

Physiologische Bedeutung der „Stringent Control“ bei *Escherichia coli* unter extremen Hungerbedingungen

Stringent Control and Starvation Survival in *Escherichia coli*

H. Mach, M. Hecker, I. Hill, A. Schroeter und F. Mach

Sektion Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, L.-Jahn-Straße 15,
DDR-2200 Greifswald, Deutsche Demokratische Republik

Z. Naturforsch. **44c**, 838–844 (1989); received September 30/Juli 18, 1989

E. coli, ppGpp, Glykogen, Starvation Survival

The viability of three isogenic *relA*⁺/*relA* strain pairs of *Escherichia coli* (CP78/CP79; NF161/NF162; CP107/CP143) was studied during prolonged starvation for amino acids, glucose or phosphate. After amino acid limitation we found a prolonged viability of all *relA*⁺ strains which synthesized ppGpp. We suggest that some ppGpp-mediated pleiotropic effects of the stringent response (e.g. glycogen accumulation, enhanced protein turnover) might be involved in this prolongation of survival.

After glucose or phosphate starvation there was no difference in the *relA*⁺/*relA* strains either in the ppGpp content or in the survival.

Einleitung

Mikroorganismen verfügen über verschiedene Möglichkeiten, Bedingungen dauernder oder auch nur vorübergehender Nährstofflimitationen zu überleben. Bei den Bakterien ist insbesondere die durch das Guanosintetraphosphat (ppGpp) vermittelte „stringent control“ zu nennen. Dabei wird ppGpp in Beantwortung ganz unterschiedlicher Stresssituationen akkumuliert. Bei dieser „stringent control“ handelt es sich um eine außerordentlich komplexe Beeinflussung verschiedener Bereiche des Stoffwechsels, um ein Überdauern der ungünstigen Milieubedingungen zu ermöglichen [1].

In den natürlichen Ökosystemen finden wir eine Vielzahl von ungünstigen Umwelteinflüssen, die nicht nur das Wachstum der Bakterien in Grenzen halten, sondern gleichzeitig verschiedene Adaptationsstrategien wie die „stringent control“ im Verlaufe der Evolution „herausgefordert“ haben (siehe [2]). Gegenwärtig wird diese „stringent control“ vordergründig aus molekularbiologischer Sicht bearbeitet [1].

Bei aller Notwendigkeit der Konzentration auf die molekulare Ebene darf die gesamtphysiologische Einordnung der „stringent control“ in das Ensemble phänotypischer Adaptationsmechanismen nicht vernachlässigt werden. Untersuchungen aus ökophysiologischer Sicht haben einen wichtigen Beitrag zum

Verständnis der durch das ppGpp ausgelösten Adaptationen zu leisten.

Wir haben uns mit der Bedeutung der „stringent control“ für das Überleben ungünstiger Milieubedingungen bei *Escherichia coli* beschäftigt. Dabei zeigte sich für die isogenen Stämme CP78 (*relA*⁺) und CP79 (*relA*), daß die *relA*-Mutante extremen Hungerbedingungen weit weniger standhalten kann als der entsprechende Wildtyp [3]. In der vorliegenden Arbeit wird diese Korrelation zwischen der *relA*-Mutation und dem Überlebensverhalten unter Einbeziehung weiterer *relA*⁺/*relA*-Paare von *E. coli* umfassender analysiert.

Ergebnisse

Unterzieht man verschiedene isogene *relA*⁺/*relA*-Paare von *E. coli* einer 10stündigen Limitation essentieller Aminosäuren und setzt sie anschließend in Phosphatpuffer um, so überlebt der zur (p)ppGpp-Bildung befähigte Stamm bedeutend länger als sein „relaxed“ kontrollierter Partner (Abb. 1 A–C).

Aus experimentellen Gründen wurde „lebensfähig“ mit „vermehrungsfähig“, d.h. koloniebildend auf geeigneten festen Kulturmedien gleichgesetzt, wobei die Zusammensetzung des Mediums ohne Einfluß war. Die Verwendung von komplexem oder von Minimalmedium führte zu vergleichbaren Werten. Ebenso blieb die Anzahl der Kolonien bei Einsatz unterschiedlicher Glukosekonzentrationen unverändert (siehe [4]).

