Frage, ob die beiden HOCl-resistenten Stämme eventuell doch die Menge ihrer Hitzeschockproteine als Antwort auf einen Hitzestress erhöhen konnten. Dies wurde daher mit Hilfe einer SDS-PAGE im Anschluss an einen Hitzeschock bei 45°C überprüft (Abb. 13). Es zeigte sich, dass lediglich im *E. coli*-Stamm BB7222 wie erwartet infolge einer Hitzeschockantwort auf den Hitzestress bei 45°C die Menge der Hitzeschockproteine DnaK und GroEL erhöht wurde. Bei den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 änderten sich die DnaK- und GroEL-Mengen infolge des Hitzestresses ebenso wie beim Ursprungsstamm BB7224 und Kontrollstamm E 8.0.9 nicht. Es war jedoch zu bemerken, dass die Stämme E 8.2.9, E 8.3.9 und E 8.0.9 des Evolutionsprozesses stets höhere DnaK-Mengen und geringere GroEL-Mengen als ihr Ursprungsstamm BB7224 aufwiesen. Grundsätzlich waren die DnaK- und GroEL-Mengen der Stämme E 8.2.9, E 8.3.9 und E 8.0.9 eher mit jenen des BB7222-Stammes unter Hitze-Stress vergleichbar. Zum einen wiesen die Stämme E 8.2.9, E 8.3.9 und E 8.0.9 demnach stets höhere DnaK- und geringere GroEL-Mengen auf als ihr Ursprungsstamm BB7224, zum anderen besaßen sie höhere Mengen an DnaK und GroEL als der Stamm BB7222 unter Wachstumsbedingungen ohne Hitzestress. Vielleicht hatten die Stämme E 8.2.9, E 8.3.9 und E 8.0.9 im Laufe des Evolutionsprozesses das Insertionselement in der Promotorregion von *groES groEL* ihres Ursprungsstamms BB7224 aus energetischen Gründen verloren. *E. coli*-Zellen, denen der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt, können jedoch nicht ohne die Produktion der Chaperonsysteme DnaK/DnaJ/GrpE und GroEL/S (Kusukawa & Yura, 1988) oder konstitutiv erhöhte GroEL/S-Mengen (Tomoyasu *et al.*, 2001) bei Temperaturen über 20°C wachsen (Zhou *et al.*, 1988). Dies legt die Vermutung nahe, dass in den Stämmen E 8.2.9, E 8.3.9 und E 8.0.9 die GroEL- und vor allem die DnaK-Mengen durch bislang unbekannte Mechanismen konstitutiv erhöht wurden, um den potentiellen Verlust des Insertionselements und damit der hohen GroEL-Mengen auszugleichen und bei der Kultivierungstemperatur des Evolutionsprozesses von 30°C wachsen zu können. Infolgedessen verfügen diese *E. coli*-Stämme konstitutiv über

ausreichend hohe Mengen an Hitzeschockproteinen, um auch bei einem Hitzestress ohne eine σ^{32}-kontrollierte Regulation der Hitzeschockproteine überleben zu können.
In Abbildung 13 ist ferner zu erkennen, dass diverse Unterschiede in den Proteomen der fünf betrachteten Stämme vorlagen. Diese wurden zu einem späteren Zeitpunkt näher analysiert.

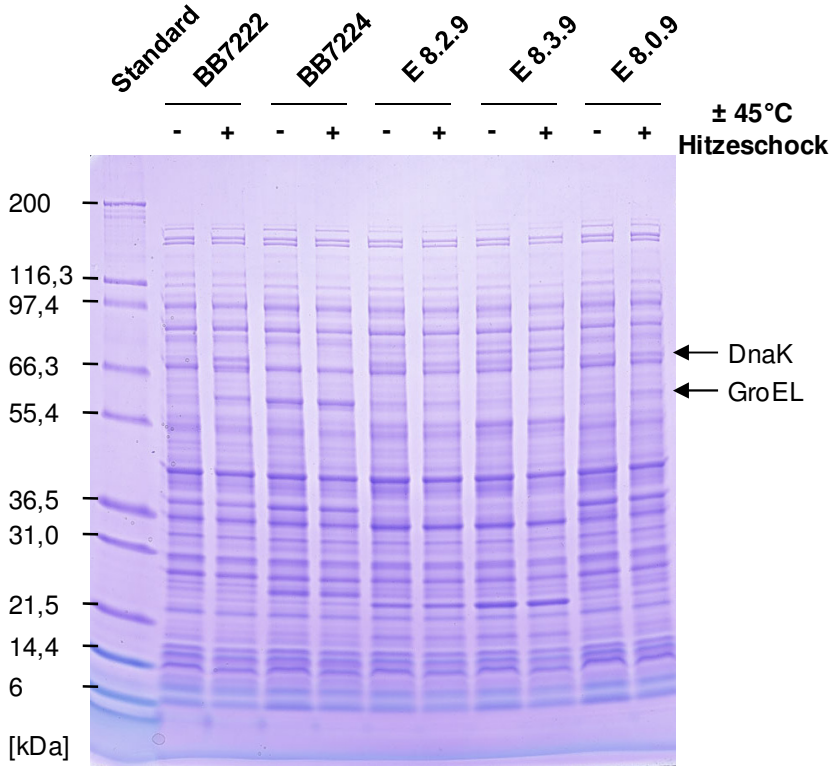


Abbildung 13: SDS-PAGE zur Analyse der Proteomveränderungen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9, ihres Ursprungsstammes BB7224 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9 und BB7222 bei einem Hitzeschock bei 45°C. Der Hitzeschock erfolgte für 15 min bei 45°C. Für jeden der betrachteten Stämme wurde eine Probe vor (-) und eine Probe nach (+) dem Hitzeschock genommen. Markiert sind die DnaK-Bande (69 kDa) und die GroEL-Bande (57 kDa). Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Außerdem wurde zusätzlich die Resistenz der Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen verschiedene Antibiotika überprüft. Dies war insbesondere für Klonierungsüberlegungen von Bedeutung. Die Überprüfung von Antibiotikaresistenzen erfolgte mit Hilfe von Flüssigkulturen sowie LB-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Antibiotika versetzt wurden. Die Kanamycinresistenz der beiden HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstamms E 8.0.9 sowie des Ursprungsstamms BB7224 konnte hierbei bestätigt werden. Zudem stellte sich heraus, dass die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen die Antibiotika Ampicillin, Spectinomycin und Chloramphenicol resistenter waren als ihr Ursprungsstamm BB7224 und der Kontrollstamm E 8.0.9. Die beiden HOCl-resistenten

Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 konnten erst bei Konzentrationen von mindestens 400 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol abgetötet werden.
Insgesamt sind die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 demnach nicht spezifisch gegen HOCl resistent, obwohl sie während des Evolutionsprozesses ausschließlich mit HOCl-Stress konfrontiert wurden. Stattdessen konnte ihnen eine erhöhte Resistenz gegen H_2O_2, Diamid, Hitzestress, hyperosmotischen Stress und einige Antibiotika nachgewiesen werden.

3.3.3 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der RNA-Ebene

Die Tatsache, dass die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 nicht nur spezifisch gegen HOCl sondern auch gegen weitere Stressbedingungen resistent waren, ließ vermuten, dass an ihrer starken HOCl-Resistenz mehrere verschiedene Stressantworten und eventuell die generelle Stressantwort beteiligt waren. Um die Ursachen für die HOCl-Resistenz und die gegebenenfalls beteiligten Stressantworten zu identifizieren, erfolgte eine Analyse der Veränderungen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen im Vergleich zum Ursprungs- und Kontrollstamm sowohl auf der RNA- als auch auf der Proteom- und Zellebene.
Zunächst wurde die Expression diverser Gene, die eine wichtige Rolle in verschiedenen Stressantworten von *E. coli* spielen, mittels qRT-PCR betrachtet. Hierfür wurden die beiden evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie ihr Ursprungsstamm BB7224 mit verschiedenen HOCl-Konzentrationen in LB-Medium gestresst. Nach einem zehnminütigen Stress und anschließendem Quenchen erfolgte parallel zur Probennahme für die RNA-Isolierung eine Probennahme für einen HOCl-Regenerierungs-Test. Anhand der Ergebnisse des HOCl-Regenerierungs-Tests wurden Proben der drei betrachteten Stämme ausgewählt, bei denen die Zellen einem vergleichbaren Ausmaß an Stress unterlagen. Aus den jeweils vergleichbaren Proben wurde die RNA isoliert und anschließend die mRNA-Menge ausgewählter Gene mittels qRT-PCR ermittelt. Untersucht wurde dabei die Expression von für Sigmafaktoren kodierenden Genen (*rpoD*, *rpoS*, *rpoN*, *rpoF, rpoE*), jene des Gens des Anti-Sigmafaktors für σ^E (*rseA*), der Schlüsselgene von DNA-Reparatursystemen wie *recA* und *lexA* (SOS-Antwort) und *dps* sowie der Gene wichtiger Komponenten unter oxidativem Stress (*soxS*, *sodA*), periplasmatischem Stress (*degP*), osmotischem Stress (*otsB*), Säurestress (*gadB*), der Psp-Antwort (*pspA*) und regulatorischer Bestandteile von Zwei-Komponenten-Systemen, welche der Signaltransduktion dienen (*arcA*, *cpxR*, *baeR*, *rcsB*). Da für Gene der Eisenaufnahme und Eisenhomöostase sowie

Gene der Methioninbiosynthese bereits ein Zusammenhang mit der HOCl-Resistenz in *E. coli* festgestellt wurde (diese Arbeit, Abschnitt 3.2.1 und (Gebendorfer *et al.*, 2012)), erfolgte zudem eine Betrachtung der Expression von Genen, welche für die Eisenregulation in der Zelle verantwortlich sind (*fur*, *fecR*, *fecD*), sowie des Gens *metB* der Methioninbiosynthese.
Abbildung 14 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der qRT-PCR-Experimente. Grundsätzlich konnten Gene unterschieden werden, deren mRNA-Mengen nach dem HOCl-Stress in allen drei betrachteten Stämmen entweder gering, moderat oder drastisch verändert waren im Vergleich zu den entsprechenden mRNA-Mengen unter Bedingungen ohne HOCl-Stress. Die Expressionsregulation der Gene *fur*, *fecR*, *fecD*, *rpoF*, *rpoN*, *recA*, *soxS*, *degP*, *otsB*, *gadB* und *metB* war dabei unter HOCl-Stress in den beiden HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 deutlich verschieden von jener in ihrem Ursprungsstamm BB7224. Teilweise war zudem das Ausmaß dieser Unterschiede zwischen den beiden HOCl-resistenten Stämmen verschieden. Dies könnte auf Unterschiede in den HOCl-Resistenz-Mechanismen der beiden evolvierten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 hindeuten. Die Expression des Gens *otsB*, einem Schlüsselgen der Osmoregulation bei hyperosmotischem Stress in *E. coli*, wurde in beiden betrachteten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen nach HOCl-Stress hoch reguliert, während dies im Ursprungsstamm BB7224 nicht der Fall war (Abb. 14). Die offenbar veränderte Regulation dieses Gens könnte die Ursache für die zuvor beobachtete, erhöhte Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen hyperosmotischen Stress (Abb. 12 E) sein.
Alles in allem unterstützen die Ergebnisse der qRT-PCR-Experimente die Theorie einer Beteiligung verschiedener Stressantworten an der HOCl-Resistenz in *E. coli*. Auch wenn die *rpoS*-Transkription selbst unter HOCl-Stress weder in den HOCl-resistenten Stämmen noch im Ursprungsstamm reguliert wurde, deutete beispielsweise die ausschließlich in den beiden HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 erhöhte Expression der Gene *otsB* und *gadB* unter HOCl-Stress eine Beteiligung σ^S-regulierter Stressantworten an der HOCl-Resistenz an. Das Gen *otsB* ist nämlich ein Schlüsselgen der Stressantwort auf hyperosmotischen Stress, das Gen *gadB* eines der Säurestressantwort in *E. coli* und beide Stressantworten sind in *E. coli* weitgehend σ^S-abhängig. So fördert eine erhöhte Umgebungsosmolarität oder ein niedriger pH-Wert die σ^S-Synthese auf der Ebene der Translation und beeinträchtigt den σ^S-Abbau, wodurch die σ^S-Menge in der *E. coli*-Zelle schnell und stark ansteigt und σ^S-abhängige Gene transkribiert werden (Klauck *et al.*, 2007). Zu diesen Genen gehören auch *otsB* und *gadB* (Weber *et al.*, 2005). Eine Beteiligung der generellen Stressantwort an der HOCl-Resistenz in *E. coli* ist anhand der Ergebnisse der qRT-PCR-Experimente daher nicht auszuschließen.

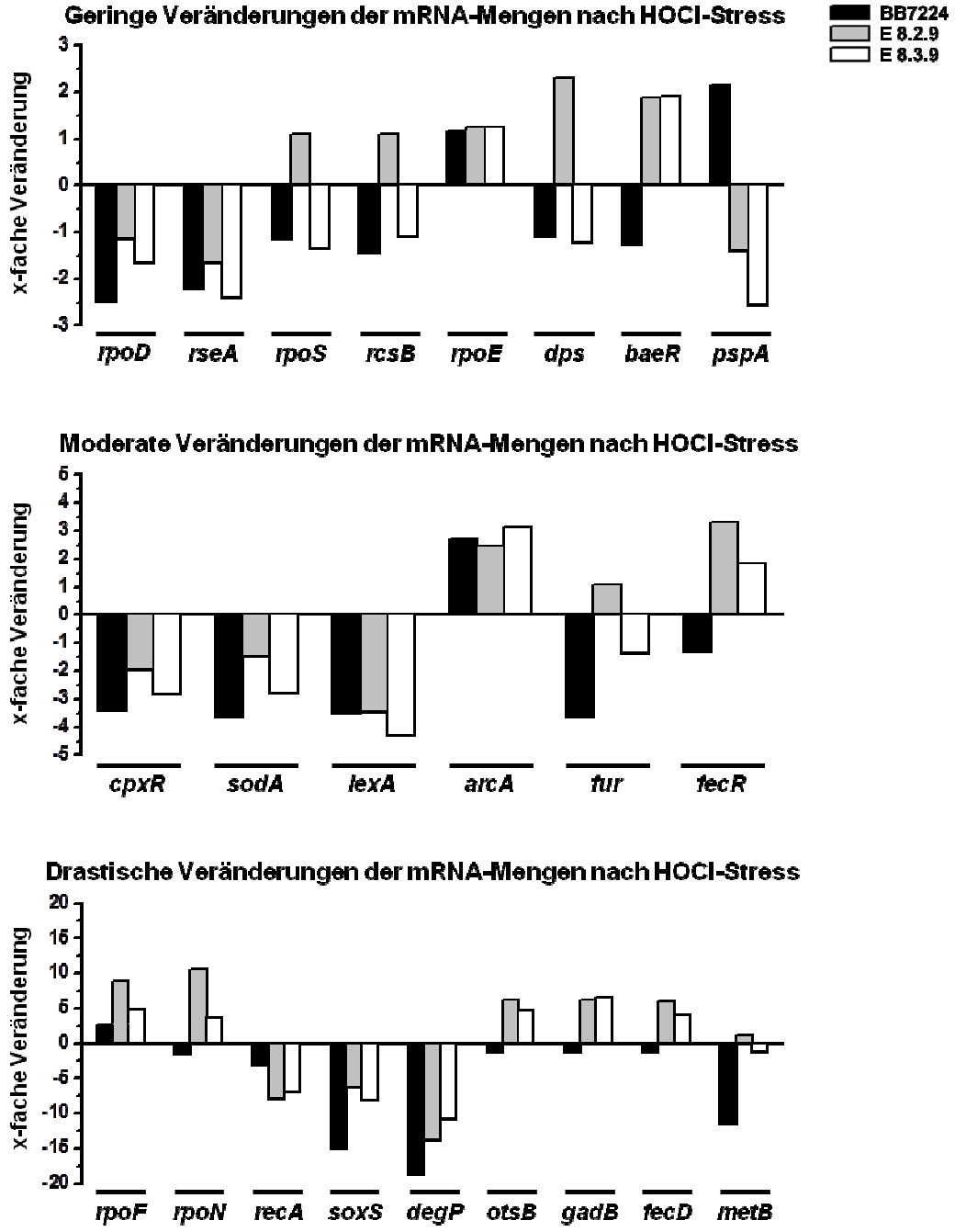


Abbildung 14: Veränderungen der mRNA-Mengen ausgewählter *E. coli*-Gene in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie deren Ursprungsstamm BB7224 nach HOCl-Stress. Die Ergebnisse wurden nach Genen sortiert, deren Expression nach HOCl-Stress in allen drei betrachteten *E. coli*-Stämmen entweder gering (oben), moderat (mittig) oder drastisch (unten) im Vergleich zur Expression unter Bedingungen ohne HOCl-Stress verändert war. Die mRNA-Mengen wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Verwendet wurde die RNA von Proben, bei denen die drei betrachteten Stämme vergleichbar stark gestresst waren. Dies war bei 3,8mM HOCl für BB7224 (schwarz), 8mM HOCl für E 8.2.9 (grau) und 7,5mM HOCl für E 8.3.9 (weiß) der Fall. Die dargestellten Werte sind jeweils bezogen auf den Messwert der ungestressten Vergleichskulturen sowie auf den Messwert für *tufB* als internen Standard.

Da sich in den qRT-PCR-Experimenten eine Beteiligung von Genen, welche für die Eisenregulation in *E. coli* verantwortlich sind, an der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 andeutete, erfolgte eine Analyse der intrazellulären Eisemengen. Hierbei wurde die Menge freien intrazellulären Eisens (Fe^{3+}) in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie in deren Ursprungsstamm BB7224 und dem während des Evolutionsprozesses parallel kultivierten, ungestressten Kontrollstamm E 8.0.9 unter Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress mittels EPR-Spektroskopie gemessen. Es zeigte sich, dass in den vier betrachteten Stämmen ähnlich hohe intrazelluläre Eisenkonzentrationen vorlagen (Abb. 15). Demnach erfolgt die Eisenregulation in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen vermutlich nicht konstitutiv anders als im Ursprungsstamm BB7224 oder dem Kontrollstamm E 8.0.9. Eine Regulation der Eisenmengen unter HOCl-Stress konnte hier jedoch nicht ausgeschlossen werden. Um dies zu untersuchen, müssten die vier betrachteten *E. coli*-Stämme während der Probenvorbereitung für die EPR-Messungen einem vergleichbar starken HOCl-Stress ausgesetzt werden. Dies gestaltete sich jedoch aufgrund ihrer unterschiedlich starken HOCl-Resistenzen und der aufwändigen Probenvorbereitung für die EPR-Messungen als nicht angemessen durchführbar.

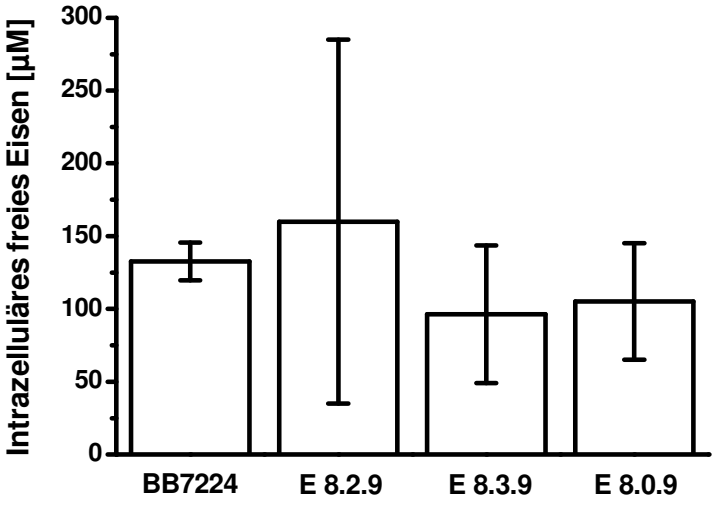


Abbildung 15: Messungen der intrazellulären freien Eisenmengen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E8.3.9, ihrem Ursprungsstamm BB7224 sowie dem Kontrollstamm E 8.0.9 mittels EPR-Spektroskopie. Die Kultivierung der Stämme erfolgte unter Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress. Bei der Bestimmung der Eisenmengen mittels EPR-Spektroskopie wurden Triplikate vermessen, deren Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt sind.

3.3.4 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der Proteom-Ebene

Als nächstes wurden die Veränderungen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen im Vergleich zum Ursprungs- und Kontrollstamm auf der Proteom-Ebene analysiert. Dies sollte zu Hinweisen auf Ursachen für die HOCl-Resistenz und die gegebenenfalls beteiligten Stressantworten führen.

Um einen möglichst umfassenden Überblick zu erhalten, wurden die Proteome verschiedener HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme des Evolutionsprozesses, ihres Ursprungsstamms BB7224 und eines parallel zur Evolution kultivierten, ungestressten Kontrollstamms mit Hilfe von 2D-Gelen aufgetrennt. Es handelte sich um Proben der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.2 und E 8.3.2, welche nach 6 Stresszyklen des Evolutionsprozesses erhalten wurden, E 8.2.4 und E 8.3.4, die nach 12 Stresszyklen erhalten wurden, E 8.2.7 und E 8.3.7, die nach 18 Stresszyklen erhalten wurden, sowie E 8.2.9 und E 8.3.9, die nach 24 Stresszyklen entstanden waren. Als Kontrollstamm diente der für die Dauer des gesamten Evolutionsprozesses und somit für 30 Stresszyklen parallel kultivierte, nie mit HOCl konfrontierte Stamm E 8.0.11. Alle hier betrachteten Kulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert bevor die Probe für die 2D-PAGE entnommen wurde.

Die 2D-Gele zeigten, dass die Proteome der betrachteten Stämme zahlreiche Unterschiede aufwiesen (Abb. 16). In Übereinstimmung mit den Erläuterungen in Abschnitt 3.3.2, zeigten auch die 2D-Gele, dass sich die Stämme des Evolutionsprozesses von ihrem Ursprungsstamm BB7224 insbesondere in den Mengen ihrer Hitzeschockproteine DnaK und GroEL unterschieden (Abb. 16 D). Dabei waren, wie bereits zuvor beobachtet (Abb. 13), die DnaK-Mengen in den Stämmen des Evolutionsprozesses deutlich höher und die GroEL-Mengen deutlich niedriger als im BB7224-Stamm. Die DnaK-Mengen schienen im Laufe des Evolutionsprozesses geringfügig zuzunehmen. Sie waren jedoch in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen und dem Kontrollstamm E 8.0.11 ähnlich hoch. DnaK scheint demnach keine wesentliche Rolle bei der HOCl-Resistenz in *E. coli* zu spielen. Ferner lagen in allen betrachteten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen des Evolutionsprozesses im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm BB7224 und dem Kontrollstamm E 8.0.11 erhöhte Mengen des Außenmembranproteins OmpA vor (Abb. 16 G). Dies deutet darauf hin, dass OmpA grundsätzlich zur HOCl-Resistenz in *E. coli* beiträgt. Die Mengen der Komponenten AhpC und AhpF der Alkylhydroperoxidreduktase waren hingegen erst in den maximal HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 höher als in ihren Vorläuferzellen des Evolutionsprozesses sowie im Ursprungsstamm BB7224 und Kontrollstamm E 8.0.11 (Abb. 16 E, F). Hierbei waren die AhpC- und AhpF-Mengen im Stamm E 8.3.9 deutlich höher als

im Stamm E 8.2.9. Dies deutet auf Unterschiede in den HOCl-Resistenz-Mechanismen der beiden evolvierten, maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 hin. Erhöhte Mengen der Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF scheinen aber zu einer starken HOCl-Resistenz in *E. coli* beizutragen. Zudem war die Menge der Katalase KatG in den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.7, E 8.2.9 und E 8.3.9 höher als in den übrigen betrachteten *E. coli*-Stämmen (Abb. 16 C). Hierbei war zu bemerken, dass offenbar alle Stämme des Evolutionsprozesses im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm BB7224 bereits über leicht erhöhte KatG-Mengen verfügten. Da die KatG-Menge im Stamm E 8.2.9 höher war als im Stamm E 8.2.7, scheint es so, als wäre sie während des Evolutionsprozesses allmählich angestiegen. Im HOCl-resistenten Stamm E 8.3.9 trat die stark erhöhte KatG-Menge hingegen offenbar plötzlich und erst im maximal HOCl-resistenten Stamm auf. Die KatG-Menge war außerdem im Stamm E 8.3.9 deutlich höher als im Stamm E 8.2.9. Dies spricht zum einen für unterschiedliche Mechanismen zur Erhöhung der zellulären KatG-Mengen und zum anderen für unterschiedliche HOCl-Resistenz-Mechanismen in den beiden HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9. Eine deutlich erhöhte Menge der Katalase KatG scheint jedoch für eine hohe HOCl-Resistenz in *E. coli* von Bedeutung zu sein.

Demnach deuten die Ergebnisse der Proteomanalysen an, dass eine erhöhte Menge des Außenmembranproteins OmpA grundsätzlich zur Resistenz gegen HOCl beiträgt und erhöhte Mengen der Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF sowie der Katalase KatG bei einer hohen HOCl-Resistenz eine Rolle spielen. Dies stützt die Annahme, dass ein Zusammenspiel verschiedener Stressantworten und Resistenzmechanismen für die HOCl-Resistenz in *E. coli* benötigt wird, wobei die HOCl-Resistenz vermutlich stärker ist, je mehr Stressresistenzmechanismen beteiligt sind. Die verschiedenen Resistenzmechanismen könnten der Zelle dabei gegen die unterschiedlichen Folgen und Schäden des HOCl-Stresses helfen. Je mehr Resistenzmechanismen beteiligt sind, desto mehr direkt oder indirekt durch HOCl verursachte Schäden könnten repariert werden und desto besser überlebt eine Zelle einen HOCl-Stress. Obwohl die beiden evolvierten, maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 eine vergleichbare Resistenz gegen verschiedene Stressfaktoren zeigten (Abb. 12), wiesen sie unterschiedlich hohe Mengen der Proteine OmpA, AhpC, AhpF und KatG auf (Abb. 16). Dies führte zu der Annahme, dass nicht das Ausmaß der einzelnen Stressantworten entscheidend für die HOCl-Resistenz ist, sondern die Tatsache, dass die verschiedenen Stressantworten zusammenwirken.

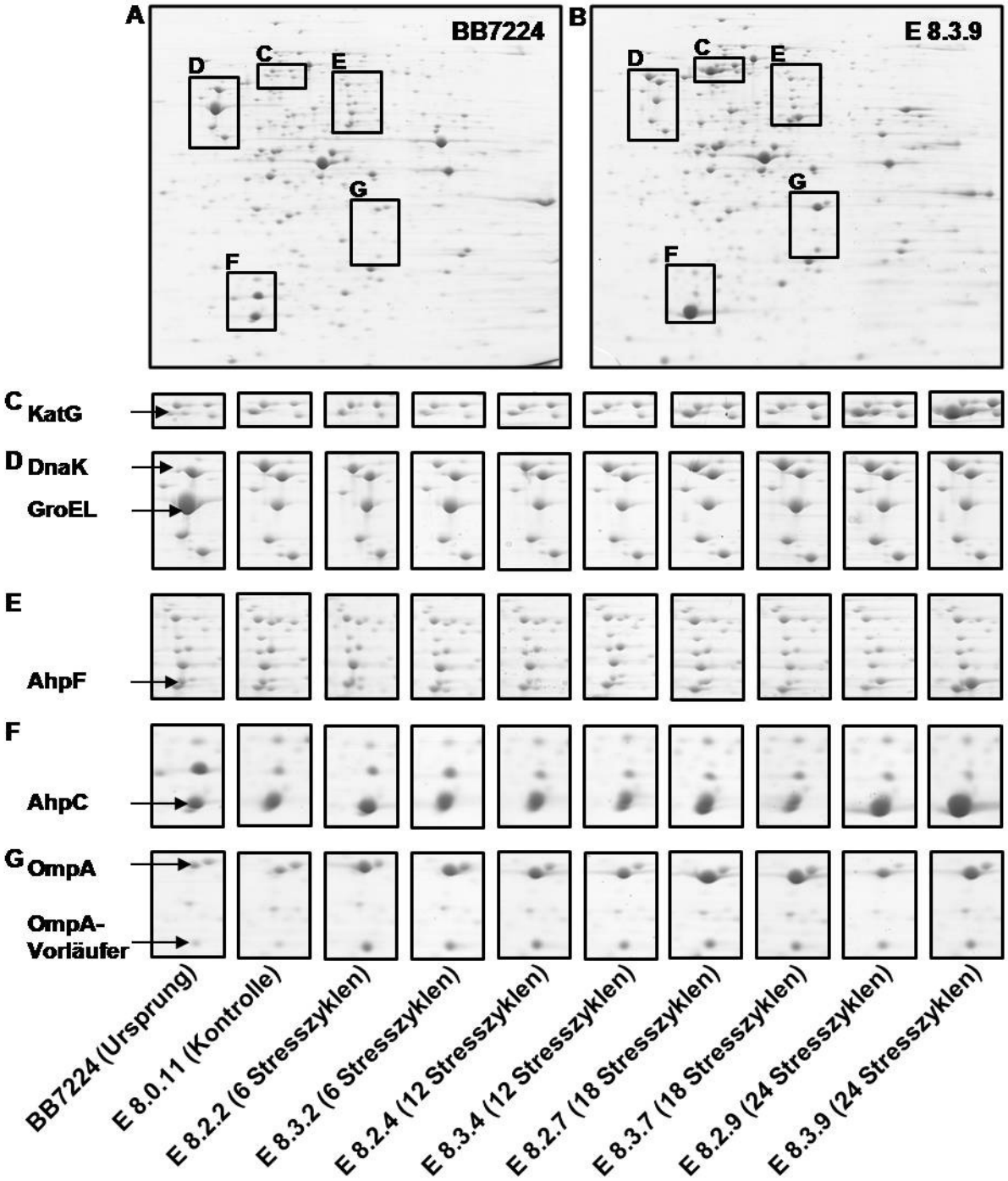


Abbildung 16: Analyse der Proteomveränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen des Evolutionsprozesses im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm BB7224 und dem Kontrollstamm E 8.0.11 mittels 2D-PAGE. Es wurden Übernachtkulturen der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.2, E 8.3.2, E 8.2.4, E 8.3.4, E 8.2.7, E 8.3.7, E 8.2.9 und E 8.3.9, die zu verschiedenen Zeitpunkten (Anzahl der Stresszyklen in Klammern) des Evolutionsprozesses entstanden waren, sowie des Kontrollstammes E 8.0.11, der für den gesamten Evolutionsprozess (30 Zyklen) parallel kultiviert und nie mit HOCl gestresst wurde, und des Ursprungsstammes BB7224 auf 2D-Gelen analysiert. Alle Stämme wurden bei 30°C kultiviert. Abgebildet sind die 2D-Gele der Stämme BB7224 (A) und E 8.3.9 (B), wobei einige Regionen, in denen sich die betrachteten Proteome stark voneinander unterschieden, mit Boxen markiert sind. Die aufgetrennten Proteine wiesen einen isoelektrischen Punkt von 3 - 10 (von links nach rechts) und ein Molekulargewicht zwischen 150 und 10 kDa (von oben nach unten) auf. In C - G sind ausgewählte Regionen von 2D-Gelen abgebildet, welche die Veränderungen in den Spot-Intensitäten der jeweils markierten Proteine in den entsprechenden *E. coli*-Stämmen zeigen.

