

## Stoffwechsel der Mikroorganismen II (SS 2002)

<b>Genexpression, Proteinexport, Regulation, Zellteilung, Signalübertragung</b>	
<b>Programm:</b>	
1. Das bakterielle Genom und Replikation / Plasmide / Prinzip der Gentechnik 2. Transkription 3. Introns bei Bakterien 4. Von der RNA zum Protein (Translation) 5. Peptid-"tagging" bei der Proteinsynthese fehlerhafter mRNA 6. Proteinexport bei Bakterien 7. Proteinfaltung in Bakterien 8. Regulation der Genexpression 9. Zellteilung 10. Signalübertragung und Kommunikation 11. Zelldifferenzierung	
<b>Klausur:</b> Di: 16.7.01 (8.15-9.00) Mo: 22.7.01 (8.15-9.00) Nachholklausur	<b>Empfohlene Bücher:</b> Kornberg & Baker: "DNA Replication" Stryer: "Biochemie" Brock: "Biology of Microorganisms" Neidhardt et al. "E. coli and Salmonella: Cellular and molecular biology" Lengeler et al. "Biology of the procaryotes"

**1. Das bakterielle Genom und Replikation**

Das Bakterien-Chromosom; strukturelle Unterschiede zu den eukaryotischen Chromosomen; Chargaff-Regeln; die DNA-Doppelhelix; Ablauf der DNA-Replikation: (Initiation, Replikationsgabel-Elongation, Termination); Tochterstrangsynthese am "leading" und "lagging" Elternstrang; beteiligte Enzyme an der Replikationsgabel; Charakterisierung der Enzyme: Helikasen, Replikations-Protein, Topoisomerasen; Einzelstrang-Bindproteine; Synthese von RNA-Primern (Primase, Primosom, Okazaki-Fragmente); Eigenschaften der 3 Typen an DNA Polymerasen (I, II, III) in *E. coli*; Korrekturlesen durch 3' → 5' - Exonuklease-Aktivität; Schleifen-(loop)- Modell; Der Origin: Sequenz des oriC; Terminus-Region beim *E.c.* Chromosom; Tus (terminator utilization substance); Dekatenation und Partition der Tochterchromosomen; Besonderheiten der DNA-Replikation bei Plasmiden und Bakteriophagen: "Transkriptionalen Aktivierung" bei ColE-1 Plasmid; Replikation von T7-DNA; Alternative Replikationsformen: Rolling circles: a) M13 b) G4 und c) FX174; Synthese des (+) Stranges; Histone und Histon-ähnliche Proteine: HU, IHF (Integration Host Factor), H-Protein;

**1.1. Entdeckung der Plasmide / Prinzip der Gentechnik:**

Diese Kenntnisse werden vorausgesetzt, da in anderen Vorlesungen vielfach erwähnt !! Klonierung und DNA-Sequenzierung / Genbegriff (Kenntnis ist Voraussetzung für die nachfolgenden Themen)

Voraussetzung für das erste Klonierungsexperiment waren:

- die Möglichkeit der Übertragung von Erbmaterial (Konjugation, Transduktion, Transformation),
- die Verwendung von Plasmiden als eigenständig replizierende Einheiten als Vektoren;
- die Entdeckung von Restriktionsenzymen und Ligasen;

d) die Entwicklung der Techniken für die DNA-Synthese und DNA-Sequenzierung;

### 3. Transkription:

Das Gen aus heutiger Sicht; Struktur und Funktion der DNA-abhängige RNA-Polymerase; Enzymatik der RNA-Synthese (Initiation, Elongation, Termination); Promoter- und Transkriptionsterminations-Sequenzen; Fehlerrate der Transkription; Regulation der Transkription; Transkriptionsfaktoren; T7 RNA Polymerase und ihre Verwendung in der kontrollierten Genexpression; Introns bei bakteriellen Genen; RNA-Spleißen bei Bakterien;

### 4. Prokaryotische Introns

Als wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen Pro- und Eukaryonten wurde bei den Eukaryonten der Besitz einer Kernmembran und der Anwesenheit von Intron und des RNA-Spleißens angesehen.

Das erste Intron, das bei Prokaryonten entdeckt wurde, war ein Gruppe I Intron, das in dem Thymidylat-Synthasegen des *E. coli* Bakteriophagen T4 gefunden wurde (Chu *et al.*, 1984). In den folgenden Jahren wurden Gruppe I Introns auch in anderen T4-Coliphagen-Genen gefunden (Gott *et al.*, 1986), als auch in *B. subtilis* Phagen Genen (Bechhofer *et al.*, 1994; Goodrich-Blair *et al.*, 1990) und in tRNA- Genen von Cyanobakterien und Proteobakterien (Khusel *et al.*, 1990; Reinhold-Hurek and Shub, 1992; Xu *et al.*, 1990). Auch in den Genomen von Chloroplasten und Mitochondrien, welche endosymbiontische Abkömmlinge von Cyanobakterien und Proteobakterien repräsentieren, konnten Gruppe I Introns gefunden werden. Als Basis für die Einteilung in die Gruppe I Introns dient der gut untersuchte Spleiß-Mechanismus von *Tetrahymena thermophila* (Chech, 1993). Ein Charakteristikum der Gruppe I Introns ist der autokatalytische Spleiß-Mechanismus der *in vitro* in Abwesenheit von Proteinen erfolgen kann, aber GTP erfordert.

**Tabelle: Vorkommen von Introns in Bakterien und Organellen**

Gen	Vorkommen	Jahr
Gruppe I		
Thymidylat-Synthase	FT4 ( <i>E. coli</i> )	1984
andere Gene	FT4 ( <i>E. coli</i> ) Nachweis durch $\alpha$ - <sup>32</sup> P-GTP-	1986
Markierung des Introns DNA-Polymerase	FSPO1 ( <i>B. subtilis</i> )	1990
Thymidylat-Synthase	$\beta$ 22 ( <i>B. subtilis</i> )	1994
t-RNA-Gene	Cyanobakterien / Chloroplasten	1990
t-RNA-Gene	viele Bakterien	992
Gruppe II (Vorstufen der Kern Pre-mRNA-Introns)		
rolA (spielt Rolle bei Haarwurzel- Infektion)	Ri plasmid A4 <i>Agrobacterium rhizogenum</i> (rolA wird auch in Arabidopsis gespleißt!)	1994
viele Gene	<i>E. coli</i>	1994
Archaea Introns		

t- und rRNA *Halobacterium volcanii* 1985/91  
(u.a. Hyperthermophile)  
(einige *Archaea*-Introns besitzen ORFs, Endoribonuclease)

### Andere RNA-Unterbrechungen

IVS in *viele Bakterien*  
23S / 16S-rRNA-Gene RNase III

---

Häufig kodieren Introns Gene für Endonukleasen, die eine Rolle bei der Intronmobilität spielen (homing).