Sonderdruck-Anforderungen an H. Mach.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/0900–0838 \$ 01.30/0

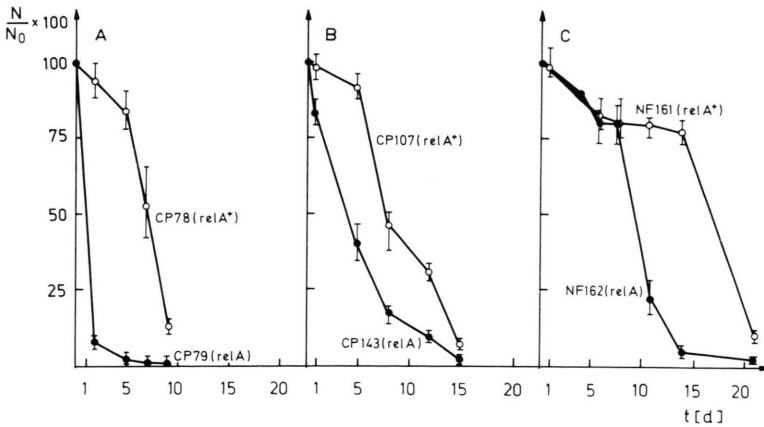


Abb. 1. Überlebensraten von *Escherichia coli-relA*⁺- und *relA*-Stämmen nach Aminosäurelimitation in Phosphatpuffer (A–C). 100prozentige Überlebensrate entspricht den koloniebildenden Einheiten 10 h nach Eintritt in die stationäre Phase.

Die Bakterienkultur wurde durch Limitation einer Aminosäure, für die das Stammpaar auxotroph ist – meist war es Arginin – bei gleichzeitigem Glukoseüberschuß in die stationäre Wachstumsphase gebracht. Dabei akkumulierten alle drei *relA*⁺-Stämme ppGpp, wenn auch mit unterschiedlicher Rate, während in den *relA*-Stämmen keine erhöhte ppGpp-Synthese festzustellen war. Ein repräsentatives Beispiel zeigt die Abb. 2. Unter diesen Bedingungen sind die zur ppGpp-Synthese befähigten Stämme CP78, CP107 und NF161 in der Lage, die vorrätige Glukose aufzunehmen und in Glykogen einzubauen [5]. Elektronenoptische Analysen zeigten eindeutig,

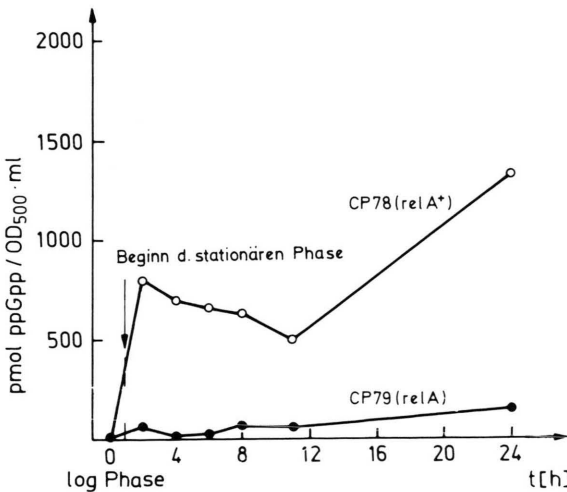


Abb. 2. Verlauf der ppGpp-Bildung in einem *E. coli-relA*⁺- und *relA*-Stamm nach Aminosäurelimitation. 0 = Basiswert in der log-Phase. ↓ = Zeitpunkt des Übergangs in die stationäre Phase; dann erfolgte die weitere Probeentnahme bis 24 h nach Argininlimitation.

daß der jeweilige „stringent“ kontrollierte Stamm Glykogen in großen Mengen gespeichert hat und daß bei den *relA*-Mutanten nur sehr vereinzelte Glykogengranula nachzuweisen waren (Abb. 3). Während des Aufenthaltes in Phosphatpuffer wurden diese Glykogenpartikel z. T. sehr schnell abgebaut und die dabei frei werdende Glukose unter den extremen Hungerbedingungen als C- bzw. Energiequelle genutzt (Abb. 3).

