

**Haben die unterschiedlichen upstream
gelegenen DNA-Sequenzen der sieben
rRNA-Operons von *E. coli* einen differentiellen
Einfluss auf die Stringente Kontrolle?**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Dr. rer. nat.

der Math.- Nat. Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

CORINNA POHL

aus Düsseldorf

JUNI 2005

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abgabedatum

1. Juni 2005

Tag der mündlichen Prüfung

6. Juli 2005

1. Gutachter:

Prof. Dr. R. Wagner

2. Gutachter:

Prof. Dr. H. Bünemann

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Düsseldorf, den 1. Juni 2005

Corinna Pohl

Die letzte Stimme, die man hört, bevor die Welt explodiert, wird die Stimme eines Experten sein, der sagt: "Das ist technisch unmöglich." (...) Wir können nicht alles den Technikern überlassen, den Experten.

Sir Peter Ustinov

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	xi
1. Abkürzungen	1
2. Zusammenfassung	5
3. Einleitung	7
3.1. Die sieben rRNA-Operons von <i>E. coli</i>	7
3.1.1. Die UAS-Region	9
3.1.2. Das UP-Element	10
3.1.3. Der <i>rrn</i> -P1- <i>core</i> -Promotor	11
3.2. Die bakterielle RNA-Polymerase	12
3.2.1. Die α -Untereinheit	13
3.2.2. Die β -Untereinheit	13
3.2.3. Die β' -Untereinheit	13
3.2.4. Der σ -Faktor	14
3.3. Die Transkription	15
3.3.1. Die Initiation	15
3.3.2. Die Promotorerkennung	16
Der geschlossene Komplex	16
Der offene Komplex	17
Der Initiationskomplex	17
3.3.3. Die Elongation	18
3.3.4. Die Termination	19
3.3.5. Einfluss der Topologie auf die Transkription	20
3.4. Überwindung von Aminosäuremangel: Die Stringente Kontrolle	21
3.4.1. Wie wird die Stringente Kontrolle ausgelöst?	22
3.4.2. Was ist von der Stringenten Kontrolle betroffen?	23
3.4.3. Der Mechanismus der ppGpp-Inhibierung an den <i>rrn</i> -P1-Promotoren	23
Die RNA-Polymerase als <i>target</i> : Das <i>partition model</i> und das <i>trapping model</i>	23
Die Transkriptionsinitiation	24
Die Kombination mehrerer Modelle erklärt die molekulare Inhibierung	24
3.5. Fragestellung und Konzeption der Arbeit	25

4. Ergebnisse	27
4.1. Promotoranalysen der sieben <i>rrn</i> -Operons von <i>E. coli</i>	27
4.1.1. Konformationsanalyse der sieben <i>rrn</i> -P1-Promotoren	28
4.1.2. Etablierung eines <i>in vitro</i> Transkriptions-Systems	32
Elongationskinetik zur Bestimmung optimaler Reaktionszeiten	32
Einfluss der RNA-Polymerase-Konzentration auf die ppGpp-Sensitivität	33
4.1.3. Differentielle ppGpp-Sensitivität bei linearen <i>rrn</i> -P1-Promotoren	34
Promotoranalyse in Gegenwart konstanter ppGpp-Konzentrationen	35
Differentielle Inhibierung bei steigenden ppGpp-Konzentrationen	36
Einfluss der Start-NTP-Konzentration auf die Transkriptionsaktivität in Gegen-	
wart und Abwesenheit von ppGpp	40
4.1.4. Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen <i>rrn</i> -P1-Promotoren	44
Bestimmung der <i>rrn</i> -P1-initiierten Transkripte auf Plasmidebene	44
Analyse des ccc-Gehaltes präparierter Plasmide	46
Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen <i>rrn</i> -P1-Promotoren	48
Differentielle ppGpp-Sensitivität bei steigenden ppGpp-Konzentrationen	50
Verändern variable Reaktionszeiten die ppGpp-bedingte Inhibierung bei ccc-	
<i>templates</i> ?	53
Verändern Hochsalzbedingungen die Inhibierungsniveaus der <i>rrn</i> -Operons? ..	56
4.2. Welche Promotorelemente des <i>rrnD</i> -P1-Promotors beeinflussen die Transkription? ...	59
4.2.1. Konformationsanalyse mit vier synthetischen <i>rrn</i> -P1-Promotorkonstrukten	59
4.2.2. Differentielle ppGpp-Sensitivität vier synthetischer linearer <i>rrn</i> -P1- <i>templates</i> ..	63
4.2.3. Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen synthetischen	
ccc- <i>rrn</i> -P1-Promotoren	66
Einfluss von verschiedenen Inhibierungssubstanzen auf unterschiedlich struktu-	
rierte <i>rrnB</i> -P1-Promotor-Konstrukte	68
4.3. <i>In vivo</i> Analysen der vier synthetischen <i>rrn</i> -P1-Promotoren während der Stringenten	
Kontrolle	72
4.3.1. Analyse der ppGpp-Akkumulation in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	73
4.3.2. Isolation der Gesamt-RNA aus verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	74
4.3.3. <i>Primer Extension</i> Analyse der vier neuen Konstrukte nach Auslösen der	
Stringenten Kontrolle	75
4.4. Bestimmung der K_m -Werte für den <i>rrnB</i> - und <i>rrnD</i> -P1-Promotor	78
4.4.1. Testtitration mit Startnukleotiden bei dem <i>rrnB</i> - und <i>rrnD</i> -Operon	78
4.4.2. Bestimmung der K_m -Werte für das <i>rrnB</i> und das <i>rrnD</i> -Operon sowie der vier	
neuen Konstrukte	80
5. Diskussion	85
5.1. Intrinsische Eigenschaften der ribosomalen P1-Promotoren	85
5.1.1. Vergleich der verschiedenen <i>rrn</i> -UAS-Regionen	86

5.1.2. Vergleich der verschiedenen <i>rrn-core</i> -P1-Promotoren	86
5.2. Welche Parameter beeinflussen die Transkription?	88
5.2.1. Einfluss der Krümmung auf die ppGpp-Sensitivität	88
5.2.2. Einfluss der <i>core</i> -Promotor-Struktur auf die ppGpp-Sensitivität	90
Die Konsensushexamere -35- und -10-Region	90
Der <i>spacer</i>	91
Der Diskriminator	93
Die Initiationsnukleotide +1 und +2	93
5.3. Einfluss der Superhelikalität auf die ppGpp-Sensitivität	96
5.4. Kann die Konformation der <i>upstream</i> gelegenen Sequenzen der <i>rrn</i> -P1-Promotoren direkt mit der ppGpp-Sensitivität korreliert werden?	97
5.5. Kann bei den <i>rrn</i> -P1-Promotoren ein Promotorkontext formuliert werden, der eine schwache ppGpp-Sensitivität hervorruft?	98
5.6. Vergleich der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Analysen	99
5.7. Korrelation zu anderen Arbeiten	100
6. Material	101
6.1. Allgemeines	101
6.2. Bakterienstämme und Plasmide	101
6.2.1. Verwendete <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stämme	101
6.2.2. Plasmide	102
6.3. Nukleinsäuren	103
6.3.1. Molekulargewichtsmarker	103
6.3.2. DNA-Fragmente	103
6.3.3. Desoxyoligonukleotide	105
6.3.4. Nukleotide/Desoxyoligonukleotide	106
6.4. Proteine	107
6.4.1. Nukleasen	107
6.4.2. Polymerasen	107
6.4.3. Sonstige Proteine	108
6.5. Allgemeine Puffer und Medien	108
6.6. Feinchemikalien	110
6.7. Diverses	111
7. Methoden	113
7.1. Allgemeine und mikrobiologische Methoden	113
7.1.1. Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	113
7.1.2. Haltung und Lagerung von Zellstämmen	113
7.1.3. Anzucht von <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen	113

7.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden	114
7.2.1. Isolation von Nukleinsäuren	114
Plasmidisolation im analytischen Maßstab	114
Plasmidpräparation im präparativen Maßstab	114
7.2.2. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	116
Phenol/Chloroform-Extraktion	116
Ethanolfällung	116
Mikrotropfendialyse	116
7.2.3. Konzentrationsbestimmung	117
Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	117
Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden	117
7.2.4. Analytische Gelelektrophorese	117
Agarosegelelektrophorese	117
Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nativen Bedingungen	118
Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen	119
7.2.5. Nukleinsäurenachweismethoden	119
Ethidiumbromid-Färbung	119
Silberfärbung	119
UV-Shadowing	120
Autoradiographie	120
Densitometrie	121
7.2.6. Präparation von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese	121
Elution aus Agarosegelen durch Zentrifugation	121
Passive Elution aus PAA-Gelen	121
7.2.7. Enzymatische Reaktionen	122
Restriktionshydrolysen	122
Alkalische Dephosphorylierung	122
5'-Endmarkierung	122
Klenowreaktion mit DNA-Fragmenten	123
7.2.8. Klonierungstechniken	123
Polymerasekettenreaktion (PCR)	124
Ligation	126
Transformation	127
7.3. Spezielle Methoden	128
7.3.1. Sequenzierung nach Sanger	128
7.3.2. Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp)	129
<i>In vitro</i> Synthese von ppGpp nach Krohn und Wagner	129
Analytischer Nachweis von ppGpp	129
Anionenaustauschchromatographie	130
Gelfiltration	131

Messung der Leitfähigkeit	131
7.3.3. <i>In vivo</i> Nachweis von ppGpp	131
7.3.4. Isolation von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i>	133
7.3.5. <i>In vitro</i> Transkription (IVT)	133
RNA-Polymerase	134
Ribonukleotide	134
<i>Templates</i>	134
Pufferbedingungen	134
Reaktionsansatz	135
Reaktionsablauf	135
<i>In vitro</i> Transkription unter <i>multiple round</i> Bedingungen	135
<i>In vitro</i> Transkription unter <i>single round</i> Bedingungen	136
7.3.6. <i>Primer Extension</i> zur Analyse von RNA	136
7.3.7. <i>Primer Extension</i> Sequenzierung von RNA	137
8. Literaturverzeichnis	139
9. Danksagung - Abschied	147

Tabellenverzeichnis

4.1	k-Faktoren der <i>rrn</i> -Fragmente	30
4.2	End-End-Distanzen nach DIAMOD	31
4.3	K_i -Werte verschiedener <i>rrn</i> -Operons	38
4.4	K_m -Werte verschiedener <i>rrn</i> -Operons	43
4.5	Berechnete Transkriptgrößen der sieben <i>ccc-templates</i>	45
4.6	K_i -Werte verschiedener <i>ccc-rrn-templates</i>	52
4.7	k-Faktoren der 4 synthetischen <i>rrn</i> -Fragmente	61
4.8	End-End-Distanzen der vier neuen Konstrukte nach DIAMOD	61
4.9	End-End-Distanzen der UP-Elemente nach DIAMOD	62
4.10	K_m -Werte von <i>rrnB</i> und <i>rrnD</i> in An- und Abwesenheit von 300 μM ppGpp	82
4.11	K_m -Werte der sechs verwendeten <i>rrn-templates</i>	82
6.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	101
6.2	Verwendete DNA-Fragmente	105
6.3	Verwendete Desoxyoligonukleotide	106
7.1	Molare Extinktionskoeffizienten nach Fasman (1979)	118