### Gruppe II Introns

Die Gruppe II Introns wurden in Cyanobakterien (*Calothrix* spp.) und Proteobakterien (*Azotobacter vinelandii*), den postulierten Vorläufern von Chloroplasten und Mitochondrien (Ferat and Michel, 1993) und auch in *E. coli* gefunden. Es ist keine GTP erforderlich.

Ähnlich wie die Gruppe I Introns besitzen auch die Gruppe II Introns eine konservierte Sekundärstruktur, die für das Spleißen essentiell ist. Diese Struktur besteht aus 6 konservierten Helices. Die Sequenzhomologien beschränken sich nur auf kurze Bereiche und auf einen herausragenden Adeninrest in Domäne 6, dem Verzweigungspunkt der Lassostruktur.

Obwohl einige Gruppe II Introns zum autokatalytischen Spleißen befähigt sind, tun sie das nur unter nicht-physiologischen Bedingungen. Die meisten benötigen Protein-Cofaktoren, einige davon sind im Intron selbst kodiert. Einige Intron ORFs kodieren für Maturasasen, die den Spleiß-Vorgang erleichtern, oder aber auch als reverse Transkriptasen (RTs) bei der Mobilität der Gruppe II Introns eine Rolle spielen.

Eine einzigartige Klasse von Introns, die keine Gemeinsamkeiten mit den bisher beschriebenen besitzt, hat man in den tRNA und rRNA-Genen von halophilen und hyperthermophilen *Archaea* gefunden. Diese Introns werden nicht autokatalytisch prozessiert, und sie besitzen nur ein halbwegs konserviertes Strukturmotiv im Intron/ Exon-Grenzbereich. Dieses Motiv wird von einem Enzym, einer RNA-Endoribonuclease erkannt, das das Intron aus der Vorläufer-RNA herausschneidet.

## 5. Von der RNA zum Protein (Translation)

Die Entschlüsselung des genetischen Codes; Informationsfluß: DNA → RNA → Protein als

"zentrales Dogma der Molekularbiologie"; Bedeutung der Polynucleotid-Phosphorylase; Charakteristika der m-RNA; Rolle von rRNA und t-RNA bei der Translation; was versteht man unter Degeneriertheit des genetischen Codes;

Beschreibung der Vorgänge bei der Initiation, Elongation und Termination der Translation; Ribosomale Bindestelle; Funktionelle Beschreibung der Kleeblatt-Struktur der t-RNA: Akzeptor-Stamm, T-U-C---Schleife, Variable Schleife, Anticodon-Schleife, D-Schleife; Ausbildung von ternären H-Brücken; strukturelle Unterschiede der beiden AUG t-RNAs; Peptidbindung erfolgt am Ribosom; Zentrum der Peptidyltransferasereaktion (23S rRNA);

Wirkungsweise der Translations-Inhibitoren: Streptomycin, Kirromycin, Erythromycin, Chloramphenicol, Fusidinsäure, Thiostrepton, Puromycin;

Beschreibung der Aktivitäten der Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen;

Berechnung der Fehlerrate der Synthetasen; Protein-Synthesegeschwindigkeit (ca 40 AS / 1 Sekunde); Schicksal des N-terminalen f-Methionins (Deformylase); Ausnahmen vom universellen genetischen Code; was versteht man unter 'Wobble-Base'; Einfluß der RBS auf die Translation bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien am Beispiel von *E. coli* und *Bacillus subtilis*;

Besonderheiten der Translation:

Cotranslationaler Einbau von Se-Cys in Formiat-DH von *E. coli*; beteiligte Enzyme bzw. Gene und anaerobe Regulation;

rRNA und tRNA werden als "Vorläufer" pre-RNAs transkribiert; an der Prozessierung und Modifizierung der Pre-RNAs beteiligt Enzyme (RNase-P, RNase-D; CCA-Nucleotidyl-Transferasen, RNaseIII); das Pre-rRNA-Transkript der rRNA-Operons ist meist in der Reihenfolge 16S - 23S - 5S rRNA angeordnet; Peptid-"tagging"; Proteinspleißen; Proteinfaltung;

## 6. Peptid-"tagging" bei der Proteinsynthese fehlerhafter mRNA

Seit langem diskutiert man die Frage, ob nicht auch die, während einer Proteinsynthese auftreten Fehler, erkannt und korrigiert werden können. 1994/95 tauchten erste Berichte mit konkreten Anhaltspunkten für eine Qualitätskontrolle bei der Translation. Fehlerhafte Proteine können entweder

- a) zerstört oder
- b) der Fehler geheilt werden.

Sie werden entweder durch proteolytische Enzyme eliminiert oder durch molekulare Chaperone in einem faltungsaktiven Zustand gehalten.

Fehlerhafte Polypeptide, die von einer defekten mRNA synthetisiert werden, sind irreparabel; die Zerstörung ist die einzige Möglichkeit. Keiler und Mitarbeiter entdeckten einen bislang völlig unbekanntem ribosomalen Translationsmechanismus bei dem naszierende Polypeptide, die von einer verkürzten fehlerhaften mRNA translatiert werden, durch eine Peptidsequenz gekennzeichnet werden, die wiederum Erkennungssequenz für eine Protease ist. Damit werden diese fehlerhaften Peptide dem gezielten proteolytischen Abbau zugeführt.

mRNAs die ohne Stopcodon enden werden mit einer C-terminalen Sequenz (...AANDENYALAA) versehen.

Für die Rettung der Ribosomen auf der mRNA ist die 10Sa RNA (*ssrA* Gen) oder auch tmRNA bezeichnet verantwortlich. kodiert wird.

Ein Teil dieser tmRNA kann in eine tRNA ähnliche Struktur falten und mit Alanin beladen werden (Komine *et al.*, 1994). Nach Übertragung der Peptidkette auf das Ala der tmRNA gehen die Ribosomen auf die Codonsequenz der tmRNA über (RNA-Hüpfen) und translatieren die 10 aa. Die Translation kann durch das Stopcodon der tmRNA korrekt beendet werden.

Der angefügte C-terminale Peptidschwanz ("tag") ist das Abbausignal für eine Schwanz-spezifische Protease, die als Tsp ("tail specific protease" oder Prc) bezeichnet wird.

1. das Ribosom wird von der defekten mRNA befreit, und
2. der Peptidschwanz führt das möglicherweise zerstörerische Peptid dem Abbau zu.