Anhand von SDS-Gelen wurde festgestellt, dass sich die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 nicht nur in den Mengen des Außenmembranproteins OmpA sondern auch wesentlich in den OmpF-Mengen von ihrem Ursprungsstamm BB7224 und dem Kontrollstamm, welcher parallel zum Evolutionsprozess ohne HOCl-Stress kultiviert wurde, unterschieden. Während die OmpA-Mengen in den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 höher waren als im Ursprungsstamm und dem Kontrollstamm (Abb. 16 G und 17), waren die Mengen des Außenmembranproteins OmpF in E 8.2.9 und E 8.3.9 deutlich geringer (Abb. 17). Aufgrund des relativ niedrigen isoelektrischen Punktes des Proteins OmpF sowie der sehr geringen Mengen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen des Evolutionsprozesses, war OmpF nicht immer auf den 2D-Gelen eindeutig detektierbar. Auf SDS-Gelen konnte OmpF jedoch stets gut detektiert und zudem mittels Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden. Abbildung 17 zeigt ein SDS-Gel, auf welchem die Proteome der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224 analysiert wurden. Es war deutlich zu erkennen, dass der Kontrollstamm E 8.0.9 ähnlich hohe OmpF-Mengen aufwies wie der Ursprungsstamm BB7224. Die OmpF-Mengen der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 waren im Vergleich dazu sehr viel geringer.

Grundsätzlich dient die äußere Membran einer *E. coli*-Zelle als eine erste schützende Barriere, indem sie das Einströmen schädlicher Substanzen verhindert. Hierbei ist die Regulation der Außenmembranpermeabilität von entscheidender Bedeutung und OmpF ein wichtiges Außenmembranprotein. So ist zum Beispiel bekannt, dass infolge eines oxidativen Stresses oder Chemikalien in der Umgebung die OmpF-Mengen herunter reguliert werden und dies zu einer erhöhten Resistenz von Enterobakterien gegen eine Vielzahl von Antibiotika und schädlichen Substanzen beiträgt (Nikaido, 2003). Demzufolge könnten die geringen OmpF-Mengen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 zu deren bereits erwähnter, erhöhter Resistenz gegen verschiedene Antibiotika (Abschnitt 3.3.2) beitragen. Des Weiteren scheint es durchaus möglich, dass infolge der geringen OmpF-Mengen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 weniger HOCl in die Zellen gelangt. Ein HOCl-Resistenzmechanismus könnte demnach in der verringerten HOCl-Aufnahme in die *E. coli*-Zelle bestehen.

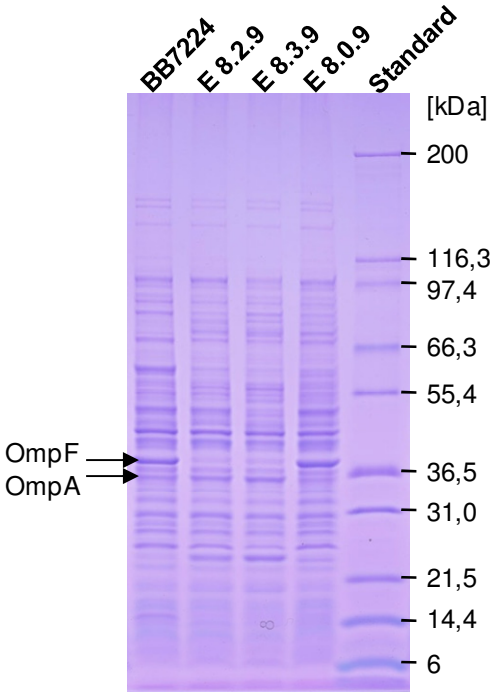


Abbildung 17: Proteomanalyse der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstammes E 8.0.9 und ihres Ursprungsstammes BB7224 mittels SDS-PAGE. Aufgetrennt wurden Proben aus Übernachtkulturen der jeweiligen Stämme, welche bei 30°C inkubiert wurden. Markiert sind die OmpF- (39 kDa) und die OmpA- (37 kDa) Bande. Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Da die Vermutung nahe lag, dass Außenmembranproteine wie OmpA und OmpF für die HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 von Bedeutung waren, sollte die Außenmembran der beiden Stämme näher analysiert werden. Als ein erstes Experiment hierzu wurde die Membranfluidität der Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 im Vergleich zu jener des Kontrollstamms E 8.0.9 sowie des Ursprungsstamms BB7224 gemessen. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe des UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (Équipe PMB, Dijon, Frankreich) und ergaben, dass sich die Membranfluidität der vier betrachteten Stämme unter Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress bei 30°C kaum unterschied (Abb. 18). Die Fluidität der Membran einer *E. coli*-Zelle scheint demnach unter diesen Bedingungen nicht mit deren OmpF-Menge zusammenzuhängen. Vermutlich wurde die im Vergleich zu ihrem Kontroll- und Ursprungsstamm verringerte OmpF-Produktion in den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 durch die erhöhte Produktion anderer Außenmembranproteine, wie beispielsweise OmpA, ausgeglichen. Demzufolge könnte die Membranfluidität der betrachteten *E. coli*-Stämme trotz unterschiedlicher Zusammensetzung ihrer Außenmembran ähnlich sein. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher die Membranzusammensetzung der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme näher analysiert werden.

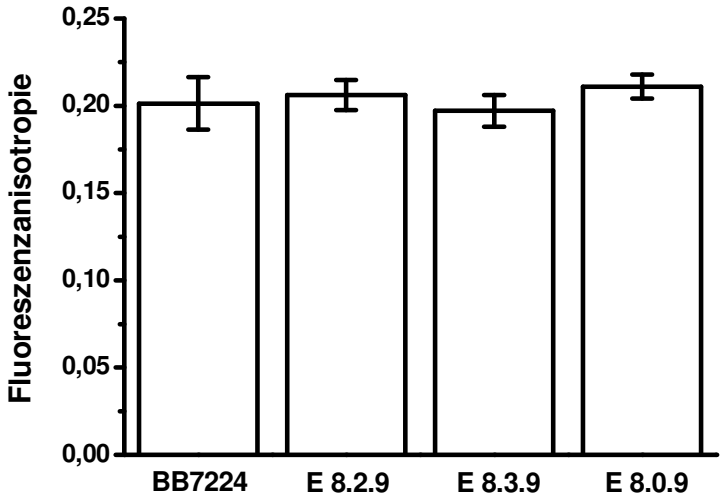


Abbildung 18: Messung der Membranfluidität der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224 mittels Fluoreszenzanisotropie mit TMA-DPH. Die Messungen erfolgten mit Proben von exponentiell wachsenden Zellen (OD_{600} = 0,5) der vier betrachteten Stämme. Die Kultivierung sowie die Probenvorbereitung und Messung erfolgte bei 30°C. Die Anregungswellenlänge betrug λ = 360 nm und die Emissionswellenlänge λ = 450 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens sieben Wiederholungen mit je mindestens 50 Messungen für jede Probe.

Die Enzyme Katalase und Alkylhydroperoxidreduktase können H_2O_2 abbauen. Ob die beobachteten erhöhten Mengen der Katalase KatG und Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 (Abb. 16 C, E, F) zu einem verstärkten H_2O_2-Abbau in Kulturen dieser Stämme führen, wurde mit H_2O_2-Abbau-Experimenten überprüft. Das Vorgehen wurde in Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

In den H_2O_2-Abbau-Experimenten wurden die Kulturen mit 0,5 mM H_2O_2 versetzt und dessen Abbau durch Bestimmung des im Medium verbliebenen H_2O_2 verfolgt. Die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 hatten das H_2O_2 bereits nach 30 min vollständig abgebaut (Abb. 19). Als Kontrollstamm diente der Stamm E 8.0.9, welcher für 24 Zyklen des Evolutionsprozesses parallel zu den Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 kultiviert, aber nie mit HOCl konfrontiert wurde. In Kulturen dieses Kontrollstamms war das H_2O_2 erst nach 90 min vollständig abgebaut. In Kulturen des Ursprungsstamms der Stämme des Evolutionsprozesses, BB7224, war dies erst nach 120 min der Fall. Der H_2O_2-Abbau erfolgte demnach in den Kulturen der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 deutlich schneller als beim Kontrollstamm E 8.0.9, welcher wiederum das H_2O_2 schneller abbaute als der Ursprungsstamm BB7224.

Die Proteomanalysen hatten zuvor zum einen gezeigt, dass alle Stämme des Evolutionsprozesses inklusive des Kontrollstamms E 8.0.11 über leicht höhere KatG-Mengen als ihr Ursprungsstamm BB7224 verfügten (Abb. 16 C). Zum anderen hatten sie gezeigt, dass die HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 deutlich höhere KatG- und

AhpCF-Mengen aufwiesen als ihre Vorläuferzellen, der Kontrollstamm E 8.0.11 und ihr Ursprungsstamm BB7224 (Abb. 16 C, E, F). Durch den Vergleich der Ergebnisse der Proteomanalysen (Abb. 16) und der H_2O_2-Abbau-Experimente (Abb. 19) wurde deutlich, dass in Kulturen von *E. coli*-Stämmen mit höheren Mengen der Katalase KatG, nämlich E 8.2.9, E 8.3.9 und auch E 8.0.9, H_2O_2 schneller abgebaut wurde als in Kulturen eines Stammes mit geringeren KatG-Mengen, und zwar BB7224. Zudem waren wahrscheinlich die deutlich höheren KatG- und auch AhpCF-Mengen der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 im Vergleich zu jenen des Kontrollstamms E 8.0.9 für den sehr viel schnelleren H_2O_2-Abbau in den Kulturen der beiden HOCl-resistenten Stämme verantwortlich. Sowohl die KatG- als auch die AhpCF-Mengen waren im Stamm E 8.3.9 deutlich höher als im Stamm E 8.2.9 (Abb. 16 E, F). Der H_2O_2-Abbau erfolgte jedoch tendentiell in Kulturen des E 8.2.9-Stammes etwas schneller als in E 8.3.9-Kulturen (Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass nicht allein die sehr hohen Mengen der Katalase KatG und Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF für den H_2O_2-Abbau bei den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen verantwortlich waren. Demzufolge scheinen die evolvierten, maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 aufgrund deutlich erhöhter KatG- und AhpCF-Mengen über die Fähigkeit eines stark beschleunigten H_2O_2-Abbaus zu verfügen. Vermutlich führten daher diese stark erhöhten KatG- und AhpCF-Mengen zu der hohen H_2O_2-Resistenz dieser beiden Stämme (Abb. 12 B).

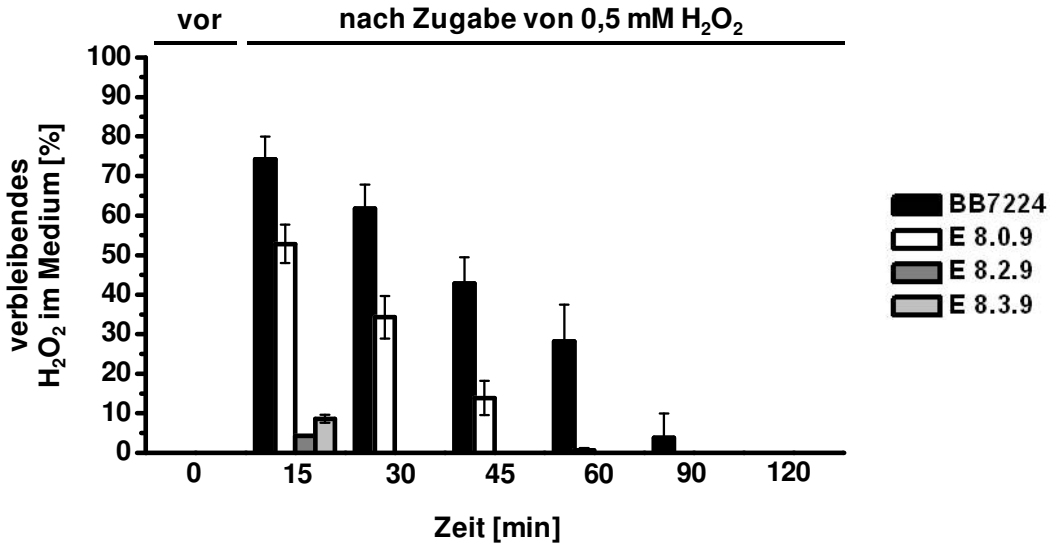


Abbildung 19: Analyse des H_2O_2-Abbaus in Kulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224. Der H_2O_2-Abbau wurde mittels FOX-Assay verfolgt. Dabei wurden Kulturen exponentiell wachsender Zellen der *E. coli*-Stämme BB7224 (schwarz), E 8.0.9 (weiß), E 8.2.9 (dunkelgrau) und E 8.3.9 (hellgrau) mit 0,5 mM H_2O_2 versetzt und weiter kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgten Probennahmen und die Ermittlung der jeweils im Medium verbliebenen H_2O_2-Konzentration. Die ermittelten Werte wurden je auf den Wert einer Probe bezogen, welche keine Zellen, sondern ausschließlich 0,5 mM H_2O_2 im LB-Medium enthielt, und in Prozent angegeben. Die Probe zum Zeitpunkt 0 min zeigte, dass in allen Kulturen vor der Zugabe von 0,5 mM H_2O_2 keine detektierbare H_2O_2-Konzentration im Medium vorhanden war. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt und die Mittelwerte ± Standardabweichung der Ergebnisse sind dargestellt.

Um die Beteiligung der Proteine OmpA, KatG, AhpC und AhpF an der HOCl-Resistenz in *E. coli* zu überprüfen, wurden entsprechende Überexpressionsmutanten hergestellt. Diese produzierten entweder das Außenmembranprotein OmpA (BB7224 pJW1-*ompA* bzw. JG176), die Katalase KatG (BB7224 pJW1-*katG* bzw. JG177) oder die Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF (BB7224 pJW1-*ahpCF* bzw. JG178) verstärkt nach Arabinose-vermittelter Induktion der entsprechenden Gene vom pJW1-Plasmid. Als Kontrollstamm diente ein BB7224-Stamm, welcher das leere Plasmid trug (BB7224 pJW1 bzw. JG179). Da die für KatG und AhpCF kodierenden Gene *katG* und *ahpCF* zum OxyR-Regulon gehören, lag die Vermutung nahe, dass die durch den Transkriptionsfaktor OxyR vermittelte Stressantwort bei der HOCl-Resistenz der evolvierten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 eine Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde ein Plasmid in den BB7224-Stamm transformiert, welches ein mutiertes *oxyR*-Gen exprimiert (BB7224 pGS058 bzw. JG175). In diesem Stamm war die OxyR-vermittelte Stressantwort permanent induziert. Die HOCl-Resistenz dieser Stämme im Vergleich zu jener der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 wurde mit Hilfe von HOCl-Regenerierungs-Tests überprüft.

Die HOCl-Regenerierungs-Tests zeigten, dass weder einer der Stämme, welche separat entweder *ahpCF*, *katG* oder *ompA* überexprimierten, noch der Stamm, in dem OxyR konstitutiv aktiv war, so stark gegen HOCl resistent war wie die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9. Dies ist in Abbildung 20 veranschaulicht. Dort ist das Wachstum der acht betrachteten Stämme BB7224, E 8.2.9, E 8.3.9, JG175, JG176, JG177, JG178 sowie JG179 ohne HOCl-Stress und nach einem Stress mit 8 mM HOCl gezeigt. Alle betrachteten Stämme wuchsen ohne HOCl-Stress annähernd wie der Ursprungs- und Kontrollstamm BB7224. Nach einem Stress mit 8 mM HOCl wuchsen die evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 nach einer kurzen lag-Phase weiter, während ihr Ursprungsstamm BB7224 nicht mehr in der Lage war, weiter zu wachsen (Abb. 20 A). Auch der Stamm JG175 mit der permanent induzierten OxyR-vermittelten Stressantwort wuchs nach dem HOCl-Stress nach einer relativ kurzen lag-Phase weiter (Abb. 20 B). Das Wachstum dieses Stammes erfolgte jedoch mit einer deutlich geringeren Wachstumsrate als jenes der Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9. Trotzdem ermöglichte die OxyR-vermittelte Stressantwort offenbar eine gewisse HOCl-Resistenz. Ferner wuchsen im Gegensatz zum Stamm BB7224 alle Stämme, die das pJW1-Plasmid trugen, nach dem HOCl-Stress weiter (Abb. 20 C - F). Dies erfolgte nach einer längeren lag-Phase und war unabhängig davon, ob der Kultur zuvor zur Induktion der Transkription des jeweiligen Plasmid-kodierten Gens Arabinose (0,1% L-Arabinose) zugesetzt wurde oder nicht. Demnach scheint bereits das pJW1-Plasmid eine schwache HOCl-Resistenz zu vermitteln. Des Weiteren war wie erwartet nach dem HOCl-Stress das Wachstum des Kontrollstamms JG179 mit dem leeren pJW1-Plasmid mit und ohne Arabinose nahezu identisch (Abb. 20 C). Im Gegensatz dazu wuchsen

nach dem HOCl-Stress die Stämme JG176 und JG178, in denen Arabinose-induziert *ompA* (Abb. 20 D) bzw. *ahpCF* (Abb. 20 F) überexprimiert wurde, bereits nach einer etwas kürzeren lag-Phase weiter als ohne Induktion. Deutlicher war der Unterschied im Stamm JG177. Wurde in diesem Stamm die *katG*-Expression durch Arabinose induziert, wuchsen die Zellen nach dem HOCl-Stress nach einer deutlich kürzeren lag-Phase weiter, als wenn keine Induktion erfolgt war (Abb. 20 E).

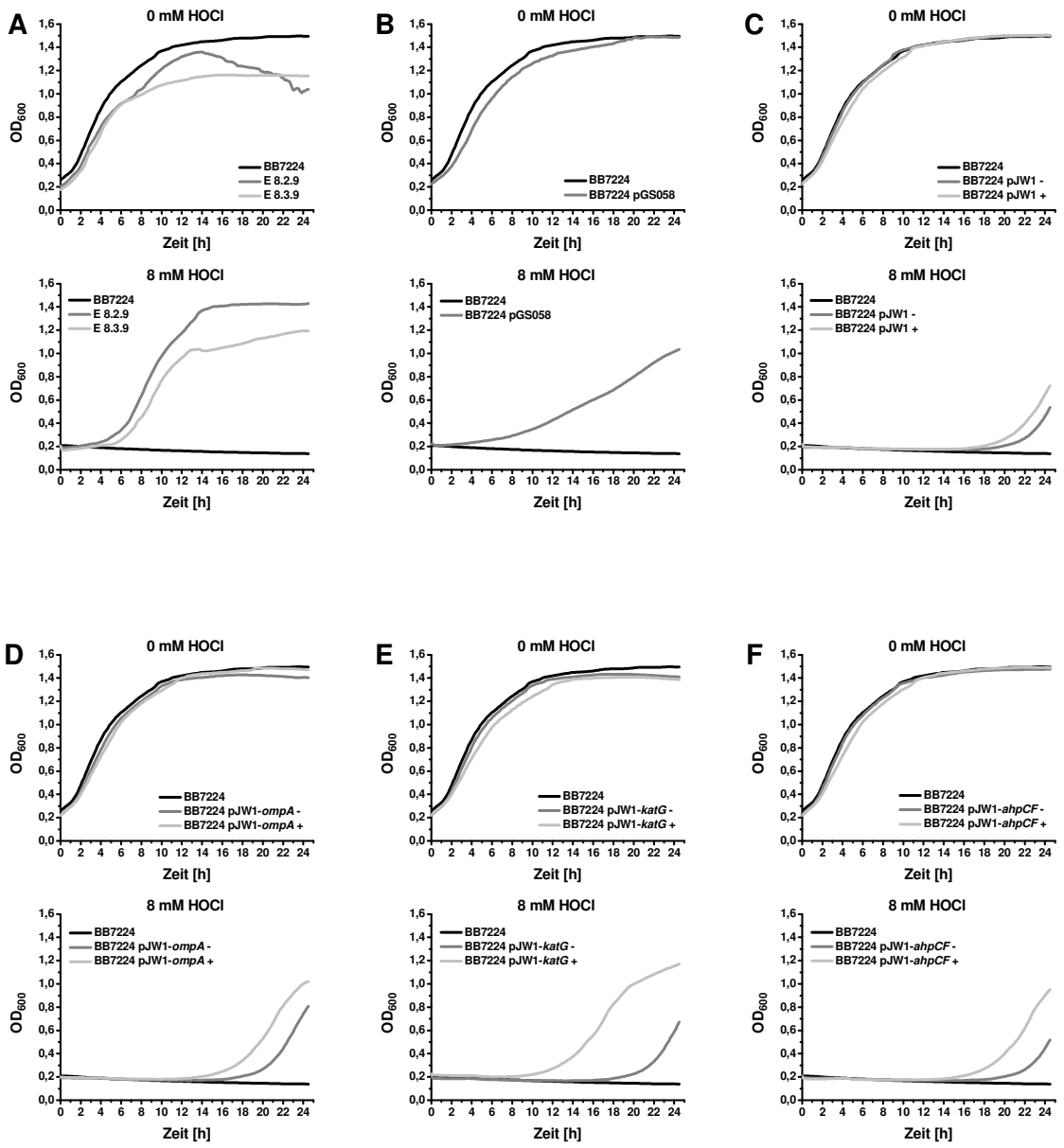


Abbildung 20: HOCl-Regenerierungs-Tests zur Analyse der HOCl-Resistenz von *ahpCF*-, *katG*-, *ompA*-Überexpressionsstämmen sowie eines *E. coli*-Stammes mit einem konstitutiv aktiven OxyR im Vergleich zu jener der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie deren Ursprungsstamms BB7224. Abgebildet ist das Wachstum der *E. coli*-Stämme BB7224, E 8.2.9, E 8.3.9, JG175 (BB7224 pGS058), JG179 (BB7224 pJW1), JG176 (BB7224 pJW1-*ompA*), JG177 (BB7224 pJW1-*katG*) und JG178 (BB7224 pJW1-*ahpCF*) ohne HOCl-Stress (je oben) sowie nach einem Stress mit 8 mM HOCl (je unten). Das Wachstum erfolgte bei 30°C und wurde durch Messungen der optischen Dichte (OD_{600}) alle 10 min mit Hilfe eines Mikrotiterplatteninkubators verfolgt. Die Überexpression des jeweiligen Plasmid-kodierten Gens in den Stämmen JG176, JG177 und JG178 erfolgte durch Induktion mit 0,1% L-Arabinose. Als Kontrolle diente der Stamm JG179 mit dem leeren Plasmid. Zur besseren Übersicht wurden die Wachstumskurven von je maximal zwei betrachteten Kulturen neben der Wachstumskurve des Kontrollstamms BB7224 dargestellt. Die Wachstumskurven der evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sind in A, die des Stammes JG175 in B gezeigt. Von den Stämmen JG179 (C), JG176 (D), JG177 (E) und JG178 (F) wurden die Wachstumskurven von Kulturen, die entweder nicht (-) oder mit (+) Arabinose versetzt wurden, jeweils gemeinsam neben der Wachstumskurve des Kontrollstammes BB7224 abgebildet.

Die Expression der Gene *ompA*, *katG*, *ahpCF* sowie von Genen des OxyR-Regulons in den *E. coli*-Stämmen BB7224, E 8.2.9, E 8.3.9, JG175, JG176, JG177, JG178 und JG179 wurde mit Hilfe eines SDS-Gels analysiert (Abb. 21). Dies diente vor allem der Kontrolle der Überexpression von *ompA*, *katG* bzw. *ahpCF* in den Stämmen JG176, JG177 bzw. JG178 nach erfolgter Induktion mit Arabinose. Auch die Mengen der Produkte von OxyR-regulierten Genen im Stamm JG175 sollte dabei überprüft werden. Es wurden daher Proben aus den entsprechenden Kulturen während der HOCl-Regenerierungs-Tests (Abb. 20) entnommen. Anhand des SDS-Gels (Abb. 21) wurde deutlich, dass nach Induktion mit Arabinose im Stamm JG176 tatsächlich erhöhte OmpA-Mengen, im Stamm JG177 erhöhte KatG-Mengen und im Stamm JG178 erhöhte AhpCF-Mengen im Vergleich zum jeweiligen Stamm ohne Induktion vorlagen. Dabei war die Protein-Menge des jeweils überexprimierten Gens in den Stämmen JG176, JG177 und JG178 höher als in den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9. Das Proteom des Kontrollstammes JG179 mit dem leeren pJW1-Plasmid erschien wie erwartet mit und ohne Induktion durch Arabinose identisch. Im Stamm JG175 mit dem Plasmid pGS058 lagen sowohl erhöhte KatG als auch AhpCF-Mengen vor. Die KatG-Menge war dabei etwas geringer als im Stamm JG177 nach Induktion mit Arabinose, aber höher als in den Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9. Die AhpCF-Mengen des Stamms JG175 waren nicht nur höher als in den Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9, sondern auch etwas höher als im Stamm JG178 nach erfolgter Induktion mit Arabinose.

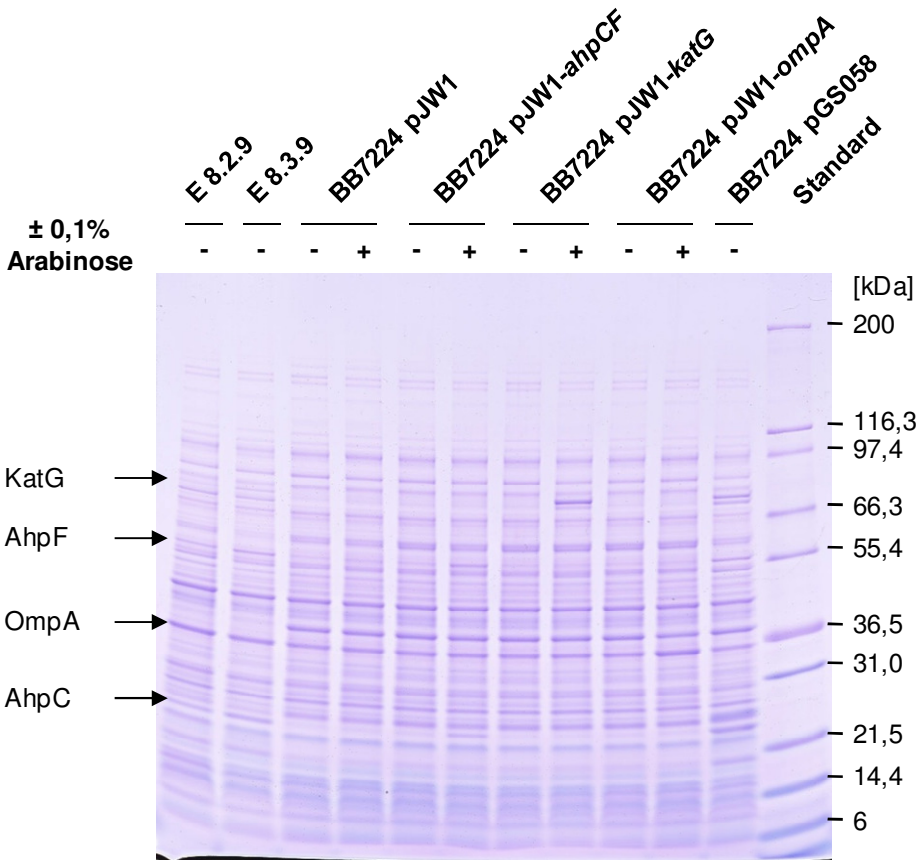


Abbildung 21: Kontrolle der OmpA-, KatG-, AhpC- und AhpF-Mengen in den *E. coli*-Stämmen E 8.2.9, E 8.3.9, JG175, JG176, JG177, JG178 und JG179. Aufgetrennt wurden Proben der evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Stammes JG175 (BB7224 pGS058), in welchem die OxyR-vermittelte Stressantwort permanent induziert ist, des *ompA*-Überexpressionsstammes JG176 (BB7224 pJW1-*ompA*), des *katG*-Überexpressionsstammes JG177 (BB7224 pJW1-*katG*), des *ahpCF*-Überexpressionsstammes JG178 (BB7224 pJW1-*ahpCF*) und des Kontrollstammes JG179 mit dem leeren pJW1-Plasmid (BB7224 pJW1). Die Induktion der Expression des jeweiligen Gens des pJW1-Plasmids erfolgte mit 0,1% L-Arabinose. Erfolgte eine Induktion mit Arabinose ist dies mit einem „+“ markiert, erfolgte keine Induktion ist dies mit einem „-“ markiert. Gekennzeichnet sind zudem die KatG- (80 kDa), AhpF- (56 kDa), OmpA- (37 kDa) und AhpC- (21 kDa) Banden. Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Demnach deuteten die Ergebnisse der HOCl-Regenerierungs-Tests der *E. coli*-Stämme BB7224, E 8.2.9, E 8.3.9, JG175, JG176, JG177, JG178 und JG179 darauf hin, dass eine separate Überexpression von *ahpCF* und *ompA* nur in sehr geringem Maße und die Überexpression von *katG* etwas stärker zur HOCl-Resistenz in *E. coli* beiträgt. Doch auch die HOCl-Resistenz des induzierten *katG*-Überexpressionsstamms JG177 war nicht so hoch wie jene der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9. Dass der Stamm JG175 mit der permanent induzierten OxyR-vermittelten Stressantwort, in welchem sowohl *katG* als auch *ahpCF* überexprimiert wurden, stärker gegen HOCl resistent war als die Stämme JG177 und JG178, in denen die betrachteten Gene separat überexprimiert wurden, könnte darauf hinweisen, dass eine kombinierte Überexpression dieser Gene zu einer stärkeren HOCl-Resistenz von *E. coli*-Zellen führt. Dies verstärkt die Annahme, dass

verschiedene Stressresistenzmechanismen für eine hohe HOCl-Resistenz in *E. coli* zusammenwirken müssen. Jedoch war auch der Stamm JG175 nicht so stark gegen HOCl resistent wie die HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse daher dafür, dass eine Überproduktion der Proteine OmpA, KatG, AhpC und AhpF nur zum Teil zur HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 beiträgt.

3.3.5 Analyse von Veränderungen in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen auf der Zellebene

Des Weiteren wurde die Zellmorphologie analysiert, um Veränderungen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 im Vergleich zu ihrem Ursprungs- und Kontrollstamm zu detektieren, Ursachen für die HOCl-Resistenz zu finden und die gegebenenfalls beteiligten Stressantworten zu identifizieren. Während *E. coli*-Zellen während des exponentiellen Wachstums eine stäbchenförmige Zellmorphologie aufweisen, sind sie in der stationären Phase klein und rund. Zellen mit erhöhten Mengen des Masterregulators der generellen Stressantwort, σ^S, sind stets eher klein und rund ((Lange & Hengge-Aronis, 1991a), (Hengge, 2011)). Eine Überlegung war daher, dass infolge einer Beteiligung einer konstitutiv aktiven generellen Stressantwort an der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 die σ^S-Menge in diesen Stämmen permanent erhöht ist und demnach die Zellen eine veränderte Morphologie aufweisen. Durch grundsätzlich erhöhte σ^S-Mengen und einer somit andauernd aktiven generellen Stressantwort könnten die *E. coli*-Zellen schneller auf verschiedene Stressbedingungen reagieren. Dies könnte die beobachtete erhöhte Resistenz der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gegen verschiedene Stressbedingungen (Abschnitt 3.3.2) erklären. Eine Analyse der Zellmorphologie mittels Lichtmikroskopie sollte daher insbesondere über eine Beteiligung einer konstitutiv aktiven generellen Stressantwort an der starken HOCl-Resistenz sowie den weiteren unterschiedlichen Stressresistenzen der *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 Aufschluss geben.