Abbildungsverzeichnis

3.1	<i>E. coli</i> -Genom.	8
3.2	Schematischer Aufbau des <i>rrnB</i> -Operons.	9
3.3	Konformationsänderungen des RNA-Polymerase-DNA-Komplexes während der Initiation.	10
3.4	Struktur der RNA-Polymerase im Elongationskomplex von <i>Thermus aquaticus</i> nach Korzheva <i>et al.</i>	12
3.5	Initiationsschema nach Record <i>et al.</i> , 1996.	15
3.6	Auswirkungen der Stringenten Kontrolle auf verschiedene Syntheseprozesse.	21
3.7	ppGpp-Synthese.	22
4.1	UAS <i>alignments</i> der sieben <i>rrn</i> -Operons von <i>E. coli</i>	28
4.2	Krümmungsanalysen der sieben <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	29
4.3	Konformation der <i>rrn</i> -UAS-Regionen.	31
4.4	Elongationskinetik mit linearem <i>template</i>	33
4.5	RNA-Polymerase-Titration mit linearem <i>template</i>	34
4.6	Differentielle ppGpp-Sensitivität bei sieben linearen <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	35
4.7	Histogramm von <i>in vitro</i> Transkriptionen mit allen sieben linearen <i>rrn</i> -P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μ M ppGpp.	36
4.8	ppGpp-Titration mit dem <i>rrnB</i> -, <i>rrnD</i> - und <i>rrnH</i> -Fragment.	37
4.9	ppGpp-Titration mit fünf <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	37
4.10	Graphische Auswertung der ppGpp-Titration mit fünf verschiedenen <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	38
4.11	Inhibierungskurven dreier verschiedener <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	39
4.12	Start-NTP-Titration mit verschiedenen <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	40
4.13	Graphische Auswertung der Start-NTP-Titration mit drei verschiedenen <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	41
4.14	Inhibierungskurven in Abhängigkeit von Startnukleotid-Konzentrationen.	42
4.15	Vergleichende <i>in vitro</i> Transkription von pHD1-B und pKK232-8 zur Bestimmung der P1-initiierten Transkripte.	46
4.16	Analyse des ccc-Gehaltes der sieben pHD1-Plasmide.	47
4.17	Analyse der <i>nicking</i> Aktivität der RNA-Polymerase.	48
4.18	Differentielle ppGpp-Sensitivität bei ccc- <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	49
4.19	Histogramm von <i>in vitro</i> Transkriptionen mit allen sieben ccc- <i>rrn</i> -P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μ M ppGpp.	49

4.20	ppGpp-Titration mit drei <i>ccc-rrn</i> -P1-Promotoren.	50
4.21	Inhibierung infolge steigender ppGpp-Konzentrationen bei drei <i>ccc-rrn</i> -P1-Promotoren. . .	51
4.22	Elongationskinetik bei zwei <i>ccc-rrn</i> -P1-Promotoren.	53
4.23	Graphische Auswertung der relativen Elongationskinetik mit zwei <i>ccc-rrn-templates</i>	55
4.24	<i>In vitro</i> Transkription unter Hochsalzbedingungen mit zwei <i>ccc-rrn</i> -P1-Promotoren. . . .	56
4.25	Histogramm der <i>in vitro</i> Transkription unter Hochsalzbedingungen.	57
4.26	Vier synthetische rRNA-P1-Promotor-Konstrukte.	59
4.27	Krümmungsanalysen der vier synthetischen <i>rrn</i> -P1-Promotoren.	60
4.28	Konformation der 4 synthetischen <i>rrn</i> -UAS-Regionen.	61
4.29	Konformation der zwei UP-Elemente.	62
4.30	<i>In vitro</i> Transkription mit linearen <i>templates</i> bei 0 und 300 μ M ppGpp.	64
4.31	Quantitative Auswertung der oben gezeigten <i>in vitro</i> Transkription.	64
4.32	Quantitative Darstellung der Restaktivität von zwei <i>in vitro</i> Transkriptionen mit linearen <i>templates</i> bei 0 und 300 μ M ppGpp.	65
4.33	IVT mit synthetischen <i>ccc-rrn</i> -P1-Promotoren bei 0 und 300 μ M ppGpp.	67
4.34	Histogramm der Restaktivitäten der <i>in vitro</i> Transkription mit synthetischen <i>ccc</i> -P1-Promotoren.	68
4.35	Autoradiogramm der <i>in vitro</i> Transkription mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen.	69
4.36	Histogramm der <i>in vitro</i> Transkription mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen.	70
4.37	Wachstumsraten der vier neuen Konstrukte im Wildtyp MG1655.	72
4.38	Wachstumsraten der vier neuen Konstrukte in der <i>relA</i> ⁻ -Mutante CF1651.	73
4.39	Akkumulation von ppGpp in den Stämmen MG1655 und CF1651.	74
4.40	Analyse der Oligonukleotidkonzentration mit verschieden Gesamt-RNA-Konzentrationen. . . .	75
4.41	<i>Primer Extension</i> Analyse der vier neuen Konstrukte in MG1655.	76
4.42	Quantitative Auswertung der <i>Primer Extension</i> Analyse der vier neuen Konstrukte in MG1655 und CP78.	77
4.43	Testtitration zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches bei der Startnukleotid-Konzentration.	79
4.44	Start-NTP-Titration bei <i>rrnB</i> -P1-Promotoren in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp. . . .	80
4.45	Transkriptintensitäten in Abhängigkeit der Startnukleotid-Konzentration bei <i>rrnB</i> -P1-Promotoren.	81
4.46	Transkriptintensitäten in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration bei <i>rrnB</i> -/+ 300 μ M ppGpp.	82
5.1	Sequenzen der ribosomalen P1- <i>core</i> -Promotoren.	87
5.2	Initiationsschema nach Record <i>et al.</i> , 1996.	88
5.3	Angulare Orientierung der Promotorelemente.	92
5.4	Molekulare Architektur der RNA-Polymerase von <i>Thermus thermophilus</i> in Komplex mit dem Effektormolekül ppGpp nach Perederina <i>et al.</i>	94
7.1	Vier synthetische rRNA-P1-Promotor-Konstrukte.	124

7.2	Gerichtete <i>blunt end</i> -Ligation.	126
7.3	Chromatogramm der ppGpp-Synthese <i>in vitro</i>	130

1 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidintriphosphat
D	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribouncleic acid</i>)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FIS	<i>factor for inverse stimulation</i>
G	Guanosin
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
H-NS	<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>
k	kilo
kb	Kilobasen
KGlu	Kaliumglutamat
l	Liter
m	milli
M	molar
mA	Miliampere
min	Minute
mm	Millimeter
μ	mikro
n	nano
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p	pico
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	<i>primer extension</i>
PEG ₆₀₀₀	Polyethylenglycol mit durchschnittl. Kettenlänge von 6000
PEI	Polyethylenimin
ppGpp	Guanosin-3'-5'-(bis)-diphosphat
pppGpp	Guanosin-3'-di-5'-triphosphat
PSI	(p)ppGpp-Synthetase I
PSII	(p)ppGpp-Synthetase II
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA-Polymerase
RNaseA	Ribonuklease A
RP _c	geschlossener Promotorkomplex (<i>closed RNAP-promoter complex</i>)
RP _{init}	Initiationskomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RP _o	offener Promotorkomplex
<i>rrn</i>	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
t	Zeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan

U	Unit
U	Uridin
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
üN	über Nacht
üT	über Tag
UTP	Uridintriphosphat
UP-Element	<i>upstream-Element</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i>

2 Zusammenfassung

Bakterien reagieren sehr schnell und effizient auf veränderte Wachstumsbedingungen. Bei Aminosäuremangel wird die Stringente Kontrolle als regulatorisches Netzwerk aktiviert, um den mangelnden Substratpool an Aminosäuren wieder aufzufüllen. Das Effektormolekül ppGpp wird schnell durch ein ribosomassoziertes Enzym (RelA) synthetisiert und vermittelt hormonartig eine weitreichende Änderung von Syntheseprozessen. Die Expression der sieben ribosomalen RNA- (*rrn*-) Operons (*rrnA* bis -E, *rrnG* und *rrnH*), die die Strukturgene der 16S, 23S und 5S RNA sowie einige tRNA-Gene codieren, wird dabei drastisch gesenkt. Vergangene Arbeiten konnten die Transkriptionsinitiation als Hauptziel für den Inhibierungsmechanismus identifizieren.

In dieser Arbeit wurde die basale Transkription und die ppGpp-Sensitivität an den sieben *rrn*-P1-Promotoren von *Escherichia coli* untersucht. Dabei zeigten starke Promotoren eine schwache ppGpp-Sensitivität, es konnte folgende Reihung aufgestellt werden:

$$\begin{array}{ccc} rrnD < rrnA, rrnB, rrnC, rrnE, rrnG < rrnH \\ \text{schwach} & \longrightarrow & \text{stark durch ppGpp inhibiert} \end{array}$$

Aufgrund dieser Reihung wurde der Einfluss der *upstream* gelegenen Sequenzen auf die ppGpp-Sensitivität näher analysiert. Anhand von Austauschfusionen wurde *in vitro* und *in vivo* der Einfluss einzelner Promotorelemente des *rrnD*-Operons auf die ppGpp-Sensitivität studiert, die Elemente wurden in UAS-Region, UP-Element und *core*-Promotor unterteilt. Die Ergebnisse zeigten:

- Je stärker die Krümmung einer Promotorregion, desto stärker fällt die basale Transkription aus
- Die Kombination einzelner Promotorelemente ist für die Transkriptionseffizienz und für die differentielle ppGpp-Sensitivität verantwortlich
- Die UAS-Region mit dem zugehörigen nativen UP-Element ist für die ppGpp-Sensitivität nicht so relevant
- Das UP-Element mit dem zugehörigen nativen P1-Promotor wirkt sich drastisch auf die ppGpp-Sensitivität aus
- Der Einfluss der UAS-Region des *rrnD*-P1-Promotors auf die ppGpp-Sensitivität ist enorm, sie kann bei Fusion mit dem *rrnB*-UP-Element und dem *rrnB-core*-Promotor dessen Inhibierung abschwächen

Zudem wurde der Einfluss der Topologie auf die basale Transkription und die ppGpp-Sensitivität untersucht. Superhelikale *templates* zeigten eine viel stärkere Transkription, die mit einer schwächeren ppGpp-Inhibierung einher ging. Die Superhelikalität wirkt sich auf die angulare Orientierung der beiden Konsensushexamere -35- und -10-Region aus. Unter superhelikalen Bedingungen scheint diese Ausrichtung günstiger für die Erkennung durch die RNA-Polymerase zu sein.