Tsp ist ein ATP unabhängige Protease, die nur eine begrenzte Fähigkeit besitzt, stabil gefaltete Proteine zu spalten

### Inteine - Proteinspleißen

to splice = spleißen, die Enden zweier Taue verflechten

Proteinspleißen ist ein neu entdeckter Vorgang, der auf Proteinebene das Äquivalent zum RNA-spleißen darstellt. Das Proteinspleißen erfolgt über ein verzweigtes Proteinintermediat. *In vitro* Untersuchungen lassen vermuten, dass die Reaktion autokatalytisch abläuft.

Die ausgeschnittenen Inteinproteine sind ortsspezifische DNA-Endonukleasen, die ihre eigene kodierende DNA-Sequenz in eine andere homologe Sequenz einbauen können, ein Vorgang, der im engl. als 'intein homing' bezeichnet wird. Diese post-translationale Prozessierung umfaßt:

- a) die präzise Exzision einer intervenierenden Proteinsequenz aus dem Precursorprotein, gekoppelt mit
- b) einer Peptidbindung zwischen den flankierenden N- und C-terminalen Proteindomänen.

In Analogie zur RNA-spleißen-Nomenklatur wird der Vorgang als Proteinspleißen bezeichnet. Das Intein (interne Proteinsequenz) stellt eine Proteinsequenz dar, die im Leserahmen innerhalb eines Precursorproteins eingebettet ist und durch Proteinspleißen ausgeschnitten (exzidiert) wird.

Das Extein (bestehend aus den externen Proteinsequenzen), setzt sich aus den, das Intein flankierenden Polypeptidketten zusammen, die ebenfalls durch Spleißen verknüpft wurden.

Mit der Entdeckung von Inteinen wurde die Vielfalt der intervenierenden Sequenzen bereichert. Inteine kommen sowohl bei Eukaryonten (Kane et al. 1990), als auch bei Archaea (Perler et al. 1992; Xu et al. 1993) und Eubakterien (Davis et al 1992 und 1994) vor.

### Die Entdeckung des Proteinspleißens

Das erste Beispiel eines Proteinspleißens wurde bei dem *Saccharomyces cerevisiae* *VMA1* Gen entdeckt. Dieses Gen kodiert für die 69 kDa katalytische Untereinheit der vakuolen Protonen ATPase (V-ATPase). Ein durchgehender ORF läßt auf ein Protein von 119 kDa schließen, wobei die N- und C-terminale Aminosäuresequenz 75% Identität mit der homologen V-ATPase Untereinheit von *Neurospora crassa* aufweist.

Diese Homologie wird durch eine 454 Kodon umfassende Sequenz unterbrochen. Diese Sequenz, als Intein bezeichnet, weist keine Homologie zu bekannten ATPase Untereinheiten auf. Schneidet man auf DNA Ebene die Intein kodierende Sequenz heraus, so wird eine voll aktive V-ATPase Untereinheit in der korrekten Größe exprimiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Intein in dem gespleißten Protein nicht enthalten ist.

Die Beteiligung eines RNA-spleißens konnte man durch Northern-blot Analysen ausschließen. Mutationen (Punkt- und Deletionsmutationen) innerhalb des Inteins führen zur Inaktivierung des Proteinspleißens; was für eine Beteiligung des Inteins am Spleißvorgang spricht.

Quantitative Untersuchungen ergaben, dass das 50 kDa große Intein und das 69 kDa gespleißte V-ATPase Protein in äquimolaren Verhältnissen gebildet werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der post-translationalen Prozessierung in 2 Proteine.

**Tabelle: Vorkommen von Inteinen bei Bakterien und Eukaryoten**

Gen (Aminosäuren)	Intein	Vorkommen	ortsspez. Endonuklease
<i>TFP 1</i> Gen 69 kDa UE V-ATPase	454	<i>Saccharomyces c.</i>	+
<i>recA</i>	440	<i>Mycobacterium</i>	?
<i>dna-pol</i>	2 Inteine 538/390	<i>Thermococcus litoralis</i> (Arch) <i>Pyrococcus</i>	+ +
<i>dna-pol</i>	537	<i>Pseudomonas</i> sp.	?

Cooper / Stevens: TIBS 20: 351-356 (1995)

Seit der ursprünglichen Entdeckung des Proteinspleißens (Kane et al 1990; Hirata et al 1990) bei Hefen wurden Inteine bei einer Reihe von Genen in Hefen, Bakterien und Archaea gefunden. Die *RecA* Gene von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* beinhalten Intein kodierende Sequenzen, die durch Proteinspleißens entfernt wurden.

### Welche Rolle spielen die Extein- bzw. Inteinsequenzen bei dem Spleißvorgang

Die N- und C-Exteine besitzen keine erkennbare Homologie, was darauf schließen läßt, dass sie für die Spleißreaktion entbehrlich sind. Verkürzt man bei der V-ATPase die Exteine bis auf 13 Aminosäurereste, so findet trotzdem noch ein Spleißens statt.

Das *M. tuberculosis* *RecA* Intein hat man zusammen mit 8 N- und 32 C-Exteinkodons in das *lacZ* Gen inseriert und in *E. coli* transformiert. In *E. coli* wurde das Fusionsprotein nicht nur gebildet, sondern auch prozessiert. Dieser Versuchsansatz wurde auf eine 'in -frame' Insertion des

*Saccharomyces cerevisiae* VMA Inteins (das keine Extein kodierende Sequenzen besaß) in das *S. cerevisiae* VAT2 Gen ausgedehnt. Auch dieses Intein wurde erfolgreich ausgeschnitten und die Exteine zu einer voll funktionierenden VAT2 zusammengefügt.

Diese Untersuchungen zeigen, dass alle Information, die für das Proteinspleißen notwendig sind, innerhalb des Inteins lokalisiert sind, also in *cis* vorliegen. Führt man innerhalb des Inteins 'in-frame' Deletionen ein, so findet kein Spleißen mehr statt. Die bekannten Inteine haben eine Größe von 360-537 Aminosäuren, die wenig Aminosäure-Sequenzhomologie aufweisen.

### Genetische Mobilität von Inteinen

Eine der größten Überraschungen bei der Entdeckung des Proteinspleißens war die, dass Inteine mobile genetische Elemente darstellen. Häufig besitzen Inteine ORFs, die für ortsspezifische Endonukleasen kodieren.

Ein konserviertes Motiv dieser Endonukleasen ist das

#### **LADLIDADG-Motiv.**

Bei *S. cerevisiae* bezeichnete man diese ortsspezifischen Endonukleasen als 'homing endonuclease' (HO).

Dieses Sequenzmotiv findet man auch bei den ORFs der Gruppe I autospleißenden Introns, die ebenfalls für deren genetische Mobilität verantwortlich sind. Die Endonukleasen vermitteln die genetische Mobilität von Gruppe I Introns in einem Vorgang der als 'intron homing' bezeichnet wird. Das Intron wird in unidirektionaler Weise in einer Kopie des Gens, das dieses Intron besitzt, auf eine andere Kopie des Gens, das dieses Intron nicht besitzt, übertragen.