Zellen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224 wurden sowohl während des exponentiellen Wachstums als auch in der stationären Phase mit einem Lichtmikroskop betrachtet. Es zeigten sich dabei in keiner Wachstumsphase Unterschiede in der Zellmorphologie der Stämme (Abb. 22).

Dass eine konstitutiv aktive generelle Stressantwort bzw. permanente σ^S-Induktion einen wesentlichen Beitrag zur HOCl-Resistenz sowie zu weiteren Stressresistenzen der

evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 leistet, wurde daher als unwahrscheinlich angesehen.

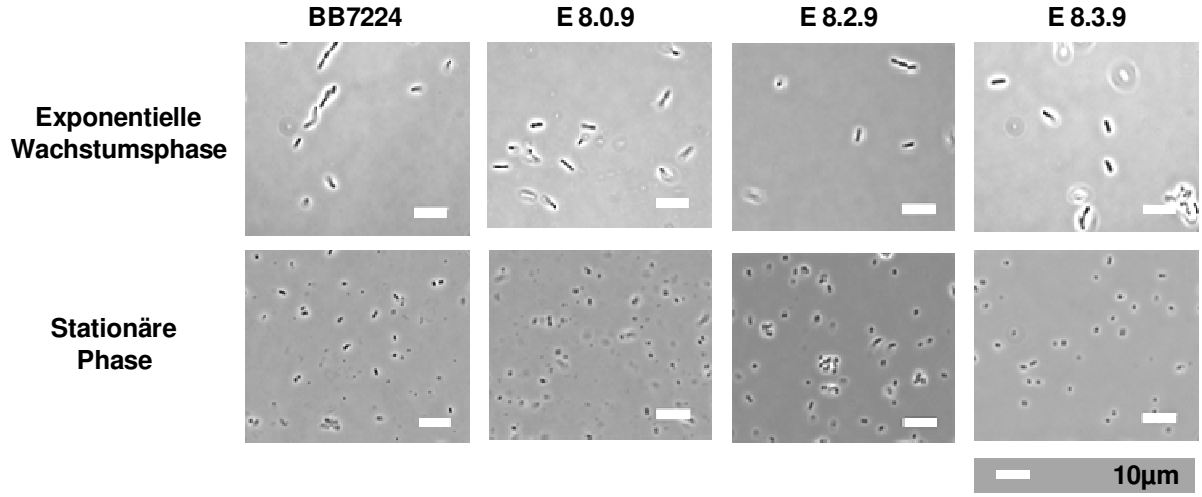


Abbildung 22: Analyse der Zellmorphologie der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, des Kontrollstammes E 8.0.9 sowie ihres Ursprungsstammes BB7224 mittels Lichtmikroskopie. Abgebildet sind Zellen aus Kulturen der betrachteten Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} von etwa 0,5; oben) und der stationären Phase (Übernachtkulturen; unten). Die Kultivierung der Stämme erfolgte in LB-Medium bei 30°C.

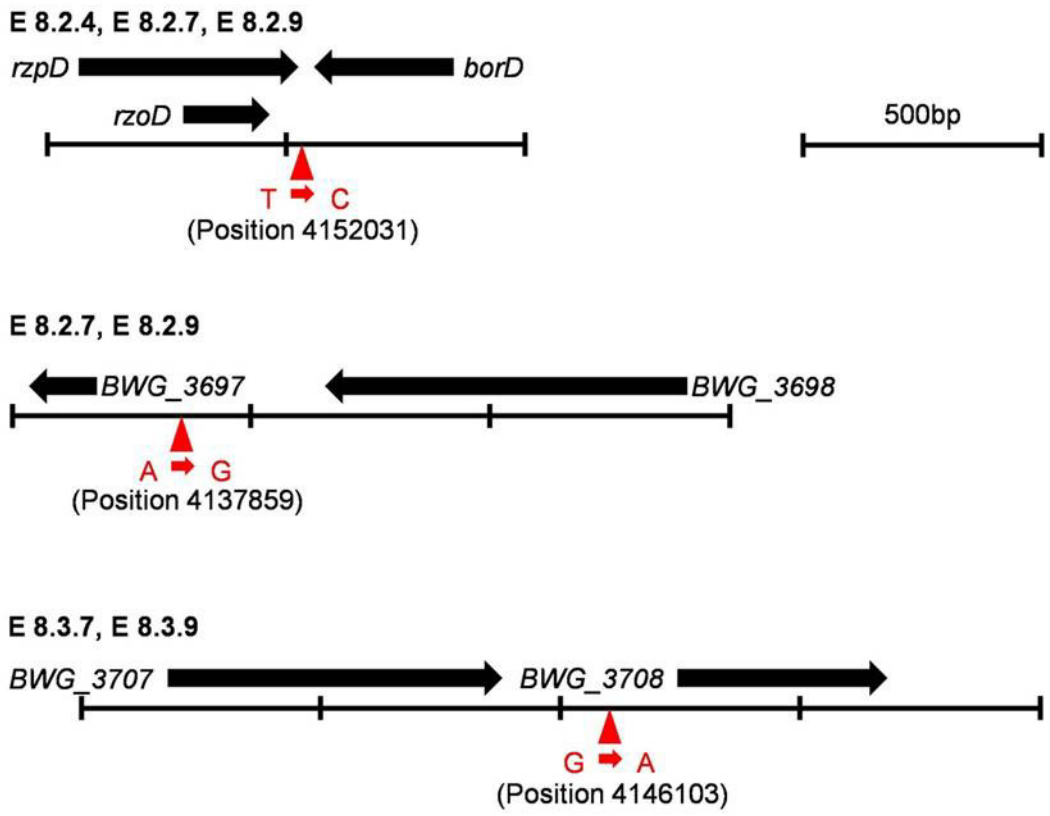
3.3.6 Sequenzierung der Genome der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme

Es stellte sich weiterhin die Frage nach den Ursachen für die beobachteten Phänotypen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 und dabei insbesondere für ihre starke HOCl-Resistenz. Zur Analyse von genetischen Ursachen wurden zunächst Genomsequenzierungen durchgeführt. Dies erfolgte analog zum Vorgehen zur Sequenzierung der Genome der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme (Abschnitt 3.1.3).

Um feststellen zu können, ob sich im Laufe des Evolutionsprozesses verschiedene Mutationen akkumuliert hatten, sollten die Genome von Stämmen analysiert werden, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Evolutionsprozesses entstanden waren. Sequenziert wurde daher die chromosomale DNA der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.2 und E 8.3.2, welche nach 6 Stresszyklen des Evolutionsprozesses erhalten wurden, E 8.2.4 und E 8.3.4, die nach 12 Stresszyklen erhalten wurden, E 8.2.7 und E 8.3.7, die nach 18 Stresszyklen erhalten wurden, sowie E 8.2.9 und E 8.3.9, die nach 24 Stresszyklen entstanden waren. Zum Vergleich wurde zum einen die chromosomale DNA des Ursprungsstamms der Stämme des Evolutionsprozesses BB7224, zum anderen jene des Stamms E 8.0.9, welcher parallel zum Evolutionsprozess für 24 Zyklen ohne HOCl-Stress kultiviert wurde, sequenziert. Die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) stellte von der genomischen DNA dieser zehn *E. coli*-Stämme genomische Standard-tagged paired-

end-Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem Illumina HiSeq 2000 her. Die zehn getaggten Bibliotheken wurden zu einer Probe gepoolt. Die Readlänge umfasste 50 Basen. Das Mapping der Sequenzen gegen die Sequenz des Referenzgenoms des *E. coli*-Stamms BW2952 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/238859724?report=fasta) wurde ebenfalls von GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Bei der BW2952-Genomsequenz handelte es sich um diejenige verfügbare Genomsequenz, welche jener des Stammes BB7224 am nähesten sein sollte. Die Genomsequenz des Stammes BB7224 selbst stand nicht als Referenz zur Verfügung. Erhalten wurde eine Tabelle mit allen SNPs und kleinen (bis zu 5 bp) Insertionen sowie Deletionen. Dieses Sequenzierungsprojekt wurde zeitgleich mit dem zweiten Genomsequenzierungsprojekt der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme durchgeführt. Wie in jenem Projekt erfolgte auch hier die Auswertung der Daten letztendlich mit derselben Software, welche für das erste Genomsequenzierungsprojekt der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme (Lasergene von DNASTAR) eingesetzt wurde, sowie mit den dort verwendeten Parametern. Aus diesem Grund konnten nur maximal 40% der Rohdaten für das Mapping verwendet werden. Es wurden demnach ca. $5 \cdot 10^6$ Readpaare je getaggter Bibliothek verwendet.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Genomsequenzierungen waren vor allem jene Mutationen von Interesse, welche ausschließlich in den maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie eventuell in ihren HOCl-resistenten Vorläuferstämmen, aber nicht im Ursprungsstamm BB7224 sowie dem Kontrollstamm E 8.0.9 auftraten. Nur bei diesen Mutationen wurde von einer potentiellen Relevanz für die Phänotypen der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 ausgegangen. Insgesamt wurden drei solche Mutationen identifiziert. Im einen Fall wurde im maximal HOCl-resistenten Stamm E 8.2.9 und seinen Vorläuferstämmen E 8.2.7 und E 8.2.4 an der Position 4152031 des BW2952-Referenzgenoms eine Punktmutation detektiert. Eine weitere Punktmutation wurde ausschließlich in den Stämmen E 8.2.9 und E 8.2.7 an der Position 4137859 des Referenzgenoms identifiziert. Im maximal HOCl-resistenten Stamm E 8.3.9 und seinem Vorläuferstamm E 8.3.7 wurde hingegen an der Position 4146103 des Referenzgenoms eine Punktmutation detektiert. In Abbildung 23 sind die drei Mutationen und die Regionen des BW2952-Referenzgenoms, in denen sie auftraten, näher beschrieben. Zudem sind dort die jeweils benachbarten Gene mit den von ihnen kodierten Proteinen aufgeführt.



Gen	kodiertes Protein
rzoD	DLP12-Prophage; vermutlich ein Lipoprotein
rzpD	DLP12-Prophage; vermutlich eine Murein-Endopeptidase
borD	DLP12-Prophage; vermutlich ein Lipoprotein
BWG_3697	Protein kil
BWG_3698	Aminoglykosid-Phosphotransferase
BWG_3707	Replikationsprotein P
BWG_3708	Protein ninB

Abbildung 23: Mittels Genomsequenzierung detektierte Mutationen mit potentieller Relevanz für die HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme. Aufgeführt sind Mutationen, die bei den Genomsequenzierungen ausschließlich in den maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie eventuell in HOCl-resistenten Vorläuferstämmen, aber nicht im Kontrollstamm E 8.0.9 sowie dem Ursprungsstamm BB7224 detektiert wurden. Schematisch dargestellt ist die jeweilige Region des Referenzgenoms des *E. coli*-Stammes BW2952, in welcher die Mutation auftrat (oben). Gekennzeichnet ist dabei in welchen Stämmen die Mutation detektiert wurde und was für ein Basenaustausch an welcher Position des Referenzgenoms erfolgte. In der Tabelle sind die Gene der betroffenen Regionen mit dem jeweils kodierten Protein aufgeführt (unten). Die Proteinbezeichnungen wurden von NCBI und UniProt übernommen.

Bei der Etablierung der Methode der Genomsequenzierung zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli* anhand von Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen hatte sich gezeigt, dass diese Methode bislang mit Vorsicht eingesetzt werden sollte (Abschnitte 3.1.3 und 3.1.4). Die Ergebnisse der Genomsequenzierungen sollten daher unbedingt durch weitere Experimente überprüft werden. Hierfür hatte sich insbesondere die Sequenzierung der chromosomalen DNA mit spezifischen Primern als geeignete Kontrollmethode herausgestellt. Mit dieser Methode wurden daher einige Ergebnisse der Genomsequenzierungen der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme kontrolliert.

Zuerst wurden die drei Mutationen betrachtet, welche mittels Genomsequenzierungen in den maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 und einigen HOCl-resistenten Vorläuferstämmen detektiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die chromosomale DNA der evolvierten, maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie jene ihres Ursprungsstamms BB7224 mit Primern, die jeweils spezifisch in den Regionen der Mutationen annealten, von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass die drei mittels Genomsequenzierungen detektierten Mutationen in allen drei betrachteten *E. coli*-Stämmen auftraten. Daher handelte es sich offenbar um generelle Unterschiede in der Genomsequenz der *E. coli*-Stämme BB7224 und BW2952. Demzufolge spielen sie sehr wahrscheinlich keine Rolle bei der HOCl-Resistenz in *E. coli*.

Insbesondere für die beobachteten Genexpressions- sowie die zahlreichen Proteomunterschiede in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm BB7224 wurden zunächst genetische Ursachen angenommen. Die Genomsequenzierungen hatten jedoch letztendlich keine einzige Mutation detektiert, die ausschließlich in den Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 und eventuell zusätzlich in deren HOCl-resistenten Vorläuferstämmen vorlag. Aus diesem Grund wurde die chromosomale DNA der evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie jene ihres Ursprungsstamms BB7224 mit spezifischen Primern, die in den Regionen der Gene *ompA*, *katG*, *ahpCF*, *recA*, *soxS*, *degP*, *otsB*, *gadB*, *fur*, *fecR*, *fecD* und *groEL* annealten, von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Es handelte sich hierbei um Gene, für welche aufgrund von Ergebnissen von Genexpressions- und Proteomanalysen eine veränderte Expression in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen im Vergleich zu ihrem Ursprungsstamm angenommen wurde. Die Auswertungen ergaben, dass sich die betrachteten Regionen der Genome der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 nicht von jenen ihres Ursprungsstamms BB7224 sowie des Referenzstamms BW2952 unterschieden. Exemplarisch wurden für die Gene *katG* und *ahpCF* zusätzlich Kontroll-PCRs durchgeführt. Dabei wurden die Gene jeweils mittels PCR aus der genomischen DNA der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sowie dem

Kontrollstamm E 8.0.9 und dem Ursprungsstamm BB7224 amplifiziert. Die Feststellung, ob die PCR-Reaktionen erfolgreich durchgeführt werden konnten sowie, ob das PCR-Produkt die erwartete Größe aufwies, sollte dabei einen Hinweis auf mögliche Insertionen oder DNA-Rearrangements in den kontrollierten Genombereichen liefern. Es stellte sich heraus, dass für alle vier betrachteten Stämme die PCR-Reaktionen erfolgreich durchgeführt werden konnten und die PCR-Produkte stets die erwartete Größe aufwiesen. So wurde zusätzlich bestätigt, dass offenbar keine Unterschiede in diesen Regionen vorlagen.

Insgesamt konnten demnach keine Hinweise auf genetische Ursachen für die beobachteten Phänotypen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 identifiziert werden.

Es stellte sich die Frage, ob inhomogene Glycerinkulturen ein Grund dafür waren, dass keine Mutationen in den evolvierten HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 detektiert werden konnten. Eine inhomogene Kultur könnte verschiedene Zellen enthalten, welche unterschiedliche Mutationen tragen. Bei der Sequenzierung der Genome einer solchen Mischkultur würden Reads der gleichen Genomregion mit verschiedenen Sequenzen auftreten. Aufgrund ihres statistisch seltenen Auftretens würden diese Reads von der Auswertungs-Software als Fehler detektiert und nicht als real angenommen. Demzufolge würden die Mutationen solcher Reads nicht in der Ergebnisliste aufgeführt. Um dies auszuschließen, wurde die Homogenität der Zellen der Glycerinkulturen der Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 analysiert. Hierfür wurden die Stämme E 8.2.9, E 8.3.9 und BB7224 zunächst auf LB_{Kan50}-Platten ausgestrichen. Mit jeweils einer Einzelkolonie des Stamms E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 wurden daraufhin je zehn Übernachtkulturen („E 8.2.9 1 - 10“ und „E 8.3.9 1 - 10“) angeimpft. Als Kontrollen wurden zudem Übernachtkulturen mit Zellen der Glycerinkulturen der Stämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sowie eine Übernachtkultur mit einer Einzelkolonie von deren Ursprungsstamm BB7224 angeimpft. Aus den Übernachtkulturen wurden Proben für Proteomanalysen mittels SDS-PAGE entnommen und parallel dazu Tagkulturen angeimpft. Während des exponentiellen Wachstums der Zellen dieser Tagkulturen wurden Proben für Vereinzelungsausstriche sowie für HOCl-Regenerierungs-Tests entnommen.

Vereinzelungsausstriche zur Homogenitätskontrolle der Glycerinkulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sind in Abbildung 24 gezeigt. Für die Ausstriche wurden je 5 µl exponentiell wachsende Zellen der jeweiligen Kultur auf eine LB_{Kan50}-Platte pipettiert und ein Vereinzelungsausstrich angefertigt. Nach der Inkubation der Platten bei 30°C über Nacht erschienen die Ausstriche der Glycerinkulturen E 8.2.9 und E 8.3.9 homogen (Abb. 24). Zudem waren sie den Ausstrichen der Kulturen der jeweiligen zehn E 8.2.9- bzw. E 8.3.9-Einzelkolonien ähnlich. Auch die Ausstriche des Stamms BB7224 zeigten eine ähnliche Koloniemorphologie und homogenes Wachstum.

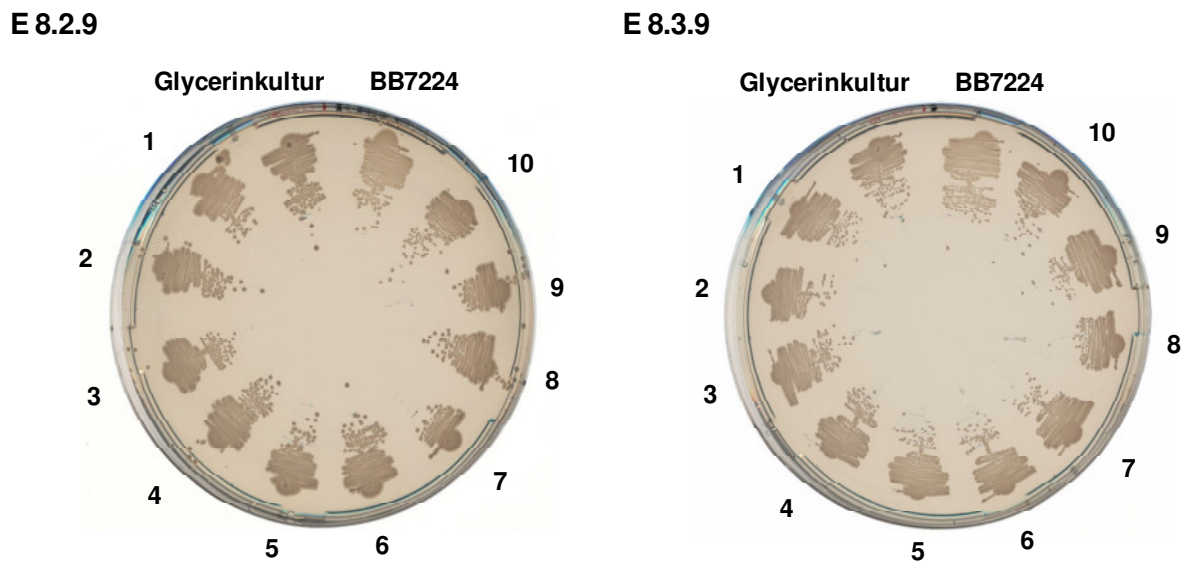


Abbildung 24: Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels Vereinzelungsausstrichen. Abgebildet sind LB_{Kan50}-Platten mit Vereinzelungsausstrichen von Kulturen von Zellen der Glycerinkulturen der Stämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9, jeweils zehn Einzelkolonien dieser beiden Stämme (je mit 1 - 10 gekennzeichnet) oder einer Einzelkolonie des Stammes BB7224. Für die Ausstriche wurden je 5 µl exponentiell wachsende Zellen der entsprechenden Kultur auf eine LB_{Kan50}-Platte pipettiert und ausgestrichen. Sowohl die Kultivierung der Kulturen als auch der LB_{Kan50}-Platten erfolgte bei 30 °C.

Die Ergebnisse der HOCl-Regenerierungs-Tests zur Homogenitätskontrolle der Glycerinkulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sind in Abbildung 25 veranschaulicht. Sie zeigten, dass sowohl die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 als auch die Zellen der Kulturen der jeweils zehn E 8.2.9- bzw. E 8.3.9-Einzelkolonien resistenter gegen HOCl waren als der Stamm BB7224. Es ist anzumerken, dass alle betrachteten Kulturen in den HOCl-Regenerierungs-Tests unter Bedingungen ohne HOCl-Stress ohne eine lag-Phase und einander sehr ähnlich weiter wuchsen. Sämtliche E 8.2.9-Kulturen wuchsen nach einem HOCl-Stress mit 8 mM, 9 mM oder 9,5 mM HOCl nach einer jeweils vergleichbar langen lag-Phase weiter (Abb. 25 A). Sie waren demnach ähnlich resistent gegen HOCl. Dasselbe galt für sämtliche E 8.3.9-Kulturen (Abb. 25 B). Die HOCl-Regenerierungs-Tests mit den E 8.2.9-Kulturen wurden getrennt von jenen mit den E 8.3.9-Kulturen durchgeführt. Die Dauer der lag-Phasen der E 8.2.9- und E 8.3.9-Kulturen konnte daher nur bedingt verglichen werden. Dies war insbesondere an den unterschiedlich langen lag-Phasen des BB7224-Stamms nach dem Stress mit 8 mM HOCl in den verschiedenen HOCl-Regenerierungs-Tests zu erkennen (Abb. 25 A, B).

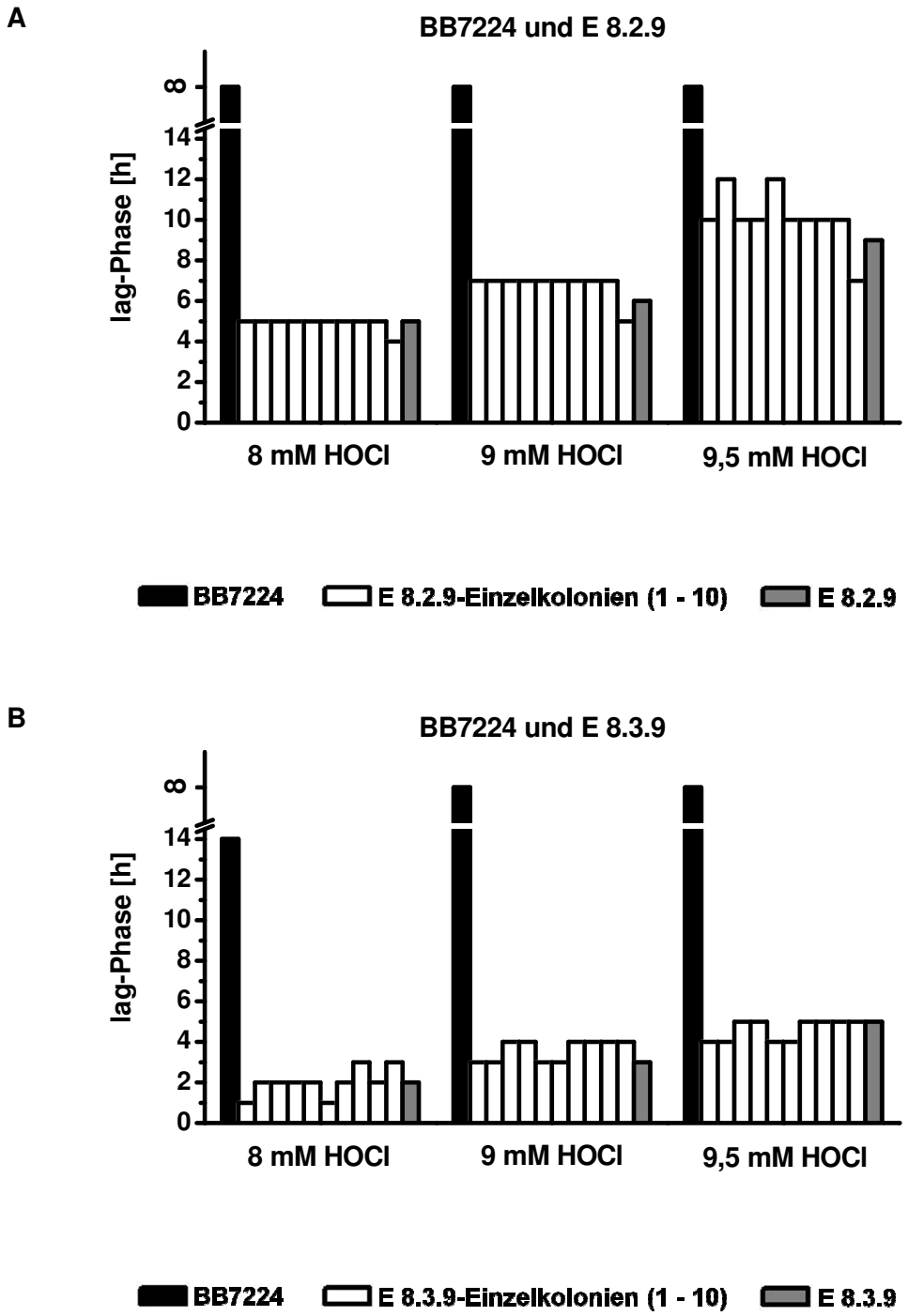


Abbildung 25: Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels HOCl-Regenerierungs-Tests. Mit Hilfe der HOCl-Regenerierungs-Tests wurde zum einen die HOCl-Resistenz von Zellen der Glycerinkultur des Stammes E 8.2.9 (grau) mit jener von zehn Kulturen, welche mit je einer E 8.2.9-Einzelkolonie angeimpft wurden (weiß; 1 - 10 von links nach rechts), verglichen (A). Zum anderen wurde die HOCl-Resistenz von Zellen der Glycerinkultur des Stammes E 8.3.9 (grau) mit jener von zehn Kulturen, von denen jede mit je einer E 8.3.9-Einzelkolonie angeimpft wurde (weiß; 1 - 10 von links nach rechts), verglichen (B). Als Kontrolle diente der Ursprungsstamm der evolvierten HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9, BB7224 (schwarz). Aufgeführt ist die Dauer der jeweiligen lag-Phasen nach einem Stress mit 8 mM, 9 mM oder 9,5 mM HOCl. Wuchsen die Zellen einer Kultur nach dem HOCl-Stress nicht weiter, wurde dies mit „∞“ markiert. Es ist anzumerken, dass bei Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress alle betrachteten Stämme ohne lag-Phase weiter wuchsen. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C.

SDS-Gele zur Homogenitätskontrolle der Glycerinkulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sind in Abbildung 26 gezeigt. Alle betrachteten E 8.2.9- und E 8.3.9-Proteome wiesen hier grundsätzlich ähnliche Bandenmuster und im Vergleich zum Proteom des Stamms BB7224 verringerte GroEL- und OmpF-Mengen sowie erhöhte KatG-, DnaK-, AhpCF- und OmpA-Mengen auf. Dies entsprach den Beobachtungen aus vorhergehenden Experimenten (Abb. 13, 16 und 17). Das Ausmaß der Unterschiede war bei den betrachteten Proteomen der Homogenitätskontrollen zum einen bei den E 8.2.9-Stämmen im Vergleich zu den E 8.3.9-Stämmen, zum anderen auch zwischen den einzelnen E 8.2.9- bzw. E 8.3.9-Kulturen untereinander teilweise verschieden ausgeprägt (Abb. 26).