3 Einleitung

In allen Organismen bestimmen drei Prozesse die Weitergabe der genetischen Information: Die Replikation (DNA-Synthese), die Transkription (RNA-Synthese) und die Translation (Proteinsynthese). Da in Bakterien keine Zellkompartimente vorliegen, greifen diese Prozesse ineinander und erfordern eine komplexe Regulation der Genexpression, die eine Anpassung an die herrschenden Umweltbedingungen gewährleisten muss. Die hauptsächliche Regulation wird auf Transkriptionsebene durchgeführt. Die Transkription wird von einer RNA-Polymerase durchgeführt, die sowohl die stabilen RNAs als auch die mRNAs synthetisiert. In *E. coli* existieren viele regulatorische Netzwerke, die eine Spezialisierung auf bestimmten Umweltstress zeigen. Ein sehr bekanntes Regulon ist die Stringente Kontrolle, die eine rasche Adaptation an Aminosäuremangel gewährleistet. Das kleine Effektormolekül Guanosintetraphosphat (ppGpp) vermittelt hormonartig die Umverteilung der Transkription, um die Mangelsituation rasch zu überwinden [20]. Die Ursache für die Umverteilung ist die starke Transkriptionseinhibierung an den ribosomalen RNA-P1-Promotoren (*rrn*-P1-Promotoren) [18], [21]. Da diese Promotoren während des exponentiellen Wachstums am stärksten transkribiert werden, bewirkt eine Transkriptionseinhibierung dieser Promotoren eine erhöhte Kapazität der vorhandenen RNA-Polymerasen für die Transkription von Genen, die für die Überwindung der Mangelsituation erforderlich sind.

In der Vergangenheit konnte eine differentielle ppGpp-Sensitivität der sieben *rrn*-P1-Promotoren festgestellt werden [17], [57], [94]. In dieser Arbeit sollte die Ursache für die differentielle ppGpp-Sensitivität näher analysiert werden. Es wurde angenommen, dass die Heterogenität der *upstream* gelegenen Sequenzen der *rrn*-P1-Promotoren einen Einfluss nehmen kann. Da der ppGpp-Effekt sich hauptsächlich auf die Transkription auswirkt, werden die beteiligten Parameter ausführlich beleuchtet.

3.1 Die sieben rRNA-Operons von *E. coli*

In Abbildung 3.1 ist das chromosomale Arrangement der sieben *rrn*-Operons in *E. coli* abgebildet. Die Operons werden als *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH* bezeichnet. Das Operon *rrnF* erwies sich als Teil eines mRNA-Gens [51]. Die Transkription der Operons ist parallel zur Replikationsrichtung ausgerichtet, die am *oriC* beginnt und sich in beide Richtungen (blaue Pfeile) fortsetzt, bis sie 180° weiter terminiert wird. Durch die parallele Ausrichtung von Replikation und Transkription wird eine Kollision beider Prozesse verhindert. Bei hohen Wachstumsraten werden am *oriC* mehrere Replikationen simultan initiiert. Dadurch ist die Gendosis solcher rRNA-Operons erhöht, die nahe am *oriC* liegen. Unter optimalen Bedingungen werden diese Operons häufiger als weiter entfernte Operons, wie z.B. das

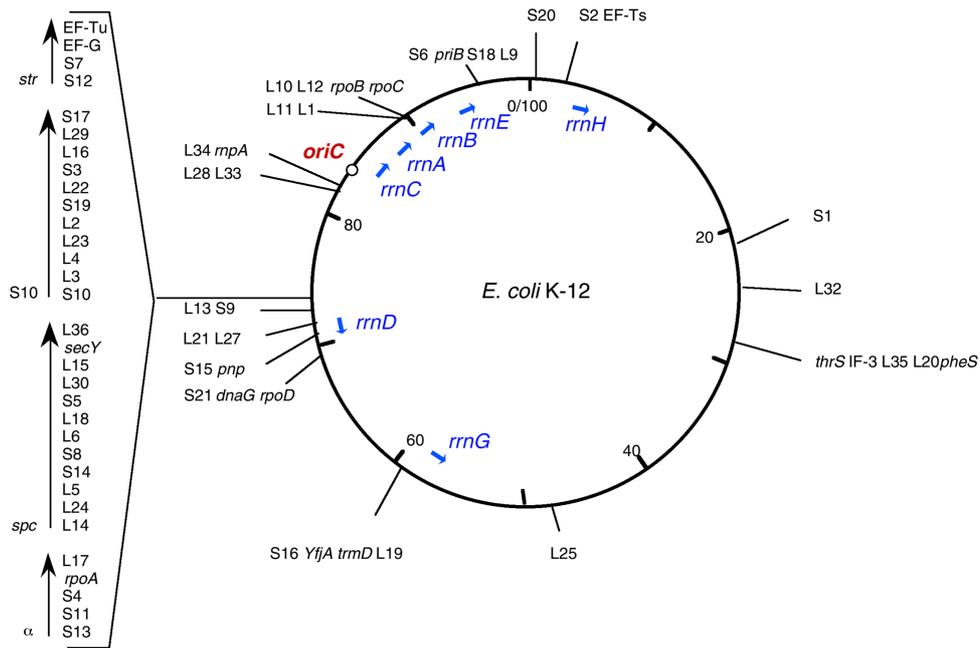


Abbildung 3.1: *E. coli*-Genom. Chromosomale Anordnung der Translationskomponenten auf dem *E. coli* Genom nach Condon *et al.* [27]. Die ribosomalen Proteine sind in Clustern angeordnet (siehe Pfeil) und sind nur einmal pro Genom codiert. L bzw. S vor der jeweiligen Zahl bezeichnet die Zugehörigkeit zur großen (*large*) bzw. kleinen (*small*) Untereinheit des 70 S Ribosoms. Die ribosomalen Operons sind in blau dargestellt und zeigen sieben verschiedene Kopien (A bis H). In rot ist der Replikationsstartpunkt markiert, von hier aus läuft die Replikationsgabel in beide Richtungen und wird 180° weiter terminiert. Zudem sind die Genloci von Translationsfaktoren und RNA-Polymeraseuntereinheiten aufgezeigt (EF-Ts, rpoX).

rrnH-Operon, transkribiert. Experimente, in denen die Anzahl der rRNA-Gene variierten, zeigten, dass sich Deletionen von Operons nicht erheblich auf die maximalen Wachstumsraten auswirken. Die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen erforderte jedoch die Anwesenheit aller sieben *rrn*-Operons [26], [27].

Dadurch stellt sich die Frage, ob die sieben *rrn*-Operons spezifische Informationen für die Adaptation an bestimmte Umweltbedingungen codieren. Mittlerweile konnten einige Arbeiten zeigen, dass in der Tat die Sequenzunterschiede in den *rrn*-Operons eine differentielle Fitness für bestimmte Stresssituationen bedingen [75] und dass die *rrn*-Operons selbst auch differentiell reguliert werden [52], [17], [94]. Die Sequenzunterschiede der sieben *rrn*-Operons nehmen vom Beginn der UAS-Region in *downstream*-Richtung ab, d.h. es liegt ein gradueller Verlauf der Heterogenitäten vor. Die Strukturgene zeigen nur noch minimale Abweichungen, man bezeichnet sie als Mikroheterogenitäten.

Vergangene Arbeiten zeigten, dass die differentielle Regulation der Transkription auf der Heterogenität der UAS-Region beruht. Die unterschiedlichen dreidimensionalen Architekturen wirken sich auf die Bindung von regulatorischen Proteinen aus, die Promotorerkennung durch die RNA-Polymerase wird maßgeblich dadurch beeinflusst. Im Folgenden wird die Promotorstruktur der ribosomalen RNA-Operons ausführlicher beleuchtet.

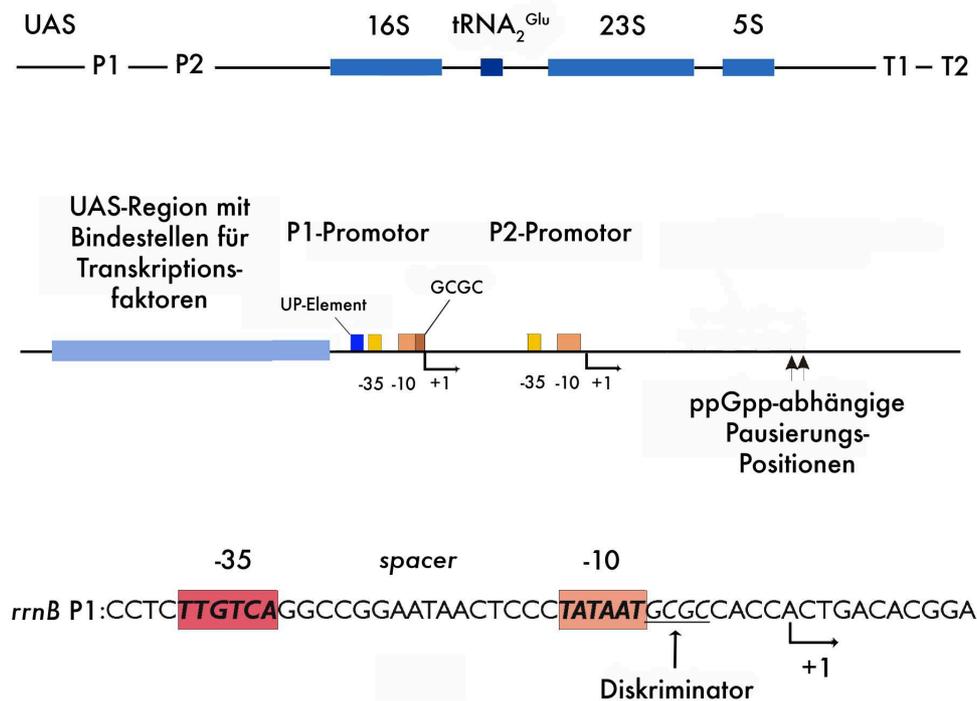


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des *rrnB*-Operons. In der Abbildung ist der Aufbau des *rrnB*-Operons schematisch dargestellt. Im oberen Teil ist das gesamte Operon abgebildet, der mittlere Teil zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Promotorregion, im untersten Teil ist die Sequenz des *rrnB*-P1-core-Promotors dargestellt. Wichtige Elemente sind farblich markiert.

3.1.1 Die UAS-Region

In Abbildung 3.2 ist der schematische Aufbau des *rrnB*-Operons exemplarisch dargestellt. Jedes *rrn*-Operon besitzt eine UAS-Region, in der Bindestellen für aktivierende und reprimierende Proteine wie FIS und H-NS lokalisiert sind. Die UAS-Regionen der sieben *rrn*-P1-Promotoren umfassen durchschnittlich 250 bp. Die Krümmung der UAS-Region fällt unter den sieben Operons unterschiedlich aus [52], diese Arbeit, 4.1.1. Damit verbunden fällt die Transkriptionseffizienz an den P1-Promotoren unterschiedlich aus. Die Promotorstärke wird durch die UAS-Regionen beeinflusst.

Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass die die Position der Krümmung zu den beiden Konsensushexameren -35- und -10-Region einen enormen Effekt auf die Aktivierung eines Promotors hat [11]. Dabei wirkten sich Insertionen und Deletionen von ganzzahligen Helixwindungen kaum auf die Aktivität aus. Änderungen in nicht-ganzzahlige Helixwindungen zeigte einen deutlichen Abfall der Aktivierung [93].

Ein wichtiger Aspekt bei der Aktivierung ist die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor. Dadurch werden kinetische Parameter der Initiation positiv beeinflusst. Die Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Komplex (k_2) sowie die initiale Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor

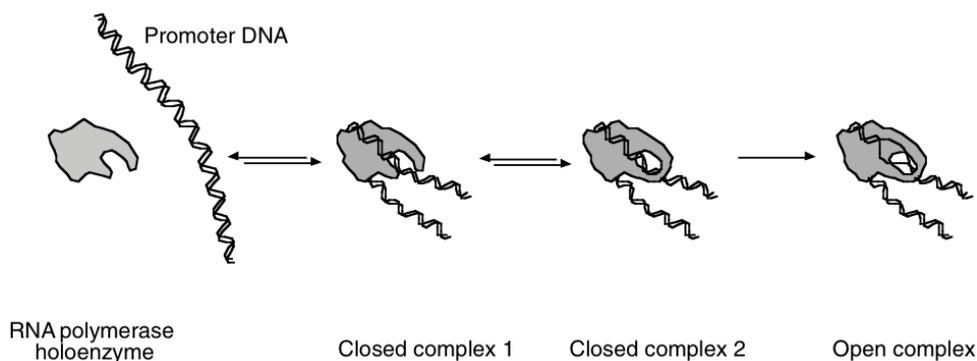


Abbildung 3.3: Konformationsänderungen des RNA-Polymerase-DNA-Komplexes während der Initiation.

In der Abbildung sind die einzelnen Isomerisierungsschritte von der Promotorerkennung bis zum offenen Komplex dargestellt. Die stark vereinfachte Darstellung der RNA-Polymerase beruht auf kristallographisch erhaltenen Strukturdaten. Aus Wagner [128], verändert nach [96].

(K_B) werden stark von der Krümmungsintensität beeinflusst [97], [108], [30]. In Abbildung 3.5 ist das Initiationsschema nach Record *et al.* angegeben.

Die erleichterte Bindung der RNA-Polymerase an die Promotor-DNA wird durch eine vergrößerte Interaktions-Oberfläche der DNA hervorgerufen. Die DNA wird um die RNA-Polymerase gewickelt, was durch eine Krümmung erleichtert wird. Die anschließende Isomerisierung zum offenen Komplex resultiert aus Konformationsänderungen der RNA-Polymerase während des geschlossenen Komplexes. Es wurden mehrere intermediäre Stadien des geschlossenen Komplexes nachgewiesen [88], [87]. Dabei schließt sich die „Klaue“ der RNA-Polymerase um die DNA, die durch die beiden Untereinheiten β und β' gebildet wird. Damit einhergehende Konformationsänderungen verursachen einen Torsionsstress, der durch ein partielles Aufschmelzen der DNA ausgeglichen werden kann. In Abbildung 3.3 wird dieser Prozess veranschaulicht.

Insgesamt betrachtet ist der aktivierende Einfluss der UAS-Region nicht nur durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase allein verantwortlich. UAS-Regionen enthalten sehr oft Bindestellen für regulatorische Proteine, deren Bindung durch eine Krümmung erleichtert bzw. eine Krümmung durch Bindung verursacht wird, die sich aktivierend oder reprimierend auf die Transkription auswirken kann. In der Vergangenheit konnten Studien mit den antagonistisch wirkenden Proteinen FIS und H-NS eine wachstumsphasenabhängige Aktivierung bzw. Reprimierung der *rrn*-P1-Promotoren nachweisen [10], [117].

3.1.2 Das UP-Element

Am *downstream*-Ende einer UAS-Region befindet sich das UP-Element. In der Vergangenheit wurde dieses Element oft als drittes Promotor-Erkennungs-Element bezeichnet [107]. Es umfasst bei den *rrn*-P1-Promotoren 27 bp und kann in das proximale und das distale UP-Element relativ zum Transkriptionsstart unterteilt werden [38]. Alle bisher charakterisierten UP-Elemente wiesen einen hohen Gehalt an *A-clustern* als Gemeinsamkeit auf. Vergangene Arbeiten zeigten, dass sich die Sequenz und

die resultierende Konformation des UP-Elements auf die Transkription u.a. an den *rrn*-P1-Promotoren auswirkt [110], [40]. Dabei konnte eine Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne der α -UE der RNA-Polymerase nachgewiesen werden und dass die Bindung in der kleinen Furche der DNA erfolgt [107], [106], [109]. Weitere Studien zeigten, dass eine gleichzeitige Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor der RNA-Polymerase vorliegt, der für die Erkennung der beiden Konsensushexamere verantwortlich ist (siehe unten) [109], [108]. Diese Interaktion führte zu einer 30fachen Aktivierung [134]. Vergleichende Analysen der *rrn*-P1-Promotoren konnten nachweisen, dass das *rrnD*-UP-Element die stärkste Aktivierung hervorruft [53].

3.1.3 Der *rrn*-P1-core-Promotor

In *E. coli* wird die Transkription der *rrn*-Operons hauptsächlich an dem P1-Promotor initiiert. Der P2-Promotor zeigt eine schwächere Transkription und wird nicht so stark durch Transkriptionsfaktoren bzw. ppGpp reguliert. In Abbildung 3.2 ist die Sequenz des *rrnB*-P1-Promotors dargestellt. Die -10-Region entspricht der des idealen Promotors (TATAAT, *non template*-Strang), die -35-Region zeigt eine Abweichung (TTGACA, *non template*-Strang). Beide Elemente werden durch den σ^{70} -Faktor erkannt und gebunden, der Grad der Übereinstimmung mit den idealen Sequenzen bestimmt die Interaktion maßgeblich.

Die Elemente werden durch den *spacer* getrennt. Der ideale Konsensuspromotor besitzt einen 17 bp langen *spacer*, die *rrn*-Operons weisen einen suboptimalen *spacer* von 16 bp auf. Vergangene Arbeiten zeigten, dass Sequenzänderungen in dem *spacer* wenig Einfluss auf die basale Transkriptionseffizienz nehmen. Insertionen oder Deletionen wirkten sich jedoch erheblich aus [129], [74]. Der Grund für die Relevanz der *spacer*-Länge liegt in der Ausrichtung der beiden Konsensushexamere zueinander, was als *angulare Orientierung* bezeichnet wird. In Abschnitt 5.2.2, Abbildung 5.3 wird diese Eigenschaft veranschaulicht. Insertionen oder Deletionen verursachen eine Änderung der Helixwindung (*twist*). Die resultierende *angulare Orientierung* verändert die Bindung der beiden Hexamere an den σ^{70} -Faktor, was sich deutlich auf die Transkription auswirkt. Die *rrn*-P1-Promotoren zeigen eine hohe *twist*-Sensitivität, die Topologie-abhängig ist. In einer superhelikalen DNA kann die Ausrichtung durch den *spacer* durchaus *different* von der linearen Form ausfallen. Dies wird weiter unten unter 3.3.5 ausführlicher diskutiert.

Direkt *downstream* der -10-Region liegt ein GCGC-Motiv. Dieses Motiv wird als Diskriminator bezeichnet und ist ein wichtiges Element für die ppGpp-Sensitivität von Promotoren [131], [132], [134]. Analysen mit ATAT-Austauschsubstitutionen zeigten eine verminderte ppGpp-Sensitivität der *rrn*-P1-Promotoren [99], [98]. Viele Promotoren, die positiv durch ppGpp reguliert werden, zeigen statt einem GCGC- ein ATAT-Motiv. Der Diskriminator ist jedoch kein ausreichendes Kriterium für die ppGpp-Sensitivität eines Promotors. Die *upstream* gelegenen Sequenzen sowie das Startnukleotid spielen dabei ebenfalls eine wichtige Rolle.

Sechs der sieben *rrn*-P1-Promotoren starten mit einem Adenosin, das *rrnD*-Operon zeigt ein Guanosin an Position +1. Die Startposition der Promotoren wird durch die Sequenzumgebung definiert. Durch die

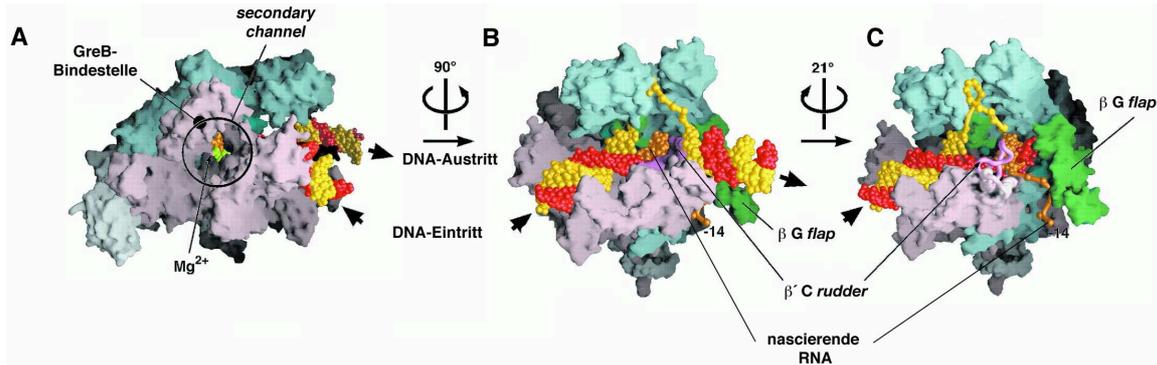


Abbildung 3.4: Struktur der RNA-Polymerase im Elongationskomplex von *Thermus aquaticus* nach Korzheva *et al.* Die Abbildung zeigt drei verschiedene Ansichten der RNA-Polymerase im Elongationskomplex nach Korzheva *et al.* [63]. Die Untereinheiten sind farbig hervorgehoben: β = hellblau, Domäne G β -flap = grün; β' = hellviolett, Domäne C β' -rudder = dunkles violett; α und ω = dunkel- bzw. hellgrau. A) Ansicht durch den *secondary channel* auf das aktive Zentrum, in der Nähe der Eintrittsöffnung ist die Bindestelle für GreB eingezeichnet. B) Frontalansicht auf den ternären Komplex, die DNA liegt partiell einzelsträngig an die RNA-Polymerase gebunden vor, die Interaktion von RNA und dem *template*-Strang ist deutlich sichtbar. C) Die RNA verlässt durch den *exit channel* die RNA-Polymerase und stößt dabei auf die Domäne G der β -Untereinheit (*flap*).