#### Literatur:

Liu, X. Q. 2000. Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution. *Annu Rev Genet* 34:61-76.

Paulus, H. 2000. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu Rev Biochem* 69:447-96.

## 7. Proteinexport bei Bakterien

Typ1, 2, 3 und 4 Sekretion

Proteinsortierung bei Bakterien: cytoplasmatische Proteine, Cytoplasmamembran-Proteine, periplasmatische Proteine, äussere Membranproteine, sekretierte Proteine;

Schritte des Proteinexports: 1. Erkennung des Proteins während oder nach Translation, 2.

Hinführen an die Cytoplasmamembran, 3. vollständige oder teilweise Translokation durch die Cytoplasmamembran,

Weitere Schritte können sein: a) Integration in die äußere Membran, b) Sekretion in das Medium; Charakteristika der Signalsequenz;

Beschreibung des Vorganges und Faktoren bei der Sec-abhängigen Translokation von Proteinen: Rolle von SecB, SecA, SecY, SecE, SecD/SecF/SecG; SPaseI; Energetisierung der Proteintranslokation (pmf und ATP);

Integrale Membranproteine (IMP) müssen kein SP besitzen; weisen Transmembransegmente auf, verankern das Protein innerhalb des Lipidbilayers der Membran; Topographie des jeweiligen IMPs wird durch die Zahl der Transmembransegmente festgelegt; (Klasse I und II -IMP); Methodische Strategien, um die Topographie bakterieller IMPs zu untersuchen; topogene Sequenzen, die die Integration der Proteine in die Cytoplasmamembran festlegen; Initiation (Signalsequenzen) und Termination (Stop-Transfersequenzen);

die Integration von vor allem sehr hydrophoben IMPs in der *E. coli* Cytoplasmamembran ist SecA unabhängig; die Abhängigkeit von SecY variiert von Protein zu Protein; die Translokation von großen hydrophilen Domänen scheint jedoch immer Sec-Funktionen zu erfordern; das kleine Haupthüllprotein von FM13 inseriert in die Cytoplasmamembran von *E. coli* unabhängig von SecA und SecY;

#### Lipoproteine:

Cytoplasmamembran-verankerte Proteine:

Das Braun'sche Lipoprotein in *E. coli*, ein Prototyp von Lipid-modifizierten Proteinen der Bakterienzellhülle wird in einer SecA und SecD, E, F- und Y-abhängigen Weise durch die CM transloziert; konservierte Position von Cys in dem SP; Precursorprotein wird am Cystein modifiziert (Thioglycerol-Ether und O- und N-Acetylierung) Struktur und Biosynthese des Lipidankers; Prozessierung durch SPasell, welche bei *E. c.* durch Globomycin gehemmt wird.

#### Äußere Membranproteine bei Gram-negativen Bakterien:

Die äußere Membran besitzt nur eine geringe Zahl an integralen Membranproteinen, meist handelt es sich dabei um Proteine, deren Funktion die Aufnahme von Nährstoffen ist; mit Ausnahme des Murein-Lipoproteins, das das Murein mit der äußeren Membran verknüpft, sind die äußeren Membranproteine polytope Transmembranproteine, die in der Regel als Trimer vorliegen z.B. PhoE, OmpA, TonA, OmpF, LamB; bislang konnte noch kein generelles Sortierungssignal identifiziert werden; denkbar wäre, dass die Oligomerisierung äußerer Membranproteine mit Hilfe molekularer "Chaperone" erfolgt;

#### Molekulare Chaperone und Foldasen:

1. die Translokation von Exoproteinen beeinflussende Faltungsproteine:

SecB

Intramolekulare Chaperone (viele sekretierte Proteine Gram-positiver Bakterien)

2. Cytosolische Proteinfaltung:

DnaK (hsp70-Familie)

GroEL und GroES

3. Chaperon und ATP-abh. Proteaseaktivität

Lon-Protease

ClpAP und ClpXP

3. Protein-Reifung (Foldasen):

Peptidyl-Prolyl *cis-trans*-Isomerase im Periplasma (Rotamase);

Disulfid-Isomerasen, DsbA, B, C, D, G im Periplasma;

#### Proteinsekretion über ABC-Transporter:

z.B. Sekretion von  $\alpha$ -Hämolysin von *E. coli*;

#### TypIII-Sekretion:

Beispiel für die Übertragung der Yop-Proteine von *Yersinia* in die Eukaryoten-Zelle. Regulation der Sekretionskaskade.

#### Proteinexport bei Gram-positiven Bakterien:

Unterschiede in der Proteinsekretion bei Gram-positive Bakterien; ein SecB-homologes Protein konnte bislang nicht nachgewiesen werden; häufig sind Exoproteine als Pre-pro-proteine organisiert; Vorkommen von intramolekularen Chaperons;

Proteindisplay bei Gram-positiven Bakterien: Kovalente Verankerung von Proteinen bei Gram-positiven Bakterien an die Zellwand (Protein A, Fibronectin-Bindeproteine etc.); Mechanismus der Verankerung; *agr*, Regulation der Proteinsekretion bei Staphylokokken.

## **8. Proteinfaltung in Bakterien**

Die Expression von Proteinen erfordert eine korrekte Faltung des Proteins zur nativen dreidimensionalen Struktur. Mißfaltung führt zu Aggregation und zu sog. 'inclusion bodies'. Obwohl der native Zustand offensichtlich thermodynamisch favorisiert wird, kann die zeitliche Abfolge der Faltung von Millisekunden bis zu Tagen dauern. Kürzliche Untersuchungen haben gezeigt, dass in Abwesenheit kinetischer Barrieren die Faltung eines 1-Domänen Proteins äußerst rasch erfolgt (Sosnick et al., 1994). Das Cytochrom c faltet sich z.B. extrem rasch (10 ms - Bereich).

Kinetische Barrieren können jedoch darin bestehen, dass der Faltungsprozeß nicht in einem Schritt abläuft, sondern sich zuerst Subdomänen eines Proteins falten, oder Untereinheiten sich

zusammenlagern müssen, oder aber dass kovalente Reaktionen stattfinden müssen, bevor das Protein sich korrekt falten kann. Zum letzten Reaktionstyp gehören:

- a) die Ausbildung von Disulfidbrücken,
- b) *cis/trans* Isomerisierung von Prolinresten innerhalb konservierter Polypeptidsequenzen eines Proteins,
- c) Prä-protein-prozessierung, oder
- d) Ligation prosthetischer Gruppen.