Auffallend ist, daß der *relA*⁺-Stamm NF161 ganz besonders lange überlebt (Abb. 1), was mit dem späteren bzw. insgesamt verzögerten Abbau der Glykogenvorräte gut korreliert. Diese Befunde erlauben die Schlußfolgerung, daß der Besitz einer intrazellulären C- bzw. Energiequelle für das Überleben im Phosphatpuffer von entscheidender Bedeutung ist. Exakte Bestimmungen des „energy charge“ hätten hier detailliertere Aussagen ermöglichen können.

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen lassen weiterhin erkennen, daß ein schnelleres Absterben der *relA*-Stämme mit sehr früh einsetzenden Plasmolyseerscheinungen und Veränderungen der Zellbegrenzung gekoppelt ist. Schließlich zeigt auch das Zellkernäquivalent bemerkenswerte Veränderungen: Bei den hungernden *relA*-Stämmen füllt das Zellkernäquivalent mehr und mehr das gesamte Zellvolumen aus, während es in den *relA*⁺-Partnern noch in kompakter Form vorliegt (Abb. 3).

In weiteren Experimenten wurde die Vermehrungsfähigkeit von Zellen der Stämme CP107 (*relA*⁺) und CP143 (*relA*) unmittelbar nach Eintreten einer Arginin-Limitation untersucht: Die Zellen verblieben in der stationären Phase im Kulturmedium, d.h. sie wurden nicht in Phosphatpuffer umgesetzt. Wie aus der Abb. 2 zu entnehmen ist,