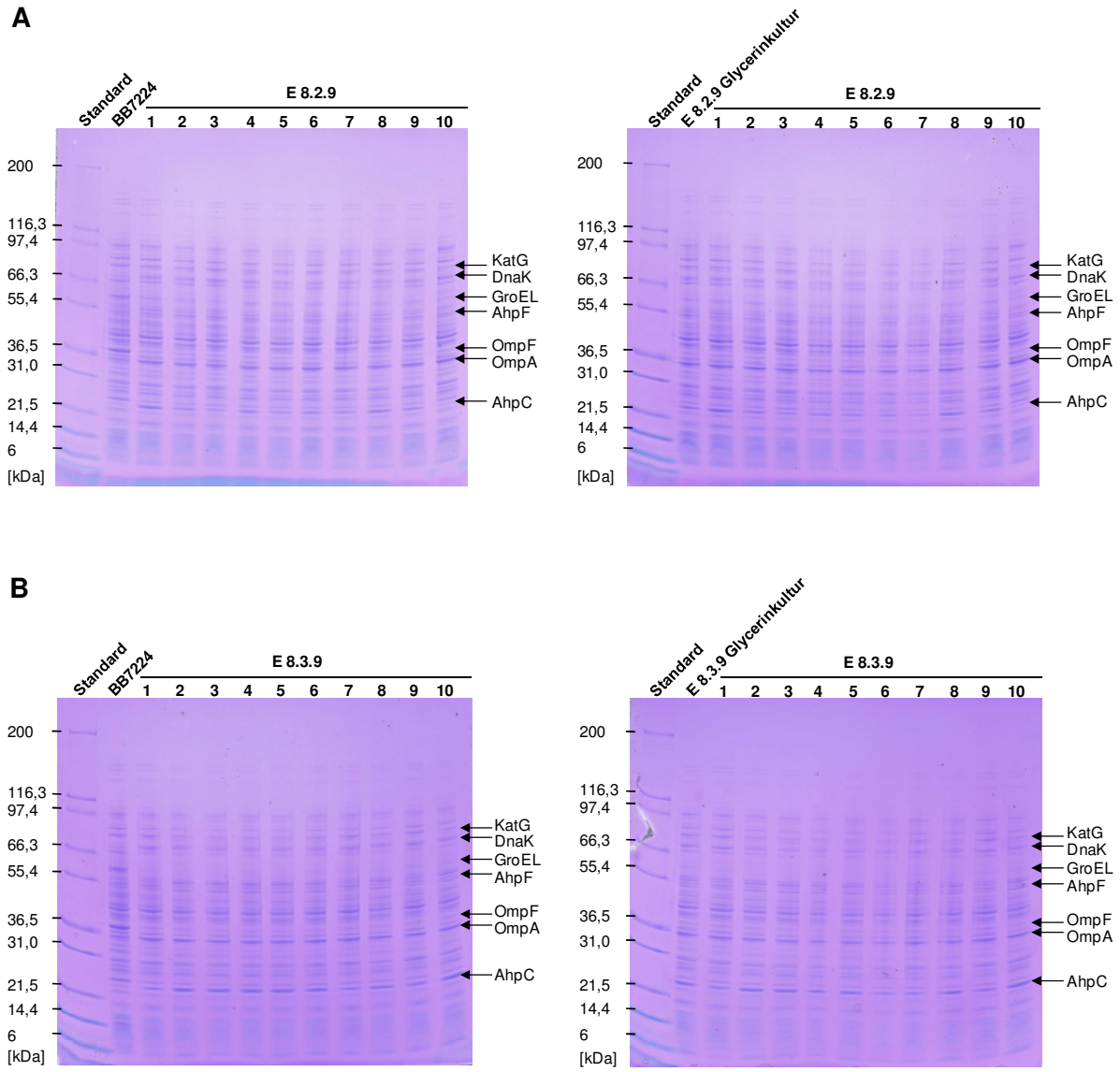


Abbildung 26: Proteomanalysen zur Homogenitätskontrolle der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 mittels SDS-PAGE. Aufgetrennt wurden Proben aus Übernachtkulturen, die mit Zellen der Glycerinkultur des Stammes E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 oder mit einer Einzelkolonie des Stammes E 8.2.9 (1 - 10), E 8.3.9 (1 - 10) oder BB7224 angeimpft wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C. Jeweils dieselben Proben der Kulturen der E 8.2.9- bzw. E 8.3.9-Einzelkolonien wurden einmal neben der Probe des Stamms BB7224 (links) und einmal neben der Probe des Stammes E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 (rechts) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die SDS-Gele zur Homogenitätskontrolle der E 8.2.9-Glycerinkultur sind in A, jene zur Kontrolle der E 8.3.9-Glycerinkultur in B abgebildet. Die Banden der Proteine KatG (80 kDa), DnaK (69 kDa), GroEL (57 kDa), AhpF (56 kDa), OmpF (39 kDa), OmpA (37 kDa) und AhpC (21 kDa) sind markiert. Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Insbesondere die Ergebnisse der Vereinzelungsausstriche (Abb. 24) sowie der HOCl-Regenerierungs-Tests (Abb. 25) zur Homogenitätskontrolle der Glycerinkulturen der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 führten zu der Annahme, dass die Glycerinkulturen dieser beiden Stämme tatsächlich eher homogen waren. Dies wurde auch von der Tatsache unterstützt, dass die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sehr stabile Phänotypen aufwiesen, welche sich in sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen in den bislang durchgeführten Experimenten zeigten. Die leichten Schwankungen in den KatG-, DnaK-, GroEL-, AhpF-, OmpF-, OmpA- und AhpC-Mengen (Abb. 26) sind daher vermutlich auf experimentelle sowie natürliche Schwankungen innerhalb der Populationen zurückzuführen. Da die HOCl-Resistenz aller E 8.2.9- bzw. E 8.3.9-Kulturen bei den HOCl-Regenerierungs-Tests zur Homogenitätskontrolle je vergleichbar hoch war, wurden die Proteom-Schwankungen offenbar stets ausgeglichen. Dies unterstützt wiederum die Annahme, dass verschiedene Resistenzmechanismen zusammenwirken müssen, damit *E. coli*-Zellen unter gewissen HOCl-Konzentrationen überleben können. Würde ein einziger, ultimativer Resistenzmechanismus gegen HOCl in *E. coli* existieren, hätte sich dieser sehr wahrscheinlich bei den bisherigen Analysen bereits herauskristallisiert, da er in allen HOCl-resistenten Zellen aufgetreten wäre. Selbst wenn die E 8.2.9- und E 8.3.9-Glycerinkulturen inhomogen wären, würde jede HOCl-resistente *E. coli*-Zelle dieser Kulturen diesen HOCl-Resistenzmechanismus aufweisen. Eine genetische Ursache eines solchen Resistenzmechanismus‘ hätte demnach auch in inhomogenen Kulturen im Zuge der Genomsequenzierungen detektiert werden können.
Trotzdem es demzufolge keine Hinweise auf genetische Ursachen der HOCl-Resistenz der evolvierten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 gab, sollte eine erneute Sequenzierung der Genome in Betracht gezogen werden. Dies sollte jedoch erst dann erfolgen, wenn das diesbezügliche Know-how bereits weiter entwickelt ist als bisher. Zudem sollte dabei eine andere Sequenzierungsmethode bzw. eine andere Art der Bibliothek und Auswertung herangezogen werden, um auch Reorganisationen größerer Bereiche des Chromosoms oder das mehrmalige Vorliegen bestimmter Regionen im Chromosom detektieren zu können. Am geeignetesten wäre daher eine *de novo*-Sequenzierung der Genome.

3.3.7 Dauerhafte Kultivierung der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme ohne HOCl

Um weitere Hinweise auf die Ursachen der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 zu erhalten, wurden die beiden Stämme einer dauerhaften Kultivierung ohne HOCl unterzogen. Dies sollte insbesondere der Feststellung dienen, ob und gegebenenfalls wie schnell die beiden Stämme ihre im Laufe des

Evolutionsprozesses erworbene HOCl-Resistenz wieder verlieren. Anhand dessen sollte eingeschätzt werden, wie stabil die Determinanten der HOCl-Resistenz in den HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9 bestehen bleiben und, ob eventuell schnell reversible, epigenetische Ereignisse zur ihrer HOCl-Resistenz führten.

Die Durchführung der dauerhaften Kultivierung der HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme ohne HOCl wurde im Abschnitt 2.2.13 beschrieben. Es wurden hierbei insgesamt 24 Überimpfungszyklen durchgeführt und letztendlich aus den Stämmen E 8.0.9, E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 die Stämme E 8.0.9 R7, E 8.2.9 R7 bzw. E 8.3.9 R7 erhalten. Die Anzahl der Überimpfungszyklen entsprach jener der Stresszyklen des Evolutionsprozesses, innerhalb welcher die maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 entstanden waren. Während des Evolutionsprozesses wurden die zu evolvierenden Zellen in nahezu jedem Zyklus einem HOCl-Stress ausgesetzt und wuchsen danach häufig zunächst beeinträchtigt weiter. Nach der Inkubation über Nacht, welche sich im Evolutionsprozess an den HOCl-Stress anschloss, wiesen die Kulturen des Evolutionsprozesses daher häufig eine geringere optische Dichte auf, als Kulturen der dauerhaften Kultivierung ohne HOCl dies nach einem Überimpfungszyklus taten. Die Anzahl der Generationen in einer Kultur war demnach in einem Zyklus der dauerhaften Kultivierung ohne HOCl in der Regel höher als in einem Zyklus des Evolutionsprozesses. Dies sollte bei der Auswertung der Beobachtungen zur dauerhaften Kultivierung der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 ohne HOCl berücksichtigt werden.

Zur Analyse der dauerhaft ohne HOCl kultivierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme wurde deren HOCl-Resistenz mit Hilfe von HOCl-Regenerierungs-Tests überprüft. Ergebnisse von Vergleichen der HOCl-Resistenz der Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 mit jener ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sind in Abbildung 27 veranschaulicht. Gezeigt sind dort Wachstumskurven der betrachteten Stämme nachdem entweder kein Stress oder ein Stress mit 8 mM HOCl erfolgt war. Bei diesen HOCl-Regenerierungs-Tests dienten drei Stämme als Kontrollen. Zum einen war dies der Stamm E 8.0.9 R7, welcher für 24 Überimpfungszyklen ohne HOCl kultiviert wurde, sowie sein Ursprungsstamm E 8.0.9, einem Kontrollstamm des Evolutionsprozesses. Zum anderen diente der Ursprungsstamm aller Stämme des Evolutionsprozesses, BB7224, als Kontrolle. Alle drei Kontrollstämme wuchsen ohne HOCl nahezu identisch, während nach einem Stress mit 8 mM HOCl keiner von ihnen weiter wachsen konnte (Abb. 27 A). Das Wachstum der vier Stämme E 8.2.9, E 8.2.9 R7, E 8.3.9 und E 8.3.9 R7 erschien unter Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress etwas beeinträchtigt (Abb. 27 B, C). So wuchsen diese Stämme zwar zunächst ohne eine lag-Phase und mit vergleichbarer Wachstumsrate wie die Kontrollstämme, erreichten aber eine geringere maximale optische Dichte. Nach einem Stress mit 8 mM HOCl konnten die vier Stämme E 8.2.9, E 8.2.9 R7, E 8.3.9 und E 8.3.9 R7 im Gegensatz zu den drei

Kontrollstämmen weiter wachsen und waren demnach alle deutlich resistenter gegen HOCl (Abb. 27). Während die lag-Phasen der Stämme E 8.2.9, E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 nahezu identisch lang waren, war jene des Stamms E 8.3.9 R7 länger. Zudem erreichten die Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 eine höhere maximale optische Dichte als die Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7. Insgesamt schien demzufolge die HOCl-Resistenz der dauerhaft ohne HOCl kultivierten Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 etwas geringer zu sein als jene ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9. Dieser Unterschied war zwischen den Stämmen E 8.3.9 und E 8.3.9 R7 etwas deutlicher als zwischen den Stämmen E 8.2.9 und E 8.2.9 R7. Folglich kam es lediglich zu einem langsamen und geringen Verlust der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 im Laufe einer dauerhaften Kultivierung ohne HOCl.

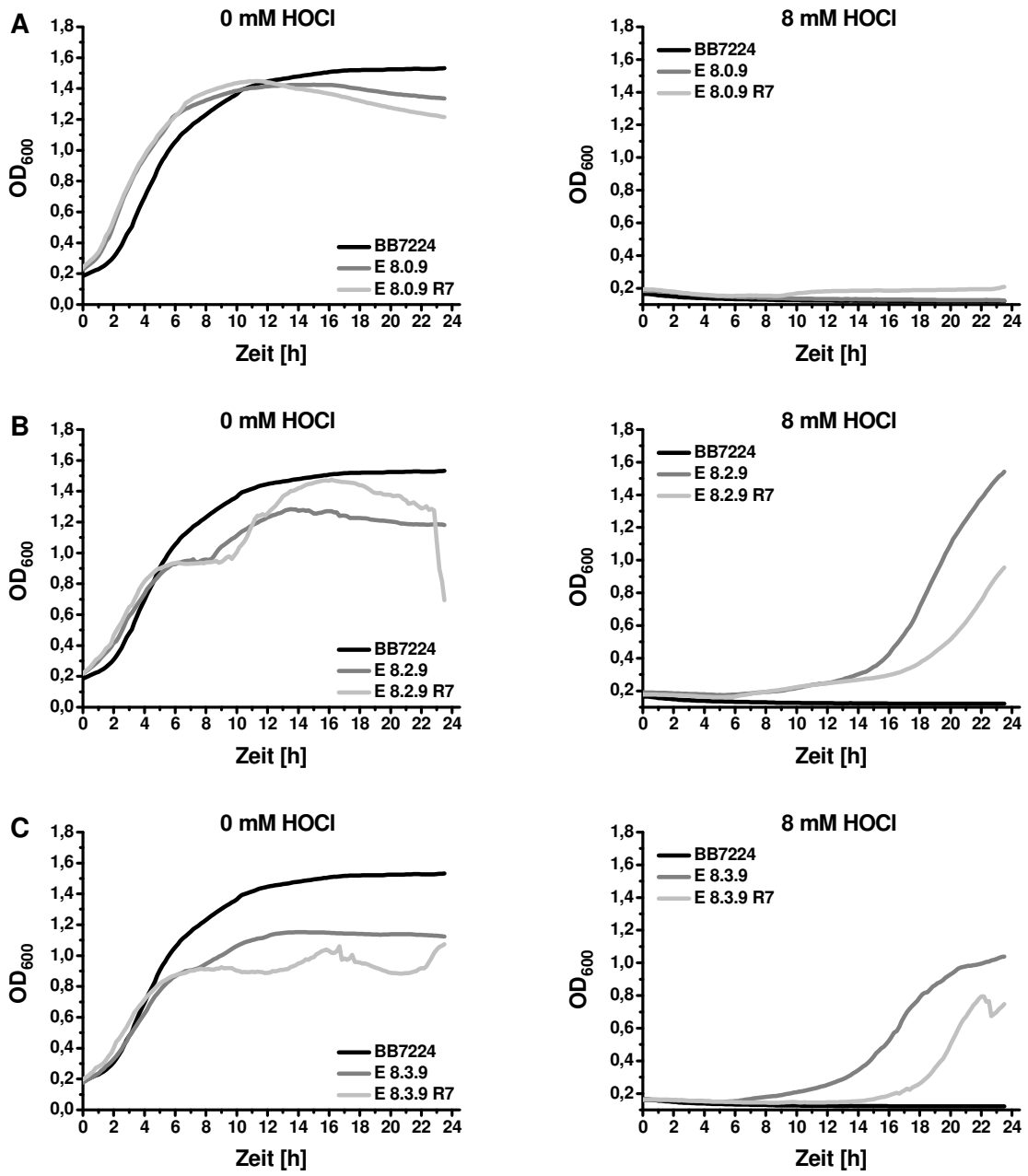


Abbildung 27: Vergleich der HOCl-Resistenz der dauerhaft ohne HOCl kultivierten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 mit jener ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9, E 8.0.9 R7 und BB7224 mittels HOCl-Regenerierungs-Tests. Die Stämme E 8.2.9 R7, E 8.3.9 R7 und E 8.0.9 R7 waren nach 24 Überimpfungszyklen bei der dauerhaften Kultivierung ohne HOCl aus den evolvierten HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 bzw. aus deren Kontrollstamm E 8.0.9 entstanden. Beim Stamm BB7224 handelte es sich um den Ursprungsstamm der Stämme E 8.0.9 (A), E 8.2.9 (B) und E 8.3.9 (C). Abgebildet sind die Wachstumskurven der betrachteten Stämme bei 30°C unter Wachstumsbedingungen ohne HOCl-Stress (0 mM HOCl; links) oder nach einem Stress mit 8 mM HOCl (rechts). Das Wachstum wurde durch Messungen der optischen Dichte (OD_{600}) alle 10 min mit Hilfe eines Mikrotiterplatteninkubators verfolgt. Zur besseren Übersicht sind die Messwerte für die dauerhaft ohne HOCl kultivierten Stämme E 8.0.9 R7, E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 (hellgrau) jeweils separat neben denen ihres Ursprungsstamms E 8.0.9, E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 (dunkelgrau) und dessen Ursprungsstamms BB7224 (schwarz) abgebildet.

Des Weiteren wurden zur Analyse der dauerhaft ohne HOCl kultivierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme deren Proteome mittels SDS-PAGE betrachtet. Hierfür erfolgte parallel zum Animpfen der Tagkulturen des HOCl-Regenerierungs-Tests (Abb. 27) eine Probennahme aus den entsprechenden Übernachtkulturen der Stämme E 8.0.9, E 8.0.9 R7, E 8.2.9, E 8.2.9 R7, E 8.3.9, E 8.3.9 R7 und BB7224. Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteomen dieser Stämme ist in Abbildung 28 gezeigt. Dort erschienen die Bandenmuster der Kontrollstämme E 8.0.9 und E 8.0.9 R7 nahezu identisch. Im Vergleich zum Kontrollstamm BB7224 wiesen sie verringerte GroEL- und erhöhte DnaK-Mengen auf. Die Stämme E 8.2.9, E 8.2.9 R7, E 8.3.9 und E 8.3.9 R7 wiesen grundsätzlich ähnliche Bandenmuster und im Vergleich zum Proteom des Stamms BB7224 verringerte GroEL- und OmpF-Mengen sowie erhöhte KatG-, DnaK-, AhpCF- und OmpA-Mengen auf. Das Ausmaß der Unterschiede war in den Proteomen der E 8.2.9- und E 8.3.9-Stämme teilweise unterschiedlich ausgeprägt. Dies alles entsprach auch Beobachtungen aus vorhergehenden Experimenten (Abb. 13, 16, 17 und 26). Während die Proteome der Stämme E 8.2.9 und E 8.2.9 R7 sich kaum voneinander unterschieden, wies der Stamm E 8.3.9 R7 etwas geringere AhpCF-Mengen auf als sein Ursprungsstamm E 8.3.9 (Abb. 28). Die unterschiedlichen AhpCF-Mengen könnten eine Ursache für den beobachteten Unterschied in der HOCl-Resistenz der beiden Stämme E 8.3.9 und E 8.3.9 R7 sein (Abb. 27). Insgesamt waren aber die Proteome der dauerhaft ohne HOCl kultivierten Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 denen ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 eher ähnlich und sie unterschieden sich von denen der Kontrollstämme (Abb. 28).

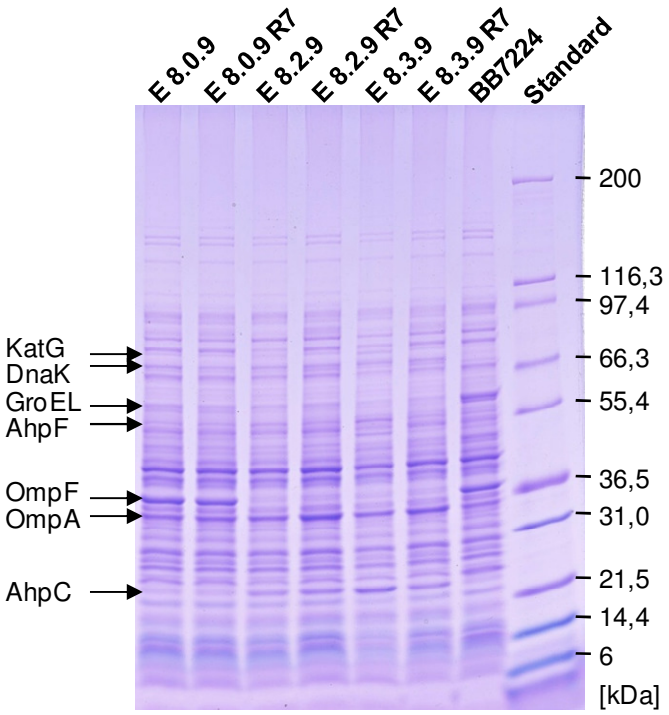


Abbildung 28: Vergleich der Proteome der dauerhaft ohne HOCl kultivierten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 mit jenen ihrer Ursprungsstämme E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 sowie der Kontrollstämme E 8.0.9, E 8.0.9 R7 und BB7224 mittels SDS-PAGE. Aufgetrennt wurden Proben aus Übernachtkulturen, die zum einen der Probennahme für Proteomanalysen, zum anderen zum Animpfen von Tagkulturen für HOCl-Regenerierungs-Tests dienten. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C. Es handelte sich um die Stämme E 8.2.9 R7, E 8.3.9 R7 und E 8.0.9 R7, die nach 24 Überimpfungszyklen bei der dauerhaften Kultivierung ohne HOCl aus den evolvierten HOCl-resistenten Stämmen E 8.2.9 bzw. E 8.3.9 bzw. aus deren Kontrollstamm E 8.0.9 entstanden waren. Als Kontrolle diente der Stamm BB7224, der Ursprungsstamm der Stämme E 8.0.9, E 8.2.9 und E 8.3.9. Die Banden der Proteine KatG (80 kDa), DnaK (69 kDa), GroEL (57 kDa), AhpF (56 kDa), OmpF (39 kDa), OmpA (37 kDa) und AhpC (21 kDa) sind markiert. Die Banden des Standards wurden mit dem jeweiligen Molekulargewicht beschriftet.

Die dauerhaft ohne HOCl kultivierten Stämme E 8.2.9 R7 und E 8.3.9 R7 unterschieden sich demzufolge nur geringfügig in ihrer HOCl-Resistenz sowie auf Proteomebene von ihren Ursprungsstämmen, den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen E 8.2.9 und E 8.3.9. Der Phänotyp der beiden HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 war demnach sehr stabil. Die Determinanten ihrer Phänotypen scheinen daher sehr stabil in den beiden Stämmen vorzuliegen. Während diese Determinanten nicht nur eine HOCl-Resistenz sondern auch weitere Stressresistenzen vermitteln, scheinen sie auch beim Wachstum ohne Stress für die *E. coli*-Zellen nicht von erheblichem Nachteil zu sein. Die Tatsache, dass die evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 eine sehr hohe HOCl-Resistenz und einen derart stabilen Phänotyp aufwiesen, macht sie für die Identifizierung von HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli* zu einem Werkzeug mit unglaublichem Potential. In weiterführenden Analysen dieser Stämme sollte neben der Durchführung erneuter Genomsequenzierungen nach epigenetischen Ursachen für ihren Phänotyp gesucht

werden. Eine DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit-Sequenzierung könnte hier beispielsweise weitere Informationen liefern. Aus diesem Grund wurde in einem weiterführenden Projekt bereits mit einer solchen Analyse in Zusammenarbeit mit der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) begonnen. Aufgrund von technischen Problemen erfolgte bislang jedoch keine Datenlieferung. Daher konnten aus diesen Untersuchungen noch keine Ergebnisse sowie deren Diskussion im Kontext der HOCl-Resistenz in *E. coli* in die vorliegende Arbeit einfließen.

4. Diskussion

4.1 Methoden zur Analyse und Charakterisierung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme

HOCl ist eine sehr reaktive, bakterizide ROS und dient nicht nur zur Abtötung von Bakterien in einem Wirt ((Ha *et al.*, 2005), (Klebanoff, 2005), (Winterbourn *et al.*, 2006)), sondern findet auch sehr weit verbreitet als Desinfektionsmittel Verwendung (Rutala & Weber, 1997). Obwohl Bakterien demnach häufig mit HOCl konfrontiert werden, ist über bakterielle Schutz- und Resistenzmechanismen bislang sehr wenig bekannt. Ein erweitertes Verständnis von bakteriellen Mechanismen zum Schutz vor und zur Resistenz gegen HOCl könnte Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von HOCl ermöglichen. Dies würde nicht nur dazu beitragen, zu verstehen, wie bakterielle Infektionen von einem Wirt bekämpft werden, sondern auch dabei helfen, neue Desinfektionsstrategien zu entwickeln. Um neue Erkenntnisse über bakterielle HOCl-Resistenzmechanismen zu erhalten, bietet es sich an, Bakterien zu analysieren, die eine Resistenz gegen HOCl aufweisen. Adäquate Methoden zur Analyse und Charakterisierung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Dies erfolgte überwiegend anhand von evolvierten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010).

Zuerst wurde eine Transposon-vermittelte Methode getestet. Hierbei sollten Resistenz-vermittelnde Gene mit Hilfe eines „EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp Transposome“-Kits identifiziert werden. Die Methode wurde anhand der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme optimiert, stellte sich jedoch als nur bedingt zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene geeignet heraus. Dies lag zum einen an der geringen Transformationseffizienz der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme, die auch nach umfangreichen Optimierungsversuchen nicht erhöht werden konnte, zum anderen an der sehr fehleranfälligen und aufwändigen Selektion auf Hitzesensitivität. Insbesondere weil sich eine Selektion auf HOCl-Sensitivität als nicht weniger fehleranfällig gestalten würde, wurde diese Methode nicht zur Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder Gene eingesetzt.

Als nächstes wurde als eine weitere Methode zur Analyse von genetischen Ursachen für eine Stressresistenz die Sequenzierung der genomischen DNA von Stress-resistenten *E. coli*-Stämmen im Vergleich zu deren Ausgangsstamm getestet. Die Sequenzierung der Genome der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme und deren Vorläuferzellen erfolgte dabei in zwei Sequenzierungsprojekten, die mit einigen Monaten Abstand durchgeführt wurden. Die mit den Sequenzierungen beauftragte Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) hatte in der Zeit zwischen den beiden Projekten neben Änderungen in der Datengewinnung vor allem die Auswertungs-Software gewechselt. Bei den zahlreichen Auswertungsversuchen der

Genomsequenzierungsdaten mit unterschiedlichen Auswertungs-Programmen und verschiedenen Parametern wurde deutlich, wie unterschiedlich die erhaltenen Ergebnisse sein können. Die Auswertung derselben Rohdaten kann demnach mit Hilfe verschiedener Auswertungs-Programme und angewandter Parameter zu völlig unterschiedlichen Schlussfolgerungen führen. Dies stellt ein aktuell unter Wissenschaftlern häufig diskutiertes Thema dar. So befasst sich beispielsweise ein Artikel von Monya Baker (Baker, 2011) ausführlich mit dieser Thematik. In jenem Artikel wird ausdrücklich betont, dass zahlreiche verschiedene Programme mit verschiedensten verstellbaren Parametern zur Auswertung von Genomsequenzierungsdaten existieren und diese fast immer zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund müssten für jedes Genomsequenzierungsprojekt verschiedene Programme und Parameter getestet werden, um die geeignetesten Analysebedingungen zur Beantwortung einer bestimmten biologischen Fragestellung zu ermitteln. Dies steht klar im Konflikt mit dem erforderlichen, hohen Zeit- und Geldaufwand. Zudem kann nie ausgeschlossen werden, dass Mutationen mit Hilfe eines Programms detektiert werden, die aber tatsächlich nicht im Genom vorhanden sind. Um wirklich sicher zu gehen, sollten die detektierten Mutationen mit anderen Methoden kontrolliert werden. Zu diesen Methoden gehören unter anderem PCR-Experimente sowie die zeit- und arbeitsintensive Sanger-Sequenzierung. Der Artikel von Baker erinnert des Weiteren daran, dass nicht nur genetische Determinanten einen Phänotyp bestimmen. Es sollte nicht nur die Genomsequenz, sondern zusätzlich die Genexpression, der Methylierungszustand sowie weitere Faktoren berücksichtigt und analysiert werden. Demzufolge sollte die Methode der Genomsequenzierung zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Gene in *E. coli* bislang mit Vorsicht eingesetzt werden und stets eine Überprüfung der Ergebnisse durch weitere Experimente erfolgen. Als für diesen Zweck geeignet stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem die Sequenzierung der chromosomalen DNA mit spezifischen Primern heraus.

Eine weitere Methode, die zur Analyse und Charakterisierung evolvierter Stress-resistenter *E. coli*-Stämme etabliert werden konnte, ist die dauerhafte Kultivierung dieser Stämme ohne den Stress, unter welchem sie evolviert wurden. Hierbei sollte festgestellt werden, ob und gegebenenfalls wie schnell eine evolvierte Stressresistenz wieder verloren geht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, wie stabil die genetischen Determinanten für die betrachtete Stressresistenz im Genom eines Stress-resistenten *E. coli*-Stamms bestehen bleiben und, ob es sich um schnell reversible epigenetische Ereignisse handelt, die zur Stressresistenz führten. Anhand der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme zeigte sich, dass diese Methode sehr interessante Erkenntnisse liefern kann. Zu deren Bestätigung müssen jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden. Beispielsweise sollte direkt nach epigenetischen

Veränderungen gesucht werden, wofür sich unter anderem die DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit-Sequenzierung anbietet.
Das Vorgehen zur Verfolgung der Expression eines Gens mit Hilfe einer *lacZ*-Reportergenfusion in Anwesenheit von HOCl wurde mit einem ausgewählten Gen etabliert. So wurde exemplarisch eine translationale Fusion der putativen *yjiE*-Promotorregion mit *lacZ* hergestellt und analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse trugen zu der Annahme bei, dass die *yjiE*-Transkription unter HOCl-Stress nicht verändert wird und YjiE, im Gegensatz zu anderen LTTRs, nicht seine eigene Expression hoch reguliert (Gebendorfer *et al.*, 2012). Mit der Verfolgung der Expression eines ausgewählten Gens mittels *lacZ*-Reportergenfusion konnte demzufolge eine wertvolle Methode zur Analyse der Rolle eines Gens unter HOCl-Stress etabliert werden.
Zur Überprüfung der HOCl-Resistenz von *E. coli*-Stämmen wurden HOCl-Regenerierungs-Tests („*recovery*"-Analysen) entwickelt. Die HOCl-Regenerierungs-Tests eignen sich hervorragend für die gleichzeitige Überprüfung der HOCl-Resistenz mehrerer *E. coli*-Stämme gegen verschiedene HOCl-Konzentrationen, da parallel 96 unterschiedliche Ansätze betrachtet werden können.
Demnach wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden zur Analyse und Charakterisierung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen etabliert.

4.2 Neue Erkenntnisse zu Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen

Die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme stammen aus der Arbeit von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010), welche sich mit der evolutionären Anpassung von Bakterien an Hitze befasst. Es handelt sich um MG1655-Zellen, die entweder kontinuierlich bei 37°C (BM3) oder bei sukzessiv höheren Temperaturen, wie 42°C (BM15), 45°C (BM16), 48°C (BM25) und 48,5°C (BM28), kultiviert wurden. Aus jener Studie ist bereits bekannt, dass vor allem die GroEL/S-Mengen der Hitze-resistenten Stämme im Zuge ihrer evolutiven Anpassung an hohe Temperaturen angestiegen waren (Abb. 2). Die Ursache hierfür ist jedoch noch ungeklärt.
Unter den Glycerinkulturen der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene BM28-Glycerinkulturen identifiziert. Bei einer der beiden Glycerinkulturen handelte es sich um den BM28-Stamm aus der Arbeit von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010). Dieser Stamm war Hitze-resistent, wies stark erhöhte GroEL/S-Mengen auf und wurde hier als Stamm $BM28^{GroEL+}$ bezeichnet. Der andere BM28-Stamm entstand spontan, ohne weitere Selektion, war ebenfalls Hitze-resistent (Abb. 4), wies jedoch keine erhöhten GroEL/S-Mengen auf

(Abb. 3) und wurde daher in dieser Arbeit als BM28^{GroEL-} bezeichnet. Dass die Genome von gelagerten *E. coli*-Stämmen Veränderungen akkumulieren können ist bereits aus anderen Studien bekannt, wobei insbesondere DNA-Rearrangements und Insertionselemente als wesentliche Ursachen für die beobachteten genetischen Unterschiede identifiziert wurden (Naas *et al.*, 1995).

Mit Hilfe des „EZ-Tn5 <DHFR-1>Tnp Transposome"-Kits wurden die Gene *hcr*, *yjcC*, *aroB*, *nrdD* und *tolA* als potentiell Hitze-Resistenz-vermittelnde Gene in *E. coli* identifiziert (Tab. 14). Von keinem dieser Gene ist bisher eine Rolle bei der Hitzeresistenz von *E. coli* bekannt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Insertionen in diesen Genen einen indirekten Einfluss auf die Hitzeresistenz ausüben. Dies sollte in weiterführenden Analysen unter anderem mit Stämmen überprüft werden, welche die betroffenen Gene nicht exprimieren.