In der Zelle wird eine fehlerhafte Faltung durch zwei unterschiedliche Klassen von zusätzlichen Proteinen vermieden, die als Foldasen und Chaperone bezeichnet werden. Foldasen haben eine klar definierte katalytische Aktivität, die der Beschleunigung durch Geschwindigkeit limitierter kovalenter Schritte in der Faltung dient. Chaperone auf der anderen Seite, erfüllen viele Funktionen, wobei die wichtigste Funktion vermutlich die ist, eine Umgebung für das naszierende Protein zu schaffen, in dem es sich falten kann, ohne dass es den konkurrierenden Prozeß der Selbstassoziation ausgeliefert ist.

Die Unterscheidung zwischen Foldasen und Chaperonen läßt sich nicht immer klar definieren, da einige Proteine z. B. die Disulfidisomerase (PDI), sowohl als Foldase als auch als Chaperon zumindest in *in vitro* Bedingungen wirksam ist.

Da Faltungsfehler zur Anhäufung von Intermediaten führen, die zur Selbstassoziation neigen, vermutet man eine Favorisierung der Ausbildung des nativen Proteinmoleküls. Verschiedene Gründe sprechen für diese Annahme:

1. Aminosäureaustausche, die Aggregation unterdrücken
2. die Expression von nativen oder heterologen Chaperonen die, mit der naszierenden Polypeptidkette interagiert, und dabei die Selbstassoziation verhindert,
3. die Co-expression von Foldasen für die Katalyse kinetischer Barrieren, die kovalenten Reaktionen zugrunde liegen,
4. die Aufrechterhaltung intrazellulärer Bedingungen, die die Tendenz der Faltungsintermediate zur Selbstassoziation verringern,
5. Verringerung der Proteinsynthesegeschwindigkeit, so dass die intrazelluläre Konzentration von zur Aggregation neigenden Intermediaten verringert ist, und
6. die Expression rekombinanter Proteine in einer Fusion mit einer hochlöslichen Polypeptidkette, die die Aggregation des Hybrids verhindert.

Im Cytoplasma gibt es 3 Chaperonkomplexe, die aus multiplen Komponenten zusammengesetzt sind und die eine breite Spezifität besitzen.

### **GroEL/GroES:**

Der erste Komplex umfaßt das 60kDa große Hitzeschockprotein (Hsp60), GroEL und das kleinere Anhängselprotein GroES (10kDa). GroEL bildet eine charakteristische Dublette aus zwei heptameren Ringen aus, welche während der Katalyse mit einem oder zwei heptameren Ringen von GroES assoziiert sind. Das GroEL Chaperon hat eine breite Spezifität und ist für die Überlebensfähigkeit der Bakterien essentiell.

Der zweite Komplex umfaßt DnaK, das bakterielle Hsp70 und zwei andere Chaperone, DnaJ und GrpE. Naszierende Polypeptide werden von DnaK in Assoziation mit DnaJ erkannt und gebunden. Anschließend werden die Proteine freigesetzt und von GrpE gebunden. Es gibt einige Anhaltspunkte, dass zu Komponenten des DnaK/DnaJ/GrpE-System von Bakterien unter bestimmten Wachstumsbedingungen homologe Proteine gebildet werden und ein zusätzliches Chaperonsystem darstellen.

Der dritte Chaperonkomplex ist das Clp-System (ClpA und ClpX), deren Funktion aller Wahrscheinlichkeit nach die Erkennung ungefalteter Polypeptide ist, die dem proteolytischen Abbausystem zugeführt werden.

### **Expression sekretierter Proteine und die Rolle von Foldasen**

Die Isomerisierung der Prolin Peptidbindung mag vor allem im Periplasma wichtig sein, da viele Membranproteine Prolin reiche Schleifen besitzen. Bislang wurden 3 Prolin-Isomeraseaktivitäten



gefunden. Doch weder die Überproduktion, noch Nullmutanten dieser Prolin-Isomerasen einen Effekt auf die Faltung heterologer Proteine (und sekretierter) unter den verschiedenen Bedingungen gezeigt (Kleerebezem et al., 1995).

Bis jetzt sind 4 periplasmatische Cystein Oxidoreduktasen, die Disulfidbrücken katalysieren, charakterisiert worden. Sie sind an der Oxidation sekretierter Proteine beteiligt. Das lösliche Enzym DsbA scheint die Hauptaktivität der Disulfidbrückenbindung zu besitzen. Die Aktivität von DsbA ist von einem anderen Protein, einem Membranprotein, dem DsbB, abhängig. DsbC ist ein anderes lösliches Enzym mit Oxidaseaktivität, seine Hauptaktivität besteht jedoch in der Reorganisation oder der Isomerisierung von unkorrekt ausgebildeten Disulfidbrücken. Eine inkorrekte Paarung von Cysteinresten gibt es selten, wenn ungefaltete Polypeptidketten zuerst oxidiert werden. DsbC erleichtert vor allem die Auflösung inkorrekt Disulfidbrücken und die anschließende Ausbildung jener Disulfidbrücken, die dem nativen Zustand entsprechen. Die Aktivität von DsbC wird durch das Membranprotein DsbD beeinflusst. DsbD ist essentiell bei höherer Wachstumstemperatur (>42°C). DsbD ist eine Reduktionsquelle für das Periplasma. Die eukaryontische-PDI katalysiert ebenfalls effizient Protein-Cystein Oxidation und die Isomerisierung von Disulfidbrücken; gleichzeitig besitzt PDI auch noch Chaperonaktivität. Es ist auch in Bakterien aktiv weil seine Peptidbindedomäne sehr effizient mit heterologen Proteinen interagiert.

Die Cysteinoxidation ist nur der erste Schritt im Faltungsweg der Disulfid besitzenden Proteine. Es muß auch eine Isomerisierung stattfinden, damit sich die nativen Disulfidbrücken ausbilden können. Diese Isomerisierungsreaktion ist langsam und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Proteinfaltung Disulfid-haltiger Proteine dar. Die Katalyse der von Disulfidbrücken Isomerisierungen im Periplasma ist äußerst ineffizient und ist der Geschwindigkeits bestimmende Schritt bei der Produktion von aktivem PTI in *E. coli*.

#### **Andere Möglichkeiten, um die Proteinlöslichkeit zu verbessern**

Wachstum bei niedrigeren Temperaturen

Zugabe von Polyolen und Saccharose

Zugabe von Ethanol (welches die Hitzeschockproteine induziert)

Zugabe von niedermolekulare Thiole und Disulfide (welche den Redoxzustand des Periplasmas beeinflussen und damit die Disulfidbrückenbindung und NaCl)

Fusion mit einem Fusionspartner (MBP, Thioredoxin, IgG-Bindedomänen von *Staphylococcus aureus* Protein A, etc.) welche die Löslichkeit rekombinierter Proteine erhöht

#### Literatur:

Fenton, W.A., Weissman, J.S. and Horwich, A.L.: Putting a lid on protein folding: structure and function of the co-chaperonin, GroES. *Chem. & Biol.* 3 (1996) 157-161.