Ausrichtung der Konsensus-Elemente zueinander bzw. durch die Konformation der RNA-Polymerase während der Initiation entscheidet die resultierende dreidimensionale Anordnung darüber, welches Nukleotid im aktiven Zentrum der RNA-Polymerase an der Position des Nukleotideinbaus liegt. Zudem bestimmt die gesamte Promotorstruktur den Konzentrationsbedarf an einzubauendem Nukleotid. Der Konzentrationsbedarf wird durch den K_m -Wert für eine Position repräsentiert. In der Vergangenheit konnte der Einbau des Startnukleotids als größte Barriere während der Initiation an *rrn*-P1-Promotoren identifiziert werden [57], [70]. Alle *rrn*-P1-Promotoren zeigen einen hohen K_m -Wert für das Startnukleotid, diese Arbeit. Im Zusammenhang damit wurde vermutet, dass der hohe K_m -Wert die Hauptursache für die starke ppGpp-Inhibierung an diesen Promotoren ist. In Abschnitt 3.4 wird ausführlicher darauf eingegangen.

3.2 Die bakterielle RNA-Polymerase

In Bakterien wird die gesamte Transkription von einer einzigen RNA-Polymerase durchgeführt, in Abbildung 3.4 ist der strukturelle Aufbau der RNA-Polymerase (*core*-Enzym im Elongationskomplex) in Komplex mit der DNA und dem naszierenden Transkript veranschaulicht. Das *core*-Enzym besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten: $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Die α -UE kommt in dem Enzym zweimal vor. Prinzipiell kann das *core*-Enzym allein die Transkription an partiell aufgeschmolzenen Promotoren initiieren [16], für die spezifische Erkennung von Promotoren ist jedoch der σ -Faktor zusätzlich notwendig. Das Holoenzym ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) zeigt ein Molekulargewicht von ca. 440 kDa.

3.2.1 Die α -Untereinheit

Die α -Untereinheit ist zweimal in der bakteriellen RNA-Polymerase vorhanden. Das Protein wird durch das *rpoA*-Gen codiert, hat eine Länge von 329 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 36,5 kDa. Die Untereinheit besteht aus zwei Domänen, der C-terminalen Domäne (CTD) und der N-terminalen Domäne (NTD). Beide Domänen werden durch einen flexiblen *linker* miteinander verbunden. Die NTD ist maßgeblich an der Assemblierung des *core*-Enzyms beteiligt [54].

Die C-terminale Domäne interagiert mit der DNA bzw. mit Transkriptionsfaktoren, die an die Promotor-DNA binden. Bei den *rrn*-P1-Promotoren wurde die Interaktion der α -CTD mit dem UP-Element ausführlich studiert [77], [38]. Es konnte gezeigt werden, dass die α -CTD in die kleine Furche der DNA innerhalb des UP-Elements bindet, die resultierende Aktivierung fiel 30fach höher aus. Beiden α -CTDs der RNA-Polymerase binden jeweils an das proximale und das distale Ende des UP-Elements, siehe 3.1.3, [38]. Die an das proximale UP-Element bindende α -CTD befindet sich in direkter Nähe zur -35-Region. Experimente mit Deletionen der α -CTD bzw. mit Austauschsubstitutionen im proximalen UP-Element konnten eine Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor zeigen, was z.T. eine enorme Aktivierung der Transkription zur Folge hatte [109], [60].

3.2.2 Die β -Untereinheit

Sie bildet zusammen mit der β' -Untereinheit das katalytische Zentrum der RNA-Polymerase. Das Protein wird von dem *rpoB*-Gen codiert und umfasst 1342 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 150,6 kDa entspricht. Damit stellt es die zweitgrößte Untereinheit der RNA-Polymerase dar. Die β -Untereinheit zeigt eine hohe Homologie zu den zweitgrößten Untereinheiten von eukaryontischen RNA-Polymerasen, was eine Konservierung der generellen katalytischen Eigenschaften dieser Untereinheit unterstreicht.

Mutationsanalysen dieser Untereinheit zeigen, dass der Einbau von Nukleotiden in die naszierende RNA maßgeblich von der β -Untereinheit mit katalysiert wird. In dieser Untereinheit ist die Bindestelle für Rifampicin lokalisiert, das den Einbau von Nukleotiden verhindert und somit ein Transkriptions-hemmendes Antibiotikum repräsentiert. Beide Untereinheiten, β und β' bilden den sogenannten *secondary channel*, durch den die Nukleotide während der Transkription in das aktive Zentrum gelangen, um dort eingebaut werden zu können. In der Vergangenheit konnte an dieser Untereinheit durch *cross-linking* Experimente eine Bindung von ppGpp nachgewiesen werden [24]. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheit an Prozessen während der Elongation und der Termination beteiligt ist.

3.2.3 Die β' -Untereinheit

Die größte Untereinheit der RNA-Polymerase wird von dem *rpoC*-Gen codiert und umfasst 1407 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 155,2 kDa. Hier existiert ebenfalls eine hohe Homolo-

gie zu eukaryontischen RNA-Polymerasen, diese Untereinheit zeigt über 70 % Sequenzhomologie zur größten Untereinheit eukaryontischer RNA-Polymerasen. Mutationsanalysen mit dieser Untereinheit bewiesen, dass die β' -Untereinheit ebenfalls an der dreidimensionalen Bildung der Nukleotideinbaustelle beteiligt ist. Die Untereinheit besitzt im N-terminalen Bereich ein Zinkfinger-Motiv, was für die DNA-Bindung durch diese Untereinheit verantwortlich ist. *Cross-linking* Experimente zeigten auch hier eine ppGpp-Bindung [121]. Die Tatsache, dass in beiden grossen RNA-Polymerase-Untereinheiten eine ppGpp-Bindestelle gefunden wurde, beweist einmal mehr, dass beide Untereinheiten an der Bildung des katalytischen Zentrums beteiligt sind. Mittlerweile ist bekannt, dass der von beiden Proteinen gebildete *secondary channel* den Eintritt der Nukleotide ermöglicht, der Durchmesser von ca. 10 Å erlaubt auch den Durchtritt von ppGpp. Strukturanalysen zeigten zudem, dass ppGpp im aktiven Zentrum in räumlicher Nähe zur Nukleotideinbaustelle lokalisiert ist [3].

3.2.4 Der σ -Faktor

Bei Bakterien ermöglichen insgesamt sieben σ -Faktoren die Transkription von bestimmten Gengruppen. Umweltveränderungen bzw. spezielle Stoffwechselprozesse erfordern die Assoziation von ganz bestimmten σ -Faktoren an das Holoenzym. Die verschiedenen Faktoren erkennen meist unterschiedliche Promotorsequenzen. Bei exponentiellem Wachstum wird der Hauptteil der Gene von dem σ^{70} -Faktor erkannt und transkribiert. Der σ^{70} -Faktor erkennt den klassischen Konsensus-Promotor: Die -35-Region (5' TTGACA 3', *non template*-Strang) wird hier durch einen 17 bp langen *spacer* von der -10-Region (5' TATAAT 3', *non template*-Strang) getrennt. Alle σ -Faktoren haben gemeinsame Funktionen: Die Erkennung des Promotors, die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren, das Aufschmelzen der DNA und die Direktion des Transkriptionsstarts [41].

Der σ^{70} -Faktor besteht aus vier Domänen, denen unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden. Die Region 4.2 ist für die Erkennung der -35-Region verantwortlich, diese Region besitzt DNA-Bindemotive und führt den Kontakt zu dem Hexamer durch. Die DNA-Bindung wird in dieser Region durch *helix-turn-helix*-Motive durchgeführt. Die Region 2.4 ist für die Erkennung und Bindung der -10-Region zuständig, auch hier sind *helix-turn-helix*-Motive enthalten. Die Region 3 spielt bei der Erkennung von sogenannten *extended*-10-Regionen eine Rolle. Die Funktion von der auffällig sauren Region 1 ist bis heute unklar. Vermutet wird eine Unterbindung der DNA-Bindung von freien σ^{70} -Molekülen.

Die Erkennung der Konsensushexamere durch die Regionen 4.2 und 2.4 spielt im Rahmen dieser Arbeit eine wichtige Rolle. Sequenzunterschiede in der -35-Region können zu einer unterschiedlich effizienten Transkription führen.

Für die optimale Erkennung der Konsensushexamere durch den σ^{70} -Faktor ist die räumliche Ausrichtung (angulare Orientierung) der beiden Elemente zueinander von Bedeutung. Der unterwundene *spacer* der *rm*-P1-Promotoren richtet die beiden Elemente suboptimal zueinander aus, wodurch die Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor negativ beeinflusst wird. Unter superhelikalen Bedingungen kann diese

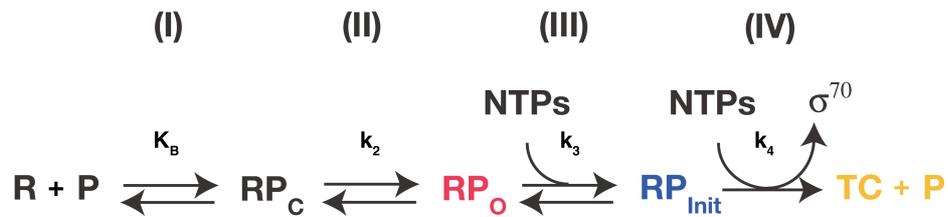


Abbildung 3.5: Initiationschema nach Record *et al.*, 1996. Die römischen Buchstaben kennzeichnen den jeweiligen Isomerisierungsschritt. R: RNA-Polymerase, P: Promotor, RP_c: geschlossener (*closed*) Komplex, RP_o: offener (*open*) Komplex, TC: Ternärer Komplex. Nach Record *et al.* [100].

Ausrichtung jedoch optimiert werden, bei superhelikalen *templates* tritt eine viel stärkere Transkription auf, die hauptsächlich auf die Interaktion des σ^{70} -Faktors mit den Konsensushexameren sowie mit der UP-Element-bindenden α -CTD der RNA-Polymerase zurückgeführt werden kann.

3.3 Die Transkription

Die Transkription kann in drei Prozesse untergliedert werden: Initiation, Elongation und Termination. Alle drei Prozesse zeigen eine komplexe Regulation. Da sich die Inhibierung von ppGpp hauptsächlich auf die Initiation auswirkt, wird dieser Prozess besonders ausführlich dargestellt.