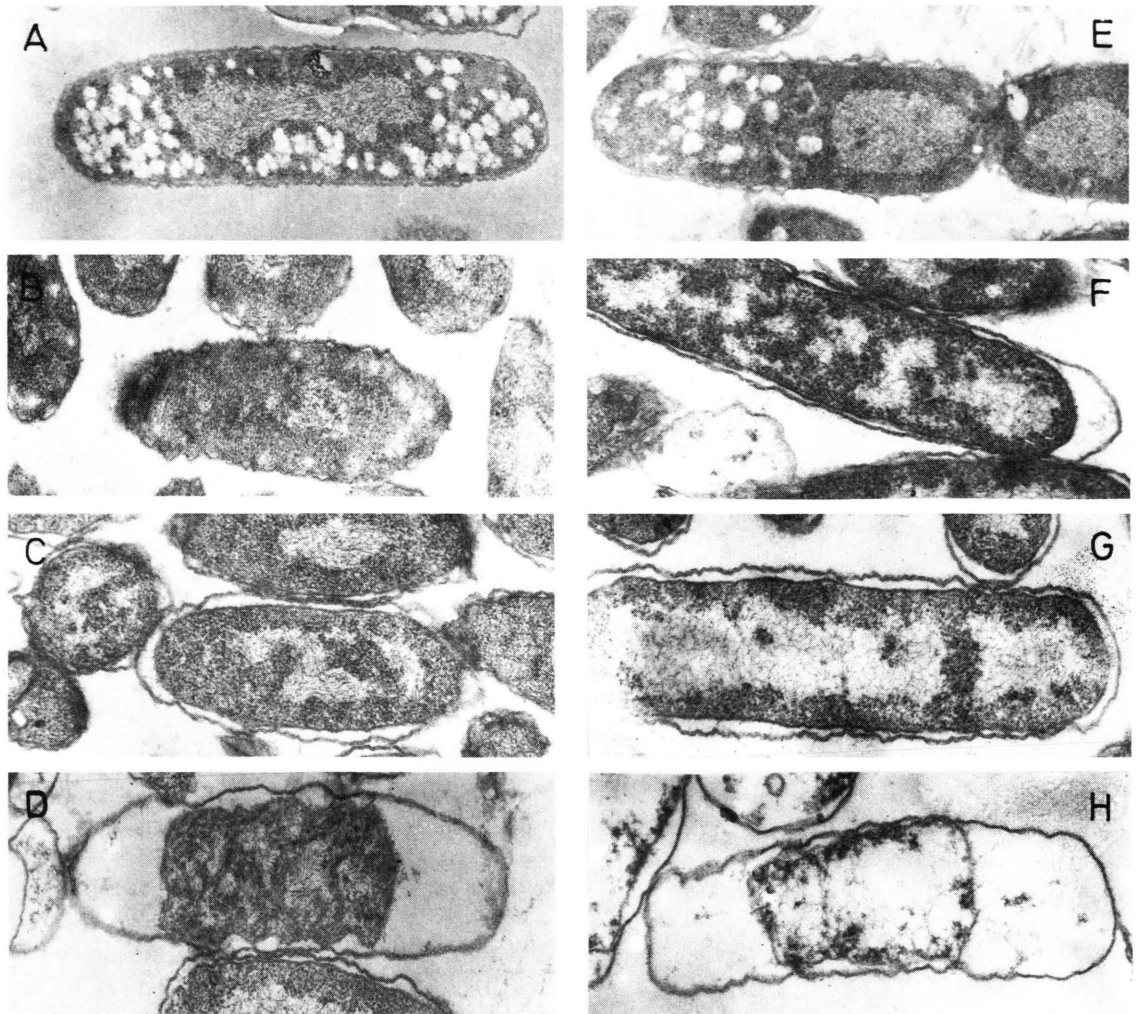


Abb. 3. Ultradünnschnitte durch *E.-coli-relA*⁺-Zellen (CP78: A, B, C, D) und *E.-coli-relA*-Zellen (CP79: E, F, G, H). A, E – 10 h nach Aminosäurelimitation (vgl. Experimentellen Teil). Nach Zentrifugation und Waschen der Zellen wurden diese in Phosphatpuffer überführt und unter Schütteln weiter inkubiert. B, F – 24 h; C, G – 48 h und D, H – 240 h in Phosphatpuffer. Vergrößerung: 30000 $\times$.

zeigte in dieser Zeit nur der *relA*⁺-Stamm (hier CP78) eine verstärkte ppGpp-Akkumulation. Bereits wenige Stunden nach Einsetzen des Aminosäuremangels nahm die Vermehrungsfähigkeit im *relA*-Stamm signifikant ab, die des isogenen „stringent“ kontrollierten Partners blieb dagegen über den Versuchszeitraum unbeeinträchtigt (Abb. 4).

Dieses Verhalten ist bei den in Abb. 1 dargestellten Ergebnissen zu berücksichtigen, bei denen die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen nach 10stündiger Aminosäurelimitation in beiden Stämmen gleich 100% gesetzt wurde, obwohl zu dieser Zeit im *relA*-

Stamm bedeutend weniger vermehrungsfähige Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, vorhanden waren (Abb. 4).

Schließlich wurde das Paar *E. coli* CP107 und CP143 nach 10stündigem Aufenthalt in einer durch Phosphatmangel (Abb. 5A) bzw. durch Glukoseverbrauch (Abb. 5B) ausgelösten stationären Phase in ein entsprechendes Hungermedium (Phosphatpuffer bzw. im Falle des bereits induzierten Phosphathungers physiologische Kochsalzlösung) übertragen. Nach Phosphatlimitation, die keine ppGpp-Bildung auslöst, verloren beide Stämme sehr schnell ihre

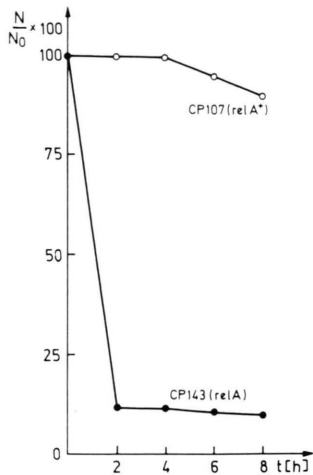


Abb. 4. Überlebensraten eines *Escherichia-coli-relA*⁺- und eines *relA*-Stammes nach Aminosäurelimitation. 100prozentige Überlebensrate entspricht den koloniebildenden Einheiten unmittelbar nach Eintritt in die stationäre Phase.