Georgiou, G. and Valax, P.: Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 (1996) 190-197.

Jonda, S., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., and E, M. s. (1999). Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm, *Embo J* 18, 3271-3281.

McCarthy, D., Kramer, G., and Hardesty, B. (1998). Reactivation of thermally inactivated pre-beta-lactamase by DnaK, DnaJ, and GrpE, *Protein Sci* 7, 1164-71.

Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., and Yoshida, M. (1999). Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-grpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7184-9.

### **9. Zellteilung**

Genetik der bakteriellen Zellteilung: FirA Protein, Gene die an der Zellteilung in *E. c.* beteiligt sind:

Initiation der Septenbildung (*ftsZ*);

Septumsynthese(*ftsE*: und*ftsI*, letzteres kodiert das PBP3);

Zellseparation (*envA*);

Regulation der Septumbildung (*minB* Locus);

Periseptale Ringbildung; Kopplung von Replikation und Zellteilung; Partition der Chromosomen während der Zellteilung.

### Literatur für Zellteilung bei Bakterien

#### **Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in Escherichia coli.**

Mol Microbiol 1999 Feb;31(3):833-44

Ogura T, Inoue K, Tatsuta T, Suzuki T, Karata K, Young K, Su LH, Fierke CA, Jackman JE, Raetz CR, Coleman J, Tomoyasu T, Matsuzawa H

The suppressor mutation, named sfhC21, that allows Escherichia coli ftsH null mutant cells to survive was found to be an allele of fabZ encoding R-3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, involved in a key step of fatty acid biosynthesis, and appears to upregulate the dehydrase. The ftsH1(Ts) mutation increased the amount of lipopolysaccharide at 42 degrees C. This was accompanied by a dramatic increase in the amount of UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase [the lpxC (envA) gene product] involved in the committed step of lipid A biosynthesis. Pulse-chase experiments and in vitro assays with purified components showed that FtsH, the AAA-type membrane-bound metalloprotease, degrades the deacetylase. Genetic evidence also indicated that the FtsH protease activity for the deacetylase might be affected when acyl-ACP pools were altered. The biosynthesis of phospholipids and the lipid A moiety of lipopolysaccharide, both of which derive their fatty acyl chains from the same R-3-hydroxyacyl-ACP pool, is regulated by FtsH.

#### **Molecular characterization of Escherichia coli FtsE and FtsX.**

Mol Microbiol 1999 Feb;31(3):983-93

de Leeuw E, Graham B, Phillips GJ, ten Hagen-Jongman CM, Oudega B, Luirink J

The genes ftsE and ftsX are organized in one operon together with ftsY. FtsY codes for the receptor of the signal recognition particle (SRP) that functions in targeting a subset of inner membrane proteins. We have found no indications for a structural relationship between FtsE/X and FtsY. Evidence is presented that FtsE and FtsX form a complex in the inner membrane that bears the characteristics of an ATP-binding cassette (ABC)-type transporter. FtsE is a hydrophilic nucleotide-binding protein that has a tendency to dimerize and associates with the inner membrane through an interaction with the integral membrane protein FtsX. An FtsE null mutant showed filamentous growth and appeared viable on high salt medium only, indicating a role for FtsE in cell division and/or salt transport. (aquaporin????)

#### **FtsZ ring clusters in min and partition mutants: role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization.**

Mol Microbiol 1999 Apr;32(2):315-326

Yu XC, Margolin W

To understand further the role of the nucleoid and the min system in selection of the cell division site, we examined FtsZ localization in Escherichia coli cells lacking MinCDE and in parC mutants defective in chromosome segregation. More than one FtsZ ring was sometimes found in the gaps between nucleoids in min mutant filaments. These multiple FtsZ rings were more apparent in longer cells; double or triple rings were often found in the nucleoid-free gaps in ftsI min and ftsA min double mutant filaments. Introducing a parC mutation into the ftsA min double mutant allowed the nucleoid-free gaps to become significantly longer. These gaps often contained dramatic clusters of FtsZ rings. In contrast, filaments of the ftsA parC double mutant, which contained active MinCDE, assembled only one or two rings in most of the large nucleoid-free gaps. These results suggest that all positions along the cell length are competent for FtsZ ring assembly, not just sites at mid-cell or at the poles. Consistent with previous results, unsegregated nucleoids also correlated with a lack of FtsZ localization. A model is proposed in which both the inhibitory effect of the nucleoid and the regulation by MinCDE ensure that cells divide precisely at the midpoint.

### **Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ.**

Mol Microbiol 1999 Mar;31(6):1853-61

Liu Z, Mukherjee A, Lutkenhaus J

ZipA is an essential cell division protein in *Escherichia coli* that is recruited to the division site early in the division cycle. As it is anchored to the membrane and interacts with FtsZ, it is a candidate for tethering FtsZ filaments to the membrane during the formation of the Z ring. In this study, we have investigated the requirements for ZipA localization to the division site. ZipA requires FtsZ, but not FtsA or FtsI, to be localized, indicating that it is recruited by FtsZ. Consistent with this, apparently normal Z rings are formed in the absence of ZipA. The interaction between FtsZ and ZipA occurs through their carboxy-terminal domains. Although a MalE-ZipA fusion binds to FtsZ filaments, it does not affect the GTPase activity or dynamics of the filaments. These results are consistent with ZipA acting after Z ring formation, possibly to link the membrane to FtsZ filaments during invagination of the septum.

### **Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring.**

Mol Microbiol 1999 Jan;31(2):725-37

Ghigo JM, Weiss DS, Chen JC, Yarrow JC, Beckwith J

In *Escherichia coli*, nine gene products are known to be essential for assembly of the division septum. One of these, FtsL, is a bitopic membrane protein whose precise function is not understood. Here we use fluorescence microscopy to study the subcellular localization of FtsL, both in a wild-type strain and in a merodiploid strain that expresses a GFP-FtsL fusion protein. We show that FtsL localizes to the cell septum where it forms a ring analogous to the cytoplasmic FtsZ ring. FtsL localization is dependent upon the function of FtsZ, FtsA and FtsQ, but not FtsI. In a reverse approach, we use fusions of green fluorescent protein (GFP) to FtsZ, FtsA and ZipA to show that these proteins localize to the division site in an FtsL-independent fashion. We propose that FtsL is a relatively late recruit to the ring structure that mediates septation.