Bei der Sequenzierung der Genome der *E. coli*-Stämme BM3, BM15, BM16, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} und der sich anschließenden Kontrolle einiger Genomsequenzierungsergebnisse wurde unter anderem in den Genen *ynjI* und *infB* sowie in der *mcrB*-Promotorregion der Hitze-resistenten Stämme BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} eine Insertion identifiziert (Tab. 16). Diese Insertion wies die Sequenz einer Region des *E. coli*-Stamms DH10B auf, welche in jenem Stamm mehrfach auftritt und ein mobiles genetisches Element sein könnte (Sequenz siehe Anhang). In den maximal Hitze-resistenten Stämmen BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} trat diese Insertion zusätzlich im Gen *yhjY* auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Gene *ynjI*, *infB* und *mcrB* bzw. die DH10B-Insertion in diesen Genen bei der Hitzeresistenz in *E. coli* eine Rolle spielen. Das Gen *yhjY* bzw. dessen DH10B-Insertion könnte für die maximale Hitzeresistenz von Bedeutung sein. Dass die besagte DH10B-Insertion in einem MG1655-Stamm vorliegt, ist meinem Kenntnisstand nach bislang unbekannt. Da der horizontale Gentransfer als bedeutende treibende Kraft in der Evolution von Prokaryonten anzusehen ist (Treangen & Rocha, 2011) und bereits Fälle beschrieben wurden, in denen unerwartete Insertionen infolge einer zunächst unberücksichtigten Selektion durch Kultivierungs- und Lagerungsbedingungen plötzlich in Laborstämmen von *E. coli* auftraten (Ferenci *et al.*, 2009), scheint es wahrscheinlich, dass die Stämme von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) die DH10B-Insertion während des Evolutionsprozesses akquirierten. Neben einer Betrachtung der Expression der betroffenen Gene in den *E. coli*-Stämmen BM3, BM15, BM16, BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} und der Analyse von entsprechenden Deletionsstämmen, sollte daher in weiterführenden Untersuchungen insbesondere die hier identifizierte DH10B-Insertion näher betrachtet werden. Hierbei könnte beispielsweise eine Überprüfung des Vorkommens sowie der Kopienanzahl dieser DH10B-Insertion in unterschiedlich Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen Aufschluss über ihre Rolle bei der Hitze-Resistenz in *E. coli* geben. Eine Methode zur Detektion von Insertionen anhand von Genomsequenzierungsdaten wurde beispielsweise

von Smith (Smith, 2011) beschrieben. Dort werden die Sequenzen kurzer Reads sowohl mit der Sequenz eines Referenzgenoms als auch mit einer individuell zu erstellenden Referenzdatei alignt, welche die Sequenzen der zu analysierenden Insertionselemente enthält. Auf diese Weise können Insertionen detektiert und ihre Position bestimmt werden.
Des Weiteren wurde festgestellt, dass zwischen den Genen *groEL* und *yjeI* in den Stämmen BM25 und BM28^{GroEL+} ein Bereich mit einer mutierten, bislang nicht eindeutig aufgeklärten Sequenz vorliegt. Interessanterweise wiesen von allen betrachteten Genomen ausschließlich die beiden Stämme, welche über deutlich erhöhte GroEL/S-Mengen verfügen (Abb. 3), diese veränderte Region auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass die mutierte Region zwischen den Genen *groEL* und *yjeI* für die hohen GroEL/S-Mengen in den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM25 und BM28^{GroEL+} verantwortlich ist. Für die eindeutige Aufklärung dieser Sequenz wäre wahrscheinlich eine *de novo*-Sequenzierung der BM25- und BM28^{GroEL+}-Genome am geeignetesten.
Insgesamt liefern die Beobachtungen bezüglich der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Ansatzpunkte für weiterführende Projekte. Zudem führen sie zum einen zu der Annahme, dass grundsätzlich zwischen einer Hitzeresistenz und der maximalen Hitzeresistenz in *E. coli* unterschieden werden muss, zum anderen unterstützen sie die Überlegungen von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.*, 2010) zur Rolle von GroEL/S bei der Evolution der Hitzeresistenz in *E. coli.* Demnach scheint es wahrscheinlich, dass die erhöhten GroEL/S-Mengen für den Evolutionsprozess der Hitzeresistenz an sich benötigt werden, auch wenn die GroEL/S-Mengen offenbar nicht direkt im Zusammenhang mit der Hitzeresistenz in *E. coli* stehen. Diese Theorie wird durch Beobachtungen aus verschiedenen Studien unterstützt. So ist bekannt, dass GroE-abhängige Substrate (Kerner *et al.*, 2005) eine hohe Aggregationsanfälligkeit aufweisen (Niwa *et al.*, 2009). Zudem können sich unter erhöhten GroE-Mengen zahlreiche Mutationen anhäufen, auch solche, die zu destabilisierten Proteinen führen oder in Regionen auftreten, welche für einen Proteinkern kodieren, und die Faltung der daraus resultierenden Proteine wird von GroE unterstützt (Tokuriki & Tawfik, 2009). Es wurde sogar beobachtet, dass die GroEL-Menge in Bakterien mit hohen Mutationsraten hoch reguliert wird und GroEL Folgen von schädlichen Mutationen abschwächt ((Todd *et al.*, 1996), (Fares *et al.*, 2002), (Maisnier-Patin *et al.*, 2005)). Demzufolge ermöglichte vermutlich GroEL/S während des Evolutionsprozesses der Hitze-resistenten *E. coli*-Stämme die Faltung thermolabiler oder mutierter Proteine, weshalb Mutationen oder auch epigenetische Ereignisse auftreten konnten, ohne dass die Zellen starben. Infolgedessen konnte eine allmähliche Anpassung der *E. coli*-Zellen an erhöhte Temperaturen erfolgen.

4.2 Neue Erkenntnisse zur HOCl-Resistenz in *E. coli*

Um neue Erkenntnisse über die HOCl-Resistenz in *E. coli* zu erhalten, sollten zunächst mit Hilfe einer genomischen Überexpressionsbibliothek Gene identifiziert werden, die eine HOCl-Resistenz vermitteln. Es wurde eine genomische Expressionsbibliothek verwendet, mit welcher bereits ein σ^S-vermittelter Schutz vor HOCl-Schäden (Barth *et al.*, 2009) sowie der erste HOCl-spezifische Transkriptionsfaktor, YjiE (Gebendorfer *et al.*, 2012), identifiziert wurde. Insgesamt wurden hierbei 30 HOCl-Resistenz-vermittelnde Gene identifiziert (Tab. 17). Für einige dieser Gene ist bereits ein Zusammenhang mit der HOCl-Resistenz in *E. coli* bekannt und viele kodieren für Proteine mit unbekannter oder putativer Funktion. Die Tatsache, dass das Gen *cpdA* bereits in einer anderen Studie (Barth *et al.*, 2009) und das Gen *gadX* im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus fünf verschiedenen Klonen mit Hilfe derselben Bibliothek als HOCl-Resistenz-vermittelnd identifiziert wurde, weist zum einen auf die sehr gute Anwendbarkeit der eingesetzten Bibliothek zur Identifizierung HOCl-Resistenz-vermittelnder *E. coli*-Gene hin, zum anderen deutet sich jedoch an, dass ihre Kapazität allmählich ausgeschöpft ist. Ferner deuten die vielfältigen Produktfunktionen der als HOCl-Resistenz-vermittelnd identifizierten Gene darauf hin, dass in *E. coli* eine Vielzahl verschiedener Mechanismen benötigt wird, um einen HOCl-Stress zu überleben. Auch die Transkriptionsfaktoren SoxR und OxyR regulieren unter oxidativem Stress jeweils die Transkription zahlreicher Gene mit verschiedenen Proteinfunktionen, deren Zusammenspiel zur Resistenz von *E. coli* gegen oxidativen Stress beiträgt ((Zheng *et al.*, 2001), (Blanchard *et al.*, 2007), (Gu & Imlay, 2011)). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die HOCl-Resistenz in *E. coli* auf der Interaktion diverser Gene verschiedener Stressresistenzmechanismen innerhalb komplexer Netzwerke beruht. Da jedoch mittels der genomischen Überexpressionsbibliothek weder Gene, deren verringerte Expression zu einer HOCl-Resistenz führt, noch große Gene oder Gen-Cluster identifiziert werden können, musste eine weitere Herangehensweise hinzugezogen werden, um neue Erkenntnisse über HOCl-Resistenzmechanismen in *E. coli* zu erhalten. Hierzu diente die Herstellung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme und deren anschließende Analyse und Charakterisierung.

Die Herstellung HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme erfolgte durch einen Evolutionsprozess. Zur Etablierung des Evolutionsprozesses wurden diverse Vorgehensweisen und *E. coli*-Stämme getestet. Letztendlich konnte ein sehr erfolgreiches Vorgehen zur Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Zellen etabliert werden, bei welchem Zellen in Flüssigkulturen innerhalb mehrerer Stresszyklen einer sukzessiv erhöhten HOCl-Konzentration ausgesetzt wurden. Die reproduzierbar am stärksten gegen HOCl resistenten *E. coli*-Stämme wurden ausgehend vom Ursprungsstamm BB7224, einem MC4100-Stamm, welchem der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} fehlt (Tomoyasu *et al.*, 2001), erhalten.

In den Experimenten zur Analyse und Charakterisierung der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme erwiesen sich die maximal HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 als nicht spezifisch HOCl-resistent. Obwohl sie während des gesamten Evolutionsprozesses ausschließlich mit HOCl-Stress konfrontiert wurden, waren sie zusätzlich gegen H_2O_2, Diamid, Hitzestress, hyperosmotischen Stress und einige Antibiotika resistenter als der Kontrollstamm E 8.0.9, welcher parallel zum Evolutionsprozess kultiviert aber nicht mit HOCl gestresst wurde, sowie ihr Ursprungsstamm BB7224. Offenbar handelt es sich um eine Kreuzprotektion. Das Auftreten von Kreuzprotektionen wurde bereits häufiger in *E. coli* beobachtet und ermöglicht einer Zelle, nach einem Stress die Resistenz gegen andere Stressfaktoren, denen sie nie zuvor begegnete (Jenkins *et al.*, 1988). Im Zuge der Anpassung an eine bestimmte Stressbedingung muss es jedoch nicht immer zu einer Kreuzprotektion oder Voranpassung an andere Stressbedingungen kommen ((Cullum *et al.*, 2001), (Rudolph *et al.*, 2010)). Ferner war der HOCl-resistente Phänotyp der beiden Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 so stabil, dass deren HOCl-Resistenz bei einer dauerhaften Kultivierung ohne HOCl nach 24 Überimpfungszyklen nur geringfügig abnahm (Abb. 27). Trotzdem keine Hinweise auf Mutationen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen identifiziert werden konnten, wurden zahlreiche Genexpressions- und Proteom-Veränderungen im Vergleich zum Kontroll- und Ursprungsstamm festgestellt. Diverse Experimente wie beispielsweise qRT-PCR-, 2D-PAGE- und SDS-PAGE-Analysen deuteten auf eine Beteiligung von Genen der zellulären Eisenregulation, Methioninbiosynthese, generellen Stressantwort, SOS- und Säurestressantwort sowie von Genen der Stressantworten auf periplasmatischen, hyperosmotischen und oxidativen Stress an der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme hin. Dies bestärkt Beobachtungen aus anderen Studien zur HOCl-Resistenz in *E. coli* ((Dukan & Touati, 1996), (Viveiros *et al.*, 2007), (Barth *et al.*, 2009), (Wang *et al.*, 2009), (Gebendorfer *et al.*, 2012)) und stützt die Annahme, dass ein Zusammenspiel verschiedener Stressantworten und Resistenzmechanismen für die HOCl-Resistenz in *E. coli* benötigt wird. Dabei ist die HOCl-Resistenz vermutlich umso stärker, je mehr Stressresistenzmechanismen beteiligt sind. Die verschiedenen Resistenzmechanismen könnten der Zelle gegen die unterschiedlichen Folgen und Schäden des HOCl-Stresses helfen sowie direkt oder indirekt durch HOCl verursachte Schäden reparieren. Je mehr Resistenzmechanismen daher beteiligt sind, desto besser könnte eine Zelle einen HOCl-Stress überleben. Ein solches Zusammenspiel verschiedener Resistenzmechanismen wurde auch bereits in *Salmonella*-Stämmen mit erhöhter HOCl-Resistenz beobachtet (Mokgatla *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen Resistenzmechanismen an der sehr ähnlich starken HOCl-Resistenz der beiden Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 sich teilweise zu unterscheiden schien, führt zu der Annahme, dass vor allem das Zusammenwirken der zahlreichen verschiedenen

Resistenzmechanismen von entscheidender Bedeutung für das Überleben von *E. coli*-Zellen unter gewissen HOCl-Konzentrationen ist. Des Weiteren wiesen insbesondere Proteomanalysen auf einen zusätzlichen Membran-vermittelten Mechanismus zum Schutz vor HOCl hin. Auch wenn sich die Fluidität der Membranen der HOCl-resistenten Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 kaum von jener des Kontrollstamms E 8.0.9 und ihres Ursprungsstamms BB7224 unterschied (Abb. 18), ist hierbei vermutlich vor allem eine verringerte Membranpermeabilität infolge geringerer Mengen des Außenmembranproteins OmpF in den HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen für eine reduzierte Aufnahme von HOCl und dessen Reaktionsprodukten in die Zelle verantwortlich. Dass ein solcher Mechanismus in *E. coli* zur Resistenz gegen schädliche Substanzen in der Umgebung genutzt wird, ist bereits bekannt ((Nikaido, 2003), (Viveiros *et al.*, 2007), (Gu & Imlay, 2011)). Wenn die geringeren OmpF-Mengen bzw. die verringerte Aufnahme von HOCl ein wesentlicher Grund für die HOCl-Resistenz der evolvierten *E. coli*-Stämme ist, könnte eine Hypothese von Ferenci (Ferenci, 2005) erklären, warum die Evolution HOCl-resistenter *E. coli*-Stämme lediglich mit dem Stamm BB7224 erfolgreich durchgeführt werden konnte. So erläutert Ferenci in einer Arbeit (Ferenci, 2005) seine Hypothese zur bakteriellen Anpassung unter anderem am Beispiel der Porin-vermittelten Permeabilität der Außenmembran. Die Porin-vermittelte Permeabilität der bakteriellen Außenmembran involviert einen Kompromiss zwischen der Selbsterhaltung der Zelle und ihrer Nährstoffversorgung. Verschiedene *E. coli*-Stämme verfügen dabei über unterschiedliche Kompromissfähigkeiten. Während diese in einigen Stämmen eher zu einer erhöhten Stressresistenz und verringerter Nährstoffversorgung neigt, ist dies in anderen Stämmen umgekehrt. Demzufolge verfügt unter den in der vorliegenden Arbeit betrachteten *E. coli*-Stämmen vermutlich lediglich der Stamm BB7224 über die Fähigkeit zu einem Selbsterhaltungs-Nährstoffversorgungs-Kompromiss in Richtung der erhöhten HOCl-Resistenz infolge verringerter OmpF-Mengen. Das heißt, nur dieser Stamm war in der Lage, seine Membranpermeabilität und somit die Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme zu Gunsten der HOCl-Resistenz ausreichend zu senken.

Eine Zusammenfassung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Erkenntnisse zur HOCl-Resistenz in *E. coli* ist im Modell der Abbildung 29 gezeigt. Allgemein ist anzumerken, dass HOCl bekanntermaßen aufgrund seiner sehr hohen Reaktivität experimentell schwierig zu handhaben ist und Experimente zumeist schwer reproduzierbar sind. Umso bedeutender ist es, dass hier HOCl-resistente *E. coli*-Stämme mit einem sehr stabilen Phänotyp hergestellt werden konnten. In einem auf diese Arbeit aufbauenden Projekt sollen epigenetische Ursachen für die Genexpressions- und Proteomveränderungen und somit den Phänotyp der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme E 8.2.9 und E 8.3.9 untersucht werden. Für dieses Projekt wurde bereits mit einer DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit-Sequenzierung begonnen. Grundsätzlich haben weiterführende

Analysen der hier evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme nicht nur das Potential, wesentlich zum Verständnis von bakteriellen Resistenzmechanismen gegen HOCl und evolutionären Prozessen unter Stressbedingungen beizutragen, sondern auch zu einem erweiterten Wissen bezüglich der Entstehung bakterieller Resistenzen im Allgemeinen zu führen. Aus diesem Grund ist die vorliegende Arbeit auch im Kontext globaler Probleme des Gesundheitswesens mit resistenten Bakterien von Bedeutung.

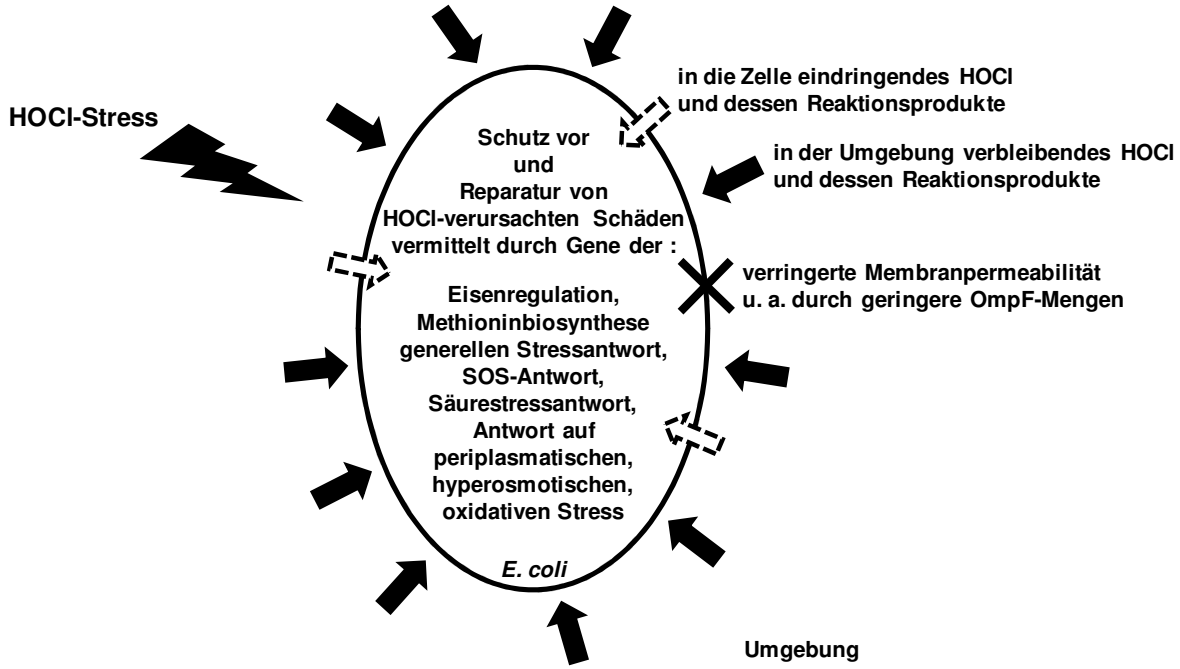


Abbildung 29: Modell zur HOCl-Resistenz in *E. coli*. Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die Faktoren, welche in der vorliegenden Arbeit als vermutlich zur HOCl-Resistenz in *E. coli* beitragend identifiziert wurden. Hierbei scheint das Zusammenwirken verschiedener Stressresistenzmechanismen in der *E. coli*-Zelle sowie eine verringerte Permeabilität ihrer äußeren Membran, insbesondere aufgrund von geringeren Mengen des Außenmembranproteins OmpF, eine wesentliche Rolle zu spielen. Folglich gelangen zunächst weniger HOCl-Moleküle und HOCl-Reaktionsprodukte aus der Umgebung in die *E. coli*-Zelle. In der *E. coli*-Zelle tragen anschließend verschiedene Resistenzmechanismen zum Schutz vor und zur Reparatur von Schäden, welche durch trotz allem in die Zelle gelangtes HOCl und dessen Reaktionsprodukte verursacht werden, bei.

5. Zusammenfassung

Zu den diversen Stressbedingungen, denen viele Bakterien in ihren natürlichen Lebensräumen ausgesetzt sind, gehört der oxidative Stress. Dieser wird durch reaktive Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) erzeugt. Eine sehr reaktive und bakterizide ROS ist hypochlorige Säure (HOCl). Aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes von HOCl als Desinfektionsmittel und ihrer Verwendung zur Abtötung von Bakterien im Wirtsorganismus, werden Bakterien sehr häufig mit HOCl konfrontiert. Trotz der außergewöhnlichen physiologischen Bedeutung von HOCl für Bakterien, liegen bislang sehr limitierte Erkenntnisse über bakterielle Schutz- und Resistenzmechanismen gegen HOCl vor. Jedoch wird erst die Aufklärung der Wirkungsweise von HOCl und ein erweitertes Verständnis von bakteriellen Mechanismen zum Schutz vor und zur Resistenz gegen HOCl-Stress es ermöglichen, zu verstehen, wie bakterielle Infektionen von einem Wirt bekämpft werden und neue Desinfektionsstrategien zu entwickeln. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, hierzu mit neuen Erkenntnissen über bakterielle HOCl-Resistenzmechanismen am Beispiel von *Escherichia coli* (*E. coli)* beizutragen.

Zunächst wurden mit Hilfe einer genomischen Überexpressionsbiliothek 30 HOCl-Resistenz-vermittelnde Gene mit vielfältigen Produktfunktionen identifiziert. Dies deutete bereits darauf hin, dass in *E. coli* eine Vielzahl verschiedener Mechanismen benötigt wird, um einen HOCl-Stress zu überleben. Beruht die bakterielle HOCl-Resistenz tatsächlich auf der Interaktion diverser Gene verschiedener Resistenzmechanismen innerhalb komplexer Netzwerke, ist die genomische Bibliothek nicht das adäquate Mittel, um diese zu identifizieren. Daher wurden zudem in dieser Arbeit HOCl-resistente *E. coli*-Stämme hergestellt, analysiert und charakterisiert.

Die Etablierung von Methoden zur Analyse und Charakterisierung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen erfolgte überwiegend anhand von evolvierten Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen, die zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlagen. Hierbei wurde insbesondere ein Vorgehen zur Sequenzierung von *E. coli*-Genomen mit anschließender Kontrolle der Ergebnisse, ein Vorgehen zur dauerhaften Kultivierung von Stress-resistenten *E. coli*-Stämmen ohne den Stress, unter welchem sie evolviert wurden, ein Vorgehen zur Analyse der Rolle eines Gens unter HOCl-Stress mittels *lacZ*-Reportergenfusion und HOCl-Regenerierungs-Tests („*recovery*“-Analysen) zur Überprüfung der HOCl-Resistenz von *E. coli*-Stämmen etabliert.

Im Zuge dieser Arbeiten wurde eine mutierte Region zwischen den Genen *groEL* und *yjeI* detektiert, welche für die in einigen Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen erhöhten GroEL/S-Mengen verantwortlich sein könnte. Ferner wurden die Gene *hcr*, *yjcC*, *aroB*, *nrdD* und *tolA* als Gene mit potentieller Beteiligung an der Hitzeresistenz in *E. coli* identifiziert und in Hitze-

resistenten *E. coli*-Stämmen eine Insertion entdeckt, welche vermutlich in den Genen *ynjI*, *infB* und *mcrB* für die Hitzeresistenz und im Gen *yhjY* für die maximale Hitzeresistenz in *E. coli* von Bedeutung ist. Diese Beobachtungen liefern zahlreiche hochinteressante Ansatzpunkte für weiterführende Analysen zur Hitzeresistenz in *E. coli*.

Zur Herstellung von HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen wurde ein ausgesprochen erfolgreicher Evolutionsprozess etabliert, in welchem außerordentlich HOCl-resistente *E. coli*-Stämme mit einem sehr stabilen Phänotyp ausgehend vom Ursprungsstamm BB7224 erhalten wurden. Es wurde gezeigt, dass die evolvierten, maximal HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme auch erhöhte Resistenzen gegen H_2O_2, Diamid, Hitzestress, hyperosmotischen Stress und einige Antibiotika aufwiesen. Obwohl umfangreiche Genomsequenzanalysen keine Hinweise auf Mutationen in den evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämmen lieferten, wurden zahlreiche Genexpressions- und Proteomveränderungen festgestellt. Daher ist von epigenetischen Ursachen für den Phänotyp der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme auszugehen. Insgesamt deutete sich in diversen Untersuchungen eine Beteiligung von Genen der zellulären Eisenregulation, Methioninbiosynthese, generellen Stressantwort, SOS- und Säurestressantwort sowie von Genen der Stressantworten auf periplasmatischen, hyperosmotischen und oxidativen Stress und eines Membran-vermittelten Resistenzmechanismus‘ an der HOCl-Resistenz der evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme an. Hierbei scheint das Zusammenwirken verschiedener Stressresistenzmechanismen in der *E. coli*-Zelle sowie eine verringerte Permeabilität ihrer äußeren Membran, insbesondere aufgrund von geringeren Mengen des Außenmembranproteins OmpF, eine wesentliche Rolle zu spielen. Demnach gelangen vermutlich zunächst weniger HOCl-Moleküle und HOCl-Reaktionsprodukte aus der Umgebung in die *E. coli*-Zelle und zum Schutz vor sowie zur Reparatur von Schäden, die durch trotzdem in die Zelle gelangtes HOCl und dessen Reaktionsprodukte auftreten, tragen anschließend die verschiedenen Resistenzmechanismen bei. Die vorliegende Arbeit liefert demzufolge einen bedeutenden Beitrag zu einem Modell zur HOCl-Resistenz in *E. coli*.

Zusätzlich weiterführende Analysen der hier evolvierten HOCl-resistenten *E. coli*-Stämme können wesentlich zum Verständnis von bakteriellen Resistenzmechanismen gegen HOCl und evolutionären Prozessen unter Stressbedingungen sowie der Entstehung bakterieller Resistenzen im Allgemeinen beitragen. Die vorliegende Arbeit ist daher auch im Kontext von globalen Problemen des Gesundheitswesens mit resistenten Bakterien von grundlegender Bedeutung.

6. Summary

One of the various kinds of stress bacteria are exposed to in their natural environments is oxidative stress. Oxidative stress is caused by reactive oxygen species (ROS). Hypochlorous acid (HOCl) is an extremely reactive and bactericidal ROS that is used by the host immune system to kill bacteria and has a widespread application as disinfectant. Therefore, HOCl plays a very important physiological role for bacteria. However, only little is known about bacterial resistance mechanisms against HOCl to date. Revealing its mechanism of action and broadening the knowledge on bacterial mechanisms of protection against HOCl and repair of HOCl mediated damage is not only essential for the understanding of how a hosts' immune system fights bacterial infections but also for the development of new disinfection strategies. Thus, the main goal of this thesis was to fill this gap of knowledge with novel insights into bacterial resistance mechanisms against HOCl using *Escherichia coli* (*E. coli*) as a model organism.

First, 30 genes conferring a HOCl-resistance in *E. coli* were identified with the help of a genomic overexpression library. The fact that these genes encode proteins with a variety of functions implicated that various resistance mechanisms are required in *E. coli* to survive a HOCl-stress. Yet, a genomic library is not the appropriate tool to analyze the interaction of various genes of different stress resistance mechanisms of complex networks. Thus, HOCl-resistant *E. coli* strains were generated, analyzed and characterized.

Methods for the analysis and characterization of HOCl-resistant *E. coli* strains were developed mainly with the help of evolved heat-resistant *E. coli* strains that already existed at the beginning of this project. In particular, a procedure to analyze whole *E. coli* genomes by sequencing and confirmation of the results; a procedure of enduring cultivation of a stress-resistant *E. coli* strain without the stress it was evolved to be resistant to; a procedure to analyze the role of a gene under HOCl stress via *lacZ*-reporter fusions and HOCl-recovery analyses to test the HOCl resistance of *E. coli* strains were established.

In the course of these experiments a mutated region was found in between the genes *groEL* and *yjeI*, which might be responsible for the high GroEL/S levels observed in some of the heat-resistant *E. coli* strains. Furthermore, the genes *hcr*, *yjcC*, *aroB*, *nrdD* and *tolA* were identified to potentially play a role in the heat resistance of *E. coli*. In addition, an insertion was detected, which might be important for heat resistance when occurring in the *ynjI*, *infB* and *mcrB* gene and maybe for a maximum heat resistance when being inserted into the gene *yhjY*. These observations provide numerous exciting starting points for further analyses on the heat resistance in *E. coli*.

Remarkably HOCl-resistant *E. coli* strains derived from the ancestor strain BB7224 were generated by a very successful evolution process established in this thesis. The evolved

strains showed a very stable HOCl resistance phenotype. For the maximum HOCl-resistant *E. coli* strains an elevated resistance against H_2O_2, diamide, heat stress, hyperosmotic stress and some antibiotics was also demonstrated. Although extensive analyses of genome sequences revealed no mutations in the evolved HOCl-resistant *E. coli* strains, numerous changes in gene expression and on the proteome level were detected. Thus, it seems very likely that epigenetic determinants are responsible for the phenotype of the evolved HOCl-resistant *E. coli* strains. Various analyses suggested a participation of genes of the cellular iron regulation, methionine biosynthesis, general stress response, SOS-response, acid stress response and the response to periplasmic, hyperosmotic and oxidative stress in the HOCl resistance of the evolved strains as well as an additional membrane mediated HOCl resistance mechanism. Especially the cooperation of these diverse stress resistance mechanisms within the *E. coli* cell and an additionally reduced membrane permeability, mainly because of lowered levels of the outer membrane protein OmpF, seem to be important for the HOCl resistance. Consequently, it seems that as a first line of defence less HOCl molecules and HOCl reaction products are able to enter the cell. If, however, HOCl or its derivatives were able to enter the cell, a diverse set of resistance mechanisms subsequently helps the cell to repair and prevent HOCl mediated damages, enabeling its survival. With this, significant contributions to a model for the HOCl resistance in *E. coli* are provided by this thesis.

Further analyses of the evolved HOCl-resistant *E. coli* strains have the potential to substantially broaden not only the understanding of bacterial resistance mechanisms against HOCl and evolutionary processes under stress conditions but also the knowledge of the development of bacterial resistances in general. Therefore, this thesis is crucial in the context of global public health concerns.

7. Literaturverzeichnis

Ades, S. E., Hayden, J. D. & Laubacher, M. E. (2011). Envelope Stress. *G Storz and R Hengge (ed), Bacterial Stress Responses, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC*, 115-131.

Amabile-Cuevas, C. F. & Demple, B. (1991). Molecular characterization of the soxRS genes of Escherichia coli: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic acids research* **19**, 4479-4484.

Baker, M. (2011). Sorting out sequencing data. *Nature methods* **8**, 799-803.

Bandyopadhyay, D., Chattopadhyay, A., Ghosh, G. & Datta, A. G. (2004). Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Current medicinal chemistry* **11**, 369-387.

Barth, E., Gora, K. V., Gebendorfer, K. M., 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.

Bjedov, I., Tenaillon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F. & Matic, I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**, 1404-1409.

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.

Calabrese, V., Scapagnini, G., Colombrita, C., Ravagna, A., Pennisi, G., Giuffrida Stella, A. M., Galli, F. & Butterfield, D. A. (2003). Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino acids* **25**, 437-444.

Casadesus, J. & Low, D. (2006). Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**, 830-856.

Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. & Ryu, S. E. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**, 103-113.

Cohen, S. E. & Walker, G. C. (2010). The transcription elongation factor NusA is required for stress-induced mutagenesis in Escherichia coli. *Current biology : CB* **20**, 80-85.

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. *Research in microbiology* **152**, 17-26.

Cruickshank, C. C., Minchin, R. F., Le Dain, A. C. & Martinac, B. (1997). Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of Escherichia coli. *Biophysical journal* **73**, 1925-1931.

Cullum, A. J., Bennett, A. F. & Lenski, R. E. (2001). Evolutionary adaptation to temperature. IX. Preadaptation to novel stressful environments of Escherichia coli adapted to high temperature. *Evolution; international journal of organic evolution* **55**, 2194-2202.

Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6640-6645.

Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta* **1703**, 93-109.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E. P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of Escherichia coli K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of microbiology* **150**, 348-357.

Dukan, S., Dadon, S., Smulski, D. R. & Belkin, S. (1996). Hypochlorous acid activates the heat shock and soxRS systems of Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* **62**, 4003-4008.