Vermehrungsfähigkeit [6, 7]. Nach Glukosehunger, der eine ppGpp-Akkumulation auch im *relA*-Stamm erlaubt [1], wurde die Überlebensfähigkeit über einen relativ langen Zeitraum aufrechterhalten. Erst nach 22 Tagen traten in beiden Stämmen überwiegend teilungsfähige Zellen mit einer insgesamt vergleichbaren Kinetik auf (Abb. 5B).

Diskussion

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der „stringent control“ für die Erhaltung der Lebensfähigkeit von *E. coli* unter drastischen Hungerbedingungen [3]. Die Befunde lassen die Schlußfolgerung zu, daß in dem in der stationären

Phase gebildeten ppGpp und der damit ausgelösten „stringent response“ die entscheidenden Faktoren zu sehen sind, die eine Lebensfähigkeit im Phosphatpuffer (als Modellfall für einen absoluten Mangel an C-, Energie- und N-Quellen) über einen längeren Zeitraum sichern.

Eine der für das Überleben wichtigsten Komponente der „stringent control“ dürfte in diesem Zusammenhang die Akkumulation von Glykogen sein, das verstärkt im *relA*⁺-Stamm aus der im Überschuß vorliegenden Glukose gebildet wird. Hinreichend bekannt ist, daß ppGpp unter vergleichbaren physiologischen Bedingungen die Glykogensynthese einleitet [8]. Auch von anderen Autoren wurde gezeigt,

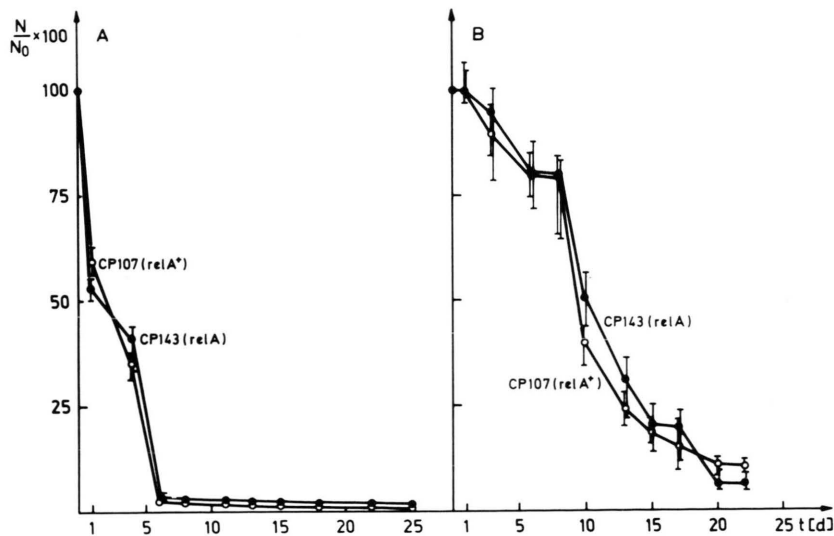


Abb. 5. Überlebensraten eines *Escherichia-coli-relA*⁺- und eines *relA*-Stammes in physiologischer Kochsalzlösung nach Phosphatlimitation (A) und in Phosphatpuffer nach Glukoselimitation (B). 100prozentige Überlebensrate entspricht den koloniebildenden Einheiten 10 h nach Eintritt in die stationäre Phase.

daß glykogenhaltige *E.-coli*-Zellen einem drastischen C- und Energiemangel über einen längeren Zeitraum standhalten können als glykogenfreie Zellen [9]. Diese Korrelation konnte von uns mehrfach erhärtet werden. Alle drei geprüften isogenen *relA*⁺/*relA*-Paare von *E. coli* zeigten immer dann eine höhere Überlebensrate, wenn sie vor dem Umsetzen in das Hungermedium große Mengen Glykogen speichern konnten. Das traf nach Aminosäurelimitation nur für die jeweiligen *relA*⁺-Stämme zu.