### **Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*.**

J Bacteriol 1999 Jan;181(2):521-30

Chen JC, Weiss DS, Ghigo JM, Beckwith J

Septation in *Escherichia coli* requires several gene products. One of these, FtsQ, is a simple bitopic membrane protein with a short cytoplasmic N terminus, a membrane-spanning segment, and a periplasmic domain. We have constructed a merodiploid strain that expresses both FtsQ and the fusion protein green fluorescent protein (GFP)-FtsQ from single-copy chromosomal genes. The *gfp-ftsQ* gene complements a null mutation in *ftsQ*. Fluorescence microscopy revealed that GFP-FtsQ localizes to the division site. Replacing the cytoplasmic and transmembrane domains of FtsQ with alternative membrane anchors did not prevent the localization of the GFP fusion protein, while replacing the periplasmic domain did, suggesting that the periplasmic domain is necessary and sufficient for septal targeting. GFP-FtsQ localization to the septum depended on the cell division proteins FtsZ and FtsA, which are cytoplasmic, but not on FtsL and FtsI, which are bitopic membrane proteins with comparatively large periplasmic domains. In addition, the septal localization of ZipA apparently did not require functional FtsQ. Our results indicate that FtsQ is an intermediate recruit to the division site.

### **Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL.**

J Bacteriol 1999 Jan;181(2):508-20

Weiss DS, Chen JC, Ghigo JM, Boyd D, Beckwith J

Assembly of the division septum in bacteria is mediated by several proteins that localize to the division site. One of these, FtsI (also called penicillin-binding protein 3) of *Escherichia coli*, consists of a short cytoplasmic domain, a single membrane-spanning segment, and a large periplasmic domain that encodes a transpeptidase activity involved in synthesis of septal peptidoglycan. We

have constructed a merodiploid strain with a wild-type copy of *ftsI* at the normal chromosomal locus and a genetic fusion of *ftsI* to the green fluorescent protein (*gfp*) at the lambda attachment site. *gfp-ftsI* was expressed at physiologically appropriate levels under control of a regulatable promoter. Consistent with previous results based on immunofluorescence microscopy GFP-FtsI localized to the division site during the later stages of cell growth and throughout septation. Localization of GFP-FtsI to the cell pole(s) was not observed unless the protein was overproduced about 10-fold. Membrane anchor alterations shown previously to impair division but not membrane insertion or transpeptidase activity were found to interfere with localization of GFP-FtsI to the division site. In contrast, GFP-FtsI localized well in the presence of beta-lactam antibiotics that inhibit the transpeptidase activity of FtsI. Septal localization depended upon every other division protein tested (FtsZ, FtsA, FtsQ, and FtsL). We conclude that FtsI is a late recruit to the division site, and that its localization depends on an intact membrane anchor.

### **ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division.**

EMBO J 1999 May 4;18(9):2372-2383

RayChaudhuri D

The first visible event in prokaryotic cell division is the assembly of the soluble, tubulin-like FtsZ GTPase into a membrane-associated cytokinetic ring that defines the division plane in bacterial and archaeal cells. In the temperature-sensitive *ftsZ84* mutant of *Escherichia coli*, this ring assembly is impaired at the restrictive temperature causing lethal cell filamentation. Here I present genetic and morphological evidence that a 2-fold higher dosage of the division gene *zipA* suppresses thermosensitivity of the *ftsZ84* mutant by stabilizing the labile FtsZ84 ring structure in vivo. I demonstrate that purified ZipA promotes and stabilizes protofilament assembly of both FtsZ and FtsZ84 in vitro and cosediments with the protofilaments. Furthermore, ZipA organizes FtsZ protofilaments into arrays of long bundles or sheets that probably represent the physiological organization of the FtsZ ring in bacterial cells. The N-terminal cytoplasmic domain of membrane-anchored ZipA contains sequence elements that resemble the microtubule-binding signature motifs in eukaryotic Tau, MAP2 and MAP4 proteins. It is postulated that the MAP-Tau-homologous motifs in ZipA mediate its binding to FtsZ, and that FtsZ-ZipA interaction represents an ancient prototype of the protein-protein interaction that enables MAPs to suppress microtubule catastrophe and/or to promote rescue.

### **Bacillus subtilis:**

#### **Septation, dephosphorylation, and the activation of sigmaF during sporulation in bacillus subtilis.**

Genes Dev 1999 May 1;13(9):1156-67

King N, Dreesen O, Stragier P, Pogliano K, Losick R

Cell-specific activation of transcription factor sigmaF during sporulation in *Bacillus subtilis* requires the formation of the polar septum and the activity of a serine phosphatase (SpolIE) located in the septum. The SpolIE phosphatase indirectly activates sigmaF by dephosphorylating a protein (SpolIAA-P) in the pathway that controls the activity of the transcription factor. By use of a SpolIE-GFP fusion protein in time-course and time-lapse experiments and by direct visualization of septa in living cells, we show that SpolIE is present in the predivisional sporangium, where it often localizes near both cell poles in structures known as E-rings. We also present evidence consistent with the view that SpolIE is present in both progeny cells after polar division. These findings are incompatible with a model for the control of sigmaF activity in which the phosphatase is simply sequestered to one cell. Instead, we conclude that the function of SpolIE is subject to regulation, and we present evidence that this occurs in two stages. The first stage, which involves the phosphatase function of SpolIE, depends on the cell division protein FtsZ and could correspond to the FtsZ-dependent assembly of SpolIE into E-rings. The second stage occurs after the

dephosphorylation of SpoIIAA-P and is dependent on the later-acting, cell-division protein DivIC. Evidence based on the use of modified and mutant forms of the phosphatase protein indicates that SpoIIIE blocks the capacity of unphosphorylated SpoIIAA to activate sigmaF until formation of the polar septum is completed.

### **Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*.**

J Bacteriol 1999 May;181(10):3201-11

Pedersen LB, Angert ER, Setlow P

Previous studies have shown that *Bacillus subtilis* cells lacking penicillin-binding protein 1 (PBP1), encoded by *ponA*, have a reduced growth rate in a variety of growth media and are longer, thinner, and more bent than wild-type cells. It was also recently shown that cells lacking PBP1 require increased levels of divalent cations for growth and are either unable to grow or grow as filaments in media low in Mg<sup>2+</sup>, suggesting a possible involvement of PBP1 in septum formation under these conditions. Using epitope-tagging and immunofluorescence microscopy, we have now shown that PBP1 is localized at division sites in vegetative cells of *B. subtilis*. In addition, we have used fluorescence and electron microscopy to show that growing *ponA* mutant cells display a significant septation defect, and finally by immunofluorescence microscopy we have found that while FtsZ localizes normally in most *ponA* mutant cells, a significant proportion of *ponA* mutant cells display FtsZ rings with aberrant structure or improper localization, suggesting that lack of PBP1 affects FtsZ ring stability or assembly. These results provide strong evidence that PBP1 is localized to and has an important function in the division septum in *B. subtilis*. This is the first example of a high-molecular-weight class A PBP that is localized to the bacterial division septum.