3.3.1 Die Initiation

Die Initiation beschreibt die Ereignisse zu Beginn der Transkription, die zu einem Elongationskomplex und der prozessiven Elongation des naszierenden Transkripts führen. In Abbildung 3.5 ist das Initiationschema nach Record *et al.* angegeben [100]. Die Initiation kann vereinfachend in vier Schritte unterteilt werden:

- Bindung der DNA und Erkennung des Promotors durch die RNA-Polymerase (geschlossener Komplex, RP_c)
- Isomerisierung in einen offenen Komplex, in dem die DNA teilweise aufgeschmolzen vorliegt (RP_o)
- Bindung von Nucleotiden und/oder Bildung der ersten Phosphodiester-Bindung (Initiationskomplex, RP_{init})

- Übergang vom Initiations- zum Elongationskomplex, verbunden mit dem *promoter escape*, dabei dissoziiert der σ^{70} -Faktor von dem Holoenzym und die RNA-Polymerase bewegt sich von dem Promotor weg

Besonders die ersten beide Schritte sind enorm von der dreidimensionalen Struktur eines Promotors abhängig [30]. Die Krümmung eines DNA-Fragments erleichtert die initiale RNA-Polymerase-Bindung enorm, was in Abbildung 3.3 veranschaulicht wird (*wrapping*).

3.3.2 Die Promotorerkennung

Bevor die Initiationsereignisse an einem Promotor stattfinden, ist eine effiziente Suche der Promotorregion durch die RNA-Polymerase erforderlich. In der Zelle liegt der Hauptteil der RNA-Polymerasen an die DNA gebunden vor, die Bindung ist unspezifisch und rein elektrostatischer Natur. Die RNA-Polymerasen diffundieren nun entlang der DNA, was durch thermische Energie beschleunigt wird. Dabei werden negativ geladene Gruppen des DNA-Phosphatrückgrats vor der RNA-Polymerase entfernt und hinter der DNA wieder angelagert. Unter physiologischen Bedingungen liegt die DNA zu 80 % durch Ionen neutralisiert vor. Dieses *sliding* erfolgt mit hoher Geschwindigkeit und reduziert die Zeit enorm, bis die RNA-Polymerase einen Promotor erkennen. Trifft ein RNA-Polymerase-Molekül auf einen Promotor, so erfolgt die Initiation und die spezifische Interaktion mit DNA-Elementen, was durch eine Folge von Isomerisierungen verschiedener Komplexe bis zur Elongation führt. Somit geht die unspezifische Bindung in eine spezifische Bindung über.

Der geschlossene Komplex

Der geschlossene Komplex wird durch die Interaktion der RNA-Polymerase mit der Promotor-DNA gebildet. Dabei wird die DNA um die RNA-Polymerase gewickelt, was durch Wechselwirkung von non-Watson-Crick-Basenpaaren erfolgt. Diese Interaktion wird nicht nur durch Wasserstoffbrücken (H-Brücken) durchgeführt, sondern ist neben elektrostatischer Natur auch durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt. Dabei interagieren die negativ geladenen Gruppen in der kleinen und grossen Furche der DNA mit positiv geladenen Aminosäureresten der RNA-Polymerase. Durch DNaseI-*footprint*-Analysen konnte eine Abdeckung durch die RNA-Polymerase von Position -55 bis -5 relativ zum Transkriptionsstart auf der DNA gezeigt werden [72]. Der geschlossene Komplex an *rrn*-P1-Promotoren ist relativ zu anderen Promotoren instabil, jedoch stabiler als der offene Komplex. Durch das Schließen der „Klaue“ durch die beiden β -Untereinheiten wird eine Konformationsänderung verursacht. Dieses Intermediat zeigt eine DNA-Abdeckung von -55 bis +20 relativ zum Transkriptionsstart. Die Konformationsänderung ruft einen Torsionsstress hervor, der durch das partielle Aufschmelzen der DNA, die in der Nähe der „Klaue“ lokalisiert ist, bewältigt werden kann, siehe Abbildung 3.3. Das Aufschmelzen wird hauptsächlich durch den σ^{70} -Faktor möglich. Dadurch resultiert der offene Komplex.

Der offene Komplex

Der offene Komplex erstreckt sich von Position -50 bis +20 relativ zum Transkriptionsstart [28]. Innerhalb des Komplexes liegt der DNA-Bereich von -10 bis -1 einzelsträngig vor. Dieser Bereich umfasst teilweise die -10-Region, die durch ihren AT-Gehalt relativ leicht aufzuschmelzen ist. Direkt *downstream* der -10-Region liegt bei den *rrn*-P1-Promotoren der GCGC-Diskriminator, der für die ppGpp-Sensitivität der Promotoren mitverantwortlich ist. Das GCGC-Motiv erschwert das Aufschmelzen, weshalb die relativ große Instabilität der offenen Komplexe an den *rrn*-P1-Promotoren auch dadurch beeinflusst wird [68], [9]. Diese Instabilität wird reduziert, wenn superhelikale DNA vorliegt. Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass superhelikale *rrn*-P1-Promotor-DNA eine weniger starke Rückreaktion zum geschlossenen Komplex zeigt [68].

Der Initiationskomplex

Der offene Komplex reagiert durch Aufnahme von Mg^{2+} -Ionen zum Initiationskomplex. Die Mg^{2+} -Ionen sind essentiell für den nachfolgenden Einbau von Nukleotiden. In dem aktiven Zentrum, wo dieser Einbau passiert, konnten diskrete Aminosäurereste der β - und β' -Untereinheit identifiziert werden, die die Mg^{2+} -Ionen komplexieren [96]. Auch die durch den *secondary channel* ins aktive Zentrum gelangenden Nukleotide interagieren mit dem Magnesium und werden dadurch in ihrer Position stabilisiert. Der Initiationskomplex deckt die DNA von Position -55 bis +20 ab. Der aufgeschmolzene Bereich erstreckt sich nun über 14 statt 12 bp (offener Komplex), er reicht von -12 bis +2.

In der bakteriellen RNA-Polymerase existiert eine einzelne Nukleotideinbaustelle [36]. Gelangen die Nukleotide durch den *secondary channel* in das aktive Zentrum zu dieser Stelle, erfolgt eine Wechselwirkung mit dem *template*-Strang. Ist das Nukleotid komplementär zur Position auf dem *template*-Strang, wird eine Basenpaarung nach dem Watson-Crick-Prinzip ausgebildet. Die nachfolgenden NTPs werden an das freie 3'-OH-Ende des vorhergegangenen Nukleotids angefügt, wobei Pyrophosphat durch Spaltung der 5'-Triphosphatgruppe frei wird, lediglich das Startnukleotid weist an dem 5'-Ende eine Triphosphatgruppe auf. Der Initiationskomplex besteht nun aus der DNA, der RNA-Polymerase und dem naszierenden Transkript, weswegen er auch als ternärer Komplex bezeichnet wird. Bevor eine Konformationsänderung zum Elongationskomplex erfolgt, wird eine Kette von bis zu 10 Nukleotiden an RNA gebildet.

Der Kontakt zwischen σ^{70} -Faktor und der -35- und -10-Region hält die RNA-Polymerase an dem Promotor fest. Vergangene Arbeiten konnten nachweisen, dass für den *promoter escape* eine geschwächte Interaktion zwischen der σ^{70} -Region 4 und der sogenannten *flap*-Domäne der β -Untereinheit vorliegen muss [66]. Strukturanalysen des Initiationskomplexes suggerieren, dass eine Schwächung durch die wachsende RNA-Kette in dem aktiven Zentrum hervorgerufen wird [79], [115], [76]. Während des Nukleotideinbaus wird die naszierende RNA durch den *exit channel* der RNA-Polymerase geschleust. Dabei liegen zwei Regionen des σ^{70} -Faktors auf dem Weg der RNA durch den *exit channel*: die Region 3.2 und

Region 4. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass in der Tat die Interaktion zwischen σ^{70} -Region 4 und der β -flap-Domäne sich maßgeblich auf die Elongation des Transkripts über 10 Nukleotide hinaus auswirkt, siehe Abbildung 3.4 [82].

Bereits im vorherigen Abschnitt wurde erwähnt, dass sowohl die Position des Transkriptionsstarts als auch der Konzentrationsbedarf für das einzubauende Nukleotid von der Promotorstruktur bzw. der resultierenden Konformation mit der RNA-Polymerase abhängt. Für alle sieben *rrn*-P1-Promotoren konnte ein hoher Konzentrationsbedarf für das Startnukleotid im Vergleich zu anderen Promotoren nachgewiesen werden [57], [70], diese Arbeit. Dadurch ist eine schnelle und effiziente Fortsetzung des Einbaus nachfolgender Nukleotide betroffen. Der Initiationskomplex an *rrn*-P1-Promotoren hat also zwei Barrieren, die eine erfolgreiche Initiation und Elongation erschweren: Zunächst die Konzentration an Startnukleotid, die bei limitierenden Mengen den Einbau der nachfolgenden Nukleotide verzögert. Dadurch ist die zweite Barriere, die Abschwächung der σ^{70} - β -Interaktion durch das naszierende RNA-Transkript unmittelbar betroffen [82].

Beide Prozesse erklären, warum der ppGpp-Effekt sich hauptsächlich auf den Initiationskomplex auswirkt [57]. Gelangt ppGpp in das aktive Zentrum der RNA-Polymerase, interagiert es dort mit den katalytisch wirkenden Mg^{2+} -Ionen [3]. Die Position von ppGpp überlappt mit der Position für die Nukleotideinbaustelle, das Molekül kann selbst jedoch nicht eingebaut werden. Dort positioniert, inhibiert es die weitere Nukleotidaddition, was besonders an solchen *template*-Positionen kritisch ist, wo ein hoher Konzentrationsbedarf an Nukleotid benötigt wird.

Die Abschwächung dieser Interaktion resultiert in der Dissoziation des σ^{70} -Faktors von dem Holoenzym, die Interaktion zu den Konsensushexameren wird unterbrochen. Dadurch ist der DNA-Bereich, der durch die RNA-Polymerase abgedeckt wird, um ca. 20 bp reduziert. Die RNA-Polymerase kann nun die Elongation durchführen, sie verlässt den Promotor und prozessiert den Nukleotideinbau über das gesamte *template* hinweg.

3.3.3 Die Elongation

Der Elongationskomplex zeigt durch die σ^{70} -Dissoziation eine veränderte Konformation der RNA-Polymerase, wodurch eine stabile Bindung des *templates* und der naszierenden RNA ermöglicht wird. Durch DNaseI-*footprint*-Analysen konnte eine Abdeckung der DNA zwischen 25 und 40 bp detektiert werden, der aufgeschmolzene DNA-Bereich erstreckt sich über 18 bp [28], [85].

Während der Elongation bewegt sich die RNA-Polymerase nicht gleichmäßig über das *template* hinweg, sondern zeigt eine diskontinuierliche Fortbewegung, die als *inch worming* bezeichnet wird [47], [50]. Diese Bewegung resultiert aus den zwei separierten DNA-Bindestellen der RNA-Polymerase, die an den Enden des RNA-Polymerase-DNA-Komplexes lokalisiert sind. Während der Elongation werden sechs bis acht Nukleotide nacheinander in das Transkript eingebaut, bevor die Kontakte zur DNA gelöst

werden und die RNA-Polymerase sich *downstream* bewegt, wo sie erneut Kontakt mit der DNA ausbildet.