Auffällig sind die Unterschiede in der Absterberate der drei *relA*⁺-Stämme CP78, CP107 und NF161. Es müßte in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob der erhöhte ppGpp-Spiegel in der *spoT*-Mutante NF161 mit dem auffallend längeren Überleben in Phosphatpuffer zusammenhängt.

In hungernden Zellen von *E.-coli-relA*-Stämmen wurde immer wieder ein Ausbreiten des Zellkernäquivalents über die ganze Zelle beobachtet. Selbst wenn hier Artefakte nicht ausgeschlossen werden können, die mit der Fixierung und Vorbereitung der Zellsuspensionen für die Elektronenmikroskopie zusammenhängen, vermuten wir dennoch, daß es sich eher um einen durch den Hunger ausgelösten Zusammenbruch der negativen Superhelixdichte der DNA handelt. Bekanntlich benötigt auch das Zellkernäquivalent zur Aufrechterhaltung seiner komplexen räumlichen Struktur die ständige Zufuhr von ATP. Eine Abnahme der Superhelixdichte in hungernden *E.-coli*-Zellen wurde an Plasmid-DNA experimentell bestätigt [10]. Damit wäre bei einer Unterschreitung des „energy charge“ unter einen kritischen Grenzwert nicht nur die für das Überleben wichtige Energetisierung der cytoplasmatischen Membran (proton-motive-force) gefährdet, sondern in gleicher Weise auch die „Energetisierung der DNA“, die für die Initiation der Transkription einer Vielzahl von Genen absolut notwendig ist (siehe [11]).

Daß der Besitz von Glykogen nicht der alleinige Faktor sein kann, der im *relA*⁺-Stamm das Überleben von Hungersituationen sichert, zeigen u.a. die Untersuchungen zur Glukoselimitation. Obgleich unter diesen Bedingungen kein Glykogen gespeichert wird, überleben beide Stämme ein nachfolgendes Umsetzen in Phosphatpuffer für mehrere Tage. Dieses Verhalten fällt mit der Fähigkeit der *relA*-Mutante zusammen, einen Glukosehunger wie der *relA*⁺-Stamm mit der Akkumulation von ppGpp be-

antworten zu können [1]. Nach Phosphatlimitation bildet nicht einmal der Wildtyp ppGpp [6]. Auch hier wird aber die Beziehung zum Überleben deutlich: Der niedrige ppGpp-Spiegel korreliert mit einer sehr schnellen Abnahme der Vermehrungsfähigkeit. Man sollte daher weitere, durch die „stringent control“ induzierte Reaktionen suchen, die das Überdauern drastischer Hungersituationen ermöglichen. Zunächst ist an einen erhöhten „turnover“ von Proteinen zu denken, der u. a. durch die ppGpp-abhängige Synthese der Lon-Protease ausgelöst wird [12]. Dieser verstärkte Proteinabbau kann zusätzliche N-, C- und Energiequellen bereitstellen, die dann der hungernden Zelle im Phosphatpuffer zur Verfügung stehen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch *E.-coli*-Zellen unter ganz verschiedenen Hungerbedingungen Streßproteine bilden, die für die Erhaltung der Integrität nichtwachsender Zellen ganz allgemein von Bedeutung sein können. So gibt es Befunde, wonach ppGpp die Expression von Hitzeschockgenen auslöst [14], die allerdings nicht unwidersprochen geblieben sind [12, 13].

E. coli synthetisiert in Beantwortung von N-, C- oder P-Hunger verstärkt eine Reihe verschiedener Proteine, die nicht mit Hitzeschockproteinen identisch zu sein brauchen [15]. Wir sind daher der Frage nachgegangen, ob ppGpp eine gesteigerte Akkumulation von Streßproteinen auslöst, die einen wichtigen Faktor für das Überleben darstellen könnten. Mit Hilfe zweidimensionaler O'Farrel-Gele, die einen Einblick in das Proteinsyntheseprogramm von *E. coli* nach Aminosäurelimitation vermitteln, ließen sich bisher keine eindeutigen Aussagen treffen (nicht gezeigt). Es fiel jedoch auf, daß durch Isoleucin-hunger, der mit Hilfe einer Valinzugabe verursacht wurde, die aus der Literatur bekannten Hitzeschockproteine nicht oder nur unwesentlich induziert wurden [16].