Dukan, S. & Touati, D. (1996). Hypochlorous acid stress in Escherichia coli: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal of bacteriology* **178**, 6145-6150.

Fares, M. A., Ruiz-Gonzalez, M. X., Moya, A., Elena, S. F. & Barrio, E. (2002). Endosymbiotic bacteria: groEL buffers against deleterious mutations. *Nature* **417**, 398.

Ferenci, T. (2005). Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Molecular microbiology* **57**, 1-8.

Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., Reeves, P. R. & Wang, L. (2009). Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology* **191**, 4025-4029.

Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J. S., Rudiger, S., Schonfeld, H. J., Schirra, C., Bujard, H. & Bukau, B. (1996). A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma32. *The EMBO journal* **15**, 607-617.

Gebendorfer, K. M., Drazic, A., Le, Y., Gundlach, J., Bepperling, A., Kastenmuller, A., Ganzinger, K. A., Braun, N., Franzmann, T. M. & Winter, J. (2012). Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **287**, 6892-6903.

Gonzalez, C., Hadany, L., Ponder, R. G., Price, M., Hastings, P. J. & Rosenberg, S. M. (2008). Mutability and importance of a hypermutable cell subpopulation that produces stress-induced mutants in Escherichia coli. *PLoS genetics* **4**, e1000208.

Gordia, S. & Gutierrez, C. (1996). Growth-phase-dependent expression of the osmotically inducible gene osmC of Escherichia coli K-12. *Molecular microbiology* **19**, 729-736.

Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L. & Wood, J. M. (1986). Proline transport and osmotic stress response in Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology* **166**, 253-259.

Gu, M. & Imlay, J. A. (2011). The SoxRS response of Escherichia coli is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Molecular microbiology* **79**, 1136-1150.

Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in E. coli. *Genes & development* **18**, 2812-2821.

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.

Hastings, P. J., Slack, A., Petrosino, J. F. & Rosenberg, S. M. (2004). Adaptive amplification and point mutation are independent mechanisms: evidence for various stress-inducible mutation mechanisms. *PLoS biology* **2**, e399.

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., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. & Boos, W. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary-phase thermotolerance in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **173**, 7918-7924.

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

Hengge-Aronis, R. (1996b). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. *R Curtiss III et al (ed) Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology ASM Press, Washington, DC*, 1497-1512.

Hengge-Aronis, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. *G Storz and R Hengge-Aronis (ed), Bacterial Stress Responses ASM Press, Washington, DC*, 161-178.

Hengge, R. (2011). The general stress response in gram-negative bacteria. *G Storz and R Hengge (ed), Bacterial Stress Responses, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC*, 251-289.

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.

Huang, S. (2012). The molecular and mathematical basis of Waddington's epigenetic landscape: a framework for post-Darwinian biology? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**, 149-157.

Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* **77**, 755-776.

Ito, K. & Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annual review of microbiology* **59**, 211-231.

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 H2O2 challenge in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **170**, 3910-3914.

Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **53 Suppl 3**, S26-36; discussion S36-28.

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. & Hartl, F. U. (2005).

Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. *Cell* **122**, 209-220.

Klauck, E., Typas, A. & Hengge, R. (2007). The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in Escherichia coli. *Science progress* **90**, 103-127.

Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology* **77**, 598-625.

Kusukawa, N. & Yura, T. (1988). Heat shock protein GroE of Escherichia coli: key protective roles against thermal stress. *Genes & development* **2**, 874-882.

Kyselova, P., Zourek, M., Rusavy, Z., Trefil, L. & Racek, J. (2002). Hyperinsulinemia and oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **51**, 591-595.

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. *Journal of bacteriology* **173**, 4474-4481.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991b). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **5**, 49-59.

Lesniak, J., Barton, W. A. & Nikolov, D. B. (2003). Structural and functional features of the Escherichia coli hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein science : a publication of the Protein Society* **12**, 2838-2843.

Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. & Booth, I. R. (1999). Protection of Escherichia coli cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO journal* **18**, 1730-1737.

Lim, B. & Gross, C. A. (2011). Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock. *G Storz and R Hengge (ed), Bacterial Stress Responses, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC*, 93-114.

Liu, X. & Ferenci, T. (2001). An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* **147**, 2981-2989.

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

Maisnier-Patin, S., Roth, J. R., Fredriksson, A., Nystrom, T., Berg, O. G. & Andersson, D. I. (2005). Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in bacteria. *Nature genetics* **37**, 1376-1379.

Maritim, A. C., Sanders, R. A. & Watkins, J. B., 3rd (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **17**, 24-38.

Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* **23**, 134-147.

Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A. H., Adler, J. & Kung, C. (1987). Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 2297-2301.

Martinac, B., Adler, J. & Kung, C. (1990). Mechanosensitive ion channels of E. coli activated by amphipaths. *Nature* **348**, 261-263.

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. *Journal of bacteriology* **173**, 4188-4194.

McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. & Epstein, W. (1994). Interdependence of K+ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **269**, 1911-1917.

Meury, J. (1994). Immediate and transient inhibition of the respiration of Escherichia coli under hyperosmotic shock. *FEMS microbiology letters* **121**, 281-286.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.

Mokgatla, R. M., Gouws, P. A. & Brozel, V. S. (2002). Mechanisms contributing to hypochlorous acid resistance of a Salmonella isolate from a poultry-processing plant. *Journal of applied microbiology* **92**, 566-573.

Morita, M., Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1999a). Heat-induced synthesis of sigma32 in Escherichia coli: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. *Journal of bacteriology* **181**, 401-410.

Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. & Yura, T. (1999b). Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & development* **13**, 655-665.

Naas, T., Blot, M., Fitch, W. M. & Arber, W. (1995). Dynamics of IS-related genetic rearrangements in resting Escherichia coli K-12. *Molecular biology and evolution* **12**, 198-207.

Nikaido, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cell & developmental biology* **12**, 215-223.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**, 593-656.

Niwa, T., Ying, B. W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T. & Taguchi, H. (2009). Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4201-4206.

Ohwada, T. & Sagisaka, S. (1987). An immediate and steep increase in ATP concentration in response to reduced turgor pressure in Escherichia coli B. *Archives of biochemistry and biophysics* **259**, 157-163.

Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. & Reinstein, J. (1997). GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**, 3417-3422.

Pashkow, F. J. (2011). Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention? *International journal of inflammation* **2011**, 514623.

Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature reviews Microbiology* **4**, 629-636.

Popov, B., Gadjeva, V., Valkanov, P., Popova, S. & Tolekova, A. (2003). Lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities in brain tumor tissues. *Archives of physiology and biochemistry* **111**, 455-459.

Powell, B. S., Rivas, M. P., Court, D. L., Nakamura, Y. & Turnbough, C. L., Jr. (1994). Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic acids research* **22**, 5765-5766.

Ram, Y. & Hadany, L. (2012). The evolution of stress-induced hypermutation in asexual populations. *Evolution; international journal of organic evolution* **66**, 2315-2328.

Rodriguez, F., Arsene-Ploetze, F., Rist, W., Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., Mayer, M. P. & Bukau, B. (2008). Molecular basis for regulation of the heat shock transcription factor sigma32 by the DnaK and DnaJ chaperones. *Molecular cell* **32**, 347-358.

Rudolph, B., Gebendorfer, K. M., Buchner, J. & Winter, J. (2010). Evolution of Escherichia coli for growth at high temperatures. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19029-19034.

Rutala, W. A. & Weber, D. J. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clinical microbiology reviews* **10**, 597-610.

Satory, D., Gordon, A. J., Halliday, J. A. & Herman, C. (2011). Epigenetic switches: can infidelity govern fate in microbes? *Current opinion in microbiology* **14**, 212-217.

Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Kramer, R. & Burkovski, A. (2000). Polyamine transport and role of potE in response to osmotic stress in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **182**, 6247-6249.

Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a000414.

Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.

Skowyra, D. & Wickner, S. (1995). GrpE alters the affinity of DnaK for ATP and Mg2+. Implications for the mechanism of nucleotide exchange. *The Journal of biological chemistry* **270**, 26282-26285.

Slack, A., Thornton, P. C., Magner, D. B., Rosenberg, S. M. & Hastings, P. J. (2006). On the mechanism of gene amplification induced under stress in Escherichia coli. *PLoS genetics* **2**, e48.

Smith, H. E. (2011). Identifying insertion mutations by whole-genome sequencing. *BioTechniques* **50**, 96-97.

Storz, G., Tartaglia, L. A. & Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**, 189-194.

Straus, D., Walter, W. & Gross, C. A. (1990). DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes & development* **4**, 2202-2209.

Straus, D. B., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1987). The heat shock response of E. coli is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature* **329**, 348-351.

Straus, D. B., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1989). The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in Escherichia coli. *Genes & development* **3**, 2003-2010.

Strom, A. R. & Kaasen, I. (1993). Trehalose metabolism in Escherichia coli: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular microbiology* **8**, 205-210.

Sukharev, S. (2002). Purification of the small mechanosensitive channel of Escherichia coli (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophysical journal* **83**, 290-298.

Sukharev, S. I., Sigurdson, W. J., Kung, C. & Sachs, F. (1999). Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *The Journal of general physiology* **113**, 525-540.

Sun, S., Ke, R., Hughes, D., Nilsson, M. & Andersson, D. I. (2012). Genome-wide detection of spontaneous chromosomal rearrangements in bacteria. *PloS one* **7**, e42639.

Tatsuta, T., Joob, D. M., Calendar, R., Akiyama, Y. & Ogura, T. (2000). Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of sigma(32). *FEBS letters* **478**, 271-275.

Todd, M. J., Lorimer, G. H. & Thirumalai, D. (1996). Chaperonin-facilitated protein folding: optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 4030-4035.

Tokuriki, N. & Tawfik, D. S. (2009). Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature* **459**, 668-673.

Tomoyasu, T., Ogura, T., Tatsuta, T. & Bukau, B. (1998). Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **30**, 567-581.

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. *Molecular microbiology* **40**, 397-413.

Treangen, T. J. & Rocha, E. P. (2011). Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. *PLoS genetics* **7**, e1001284.

VanBogelen, R. A., Acton, M. A. & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in Escherichia coli. *Genes & development* **1**, 525-531.

Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pages, J. M. & Amaral, L. (2007). Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of E. coli. *PloS one* **2**, e365.

Wang, S., Deng, K., Zaremba, S., Deng, X., Lin, C., Wang, Q., Tortorello, M. L. & Zhang, W. (2009). Transcriptomic response of Escherichia coli O157:H7 to oxidative stress. *Applied and environmental microbiology* **75**, 6110-6123.

Weber, A., Kogl, S. A. & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **188**, 7165-7175.

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of bacteriology* **187**, 1591-1603.

Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. & Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Molecular cell* **17**, 381-392.

Winter, J., Ilbert, M., Graf, P. C., Ozcelik, 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. *The Journal of biological chemistry* **281**, 39860-39869.

Wood, J. M. (2011). Osmotic stress. *G Storz and R Hengge (ed), Bacterial Stress Responses, 2nd ed, ASM Press, Washington, DC*, 133-156.

Wu, J. & Weiss, B. (1991). Two divergently transcribed genes, soxR and soxS, control a superoxide response regulon of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **173**, 2864-2871.

Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**, 1718-1721.

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. *Journal of bacteriology* **183**, 4562-4570.

Zhou, Y. N., Kusukawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A. & Yura, T. (1988). Isolation and characterization of Escherichia coli mutants that lack the heat shock sigma factor sigma 32. *Journal of bacteriology* **170**, 3640-3649.

8. Anhang

A Sequenz der Region 3199468-3200799 des Genoms des *E. coli*-Stamms DH10B:

```
GCTGATGAATCCCCTAATGATTTTGGTAAAAATCATTAAGTTAAGGTGGATACACATCTTGTCATATGATCAAATGGTTTCGC
GAAAAATCAATAATCAGACAACAAGATGTGCGAACTCGATATTTTACACGACTCTCTTTACCAATTCTGCCCCGAATTACACT
TAAAACGACTCAACAGCTTAACGTTGGCTTGCCACGCATTACTTGACTGTAAAACTCTCACTCTTACCGAACTTGGCCGTAAC
CTGCCAACCAAAGCGAGAACAAAACATAACATCAAACGAATCGACCGATTGTTAGGTAATCGTCACCTCCACAAAGAGCGACT
CGCTGTATACCGTTGGCATGCTAGCTTTATCTGTTCGGGCAATACGATGCCCATTGTACTTGTTGACTGGTCTGATATTCGTG
AGCAAAAACGACTTATGGTATTGCGAGCTTCAGTCGCACTACACGGTCGTTCTGTTACTCTTTATGAGAAAGCGTTCCCGCTT
TCAGAGCAATGTTCAAAGAAAGCTCATGACCAATTTCTAGCCGACCTTGCGAGCATTCTACCGAGTAACACCACACCGCTCAT
TGTCAGTGATGCTGGCTTTAAAGTGCCATGGTATAAATCCGTTGAGAAGCTGGGTTGGTACTGGTTAAGTCGAGTAAGAGGAA
AAGTACAATATGCAGACCTAGGAGCGGAAAACTGGAAACCTATCAGCAACTTACATGATATGTCATCTAGTCACTCAAAGACT
TTAGGCTATAAGAGGCTGACTAAAAGCAATCCAATCTCATGCCAAATTCTATTGTATAAATCTCGCTCTAAAGGCCGAAAAAA
TCAGCGCTCGACACGGACTCATTGTCACCACCCGTCACCTAAAATCTACTCAGCGTCGGCAAAGGAGCCATGGGTTCTAGCAA
CTAACTTACCTGTTGAAATTCGAACACCCAAACAACTTGTTAATATCTATTCGAAGCGAATGCAGATTGAAGAAACCTTCCGA
GACTTGAAAAGTCCTGCCTACGGACTAGGCCTACGCCATAGCCGAACGAGCAGCTCAGAGCGTTTTGATATCATGCTGCTAAT
CGCCCTGATGCTTCAACTAACATGTTGGCTTGCGGGCGTTCATGCTCAGAAACAAGGTTGGGACAAGCACTTCCAGGCTAACA
CAGTCAGAAATCGAAACGTACTCTCAACAGTTCGCTTAGGCATGGAAGTTTTGCGGCATTCTGGCTACACAATAACAAGGGAA
GACTTACTCGTGGCTGCAACCCTACTAGCTCAAAATTTATTCACACATGGTTACGCTTTGGGGAAATTATGAGGGGATCTCTC
AGCG
```

B Sequenz der Region 3211919-3213270 des Genoms des *E. coli*-Stamms DH10B:

```
GCGCCCAGCACTGATGAATCCCCTAATGATTTTTATCAAAATCATTAAGTTAAGGTAGATACACATCTTGTCATATGATCAAA
TGGTTTCGCCAAAAATCAATAATCAGACAACAAAATGTGCGAACTCGATATTTTACACGACTCTCTTTACCAATTCTGCCCCG
AATTACACTTAAAACGACTCAACAGCTTAACGTTGGCTTGCCACGCCTTACTTGACTGTAAAACTCTCACTCTTACCGAACTT
GGCCGTAACCTGCCAACCAAAGCGAGAACAAAACATAACATCAAACGAATCGACCGATTGTTAGGTAATCGTCACCTCCACAA
AGAGCGACTCGCTGTATACCGTTGGCATGCTAGCTTTATCTGTTCGGGCAATACGATGCCCATTGTACTTGTTGACTGGTCTG
ATATCCGTGAGCAAAAACGGCTTATGGTATTGCGAGCTTCAGTCGCACTACACGGTCGTTCTGTTACTCTTTATGAGAAAGCG
TTCCCGCTTTCAGAGCAATGTTCAAAGAAAGCTCATGACCAATTTCTAGCCGACCTTGCGAGCATTCTACCGAGTAACACCAC
ACCGCTCATTGTCAGTGATGCTGGCTTTAAAGTGCCATGGTATAAATCCGTTGAGAAGCTGGGTTGGTACTGGTTAAGTCGAG
TAAGAGGAAAAGTACAATATGCAGACCTAGGAGCGGAAAACTGGAAACCTATCAGCAACTTACATGATATGTCATCTAGTCAC
TCAAAGACTTTAGGCTATAAGAGGCTGACTAAAAGCAATCCAATCTCATGCCAAATTCTATTGTATAAATCTCGCTCTAAAGG
CCGAAAAAATCAGCGCTCGACACGGACTCATTGTCACCACCCGTCACCTAAAATCTACTCAGCGTCGGCAAAGGAGCCATGGA
TTCTAGCAACTAACTTACCTGTTGAAATTCGAACACCCAAACAACTTGTTAATATCTATTCGAAGCGAATGCAGATTGAAGAA
ACCTTCCGAGACTTGAAAAGTCCTGCCTACGGACTAGGCCTACGCCATAGCCGAACGAGCAGCTCAGAGCGTTTTGATATCAT
GCTGCTAATCGCCCTGATGCTTCAACTAACATGTTGGCTTGCGGGCGTTCATGCTCAGAAACAAGGTTGGGACAAGCACTTCC
AGGCTAACACAGTCAGAAATCGAAACGTACTCTCAACAGTTCGCTTAGGCATGGAAGTTTTGCGGCATTCTGGCTACACAATA
ACAAGGGAAGACTCACTCGTGGCTGCAACCCTGCTTACTCAAAATCTATTCACACATGGTTACGTTTTGGGGAAATTATGAGG
GGATCTCTCAGCGCGTAACGTTTT
```

C Sequenz der Region 4640584-4641922 des Genoms des *E. coli*-Stamms DH10B:

```
TAGCACTGAGAGATCCCCTCATAATTTCCCCAAAGCGTAACCATGTGTGAATAAATTTTGAGCTAGTAGGGTTGCAGCCACGA
GTAAGTCTTCCCTTGTTATTGTGTAGCCAGAATGCCGCAAAACTTCCATGCCTAAGCGAACTGTTGAGAGTACGTTTCGATTT
CTGACTGTGTTAGCCTGGAAGTGCTTGTCCCAACCTTGTTTCTGAGCATGAACGCCCGCAAGCCAACATGTTAGTTGAAGCAT
CAGGGCGATTAGCAGCATGATATCAAAACGCTCTGAGCTGCTCGTTCGGCTATGGCGTAGGCCTAGTCCGTAGGCAGGACTTT
TCAAGTCTCGGAAGGTTTCTTCAATCTGCATTCGCTTCGAATAGATATTAACAAGTTGTTTGGGTGTTCGAATTTCAACAGGT
AAGTTAGTTGCTAGAATCCATGGCTCCTTTGCCGACGCTGAGTAGATTTTAGGTGACGGGTGGTGACAATGAGTCCGTGTCGA
GCGCTGATTTTTTCGGCCTTTAGAGCGAGATTTATACAATAGAATTTGGCATGAGATTGGATTGCTTTTAGTCAGCCTCTTAT
AGCCTAAAGTCTTTGAGTGACTAGATGACATATCATGTAAGTTGCTGATAGGTTTCCAGTTTTCCGCTCCTAGGTCTGCATAT
TGTACTTTTCCTCTTACTCGACTTAACCAGTACCAACCCAGCTTCTCAACGGATTTATACCATGGCACTTTAAAGCCAGCATC
ACTGACAATGAGCGGTGTGGTGTTACTCGGTAGAATGCTCGCAAGGTCGGCTAGAAATTGGTCATGAGCTTTCTTTGAACATT
GCTCTGAAAGCGGGAACGCTTTCTCATAAAGAGTAACAGAACGACCGTGTAGTGCGACTGAAGCTCGCAATACCATAAGCCGT
TTTTGCTCACGGATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTGCCCGAACAGATAAAGCTAGCATGCCAACGGTA
TACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGACGATTACCTAACAATCGGTCGATTCGTTTGATGTTATGTTTTGTTCTCGCTTTGG
TTGGCAGGTTACGGCCAAGTTCGGTAAGAGTGAGAGTTTTACAGTCAAGTAAGGCGTGGCAAGCCAACGTTAAGCTGTTGAGT
CGTTTTAAGTGTAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAAATATCGAGTTCGCACATTTTGTTGTCTGATTATTG
ATTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGGGGATT
CATCAGTGCTT
```

Abbildung A1: Sequenz der DH10B-Insertion. In den Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM25, BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} wurde in den Genen *ynjI* und *infB* sowie in der *mcrB*-Promotorregion eine Insertion detektiert, welche in den maximal Hitze-resistenten *E. coli*-Stämmen BM28^{GroEL-} und BM28^{GroEL+} zusätzlich im Gen *yhjY* auftrat. Die Sequenz dieser Insertion war nahezu identisch mit einer Sequenz des Genoms des *E. coli*-Stamms DH10B, welche dort mit je nur wenigen Basenpaaren Unterschied (99% Übereinstimmung) sowohl zwischen den Genen *mltC* und *pppA* (A) als auch zwischen den Genen *speC* und *glcA* (B) bzw. *yjhA* und *yjjA* (C) vorliegt. Aufgeführt sind die Sequenzen der drei Regionen des DH10B-Genoms. Die abgebildeten Sequenzen stammen von: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/170079663?report=fasta&from=4633148&to=4649621.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2012/01/04/M111.287219.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 9, pp. 6892–6903, February 24, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Identification of a Hypochlorite-specific Transcription Factor from *Escherichia coli*[*][S]

Received for publication, July 28, 2011, and in revised form, January 4, 2012 Published, JBC Papers in Press, January 4, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.287219

Katharina M. Gebendorfer[‡1], Adrian Drazic[‡1], Yan Le[‡], Jasmin Gundlach[‡], Alexander Bepperling[‡2], Andreas Kastenmüller[§], Kristina A. Ganzinger[§3], Nathalie Braun[§], Titus M. Franzmann[‡4], and Jeannette Winter[‡5]

From the Sections of [‡]Biotechnology and [§]Electron Microscopy, Department of Chemistry, Center for Integrated Protein Science Munich (CiPS[M]), Technische Universität München, 85747 Garching, Germany

Background: Hypochlorite is strongly bactericidal and used as disinfectant; yet, a response regulator allowing adaptation to the inflicted stress is so far unknown.
Results: The transcription factor YjiE specifically confers hypochlorite resistance and is an atypical dodecameric regulator that undergoes DNA-induced dissociation to dimers and tetramers.
Conclusion: YjiE protects cells from hypochlorite-induced oxidative damage by triggering a specific stress response.
Significance: This is the first described hypochlorite-specific regulator.

Hypochlorite is a powerful oxidant produced by neutrophils to kill invading microorganisms. Despite this important physiological role of HOCl in fighting bacterial infections, no hypochlorite-specific stress response has been identified yet. Here, we identified a hypochlorite-responsive transcription factor, YjiE, which is conserved in proteobacteria and eukaryotes. YjiE forms unusual dodecameric ring-like structures *in vitro* that undergo large DNA-induced conformational changes to form dimers and tetramers as shown by transmission electron microscopy and analytical ultracentrifugation. Such smaller oligomers are predominant in hypochlorite-stressed cells and are the active species as shown by fluorescence anisotropy and analytical ultracentrifugation. YjiE regulates a large number of genes upon hypochlorite stress. Among them are genes involved in cysteine, methionine biosynthesis, and sulfur metabolism (up-regulated) and genes involved in iron acquisition and homeostasis (down-regulated), thus supposedly replenishing oxidized metabolites and decreasing the hypochlorite-mediated amplification of intracellular reactive oxygen species. As a result, YjiE specifically confers hypochlorite resistance to *E. coli* cells. Thus, to our knowledge, YjiE is the first described hypochlorite-specific transcription factor.

The reactive oxygen species (ROS)[6] hypochlorite (HOCl) is produced by neutrophils in humans and higher eukaryotes upon bacterial infection and by mucosal barrier epithelia in the gut of *Drosophila* to inhibit bacterial colonization (1, 2). HOCl is also known as bleach and used worldwide as a powerful disinfectant in households, hospitals, water disinfection, and the food industry. In contrast to redox-cycling drugs and other ROS such as superoxide anion and hydrogen peroxide (H_2O_2), HOCl is extremely reactive and bactericidal. It reacts with iron forming hydroxyl radicals via the Fenton reaction making it cytotoxic (3, 4). HOCl targets and damages a variety of macromolecules, including DNA, lipids, and proteins. It is especially reactive toward the side chains of the amino acids methionine and cysteine, causing oxidation to methionine sulfoxide as well as formation of disulfides and oxidation to oxy acids (*e.g.* sulfenic, sulfinic, sulfonic acid), respectively (5). This eventually leads to genome-wide mutations, protein inactivation, and perturbations in membrane function (5, 6).

Despite this physiological importance of HOCl in killing bacteria, bacterial protection mechanisms against HOCl-derived damage have not received much investigative attention. Previous studies showed that HOCl causes the induction of the heat shock and SoxR responses (7, 8). Further studies revealed reasons for the bactericidal effect of HOCl as oxidative protein unfolding leading to irreversible aggregation (9) and proteome-wide oxidation of methionine residues (10). In contrast to the majority of cellular proteins that are inactivated by HOCl, the redox-regulated *E. coli* chaperone Hsp33 (11) is activated by oxidative unfolding and serves to protect cellular proteins from aggregation, thus increasing *E. coli* resistance to HOCl (9, 12).

Oxidative stress responses in prokaryotes and eukaryotes are typically driven by transcription factors specific to the drug or ROS that causes the oxidative stress (13). Examples for redox-cycling drugs and H_2O_2 are the well characterized oxidative stress transcription factors SoxR and OxyR, respectively (14,

* This work was supported by project pr28ci (to Johannes Buchner and T. M. F.), the Elitenetzwerk Bayern (to K. M. G., T. M. F., and J. G.), the Boehringer Ingelheim Fonds (to Y. L.), and the Emmy-Noether program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J. W.).
[S] This article contains supplemental "Experimental Procedures," Tables S1–S4, Figs. 1–3, and additional references.
[1] Both authors contributed equally to this work.
[2] Present address: Sandoz Biopharmaceuticals, HEXAL, 82041 Oberhaching, Germany.
[3] Present address: Dept. of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge, CB2 1EW, United Kingdom.
[4] Present address: Dept. of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-1048.
[5] To whom correspondence should be addressed: CiPS[M] at the Department Chemie, Biotechnologie, TU München, Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany. Tel.: 49-89-289-13191; Fax: 49-89-289-13345; E-mail: jeannette.winter@tum.de.

[6] The abbreviations used are: ROS, reactive oxygen species; aUC, analytical ultracentrifugation; FA, fluorescence anisotropy; LTTR, LysR-type transcriptional regulator; HOCl, sodium hypochlorite; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine.

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

15). In contrast, no HOCl-specific transcription factor protecting bacteria from HOCl damage has been identified until now. In this study, we identified a novel transcription factor, YjiE, which confers HOCl resistance to *E. coli* cells. Based on homology, YjiE belongs to the large family of LysR-type transcriptional regulators (LTTRs). LTTRs are ubiquitous and act as repressors or activators of transcription. They contain an N-terminal DNA-binding helix-turn-helix motif and a C-terminal co-inducer response domain (16). LTTRs typically form dimers and tetramers (*e.g.* OxyR (17), CysB (18), TsaR (19), nitrogen assimilation control protein (20)), but also octamers (CrgA (21)). Activation of LTTRs usually occurs through the binding of a small molecule co-inducer (18, 19) or covalent modifications (17). We show here that YjiE is the first HOCl-specific transcription factor that increases cellular viability by reducing the intracellular iron levels.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Cloning, Cultivation Conditions, and Analysis of Cellular Viability—The generation and screen of the genomic library were performed as described (22). Details on the generation of bacterial strains, plasmids, and primer are given in the supplemental data. Bacteria were cultivated at 37 °C in LB medium supplemented with adequate antibiotics until an A_{600} of 0.45 to 0.5 was reached (equivalent to at least four doublings). Viability assays were performed as described (9, 22). The viability of cells (after 1:20 dilution into fresh LB) was tested at 37 °C in LB medium supplemented with the indicated ROS (4 mM HOCl, 4 mM H_2O_2, or 5 mM diamide). Samples were removed at various time points, serially diluted in LB, and spotted onto LB agar plates. Recovery of cells was analyzed in micro titer plates using a micro titer plate reader (BioTek). Cells (at 1:20 dilution) were mixed with various concentrations of HOCl, subsequently continuously shaken at 37 °C, and A_{600} values were recorded at 10-min intervals. (HOCl was not quenched.)

Gene Expression Analysis—The procedure for transcriptional profiles is described in the supplemental data.

Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)—3 ml of culture at an A_{600} of 0.45 were either treated with HOCl (37 °C, 10 min) or left untreated. Then, 2 ml of 5× LB medium was added to quench the remaining HOCl, cells were harvested (5000 rpm, 5 min), and the cell pellet was frozen in liquid nitrogen. RNA was isolated using the SV total RNA isolation system (Promega) according to the manufacturer's protocol. The concentration was determined at 260 nm using a NanoDrop spectrometer (PeqLab). qRT-PCR was performed in a one-step reaction using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies) supplemented with 100 ng of isolated RNA as template and 150 nM primers (see supplemental Table S2). The cDNAs were synthesized at 50 °C for 10 min and subsequently denatured at 95 °C for 3 min. Then, the cDNAs were amplified through 40 cycles (denaturation, 95 °C and 20 s; annealing/extension, 60 °C and 30 s). Nonspecific products or primer-dimers were detected by increasing the incubation temperature from 25 to 95 °C after amplification. The amplification efficiency was validated by standard curves for each primer pair. Besides the no-template control and no RT control omitting the reverse transcriptase/RNase block provided in the master mix kit, the *tufB* gene was used as endogenous control to normalize the variation of RNA template in each sample.

Analysis of Intracellular Iron Levels—Cells were cultivated as described above. At an A_{600} of 0.45, cells were HOCl-stressed (2.75 mM HOCl, 10 min) or left untreated and harvested. Further sample treatment and EPR measurements of incorporated iron were exactly performed as described (23).

Reporter Gene Fusion—The construction of translational *lacZ* reporter gene fusions and β-galactosidase assays were performed as described in the supplemental data.

Purification of YjiE and Preparation for Analysis—Expression was performed using BL21(DE3) cells. Cultures (1–6 liters) were inoculated and incubated overnight at 37 °C without shaking. Then, the cultures were shaken at 25 °C, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside was added after 45 min (0.1 mM final concentration), and cells were harvested after 4 h. Washed cells were resuspended in ice-cold buffer A (50 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) containing Protease Inhibitor Mix HP (Serva), disrupted, and centrifuged (8 °C, 48,400 × *g*). All chromatography steps were performed at ambient temperature, and protein fractions were collected on ice. The lysate was applied onto a HisTrap FF column (GE Healthcare) and eluted with a linear gradient from buffer B (50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) to buffer C (buffer B with 750 mM imidazole). YjiE-containing fractions were diluted with buffer D (10 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 5 mM EDTA), immediately applied onto a Hi-Trap Q FF (GE Healthcare), and eluted with a linear gradient from buffer E (10 mM NaH_2PO_4, pH 7.5) to buffer F (buffer E with 600 mM NaCl). YjiE-His containing fractions were pooled and stored at −80 °C after addition of 5% (v/v) final concentration of glycerol. To remove the His tag, His-T-YjiE or His-T-YjiE-flash containing fractions after the Hi-Trap Q FF column were digested with thrombin (bovine, high activity (Calbiochem)) for 40 h at 4 °C. Thrombin was removed using a Superdex75 column (GE Healthcare) (buffer E with 400 mM NaCl). For storage at −80 °C, glycerol was added to a final concentration of 5% (v/v) (storage buffer B (9.5 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 380 mM NaCl, 5% glycerol)). Unless otherwise stated, YjiE was reduced with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, 1 mM, 1 h, 37 °C), centrifuged (13,300 rpm, 4 °C, 20 min), and the protein concentration was determined at 280 nm using a NanoDrop spectrometer (PeqLab) prior to analysis. For purification of YjiE-HOCl (*i.e.* YjiE-His isolated from HOCl-treated cells), HOCl was added to cultures to a final concentration of 2 mM immediately before cells were harvested (10 min, 8 °C). Cells were then resuspended in buffer B containing Protease Inhibitor Mix HP, disrupted, and YjiE-HOCl purified and stored as described above for YjiE-His.