Die Elongationsgeschwindigkeit bei bakteriellen RNA-Polymerasen beträgt durchschnittlich 50 Nucleotide pro Sekunde *in vivo*, kann aber durchaus an bestimmten *template*-Positionen verzögert werden [116]. *In vitro* wurden Raten zwischen 19 bis 35 Nucleotiden pro Sekunde beobachtet. An sogenannten Pausierungsstellen kann ein hoher Konzentrationsbedarf für das einzubauende Nucleotid vorliegen, oder eine komplexe Sekundärstruktur des Transkripts die weitere Prozessierung behindern. Der Übergang zu sogenannten arretierten oder *dead end*-Komplexen kann an diesen Pausen einen Abbruch der Transkription bewirken. Diese Komplexe können durch die Faktoren GreA oder GreB wieder rückgängig gemacht werden, indem ein kurzes RNA-Fragment am 3'-Ende des Transkripts abgespalten wird [120], [89]. Dadurch wird die RNA von dem katalytischen Zentrum entfernt und so positioniert, dass die Transkription weiter durchgeführt werden kann. Diese Proteine können als *proof reading*-Faktoren bezeichnet werden.

In der Vergangenheit konnten ein ppGpp-Effekt auf die Elongation der *rrn*-P1-Transkripte beobachtet werden. An bestimmten *template*-Positionen wurden die Transkriptionspausen in Gegenwart von ppGpp verstärkt [58], [12], [65]. An diesen Positionen scheinen ebenfalls wie bei dem Startnucleotid hohe Konzentrationen für eine reibungslose Elongation erforderlich zu sein.

3.3.4 Die Termination

Die Termination der Transkription kann bei Bakterien auf unterschiedliche Weise erfolgen: Man unterscheidet zwischen der faktorabhängigen und der faktorunabhängigen Termination.

Die faktorabhängige Termination wird durch das Protein *Rho* katalysiert. Das Protein besteht aus sechs identischen Untereinheiten, die zu einem Ringmolekül assemblieren. *Rho* bindet an RNA-Abschnitte, die keine komplexe Sekundärstruktur zeigen [105], und wandert dem 3'-Ende der Bindung dem Elongationskomplex hinterher. Dort angekommen, wird die weitere Elongation behindert, durch die ATP-anhängige RNA:DNA-Helikase-Aktivität des *Rho*-Faktors kann das Transkript aus dem Elongationskomplex entlassen werden [6]. RNA-Abschnitte, die eine *Rho*-Bindung zeigen, werden als *rut sites* (*rho utilization sites*) bezeichnet und zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Cytosinen aus.

Die faktorunabhängige Termination erfolgt durch spezifische Sekundärstrukturen auf Transkriptebene [29], [103]. Diese Sekundärstrukturen zeigen einen stabilen *stem loop* mit hohem Gehalt an GC-Basenpaaren, dem ein Uracil-reicher Abschnitt folgt. Die Bildung des stabilen *stem loops* verursacht zunächst eine Pausierung des Elongationskomplexes, durch die schwache Interaktion der Uracilreste mit der DNA wird der Komplex destabilisiert und das Transkript wird von der RNA-Polymerase entlassen. Der *stem loop* wirkt sich auf die Stabilität der Transkripte aus, die RNA wird dadurch vor Degradation geschützt. Insgesamt werden 50 % der Transkriptionen durch faktorunabhängige Termination beendet. In dieser Arbeit wurden Transkriptionen mit superhelikaler DNA durchgeführt, deren Termination ausschliesslich durch die faktorunabhängige Termination erfolgte. Die intrinsischen Terminatoren

des *rrnB*-Operons auf den verwendeten Vektoren sorgten für eine effiziente Transkriptionstermination an diskreten Positionen, siehe Abschnitte 6.2.2 und 4.1.4.

3.3.5 Einfluss der Topologie auf die Transkription

In der Zelle erfordert die Länge eines Chromosoms eine Kompaktierung der DNA. Bis auf wenige Ausnahmen liegt die DNA als kovalent geschlossenes, zirkulares Molekül vor (*ccc = covalent closed circular*). Diese Form wird durch spezielle Enzyme, den Topoisomerasen, superspiralisiert, die dann wiederum durch Nukleoid-strukturierende Proteine kondensiert wird und im Vergleich zu ihrer Länge einen sehr kleinen Raum einnimmt.

Die strukturellen Dimensionen der Superhelikalität werden durch drei Parameter definiert:

- Der *linking number* (L_k), sie entspricht der Anzahl der Überkreuzungen zweier DNA-Stränge
- Dem *twist* (T_w), er entspricht der Anzahl der Windungen beider DNA-Stränge um die Helixachse
- und dem *writhe* (W_r), er beschreibt die Anzahl an superhelikalen Windungen eines DNA-Moleküls und kann negativ oder positiv ausfallen, je nachdem ob rechtsgängige oder linksgängige Windungen vorliegen.

Die superhelikale Dichte σ eines Moleküls ergibt sich aus dem Verhältnis von W_r zu T_w . Isolierte Plasmid-DNA zeigt eine durchschnittliche Dichte von $-0,05$, was in einem B-DNA-Molekül mit 10 Basenpaaren pro Helixwindung einer superhelikalen Windung pro 200 bp entspricht. Bei der Transkriptionsinitiation werden von der RNA-Polymerase ca. 1,5 Helixwindungen aufgeschmolzen, was die Konsequenz des oben besprochenen DNA-*wrappings* und des dadurch verursachten Torsionsstresses ist.

Negativ superspiralisierte DNA ist leichter aufzuschmelzen als linearisierte DNA. Bei den *rrn*-P1-Promotoren verläuft die Bildung des offenen Komplexes leichter, wenn superhelikale DNA vorliegt. Auch die initiale Bindung der RNA-Polymerase an die Promotor-DNA ist erleichtert, die Konstanten k_2 und K_B (siehe Abbildung 3.5) werden demzufolge positiv durch superhelikale DNA beeinflusst [123], [102].

Die in Bakterien vorhandenen Enzyme Topoisomerase I und II katalysieren die Einführung negativer (II) oder positiver (I) superhelikaler Windungen. Die Topoisomerase II verbraucht für diese Aktivität Energie in Form von ATP-Hydrolyse. Daher ist das Energieverhältnis in der Zelle ausschlaggebend für die Aktivität des Enzyms. Eine Änderung des zellulären ATP:ADP-Verhältnisses in Folge von Umweltveränderungen wirkt sich somit stark auf den Grad der Superhelikalität aus, wovon vor allem *twist-sensitive* Promotoren wie die *rrn*-P1-Promotoren betroffen sind. Bei diesen Promotoren liegt ein unterwundener *spacer* von 16 bp vor, der ideale Konsensus-Promotor zeigt eine *spacer*-Länge von 17 bp. Durch den kurzen *spacer* resultiert eine suboptimale Ausrichtung der beiden Konsensushexamere

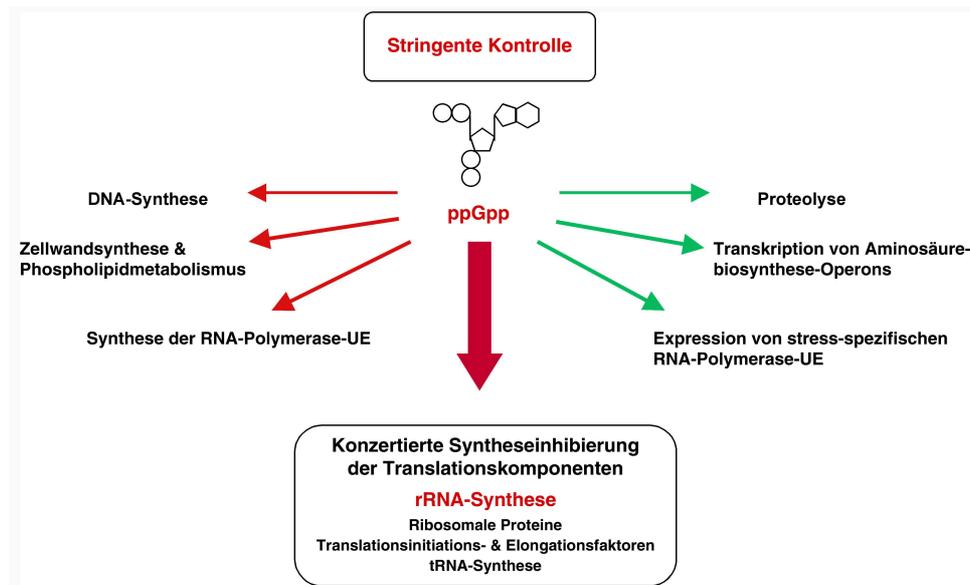


Abbildung 3.6: Auswirkungen der Stringenten Kontrolle auf verschiedene Syntheseprozesse. Die Abbildung veranschaulicht die Änderung der zellulären Syntheseprozesse im Verlauf der Stringenten Kontrolle. Rote Pfeile präsentieren die Inhibierung, grüne Pfeile symbolisieren die Aktivierung. Das Effektormolekül ppGpp ist schematisch dargestellt.

-35- und -10-Region, die den *spacer* flankieren. Generell ist eine optimale angulare Orientierung beider Hexamere zueinander essentiell für die Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor der RNA-Polymerase, siehe Abschnitt 3.2.4 und Abschnitt 5.2.2 [129], [74], Abbildung 5.3. Die negative Superhelikalität der DNA erhöht den *twist*, was eine optimalere Ausrichtung der beiden Konsensushexamere zueinander zur Folge hat.

3.4 Überwindung von Aminosäuremangel: Die Stringente Kontrolle

In einer Bakterienzelle existieren viele regulatorische Netzwerke, die eine effiziente Anpassung an Umweltveränderungen ermöglichen. Umweltveränderungen können eine Stresssituation hervorrufen, die sich auf das Wachstum einer Bakterienpopulation drastisch auswirken kann.

Infolge von Aminosäuremangel wird die Stringente Kontrolle ausgelöst. Dieses Netzwerk wird durch unaminoacylierte tRNAs ausgelöst, die während der Translation an Ribosomen gelangen. Das Signal löst wiederum die rasche Synthese von ppGpp aus, dabei werden millimolare Konzentrationen erreicht. Dieses kleine Effektormolekül bewirkt eine Adaptation des Stoffwechsels an die Mangelsituation, indem es hormonartig den gesamten Zellmetabolismus umdirigiert. In Abbildung 3.6 wird der Effekt von ppGpp auf die wichtigsten Zellmetabolismen schematisch dargestellt.