Es bleibt daher zu fragen, ob noch weitere durch ppGpp ausgelöste Adaptationsmechanismen die hier beschriebenen Unterschiede im Überleben der *relA*⁺- und *relA*-Stämme bedingen. Ungeachtet dieser Fragen unterstreichen die vorgelegten Befunde die ökologische Bedeutung der „stringent control“ als eine entscheidende Überlebensstrategie von nichtsporenbildenden Bakterien, wenn man berücksichtigt, daß Hungerbedingungen in den natürlichen Ökosystemen eher die Regel als die Ausnahme sind.

Experimenteller Teil

Die untersuchten *Escherichia coli*-Stämme sind der Tab. I zu entnehmen.

Tab. I: Verwendete Stämme.

CP78 (<i>relA</i> ⁺ , thr, arg, leu, his, thi)
CP79 (<i>relA</i> , thr, arg, leu, his, thi)
NF161 (<i>relA</i> ⁺ , met, arg, thi) <i>spoT</i> -Mutante
NF162 (<i>relA</i> , met, arg, thi)
CP107 (<i>relA</i> ⁺ , thy, arg, ura, thi)
CP143 (<i>relA</i> , thy, arg, ura, thi)

Kultivierungsbedingungen und Bestimmung der Überlebensrate

Die Vorkultur der Stämme erfolgte für 20 h als Schüttelkultur bei 30 °C in einem supplementierten Minimalmedium (MM) [17].

Supplemente: 0,2% Glukose, 0,005% der entsprechenden Aminosäuren und 0,001% Thiamin. Die Hauptkultur wurde mit Zellen aus der Vorkultur bis zu einer optischen Dichte von 0,1 angeimpft (Messung am Spekol Carl Zeiss Jena mit Zusatzverstärker bei 500 nm). Die erste Bestimmung der Überlebensrate (*t*₀) erfolgte mit Kulturen, die sich seit 10 h in der stationären Phase befanden. Abhängig von der beabsichtigten Limitation wurde das MM unterschiedlich supplementiert.

Aminosäurelimitation

100 ml MM enthielten 0,6% Glukose; 0,03% Na₂HPO₄ × 12 H₂O; 0,001% Thiamin und 0,005% jeder notwendigen Aminosäure.

Glukoselimitation

100 ml MM wurden supplementiert mit 0,2% Glukose; 0,03% Na₂HPO₄ × 12 H₂O; 0,001% Thiamin; 0,015% je Aminosäure.

Phosphatlimitation

100 ml MM wurden supplementiert mit 0,6% Glukose; 0,001% Thiamin; 0,015% je Aminosäure.

Die Kulturen befanden sich zu Versuchsbeginn immer seit 10 h in der stationären Phase. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet, 2× mit Phosphatpuffer gewaschen und eine optische Dichte von

1,5 im gleichen Puffer eingestellt (bei Phosphatlimitation mit physiologischer Kochsalzlösung). In Abständen von meist 24 h wurden weitere Proben entnommen. Meßgrößen waren: Zelltitert (mikroskopische Zählung), Bestimmung der optischen Dichte, eine lichtmikroskopische Kontrolle und die Ermittlung der lebensfähigen Keime im Plattentest (MM unter Zusatz von 0,2% Glukose; 0,005% je Aminosäure; 0,001% Thiamin und 2% gewaschenem Fadenagar). Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 30 °C, die Auszählung der Kolonien nach 24 h, weitere Kontrollen nach 72 bzw. 96 h.

Nachweis hochphosphorylierter Nukleotide

Die Zellen wurden in der frühen logarithmischen Phase mit 3,7 MBq/ml H₃ ³²PO₄ (Rossendorf DDR, trägerfrei) markiert und im Abstand von 2 h Proben entnommen. Zusätzlich erfolgte eine Probeentnahme 24 h nach Beginn der log Phase. Je 100 µl wurden dazu in vorgekühlte Eppendorfgefäße mit 10 µl 10 N Ameisensäure pipettiert, 40 min im Eisbad inkubiert und bei 9800 × *g* bei 4 °C für 1 min zentrifugiert. Die Trennung der Nukleotide (10 µl) erfolgte auf Polyäthyleniminzelluloseplatten (1-dimensional) mit KH₂PO₄ (1,5 M, pH = 3,4).