Sample Preparation for Analytical Ultracentrifugation—For the analysis of the oligomerization state of YjiE, the protein was analyzed at 15, 3, and 0.6 μM in storage buffer. YjiE-HOCl was analyzed at 12 μM in storage buffer. To analyze the dissociation of YjiE by DNA, 50 nM YjiE-flash* (see below) was incubated with 50 nM DNA (158 bp) in 10 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 375 mM NaCl. After 20 to 30 min at 25 °C, sedimentation velocity ultracentrifugation was carried out. To ana-

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

lyze binding of YjiE to different DNA, the protein was reduced with TCEP (1 mM, 2 h, 37 °C), and TCEP was removed using a NAP-5 column (elution in 2.5 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 100 mM NaCl). DNA-binding samples were prepared containing 30–50 nM DNA (*yjiE*, *metN*, *cydA*), different amounts of protein, and a final buffer concentration of 1 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 30 mM NaCl.

Analytical Ultracentrifugation (aUC)—aUC experiments were carried out using a ProteomeLab XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) equipped with a fluorescence detection system (Aviv) (24, 25). For sedimentation velocity experiments, samples were spun at 35,000 rpm or 42,000 rpm (monitoring fluorescence) at 20 °C. Scans were collected continuously during sedimentation recording absorbance at 235 and 280 nm for unlabeled protein or monitoring fluorescence at an excitation of 488 nm and emission cut off at 505 nm when YjiE-flash* or Alexa Fluor 488-labeled DNA should be detected.

Sedimentation velocity data were analyzed using the dC/dT method (25) and/or *c*(*s*) method provided with the SedFit software. For two-dimensional spectrum analysis (26), sedimentation profiles were analyzed at a grid resolution of 62,500 using 25 grid repetitions. Confidence levels for statistics were derived from two-dimensional spectrum analysis data refinement using genetic algorithm followed by 50 Monte Carlo simulations. Buffer density and viscosity were determined using a falling ball viscosimeter type C (Haake), and all aUC data were calculated based on the experimentally determined buffer parameters. The partial specific volume (vbar) of 0.737 ml/g for YjiE was calculated based on the amino acid sequence. Sedimentation equilibrium experiments were performed at 8,000 rpm at 4 °C with 15 μM YjiE-His. Absorbance scans at 280 nm and interference scans were recorded after the sample was at equilibrium. These data were analyzed by a single species fit. The calculation of the YjiE-DNA-complex stoichiometry is described in the supplemental data.

Sucrose Gradient Centrifugation—Preparation and analysis of sucrose gradients are described in the supplemental data.

Transmission Electron Microscopy and Image Processing—YjiE samples were adsorbed for 2 min onto carbon-coated grids that were glow discharged in air before the application of 5 μl of protein solution. YjiE alone and HOCl-treated YjiE were analyzed at 0.1 mg/ml and 0.05 mg/ml, respectively, in 10 mM NaH_2PO_4, pH 7.4, 200 mM NaCl. HOCl-treated YjiE (0.5 mg/ml (14 μM)) was incubated with a 10-fold molar ratio of HOCl (25 °C, 30 min) before HOCl was quenched by the addition of methionine. For DNA-binding experiments, TCEP-reduced (1 mM, 1 h, 37 °C) YjiE was diluted to a final concentration of 50 mM NaCl and incubated with an equimolar ratio of 315-bp *yjiE* DNA (final YjiE concentration, 0.018 mg/ml (504 nM)). Excess protein solution was blotted off, and the samples were stained negatively with uranyl acetate (5 μl 2% (w/v), 30 s). Electron micrographs were recorded at a nominal magnification of 50,000 and at defocus values ~500 to 700 nm using a JEOL JEM 100CX electron microscope operated at 100 kV. Image preparation was performed as described (27). Centered images (1,500 for YjiE+DNA; 9,918 for YjiE alone; 8,320 for HOCl-treated YjiE) were analyzed by multivariate statistical analysis and multireference-alignments within the Imagic suite (28) to obtain the final class averages. Quantification, three-dimensional reconstruction, and the hydrodynamic simulations are described in the supplemental data.

FlAsH Labeling of YjiE in Vitro and in Vivo—AD2 cells were induced with 0.1% arabinose (30 °C, 4 h), which yielded YjiE levels ~100 times higher than wild-type levels (final level ~0.1% of the total cellular protein, as inferred from quantitative Western blot analysis using YjiE-specific antibodies) and was required to obtain a significant fluorescence signal. For preparation of the lysate, cell pellets were resuspended in 20 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 115 mM NaCl. Cells were disrupted using a bead mill (4-mm glass beads, frequency 30 s^{-1}, 6 min). After centrifugation, the protein concentration in the soluble fraction was determined by Bradford assay.

Purified YjiE-flash and *yjiE*-flash expressing cell lysates were incubated with 1 mM TCEP and 0.4 μM FlAsH-EDT_2 (Invitrogen) for 90 min (29) prior to analysis by aUC (see above) or sucrose gradient centrifugation (see supplemental data). Lysate (50–75 μg) was used for aUC monitoring fluorescence in a total volume of 450 μl. *In vivo* labeling was performed as described before (30) with minor modifications as follows using AD2 cells at an A_{600} of 0.5. Lysozyme-treated, washed cells were resuspended in LB medium supplemented with ampicillin, and 0.4 μM FlAsH-EDT_2 and 2 μM ethanedithiol were added (37 °C, 30 min). Then, 0.1% arabinose was added to induce expression of *yjiE*-flash at 30 °C for 4 h, and cells were harvested as described above. For the *in vivo* HOCl treatment, cells were treated with 2 mM HOCl (5 min), and the reaction was quenched with LB medium directly before cell disruption. Lysate (120 μg) was used for aUC in a total volume of 300–450 μl.

Generation of DNA Fragments for Binding Studies—DNA fragments comprising the upstream region of *yjiE*, *metN*, or *cydA* were generated by PCR using the following primers: −263-bp *yjiE* (forward) and +52-bp *yjiE* (reverse) (315-bp DNA), or −106-bp *yjiE* (forward) *metN* or *cydA* and +52-bp *yjiE*, *metN*, or *cydA* (reverse) (158-bp DNA), respectively, and purified. Positions are given with respect to the translational start sites. To obtain single fluorescently labeled DNA fragments, the reverse primer was 5′-labeled with Alexa Fluor 488.

Fluorescence Anisotropy Measurements (FA)—FA was analyzed using a Jasco FP-6500 fluorescence spectrometer at 37 °C (excitation/emission at 488 nm/515 nm). YjiE was reduced as indicated (1 h, 37 °C, 10 mM TCEP, or 3 h, 37 °C, 10 mM DTT) prior to addition to DNA. Analysis was performed in the presence of reductants. YjiE-His was always analyzed in its nonreduced state (*in vitro* HOCl-treated, from unstressed cells, and from HOCl-treated cells). For *in vitro* oxidation, YjiE-His (0.5 mg/ml) was incubated with a 10-fold molar excess of HOCl (70 μM; 30 min, 25 °C) before HOCl was quenched by the addition of methionine (final concentration, 1 mM). Single Alexa Fluor 488-labeled 158-bp DNA at 10 nM (*yjiE*, *metN*, or *cydA*) was preincubated in 10 mM NaH_2PO_4, pH 7.5, 5% glycerol in a stirred cuvette for 5 min. Then, the respective YjiE variant was added in 100 or 200 nM steps to the DNA, and anisotropy was monitored for 60 s (data pitch, 2 s). The recorded values (20–50 s) were averaged.

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

RESULTS

Identification of Putative Transcription Factor That Confers Specific Resistance to HOCl Stress—In an attempt to identify a potential cellular response system to HOCl, we screened a genomic expression library and selected clones that survived exposure to 6 mM HOCl in liquid LB medium (22). We identified one clone with a 150-fold increased number of surviving cells (5 mM HOCl) that contained the complete gene *yjiE* and parts of *iadA* and *iraD*, suggesting that *yjiE* is responsible for the observed HOCl resistance. Based on homology, *yjiE* encodes a putative LTTR and is conserved in α-, β-, and γ-proteobacteria and in eukaryotes (*Xenopus tropicalis*). Multiple sequence alignment showed that YjiE contains many conserved amino acids in the N-terminal DNA-binding domain and the C-terminal co-inducer response domain (Fig. 1*A*). To confirm that *yjiE* confers the HOCl-resistant phenotype of the originally selected library clone, we deleted *yjiE* in *E. coli* C600 (KMG214) and compared its survival after exposure to HOCl to the parental strain C600. Deletion of *yjiE* resulted in an up to 350-fold reduced viability upon HOCl stress and delayed recovery, resulting in an increased lag phase in the growth curve (Fig. 1*B* and *inset*). YjiE appears to act specifically during HOCl stress and does not confer resistance to other ROS such as H_2O_2 and diamide (Fig. 1, *C* and *D*). We conclude that YjiE improves cell viability and growth upon HOCl stress.

What is the function of YjiE upon HOCl stress? To obtain insight into the potential regulatory role of YjiE and to assess how YjiE protects cells from HOCl stress, we performed gene expression analyses of *yjiE*$^+$ and *yjiE*$^-$ cells (C600, KMG214) in response to HOCl treatment. Under the conditions chosen the viability of cells was 100% for all tested HOCl concentrations. Considering that most LTTRs autoregulate their expression (16), we compared RNA levels of YjiE in unstressed and HOCl stressed cells. No significant change in RNA levels was observed, and this was confirmed by qRT-PCR (data not shown). Likewise, translational fusions of the putative *yjiE* promoter region with *lacZ* yielded similar β-galactosidase activity in unstressed and HOCl-stressed *yjiE*$^+$ and *yjiE*$^-$ cells (supplemental Fig. 2). This suggests that *yjiE* transcription is not altered by HOCl stress and that YjiE does not up-regulate its own expression, unlike other LTTRs (16).

Only 11 genes had slightly different RNA levels (2.1–3.5-fold up/down) under non-stress conditions in *yjiE*$^-$ cells compared with *yjiE*$^+$ cells. Upon HOCl treatment, however, >300 genes were altered at the transcript level by at least 2-fold in response to HOCl in *yjiE*$^+$ or *yjiE*$^-$ cells. Some of these genes showed stronger regulation in one of both strains, and some were exclusively regulated in *yjiE*$^+$ cells but remained unaffected by HOCl in *yjiE*$^-$ cells. These genes are supposedly regulated by YjiE (supplemental Tables S3 and S4). Up-regulated genes can mainly functionally be classified into genes involved in sulfur, methionine, and cysteine metabolism (*metB*, *metK*, *metN*, *cysH*, *cysK*, *cysN*, *cysPUW*, *sbp*, *sufA*), biosynthesis of other amino acid, and genes with unknown function. Down-regulated genes can mainly be classified into genes involved in iron acquisition and homeostasis (*entC*, *entH*, *fecABCDE*, *fecR*, *fepCD*, *ryhB*, *tonB*, *yncE*; and with a much lower amplitude *entEBA*, *ybiX* (1.5 to 2-fold change)) as well as transporter (sugar, peptides, amino acids) and RNA-related genes.

To confirm the regulatory effect of YjiE during HOCl stress, we monitored the levels of selected RNAs (CysH, MetB, MetN, FecD) by qRT-PCR. All of these genes showed an YjiE-dependent transcription over a HOCl concentration range from 2–3.5 mM with an optimum at 2.5–2.75 mM HOCl (Fig. 2*A*). (Differences in absolute values in the gene expression analysis and the qRT-PCR analysis are most likely due to a different experimental setup.) It should be noted that the viability of cells was 100% for all HOCl concentrations tested. Thus, the qRT-PCR data support the gene expression analysis.

The up-regulation of cysteine and methionine biosynthesis may reflect the requirement to replenish methionine, which is quickly oxidized upon HOCl stress (5) and thus possibly depleted. The potential role of genes with unknown functions is yet to be analyzed. Genes that were down-regulated are involved mainly in iron homeostasis. They are regulated by Fur, a transcriptional regulator and repressor that is activated by iron (31). Dukan and Touati (4) showed that *fur* mutants, which have higher intracellular iron levels because they lack down-regulation of iron acquisition, are more sensitive to HOCl stress. This suggests that *E. coli* cells with higher intracellular iron levels suffer from increased ROS generation via the Fenton reaction (4). Thus, the primary role of YjiE may be to down-regulate iron acquisition genes to prevent further synthesis of iron uptake proteins.

To test whether YjiE influences iron levels, we analyzed intracellular free iron levels in *yjiE*$^+$ and *yjiE*$^-$ cells in the absence or presence of HOCl stress. Cells were treated with 2.75 mM HOCl at which the levels of FecD were most strongly affected as shown by qRT-PCR (see Fig. 2*A*). The unincorporated free iron levels were similar in untreated *yjiE*$^+$ and *yjiE*$^-$ cells as expected because YjiE is inactive in the absence of HOCl. Unincorporated free iron levels were also similar in HOCl-stressed *yjiE*$^+$ and *yjiE*$^-$ cells (Fig. 2*B*). Such similar levels in HOCl-stressed and unstressed cells suggest that HOCl does not particularly damage iron-containing proteins. Significant iron release from proteins may, however, occur depending on the applied HOCl concentration as shown *in vitro* for lactoperoxidase (32). Therefore, a direct effect of YjiE on intracellular unincorporated iron levels cannot be observed because HOCl stress does not increase iron levels. Thus, the role of YjiE-regulated genes upon HOCl stress is apparently multifaceted, and they may contribute collectively to cell survival.

YjiE Forms Unusually Large Oligomers—Many LTTRs form dimers or tetramers (16). We thus analyzed the oligomerization state of purified YjiE by aUC. In sedimentation equilibrium experiments, we determined a molecular mass of ~420 kDa for C-terminally His-tagged (YjiE-His) and untagged YjiE, suggesting that it forms a dodecamer under equilibrium conditions (YjiE monomer, 35 kDa). In sedimentation velocity experiments, YjiE sedimented with an *s* value of 11.1 S ± 0.3 S independent of the protein concentration within the tested range of 0.6–15 μM (Fig. 3*A*). In agreement with the sedimentation equilibrium experiments, two-dimensional spectrum analysis yielded a molecular mass of 395 ± 10 kDa for the 11.1 S particles and a frictional ratio of $f/f_0 = 1.66$, suggesting that the YjiE

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

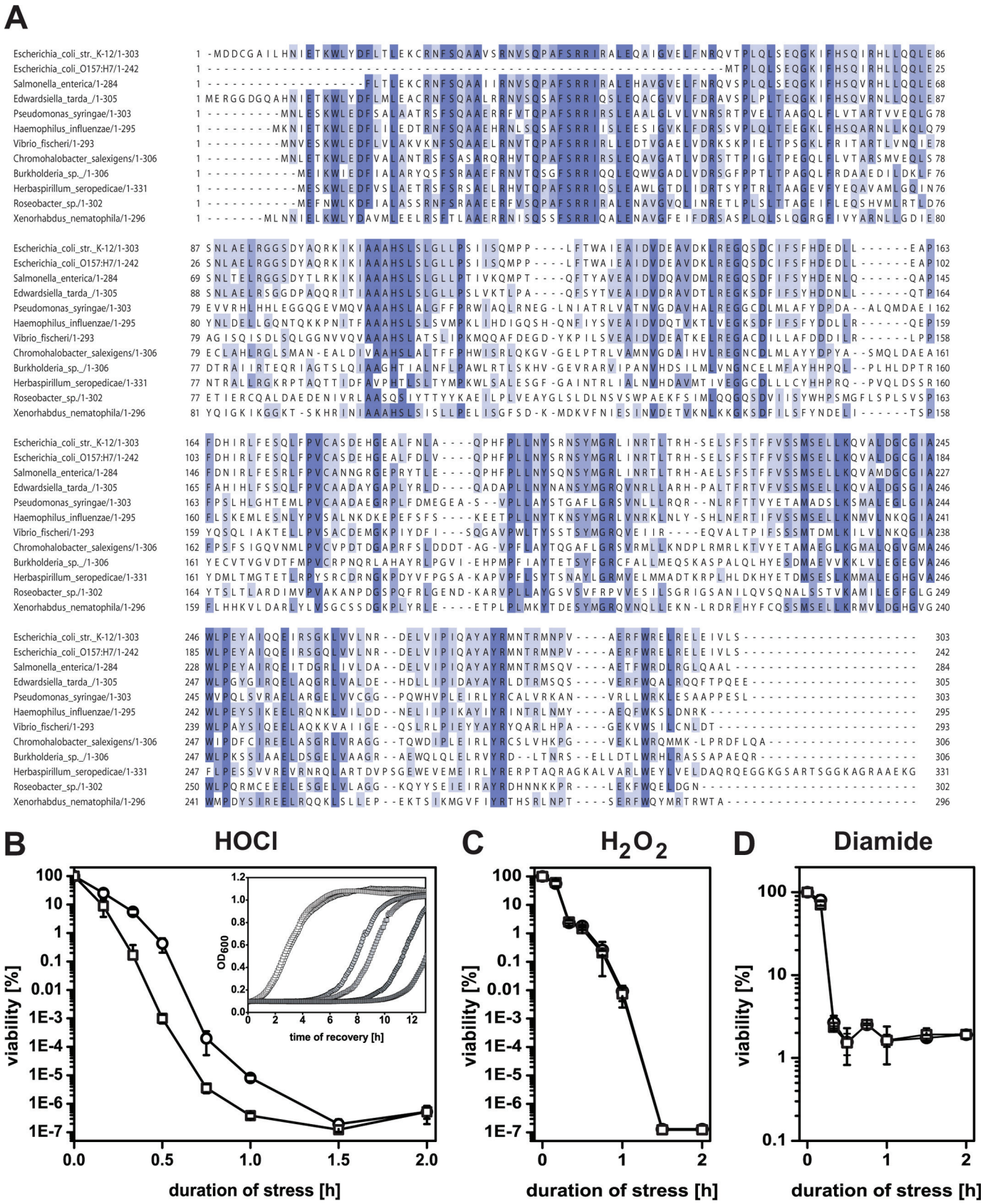


FIGURE 1. *A*, sequence alignment of YjiE from 10 representative species from α-, β-, and γ-proteobacteria and eukaryotes using ClustalW. Conserved amino acids are highlighted in *blue*, and the degree of conservation is proportional to the darkness of the color. *B–D*, growth of C600 (WT, *circles*) and KMG214 cells (*yjiE*$^-$, *squares*) at different stresses. Cells were grown at 37 °C, supplemented with the indicated stressor, and either viability or recovery analyzed. Viability at 4 mM HOCl (*B*), 4 mM H_2O_2 (*C*), and 5 mM diamide (*D*), respectively. Shown is the mean ± *error* from two to six independent experiments. *Inset*, recovery of cells at 0 mM (*open symbols*), 2.8 mM (*light gray symbols*), and 3 mM HOCl (*dark gray symbols*). Shown is the result of one representative experiment.

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

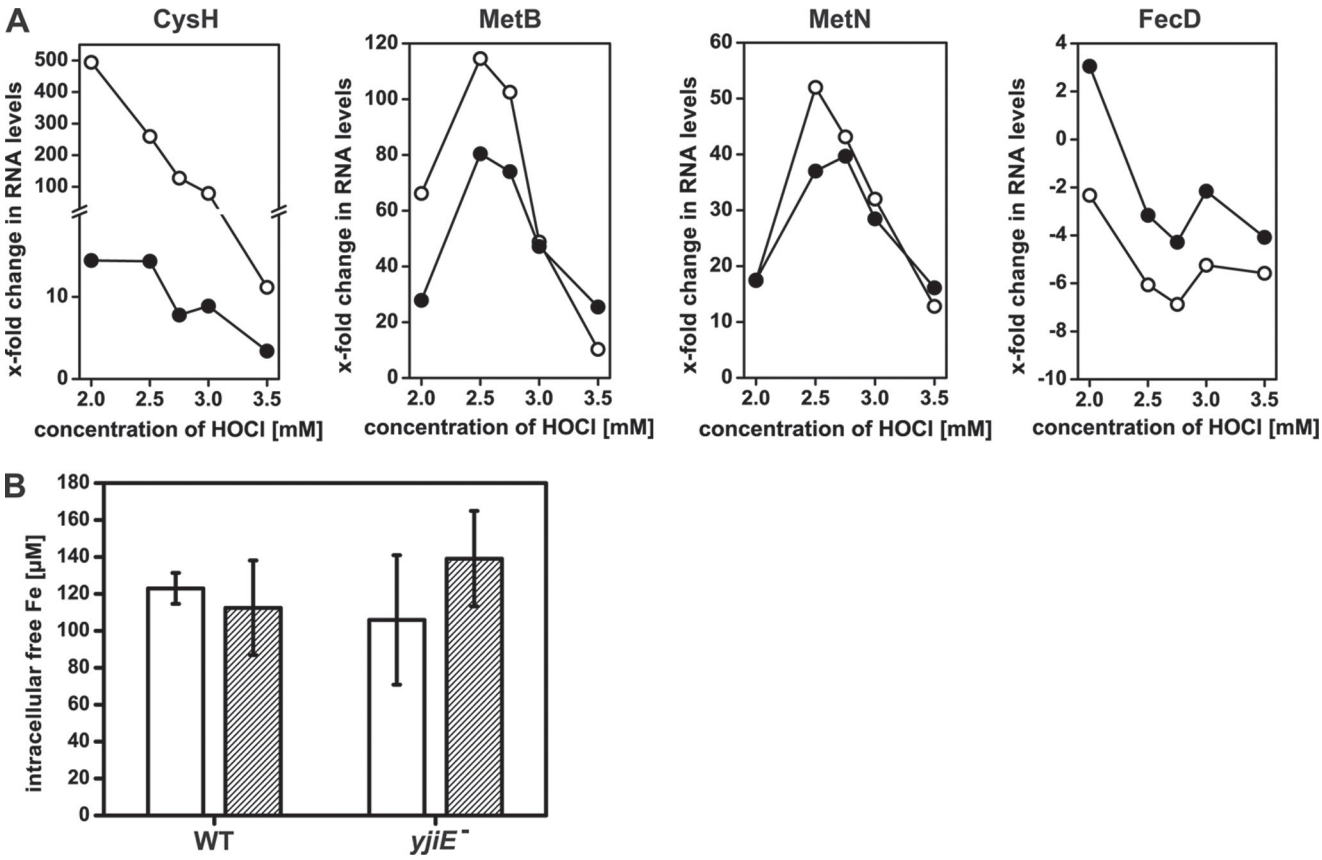


FIGURE 2. *A*, qRT-PCR analysis of the RNA levels of CysH, MetB, MetN, and FecD at the indicated concentration of HOCl. WT (*open symbols*) and *yjiE*$^-$ cells (*closed symbols*) were grown at 37 °C and supplemented with HOCl. After 10 min, 5× concentrated LB was added to quench HOCl, cells were harvested, RNA was isolated, and the RNA levels were analyzed by qRT-PCR using specific primer pairs. Shown is the result of one representative experiment. Please note that CysH, MetB, and MetN are up-regulated, whereas FecD is down-regulated. *B*, analysis of intracellular free iron levels in WT and *yjiE*$^-$ cells. Cells were cultivated in LB medium at 37 °C without stress (*white bars*) or subjected to stress (2.75 mM HOCl, 10 min; *striped bars*) and prepared for EPR analysis. Shown is the mean ± *error* from two to four independent experiments.

oligomer adopts an elongated shape in solution (data not shown). (Note that an f/f_0 value of 1 is expected for a spherical particle.)

To obtain further structural information about YjiE, we subjected the samples to negative stain transmission electron microscopy. YjiE adsorbed onto carbon-coated grids and stained with uranyl acetate mainly formed ring-like pentagonal, hexagonal, and heptagonal structures with hexagons being the predominant assembly form (Fig. 3, *B–D*). The hexagons have a diameter of 24 nm with a segment length and width of ~11 and 3 nm, respectively. The height of all oligomers is ~6 nm, as indicated by three-dimensional reconstructions (Fig. 3*C*, *lower panel*). According to hydrodynamic simulations, the *s* values of the corresponding three-dimensional volumes are between 10.4 and 11.9 S and fit well the observed mean *s* of ~11 S (supplemental Fig. 1*A*).

YjiE in Lysates Forms Small and Large Oligomeric Species—To test whether YjiE also forms atypical large complexes *in vivo*, we fused a CCGPCC tag (flash tag), which is known to specifically react with the biarsenical fluoresceine analog FlAsH forming strongly fluorescent adducts (29), to the C terminus of YjiE (yielding YjiE-flash). YjiE-flash showed a wild-type-like oligomerization and DNA binding (see below) and conferred wild-type-like HOCl resistance to Δ*yjiE* cells (data not shown). We then labeled YjiE-flash with the FlAsH dye *in vitro*, *in vivo*, and in lysates to form fluorescent YjiE-flash (YjiE-flash*) and analyzed the lysates by sucrose gradient centrifugation (supplemental Fig. 1*C*). YjiE-flash* was detected in two fractions, in which it was distributed equally, and co-migrated with proteins of molecular weights between 140–380 kDa. A smaller fraction migrated at ~70 kDa, presumably dimers (supplemental Fig. 1*C*, fractions 16/18). We then analyzed YjiE-flash* by aUC monitoring fluorescence. Purified YjiE-flash* showed a wild-type-like *s* value of 10.9 S (see Fig. 5*A*, *black line*). To detect YjiE-flash* fluorescence in cell lysates, *yjiE*-flash had to be expressed to ~0.1% of the total cellular protein (~100-fold greater than wild-type levels). Labeling was YjiE-specific as a lysate of FlAsH-labeled cells that did not express *yjiE*-flash showed no significant fluorescence (supplemental Fig. 1*B*, *gray line*). YjiE-flash* sedimented predominantly with 10.6 S (Fig. 3*E* and supplemental Fig. 1*B*, *black line*), demonstrating that YjiE dodecamers form in cell lysates. As in sucrose gradient centrifugation, smaller YjiE particles (4.1 and 7.1 S) were detected in addition to the 11 S particles. Two-dimensional spectrum analysis and hydrodynamic estimations from the oligomeric three-dimensional structures (see supplemental Fig. 1*A*) estimate that the 4.1 S particles correspond to dimers, whereas the 7.1 S particles are likely to be tetramers (Fig. 3*E*). The ratio of small to large oligomers depended on the cellular concentration of YjiE. Smaller oligomers (*i.e.* dimers, tetramers) comprised the most

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

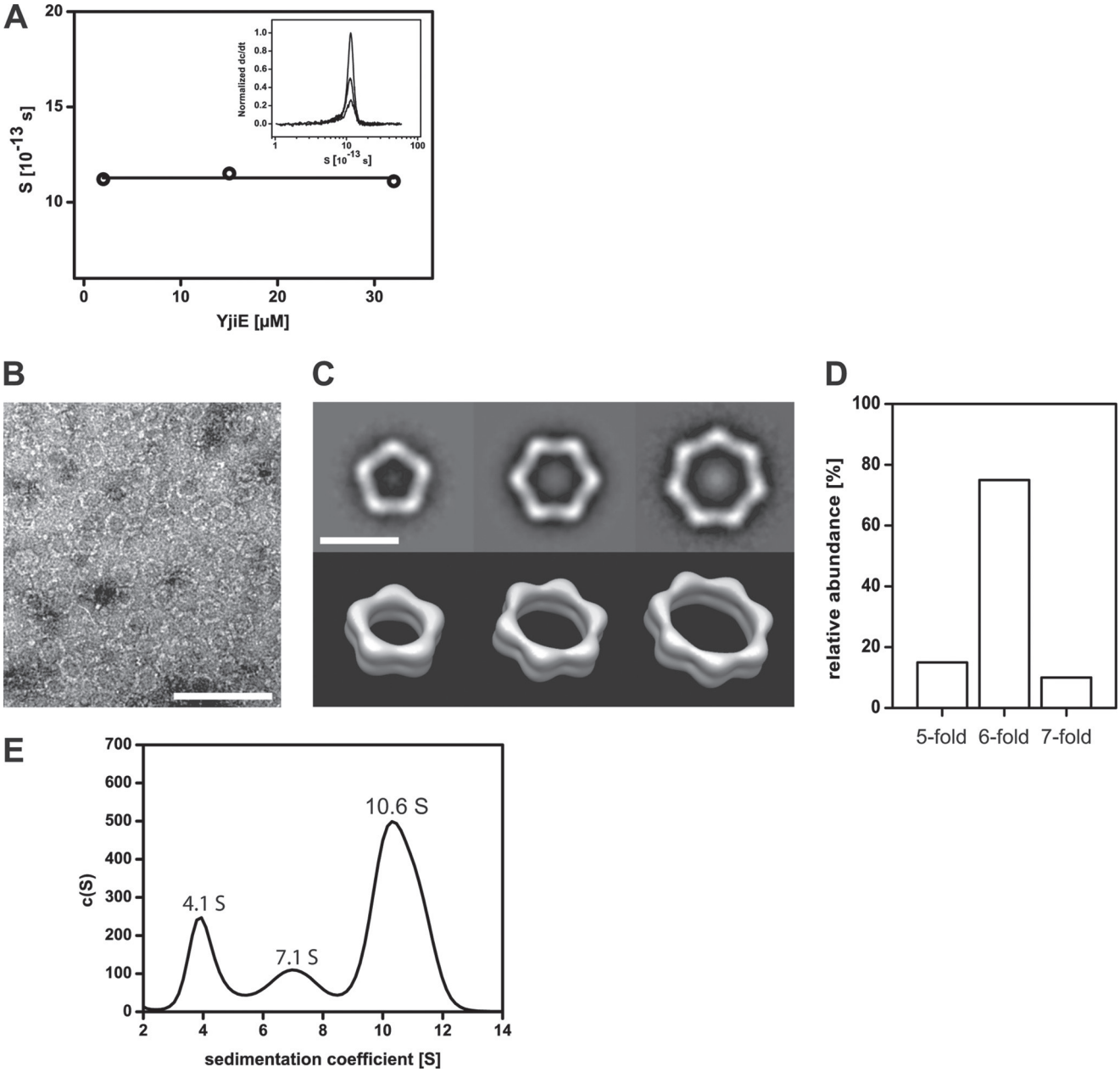


FIGURE 3. *A*, concentration-dependent analysis of the sedimentation coefficient of YjiE. The indicated concentrations of YjiE in storage buffer were analyzed by aUC. *Inset*, sedimentation coefficient distribution of 15, 3, and 0.6 μM YjiE using the dC/dT method. Sedimentation was performed at 35,000 rpm. *B*, negative stain transmission electron microscopy image of YjiE (0.1 mg/ml) negatively stained with uranyl acetate. *Scale bar*, 100 nm. *C*, typical class averages of the pentagonal, hexagonal, and heptagonal YjiE oligomers (*upper panel*) and corresponding surface representations of the simulated three-dimensional structures (*lower panel*). *Scale bar*, 20 nm. *D*, distribution of oligomers shown in *C*. *E*, YjiE-flash that was FlAsH-labeled in lysates was analyzed by aUC, and fluorescence was monitored. The 4.1 S, 7.1 S, and 10.6 S YjiE particles likely correspond to dimers, tetramers, and dodecamers.

abundant species in wild-type *E. coli* cells, whereas large oligomers (*i.e.* dodecamers) were detected predominantly when *yjiE* was overexpressed as used for purification purposes (as inferred from analytical gel filtration of cell lysates; data not shown). These results indicate that the YjiE oligomers are in an equilibrium governed by the cellular concentration of YjiE.