## **10. Regulation der Genexpression**

Das Ausmaß der Genexpression auf Transkriptions- und Translationsebene ist abhängig von:  
a) Stärke des Promoters, b) Regulationsfaktoren, c) Geschwindigkeit der Translation, d) Stabilität von mRNA (RNasen) und Protein (Proteinasen);

1. Regulation der Lactoseverwertung bei *E. c.*

(2. Regulation des Arabinose-Operons)

3. DNA-Reparaturgene und SOS-Antwort;

4. Hitze-Schockproteine und  $s^{32}$ ;

5. Weitere s-Faktoren:

Sporulation bei *B. subtilis* (Antisigmafaktoren);

Stationärphasen s-Faktor,  $s^B$

6. Aminosäurebiosynthese-Operons und transkriptionelle Attenuation;

7. Translationale Attenuation (am Beispiel von *cat* und *ermC*)

8. Antisense-RNA;

9. Stringente Kontrolle der tRNA und rRNA-Synthese bei AS-Mangel;

10. Rolle von FIS-Regulator;

Wie binden die Regulatorproteine an die DNA:

a) Helix-Turn-Helix Motiv

b) Zinkfinger-Motiv

c) Leucin-Zipper (Reißverschluß)

## **11. Signalübertragung bei Bakterien oder Adaption auf Umweltreize**

Proteinphosphorylierung: ein Regulationsprinzip bei der Adaption von Bakterien auf Umweltveränderungen; Reaktion auf äußere Reize oder Medienveränderungen:

a) auf Attraktantien und Repellantien (Chemotaxis)

b) Veränderung der N-Quelle;

c) Veränderung der PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> Konzentration;

d) Veränderung der Osmolarität u.v.m.

Wie reagieren Bakterien auf Veränderung des  $\text{NH}_4^+$  Angebots:

a) auf Enzymebene durch allosterische Wechselwirkung;

b) auf Transkriptionsebene, *glnALG* Operon (Ntr-Regulon);

Die Osmoregulation (Porine (Homotrimere), bei *E. coli* OmpF und OmpC);

Der molekulare Mechanismus für die Reizerkennung und Reizaufnahme bzw. Reizantwort in Form von Induktion/Repression von Genen beruht häufig auf 2 Typen von Enzymen:

a) Histidin-Protein-Kinasen (HPK) und die assoziierten

b) Antwort (response)-Regulatoren (RR);

Die Signalübertragung erfolgt häufig a) durch autokatalytische Übertragung einer

Phosphorylgruppe von ATP auf ein Histidin der HPK; b) von P-HPK wird die Phosphatgruppe auf einen Asp-Rest des RR übertragen und c) zum Abklingen des Stimulus wird von P-RR die P auf  $\text{H}_2\text{O}$  übertragen (Hydrolyse).

**Pheromone:** Ihre Rolle als Sexpheromon bei *Enterococcus*; Zelldichtekontrolle bei *Vibrio*; Kontrolle des Proteinexportes bei Staphylokokken; als Autoinduktor von Peptidantibiotika-Biosynthese;

## 12. Analyse bakterieller Genome

### References: Whole genome analysis

- Bao, Q., Y. Tian, W. Li, Z. Xu, Z. Xuan, S. Hu, W. Dong, J. Yang, Y. Chen, Y. Xue, Y. Xu, X. Lai, L. Huang, X. Dong, Y. Ma, L. Ling, H. Tan, R. Chen, J. Wang, J. Yu, and H. Yang. 2002. A Complete Sequence of the *T. tengcongensis* Genome. *Genome Res.* 12:689-700.
- Dandekar, T., M. Huynen, J. T. Regula, B. Ueberle, C. U. Zimmermann, M. A. Andrade, T. Doerks, L. Sanchez-Pulido, B. Snel, M. Suyama, Y. P. Yuan, R. Herrmann, and P. Bork. 2000. Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Res.* 28:3278-3288.
- Delcher, A. L., S. Kasif, R. D. Fleischmann, J. Peterson, O. White, and S. L. Salzberg. 1999. Alignment of whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:2369-2376.
- Di Gennaro, J. A., N. Siew, B. T. Hoffman, L. Zhang, J. Skolnick, L. I. Neilson, and J. S. Fetrow. 2001. Enhanced functional annotation of protein sequences via the use of structural descriptors. *J Struct Biol.* 134:232-245.
- Fayazi, Z., A. Ghadersohi, and R. G. Hirst. 2002. Development of a *Brucella suis* specific hybridisation probe and PCR which distinguishes *B. suis* from *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* 84:253-261.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, and et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science.* 270:397-403.
- Gohlmann, H. W., J. Weiner, 3rd, A. Schon, and R. Herrmann. 2000. Identification of a small RNA within the *pdh* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol.* 182:3281-3284.
- Hernandez, A., A. Figueroa, L. A. Rivas, V. Parro, and R. P. Mellado. 2000. RT-PCR as a tool for systematic transcriptional analysis of large regions of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology.* 146:823-828.
- Herrmann, R., and B. Reiner. 1998. *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*: a comparison of two closely related bacterial species. *Curr Opin Microbiol.* 1:572-579.
- Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B. C. Li, and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24:4420-4449.
- Ishii, T., K. Yoshida, G. Terai, Y. Fujita, and K. Nakai. 2001. DBTBS: a database of *Bacillus subtilis* promoters and transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29:278-280.

- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357:1225-1240.
- May, B. J., Q. Zhang, L. L. Li, M. L. Paustian, T. S. Whittam, and V. Kapur. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3460-3465.
- Morikawa, K., A. Maruyama, Y. Inose, M. Higashide, H. Hayashi, and T. Ohta. 2001. Overexpression of sigma factor,  $\sigma^{B}$ , urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:385-389.
- Ng, W. V., S. P. Kennedy, G. G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H. D. Shukla, S. R. Lasky, N. S. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T. A. Dahl, R. Welti, Y. A. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M. J. Danson, D. W. Hough, D. G. Maddocks, P. E. Jablonski, M. P. Krebs, C. M. Angevine, H. Dale, T. A. Isenbarger, R. F. Peck, M. Pohlschroder, J. L. Spudich, K. W. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C. J. Daniels, P. P. Dennis, A. D. Omer, H. Ehardt, T. M. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood, and S. DasSarma. 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12176-12181.
- Regula, J. T., B. Ueberle, G. Boguth, A. Gorg, M. Schnolzer, R. Herrmann, and R. Frank. 2000. Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*. *Electrophoresis*. 21:3765-3780.