Der autoradiographische Nachweis der Nukleotide wurde unter Einsatz von Röntgenfilmen HS 11 (VEB Fotochemisches Werk Berlin, DDR) nach einer Expositionszeit von 20–24 h durchgeführt. Nach Lokalisierung der Nukleotide wurden die entsprechenden Stellen ausgeschnitten, in 1 ml Toluolszintillator überführt und im Flüssigkeitszintillationspektrometer „Wallace 7000“ (LKB, Schweden) gemessen.

Nach Abzug der Background-Werte wurden die gemessenen Impulse zum Phosphatgehalt des Mediums und zur Gesamtaktivität der Zellsuspension ins Verhältnis gesetzt, durch die Anzahl der Phosphatreste des Nukleotids dividiert und auf eine OD von 1 sowie ein Volumen von 1 ml bezogen. Das Ergebnis wurde in p mol/OD × ml angegeben.

Untersuchungen der Ultrastruktur

Die Fixierung und Einbettung des Zellmaterials erfolgte nach [18]. Die Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop SEM 3 (VEB Werk für Fernsehelektronik Berlin-Oberschöneweide, DDR) angefertigt.

- [1] M. Cashel und K. E. Rudd, in: Cellular and Molecular Biology of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (F. C. Neidhardt, ed.), Amer. Soc. Microbiol., Washington 1987.
- [2] M. Hecker und W. Babel (Hrsg.), Physiologie der Mikroorganismen. Die Zelle, ihr Ökosystem und die molekularen Mechanismen der Adaptation, Gustav Fischer-Verlag, Jena 1988.
- [3] M. Hecker, A. Schroeter, K. Träder und F. Mach, Arch. Mikrobiol. **143**, 400 (1986).
- [4] J. R. Postgate, in: The Survival of Vegetative Microbes, Society of Gen. Microbiol., Symposium No. 26 (T. R. G. Grav und J. R. Postgate, eds.), p. 18, Cambridge University Press, Cambridge 1977.
- [5] D. N. Dietzler und M. P. Leckie, Biochem. Biophys. Res. Commun. **77**, 1459 (1977).
- [6] M. Hecker und A. Schroeter, J. Basic Microbiol. **25**, 341 (1985).
- [7] B. D. Davis, S. H. Luger und P. C. Tai, J. Bacteriol. **166**, 439 (1986).
- [8] M. P. Leckie, V. L. Tieber, S. E. Porter, W. G. Roth und D. N. Dietzler, J. Bacteriol. **161**, 133 (1985).
- [9] J. Preiss, Ann. Rev. Microbiol. **38**, 412 (1984).
- [10] V. L. Balke und J. D. Gralla, J. Bacteriol. **169**, 4499 (1987).
- [11] S. B. Jovanovich und J. Lebowitz, J. Bacteriol. **169**, 4431 (1987).
- [12] R. A. Van Bogelen, P. M. Kelly und F. C. Neidhardt, J. Bacteriol. **169**, 26 (1987).
- [13] J. E. Schultz, G. J. Latter und A. Matin, J. Bacteriol. **170**, 3903 (1988).
- [14] A. D. Grossman, W. E. Taylor, Z. F. Burton und C. A. Gross, J. Mol. Biol. **186**, 357 (1985).
- [15] R. G. Groat, J. E. Schultz, E. Zychlinski, A. Bockman und A. Matin, J. Bacteriol. **168**, 486 (1986).
- [16] F. C. Neidhardt, R. A. Van Bogelen und V. Vaughn, Ann. Rev. Genet. **18**, 295 (1984).
- [17] J. J. Mitchell und J. M. Lucas-Leonard, J. Biol. Chem. **255**, 6307 (1980).
- [18] A. Ryter und E. Kellenberger, Z. Naturforsch. **136**, 597 (1958).