YjiE Binds to DNA—DNA binding is a prerequisite for the activity of YjiE as an LTTR and occurs independent of activation (16). To test for DNA binding, we mixed purified YjiE with fluorescent labeled DNA (Alexa Fluor 488 DNA) and subsequently analyzed the samples by FA and aUC monitoring fluorescence. As double-stranded DNA substrates, we chose the promoter regions of two of the identified target genes, *cydA* and *metN* (158 bp in length, comprising the 106-bp upstream region of the respective gene) and the *yjiE* promoter region in our analysis. First, we titrated YjiE to Alexa Fluor 488-labeled DNA and monitored changes in FA. Changes in FA were observed with all three DNA substrates and followed a sigmoidal binding curve with half-maximal amplitudes at ~0.3 μM YjiE (Fig. 4*A*). The change in FA could be reverted by addition of excess unlabeled YjiE promoter DNA, demonstrating that binding of YjiE to DNA is dynamic and reversible (supplemental Fig. 1*D*). To corroborate further evidence for the interaction between YjiE and the double-stranded DNA substrates, we subjected the

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

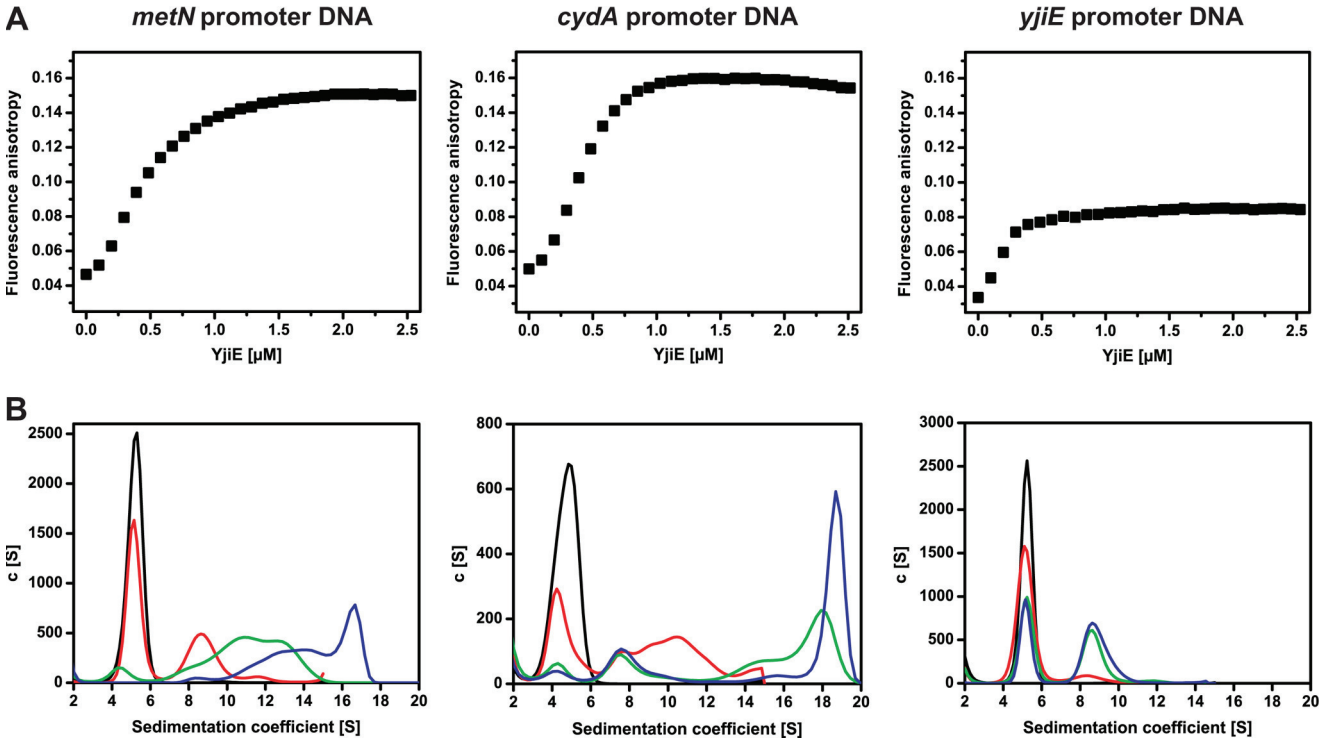


FIGURE 4. *A*, binding of reduced YjiE to Alexa Fluor 488 DNA was monitored by FA. TCEP-reduced YjiE at the indicated concentrations was added stepwise to 10 nM of the indicated Alexa Fluor 488 DNA in 100 nM steps. The change in FA upon titration of YjiE was measured using a Jasco FP-6500 fluorescence spectrometer. *B*, binding of YjiE to Alexa Fluor 488 DNA was analyzed by aUC, and fluorescence was monitored. Reduced YjiE was added to the indicated DNA at a ratio of 10:1 (*red*), 40:1 (*green*), and 80:1 (*blue*) for *metN* and *cydA* DNA and 10:1 (*red*), 24:1 (*green*), and 48:1 (*blue*) for *yjiE* DNA (at 30 mM NaCl).

samples to aUC and monitored the sedimentation of Alexa Fluor 488 DNA in the absence and presence of YjiE. Alexa Fluor 488 DNA sedimented with 5.1 S. Because we monitored DNA-fluorescence, any shift in the *s* value reports on the interaction of YjiE with the DNA. Upon titration of YjiE to DNA, the amount of free DNA decreased, and we observed a shift toward larger *s* values, demonstrating the formation of DNA-YjiE complexes. YjiE interacted with all three DNA substrates; however, the YjiE-*yjiE* DNA complex (8.7 S) was significantly smaller compared with complexes between YjiE and *cydA* and *metN* DNAs (~16–20 S) (Fig. 4, *A* and *B*). This is in agreement with the *yjiE* DNA yielding the smallest FA amplitude. The 8.7 S complex (Fig. 4*B*) fits to an YjiE-dimer bound to DNA (according to two-dimensional spectrum analysis and simulations). 8 S complexes were also populated in *metN* and *cydA* samples at intermediate YjiE concentrations, whereas the larger ~16–20 S complexes were populated at high YjiE concentrations, suggesting that target DNA might be bound by multiple YjiE molecules (presumably dimers). To exclude aggregate formation, we subjected these samples to SDS-PAGE analysis and found that YjiE was soluble after fractionation by centrifugation (see Fig. 6*A*, *inset*, *lanes 1* and *2*). We conclude that YjiE exhibits the ability to distinguish between target DNA and nonspecific DNA (*i.e. yjiE* DNA) and forms distinct DNA-YjiE complexes.

YjiE Dissociates in Presence of DNA—In vitro, free YjiE sediments with ~11 S, but the DNA-YjiE complexes at a given DNA:YjiE ratio sedimented with smaller *s* values. We also detected smaller oligomers *in vivo* (see above), suggesting that the dodecamer dissociates into smaller particles and that this process might be DNA-driven. To visualize changes in YjiE oligomerization, we monitored the sedimentation of YjiE-flash* in the absence and presence of unlabeled DNA. YjiE-flash* (50 nM) sedimented with ~11 S in the absence of DNA. In the presence of equimolar concentration of DNA, 3.7 and 5.5 S particles occurred in addition to the 11 S particles (Fig. 5*A*), indicating dodecamer dissociation into dimers and tetramers in the presence of DNA substrates.

The presence of considerably smaller oligomers was confirmed by analyzing samples containing YjiE and DNA by negative stain transmission electron microscopy (Fig. 5, *B–D*). Smaller oligomers (*i.e.* ~80%) assembled into small, ring-like structures, assumedly tetramers, with mean diameters of ~11 nm (Fig. 5, *B–D*). An overlay of the tetramer with the dodecameric structure elements shows that the basic building block of the dodecamer is likely to be a dimer (see colored substructures in Fig. 5*C*; see also supplemental Fig. 1*A*).

YjiE Forms Predominantly Smaller Oligomers in HOCl-stressed E. coli Cells—Given that YjiE dissociates in the presence of DNA and to test whether and how YjiE is activated *in vivo*, the oligomerization state of YjiE was analyzed in lysates prepared from HOCl-stressed *E. coli* cells. To this end, *E. coli* cells were labeled with FlAsH prior to the induction of *yjiE*-flash expression (*i.e. in vivo* labeling). (Please note that *yjiE*-flash was overexpressed, yielding ~100 times the wild-type levels.) Shortly before cell lysis, cells were either treated with HOCl or left untreated, and then the lysate prepared and analyzed by aUC. This ensured low and very similar YjiE levels under both conditions. YjiE-flash* showed 3.8 S, 5.9 S, and 10.5 S particles in the absence of HOCl, which correspond to dimers, tetramers, and dodecamers (Fig. 6*A*, *black line*). Similar species

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

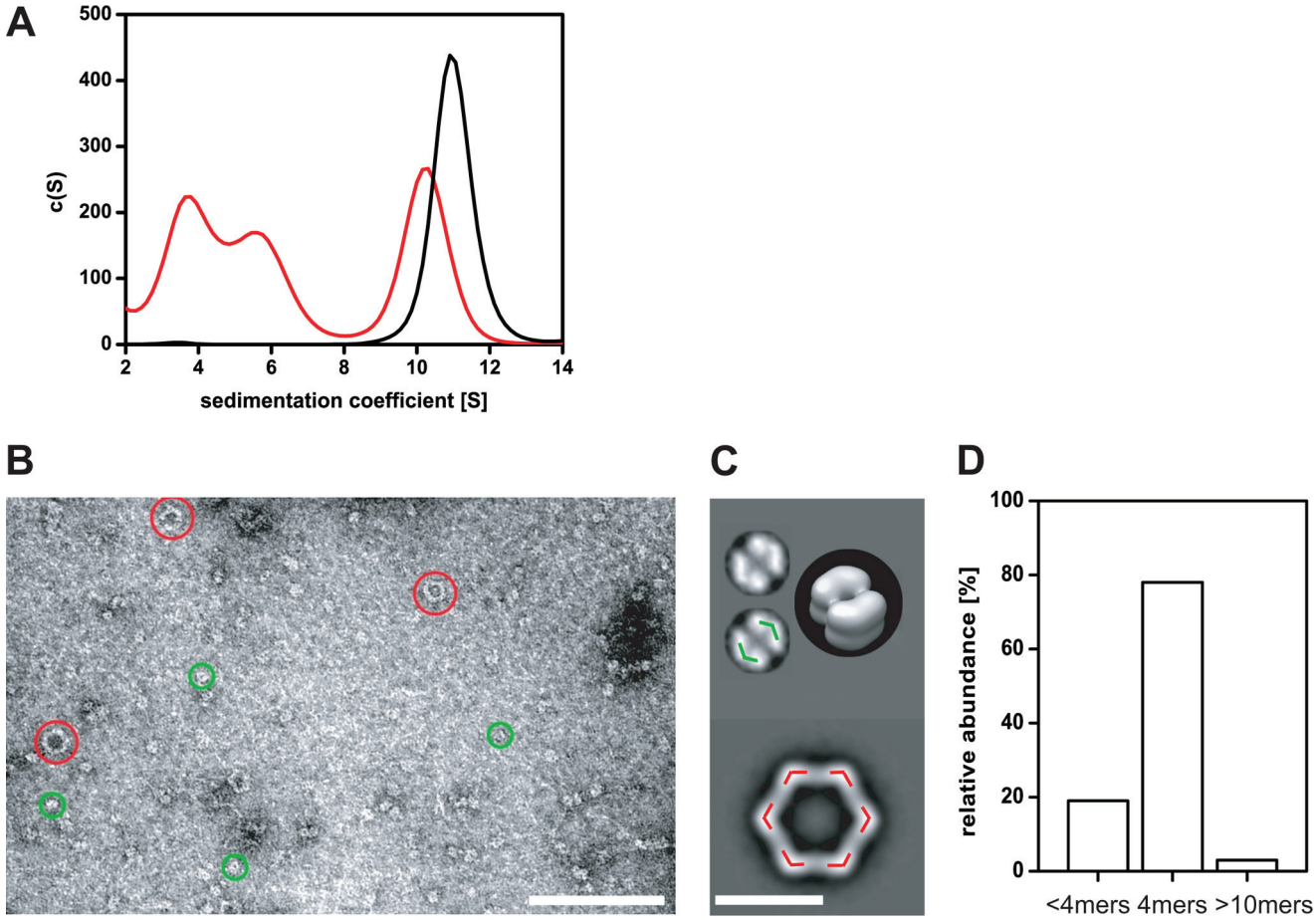


FIGURE 5. *A*, 50 nM *yjiE* DNA and 50 nM YjiE-flash* (at 400 mM NaCl) were analyzed by aUC monitoring fluorescence. Dodecameric YjiE-flash* alone (*black line*) sedimented with ~11 S. YjiE-flash* dissociated into smaller oligomers with 3.7 S and 5.5 S in the presence of DNA (*red line*), most likely representing dimers and tetramers. *B*, electron microscopic image of YjiE (0.018 mg/ml, 50 mM NaCl) that was incubated with an equimolar ratio of 315 bp *yjiE* DNA and stained with uranyl acetate. Please note large oligomers (*red*) and smaller oligomers (*green*). *Scale bar*, 100 nm. *C*, *upper panel*: typical class average (*top view*) of YjiE tetramers shown in *B*. The *green* overlay indicates the positions of YjiE dimers of an YjiE tetramer. *Lower panel*, *red* overlay indicating the positions of YjiE dimers on the top view class average of an YjiE dodecamer. *Inset*, surface representation of the simulated tetrahedral three-dimensional structure. *Scale bar*, 10 nm. *D*, distribution of oligomers shown in *B*.

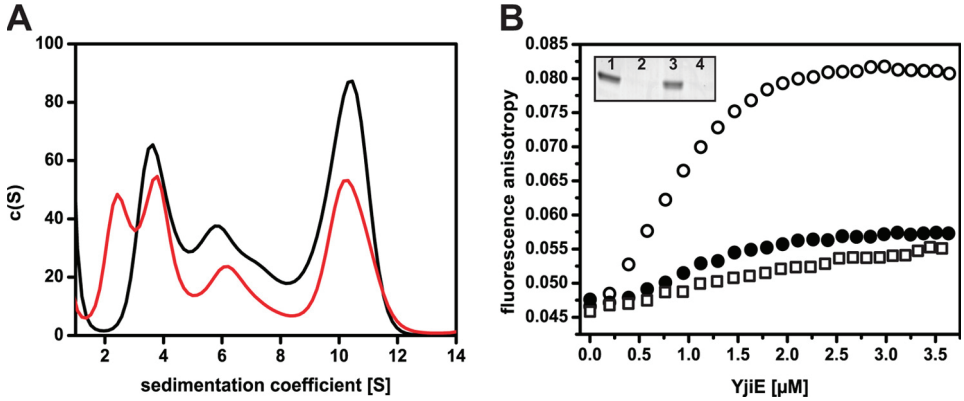


FIGURE 6. *A*, YjiE in HOCl-stressed cells forms a higher proportion of small oligomers compared with YjiE in non-stressed cells. *yjiE*-flash expressing cells were *in vivo* FlAsH-labeled, and cultures were split and either left untreated (*black line*) or HOCl-stressed (2 mM, 5 min; *red line*) immediately before cell lysis. Then, lysates were analyzed by aUC monitoring fluorescence. *B*, YjiE-His purified from HOCl-stressed cells (*open circles*) shows a higher DNA-binding capacity than YjiE-His purified from non-stressed cells (*filled circles*) or *in vitro* HOCl-treated YjiE-His (HOCl:YjiE 10:1; *squares*). Binding of YjiE to Alexa Fluor 488 *metN* DNA was monitored by FA. YjiE protein was not reduced prior to analysis and was added in 200 nM steps to 10 nM DNA. The change in FA was measured using a Jasco FP-6500 fluorescence spectrometer. *Inset*, samples after FA analysis were spun, and the supernatant (*1* and *3*) and the pellet (*2* and *4*) were analyzed by SDS-PAGE. Samples correspond to YjiE from non-stressed cells (*1* and *2*) and YjiE from HOCl-stressed cells (*3* and *4*).

were observed after HOCl stress, but their distribution was shifted toward the smaller oligomers (Fig. 6*A*, *red line*). An additional species was observed with 2.6 S, likely corresponding to a monomer (see supplemental Fig. 1*A*). These small oligomers may represent the physiologically relevant species, whereas the dodecamer may be a storage form. Considering

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

that YjiE-flash levels were ~100 times the wild-type levels, and the oligomer distribution depends on the cellular YjiE concentration, it seems reasonable that the effect of HOCl on YjiE would be even stronger pronounced in wild-type cells.

YjiE Is Not Directly Activated upon HOCl Treatment in Vitro—LTTRs are typically regulated by binding of and/or modification by co-inducer molecules. To this end, we tested whether the activation of the protective function of YjiE to *E. coli* cells is by direct interaction of HOCl with YjiE. First, purified YjiE was incubated with a 5–10-fold molar excess of HOCl, and its secondary and quaternary structure was examined for conformational changes. A 10-fold molar excess of HOCl was found sufficient to activate the redox-regulated chaperone Hsp33 and to cause major unfolding of the chaperone GrpE (8). In the case of YjiE, four of the five cysteines of YjiE were oxidized as opposed to one to two oxidized cysteines in untreated YjiE, which is due to air oxidation (as inferred from Ellman's assay). However, neither the secondary structure and thermal stability nor the dodecameric ring-like conformation of YjiE was altered significantly as shown by circular dichroism, aUC, and negative stain transmission electron microscopy (supplemental Fig. 3, *A–D*). Also, the ability of HOCl-treated YjiE to interact with DNA was similar to the untreated protein (Fig. 6*B*, *squares* and *filled circles*). (Note that samples were not reduced prior to analysis.) indicating that neither binding of HOCl to YjiE nor oxidation of cysteine residues *per se* are sufficient to activate YjiE *in vitro*. Similarly, purified YjiE that was treated with reaction products of HOCl with iron (to generate hydroxyl radicals) and ammoniumchloride or Tris (to generate chloramines) showed a low DNA-binding activity (data not shown).

Next, we overexpressed and purified YjiE from HOCl-stressed cells (YjiE-HOCl). Similar to YjiE purified from unstressed cells, YjiE-HOCl formed a dodecamer in solution (data not shown) and exhibits a secondary structure that is very similar to untreated YjiE, indicating that no major structural and conformational changes occurred (data not shown). In sharp contrast to purified YjiE that was HOCl-treated *in vitro*, YjiE-HOCl showed a high change in anisotropy that was significantly larger than that of untreated YjiE (Fig. 6*B*, *filled circles*). (Note that samples were not reduced prior to analysis.) This indicates formation of large DNA-YjiE complexes and is suggestive for YjiE activation in HOCl-stressed *E. coli* cells. It is noteworthy to add that neither YjiE nor YjiE-HOCl showed any aggregation in the time course of the experiments, thus indicating that the detected changes in FA did probably not arise from aggregate formation (Fig. 6*B*, *inset*).

DISCUSSION

ROS damage macromolecules and cells, therefore making it pivotal for cells to employ response systems that are specifically activated by the ROS inflicting stress. Here, we identified *E. coli* YjiE as the first transcription factor specifically protecting cells from HOCl-derived killing. YjiE was described recently as cell density-dependent motility repressor, QseD (33). However, in this work, we did not observe an effect of YjiE on the motility of various *E. coli* strains (data not shown). YjiE is specific for HOCl and not activated upon H_2O_2 or diamide stress. This makes YjiE a very specific defense molecule for strong oxidative stress as HOCl is much more reactive toward amino acids than those ROS and causes oxidative protein unfolding (9, 34). In contrast to the specific activation of YjiE, a recent transcriptome study in *Bacillus subtilis* identified the regulator OhrR to be inactivated by HOCl. In this case, HOCl causes *S*-bacillithiolation of OhrR thus inactivating its repressor function and concomitantly up-regulating *ohrA*, which encodes a peroxiredoxin (35). Considering that OhrR is also inactivated by organic hydroperoxides leading to *S*-cysteinylation (36), this suggests that OhrR does not specifically respond to HOCl *per se* but is responsive to reactive species causing oxidation of cysteines to sulfenic acid that can form mixed disulfides.

YjiE appears to be activated in HOCl-stressed cells but not *in vitro* by HOCl directly. This may suggest that activation of YjiE is caused by some reaction product of HOCl with a cellular component or by subtle conformational changes that are sufficient for increased DNA binding but could not be detected by CD spectroscopy. Also, YjiE seems to be exclusively regulated at the level of activity. As the activation of already existing YjiE molecules is much faster than the synthesis of new YjiE, YjiE should be able to regulate the transcription of specific genes before cells are irreversibly damaged by HOCl. This fits well to the kinetics of action of HOCl, which damages cells within seconds (37) and activates the molecular chaperone Hsp33 quickly (9).

Most LTTRs are believed to form tetramers from a dimer of dimers (16). YjiE is an oligomerically versatile molecule. We observed dimers-tetramers-dodecamers with large oligomers dissociating to smaller ones in the presence of DNA. Binding of YjiE to DNA occurs very quickly (see supplemental Fig. 1*D*) with the DNA binding competent small oligomers being potentially quickly removed from the small oligomer-dodecamer equilibrium, thus leading to dissociation. This has not been observed for a transcription factor before and may be unique for YjiE. The advantage may be that once the cellular YjiE level exceeds a certain threshold, YjiE molecules form a dodecameric storage form that can dissociate and become activated quickly on demand. Yet, the main building block of YjiE is likely a dimer, similar to other LTTRs. Dimers may associate to tetramers that apparently represent the DNA-binding state in the case of YjiE, with their ratio being determined by the cellular YjiE level or the availability of target genes. Based on the observation that YjiE showed similar affinity but forms different complexes with nonspecific or target DNA, it appears that the regulation of transcriptional activity of target genes may predominantly involve acquisition of the right amount of YjiE molecules into the functional complex. However, the exact mechanism of YjiE activation needs yet to be unraveled.

Similar to the other *E. coli* oxidative stress transcription factors OxyR and SoxR, YjiE is specifically activated by a ROS. Regulation of many genes is also similar to OxyR and SoxR because the inflicted damage is multifaceted, yet it is unusual for LTTRs that typically regulate only few genes (16). For SoxR and OxyR, the corresponding gene products decrease the extent of intracellular oxidative stress (*e.g.* catalase, superoxide dismutase) and repair damaged macromolecules (15, 38). YjiE differs from OxyR and SoxR as it does not regulate genes that

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

are apparently involved in the degradation of ROS. Whether the genes with unknown function play a central role in the protection of *E. coli* from HOCl stress needs to be analyzed. The main focus of the response orchestrated by YjiE appears to generally decrease the intracellular load of ROS by replenishing methionine and cysteine and down-regulating Fur-regulated genes involved in iron acquisition. OxyR and SoxR activate *fur* expression upon H_2O_2 or superoxide (*i.e.* redox-cycling drugs (14)) treatment by ~10-fold, leading to a 2-fold increase in Fur protein (39). Although Fur-RNA levels were only slightly increased upon HOCl stress (as inferred from gene expression analysis and qRT-PCR; data not shown), this indicates that the control of iron homeostasis in *E. coli* is an integral part of the antioxidant defense response. In the case of HOCl stress, some but not all Fur-controlled genes are affected, suggesting some kind of fine-tuning of iron homeostasis that is facilitated by YjiE. Whether YjiE regulates genes directly or maybe in cooperation with another regulator is unclear as of now and needs to be analyzed.

In vitro and *in vivo*, HOCl can undergo Fenton reaction in the presence of iron generating cytotoxic hydroxyl radicals that cause cell damage (3, 4). One could speculate that HOCl-induced oxidative protein unfolding (9) damages iron-containing proteins, thereby increasing free iron levels and requiring immediate regulation of iron homeostasis genes. However, such increased iron levels after HOCl stress are not evident from our analysis, in contrast to the increase observed upon H_2O_2 stress (40). Even if HOCl stress increased iron levels, YjiE potentially does not directly affect intracellular free iron levels, considering that it acts as a repressor of iron acquisition genes. Repression is a slow-acting process; even though transcription and protein synthesis are repressed, cellular protein levels will remain similar until the respective protein is degraded or diluted out by cell growth.

To summarize, we identified the first, to our knowledge, bacterial transcription factor that specifically protects *E. coli* cells from HOCl stress but not peroxide or diamide stress. YjiE is present in proteobacteria and eukaryotes, suggesting that YjiE-mediated protection from HOCl stress arose early in evolution and is maintained throughout the kingdoms.

Acknowledgments—We thank Bernd Bukau, Barry Wanner, and Regine Hengge for strains/plasmids and Ursula Jakob, Johannes Buchner, Ryan Frisch, Robert Bender, Stefan Gleiter, Hauke Lilie, Jirka Peschek, and Sevil Weinkauf for discussions. James Imlay is gratefully acknowledged for discussions and comments on the manuscript, and Yuanyuan Liu is acknowledged for technical assistance. EPR analysis was performed at the Illinois EPR Research Center. Calculations were performed on the UltraScan LIMS cluster (Bioinformatics Core Facility, University of Texas Health Science Center, San Antonio), the Lonestar cluster (Texas Advanced Computing Center), and the National Supercomputer HLRB-II at the Leibnitz-Rechenzentrum Munich, Germany.

REFERENCES

1. Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., and Lee, W. J. (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310,** 847–850
2. Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H., and 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
3. Candeias, L. P., Stratford, M. R., and Wardman, P. (1994) Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron(II) complex. *Free Radic. Res.* **20,** 241–249
4. Dukan, S., and Touati, D. (1996) Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* **178,** 6145–6150
5. Davies, M. J. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* **1703,** 93–109
6. Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57,** 395–418
7. Dukan, S., Dadon, S., Smulski, D. R., and Belkin, S. (1996) Hypochlorous acid activates the heat shock and soxRS systems of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62,** 4003–4008
8. Wang, S., Deng, K., Zaremba, S., Deng, X., Lin, C., Wang, Q., Tortorello, M. L., and Zhang, W. (2009) Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **75,** 6110–6123
9. Winter, J., Ilbert, M., Graf, P. C., Ozcelik, D., and Jakob, U. (2008) Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell* **135,** 691–701
10. Rosen, H., Klebanoff, S. J., Wang, Y., Brot, N., Heinecke, J. W., and Fu, X. (2009) Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 18686–18691
11. Jakob, U., Muse, W., Eser, M., and Bardwell, J. C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96,** 341–352
12. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., and Jakob, U. (2005) Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell* **17,** 381–392
13. Mongkolsuk, S., and Helmann, J. D. (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* **45,** 9–15
14. Gu, M., and Imlay, J. A. (2011) The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol. Microbiol.* **79,** 1136–1150
15. Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **183,** 4562–4570
16. Maddocks, S. E., and Oyston, P. C. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154,** 3609–3623
17. Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105,** 103–113
18. Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D., and Hryniewicz, M. M. (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
19. Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M. A., Dix, I., Sola, M., and 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
20. Bender, R. A. (2010) A NAC for regulating metabolism: The nitrogen assimilation control protein (NAC) from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **192,** 4801–4811
21. Sainsbury, S., Lane, L. A., Ren, J., Gilbert, R. J., Saunders, N. J., Robinson, C. V., Stuart, D. I., and Owens, R. J. (2009) The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **37,** 4545–4558
22. Barth, E., Gora, K. V., Gebendorfer, K. M., Settele, F., Jakob, U., and Winter, J. (2009) Interplay of cellular cAMP levels, σS activity, and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155,** 1680–1689
23. Liu, Y., Bauer, S. C., and Imlay, J. A. (2011) The YaaA protein of the *Escherichia coli* OxyR regulon lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron. *J. Bacteriol.* **193,** 2186–2196

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012

24. Chen, J., Feige, M. J., Franzmann, T. M., Bepperling, A., and Buchner, J. (2010) Regions outside the α-crystallin domain of the small heat shock protein Hsp26 are required for its dimerization. *J. Mol. Biol.* **398,** 122–131
25. MacGregor, I. K., Anderson, A. L., and Laue, T. M. (2004) Fluorescence detection for the XLI analytical ultracentrifuge. *Biophys. Chem.* **108,** 165–185
26. Brookes, E., Cao, W., and 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
27. Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T. M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., Weinkauf, S., and Buchner, J. (2009) The eye lens chaperone α-crystallin forms defined globular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 13272–13277
28. van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R., and Schatz, M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.* **116,** 17–24
29. Griffin, B. A., Adams, S. R., and Tsien, R. Y. (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281,** 269–272
30. Ignatova, Z., and Gierasch, L. M. (2008) Chapter 3: A fluorescent window into protein folding and aggregation in cells. *Methods Cell Biol.* **89,** 59–70
31. McHugh, J. P., Rodríguez-Quinoñes, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E., and Andrews, S. C. (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278,** 29478–29486
32. Souza, C. E., Maitra, D., Saed, G. M., Diamond, M. P., Moura, A. A., Pennathur, S., and Abu-Soud, H. M. (2011) Hypochlorous acid-induced heme degradation from lactoperoxidase as a novel mechanism of free iron release and tissue injury in inflammatory diseases. *PLoS One* **6,** e27641
33. Habdas, B. J., Smart, J., Kaper, J. B., and Sperandio, V. (2010) The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *E. coli*. *J. Bacteriol.* **192,** 3699–3712
34. Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem. Res. Toxicol.* **14,** 1453–1464
35. Chi, B. K., Gronau, K., Mader, U., Hessling, B., Becher, D., and Antelmann, H. (2011) *Mol. Cell Proteomics* **10,** M111.009506
36. Lee, J. W., Soonsanga, S., and Helmann, J. D. (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104,** 8743–8748
37. Barrette, W. C., Jr., Albrich, J. M., and Hurst, J. K. (1987) Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55,** 2518–2525
38. Blanchard, J. L., Wholey, W. Y., Conlon, E. M., and 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
39. Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D., and Storz, G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. *J. Bacteriol.* **181,** 4639–4643
40. Jang, S., and Imlay, J. A. (2007) Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J. Biol. Chem.* **282,** 929–937

Downloaded from www.jbc.org at TU MUENCHEN, on November 18, 2012