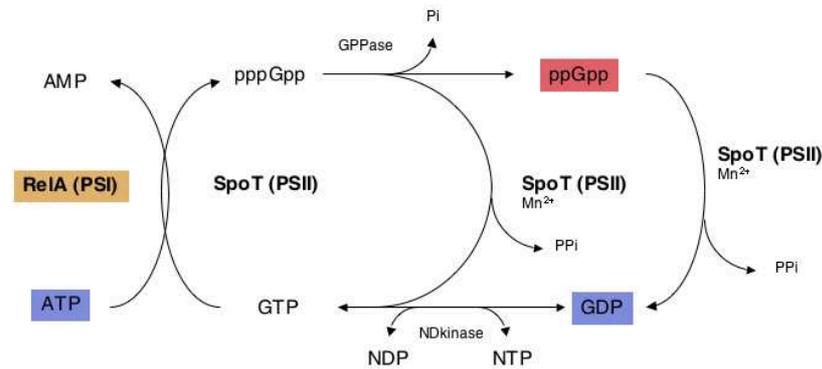


Abbildung 3.7: ppGpp-Synthese. Schematische Darstellung der ppGpp-Synthese in *E. coli* nach [19], [81]. Die für die *in vitro* Synthese verwendeten Ausgangssubstrate sind blau markiert, das Enzym ist orange, das Endprodukt in rot markiert.

3.4.1 Wie wird die Stringente Kontrolle ausgelöst?

In einer *E. coli*-Zelle reicht bereits die Limitation einer einzigen Aminosäure für das Auslösen der Stringenten Kontrolle. Die entsprechenden tRNAs können nicht mehr ausreichend mit dieser Aminosäure beladen werden. Gelangt eine solche unaminoacylierte tRNA während der Translation an ein Ribosom, welches gerade an dem entsprechenden „hungrigen“ Codon positioniert ist, gibt diese tRNA das Signal für das Auslösen der Stringenten Kontrolle.

An den Ribosomen ist das Protein RelA assoziiert. Es zeigt eine Länge von 743 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 84 kDa entspricht. Das Protein wird auch als ppGpp-Synthetase I oder als *stringent factor* bezeichnet. RelA katalysiert die Synthese von hohen ppGpp-Konzentrationen während der Stringenten Kontrolle aus den Substraten ATP und GTP, die Konzentrationen reichen bis in den millimolaren Bereich. Dabei treten das Penta- und das Tetraphosphat gleichzeitig auf, beide Moleküle unterscheiden sich in ihrem Effekt jedoch nicht. Im Folgenden wird daher der Term (p)ppGpp verwendet. In Abbildung 3.7 ist die Synthese schematisch dargestellt.

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass RelA direkt mit der unaminoacylierten tRNA und dem Ribosom interagiert. Dabei konnte eine Komplexbildung von RelA mit der tRNA nachgewiesen werden [59]. Die Experimente zeigten maximale Syntheseraten von 4,5 nmol (p)ppGpp pro RelA-Protein pro Minute.

Das Effektormolekül hat eine sehr kurze Halbwertszeit und wird durch das Protein SpoT zu GDP abgebaut. Dieses Protein umfasst 700 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 70 kDa entspricht und wird auch als ppGpp-Synthetase II bezeichnet. SpoT ist ein cytosolisches Protein und nicht an die Ribosomen assoziiert, was die (p)ppGpp-Synthese während der Stringenten Kontrolle durch dieses Protein ausschließt. SpoT ist ein bifunktionelles Enzym, es kann (p)ppGpp sowohl abbauen als auch synthetisieren. Während des exponentiellen Wachstums ist in *E. coli*-Zellen ein basales Level von 10 bis 30 μM ppGpp vorhanden. Dieses Level wird durch die Syntheseaktivität von SpoT katalysiert, die zur Angleichung der rRNA-Synthese an die Wachstumsrate dient (Wachstumsratenregulation).

3.4.2 Was ist von der Stringenten Kontrolle betroffen?

Wie in Abbildung 3.6 gezeigt, sind viele Metabolismen direkt von (p)ppGpp betroffen. Dabei werden Prozesse sowohl aktiviert als auch reprimiert. Alle Änderungen verfolgen die logische Konsequenz, den Aminosäuremangel zu überwinden. Der augenscheinlichste Effekt ist die starke Inhibierung von Translationskomponenten, wobei hier die Inhibierung der rRNA-Synthese im Vordergrund steht. Da die rRNA-Gene während des exponentiellen Wachstums am stärksten transkribiert werden, kann durch deren Syntheseinhibierung die Kapazität an RNA-Polymerasen für die Transkription von z.B. Aminosäurebiosynthese-Genen erhöht werden.

3.4.3 Der Mechanismus der ppGpp-Inhibierung an den *rrn*-P1-Promotoren

Die Transkriptionseinhibierung an den *rrn*-P1-Promotoren fällt in Gegenwart von (p)ppGpp sehr stark aus. Über den molekularen Mechanismus wurde lange Zeit spekulativ diskutiert, aktuelle Strukturauflösungen von RNA-Polymerase-ppGpp-Kristallen geben mittlerweile Einsicht in die molekularen Prozesse während der Inhibierung [3].

Unter Abschnitt 3.2 wurde bereits erwähnt, dass eine ppGpp-Bindung an die RNA-Polymerase nachgewiesen werden konnte. Daraus folgt die logische Konsequenz, dass hauptsächlich die Transkription betroffen sein muss. In Abschnitt 5.2.2, Abbildung 5.4 ist die molekulare Anordnung von RNA-Polymerase, ppGpp und dem *template* ausführlich dargestellt.

Der Einfluss von (p)ppGpp auf die *rrn*-P1-Transkription wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert, es wurden mehrere Stadien der Initiation als *target* postuliert, wobei die Bildung des offenen Komplexes bzw. der Initiationskomplex am stärksten von ppGpp betroffen zu sein scheinen. Im Folgenden werden allgemeine Modelle vorgestellt, die zu einem plausiblen (p)ppGpp-Inhibierungsmodell an den *rrn*-P1-Promotoren beitragen.

Die RNA-Polymerase als *target*: Das *partition model* und das *trapping model*

Das *partition model* erklärt die differentielle Regulation von (p)ppGpp-sensitiven und nicht-sensitiven Promotoren [12]. Nach diesem Modell existieren während der Stringenten Kontrolle in der Zelle zwei ineinander umwandelbare Populationen an RNA-Polymerasen. Beide Polymerasen zeigen unterschiedliche Affinitäten zu stringent und nicht-stringent kontrollierten Promotoren, d.h. Promotoren der stabilen RNAs und mRNAs. Die Umwandlung der Polymerase-Affinitäten erfolgt durch (p)ppGpp, wahrscheinlich wird durch dessen Bindung an die RNA-Polymerase-Untereinheiten eine Konformationsänderung verursacht, die sich auf (p)ppGpp-sensitiven Promotoren auswirkt. Aktuelle Arbeiten mit RNA-Polymerase-Mutationen suggerieren, dass in der Tat in Gegenwart von ppGpp eine veränderte RNA-Polymerase-Konformation vorliegt [73]. Die veränderten RNA-Polymerasen sind während der Initiation an stringent-sensitiven Promotoren nicht mehr in der Lage, die Isomerisierung zum offenen Kom-

plex zu bewerkstelligen, sondern zeigen einen alternativen Initiationsmechanismus, was in der Vergangenheit durch das *trapping model* beschrieben wurde [48]. In diesem Modell sind die RNA-Polymerasen in Gegenwart von ppGpp an den *rrn*-P1-Promotoren im geschlossenen Komplex „gefangen“, man bezeichnet dieses Stadium als *trapped complex*.

Die Transkriptionsinitiation

In der Vergangenheit wurden der instabile offene Komplex sowie der Initiationskomplex als Haupt-*target* der (p)ppGpp-Inhibierung identifiziert. Viele Arbeiten zeigen, dass die ohnehin schon sehr kurze Lebensdauer des offenen Komplexes in Gegenwart von ppGpp etwas erniedrigt ist [5], [87]. Eine molekulare Erklärung konnte jedoch nicht überzeugend formuliert werden. Erst durch Studien des Initiationskomplexes wurde eine plausible mechanistische Erklärung des (p)ppGpp-Effekts deutlich. Durch den Einbau der ersten Initiationsnukleotide wird der Initiationskomplex gebildet. Dabei gelangen die Nukleotide durch den *secondary channel* der RNA-Polymerase in das aktive Zentrum an die einzubauende Position, was auch für (p)ppGpp gilt. Gelangt (p)ppGpp in das aktive Zentrum, inhibiert es dort die Transkriptionsinitiation, weil der Einbau von Nukleotiden räumlich blockiert ist [3], [57]. Durch dieses Modell kann auch die erhöhte Instabilität des offenen Komplexes erklärt werden. Durch die (p)ppGpp-Blockade wird die Umwandlung zum Initiationskomplex erschwert, daher schaffen weniger RNA-Polymerase-Moleküle diese Isomerisierung, der ohnehin instabile offene Komplex reagiert dadurch verstärkt zum geschlossenen Komplex zurück.

Die Kombination mehrerer Modelle erklärt die molekulare Inhibierung

Wodurch sind die *rrn*-P1-Promotoren (p)ppGpp-sensitiv? Die Beantwortung dieser Frage schließt alle bisher besprochenen Parameter ein und erklärt, warum die *rrn*-P1-Promotoren so effizient durch (p)ppGpp inhibiert werden.

Die Initiation an den *rrn*-P1-Promotoren ist enorm von der Promotorstruktur bzw. der dreidimensionalen Architektur der Promotoren abhängig [68], [134], [109]. Der GCGC-Diskriminator und der hohe Konzentrationsbedarf an Startnukleotiden bewirken an diesen Promotoren hauptsächlich die starke (p)ppGpp-Sensitivität. Eine ppGpp-Inhibierung durch den hohen Konzentrationsbedarf an Startnukleotid wird durch das Kompetitionsmodell von Joeres *et al.* erklärt [57]. Gelangt (p)ppGpp in das aktive Zentrum, so interagiert es dort mit den katalytischen Mg^{2+} -Ionen und dem *template*-Strang [3]. Ist (p)ppGpp dort komplexiert, überlappt seine Position mit der Position für die Nukleotideinbaustelle. Das Molekül kann selbst nicht eingebaut werden, verhindert jedoch den Zugang der Nukleotide zur Einbaustelle. Dadurch sind solche Positionen betroffen, die einen hohen Konzentrationsbedarf an Startnukleotid benötigen, was durch einen hohen K_m -Wert für diese Position repräsentiert wird. Dies ist der Fall für alle *rrn*-P1-Promotoren [57], [70], diese Arbeit, wodurch die Transkriptionsinhibierung an dieser Stelle plausibel wird.

Als Konsequenz der Inhibierung an diesem Stadium kann nicht eine ausreichend lange RNA gebildet werden, die für die Abschwächung der σ^{70} -Interaktion zur RNA-Polymerase erforderlich ist, siehe Abschnitt 3.3.1.

Bei Vorliegen von zwei verschiedenen RNA-Polymerase-Populationen (*partition model*) können die ppGpp-haltigen RNA-Polymerasen aufgrund ihrer veränderten Konformation die Isomerisierung zum offenen Komplex nicht mehr ausreichend bewerkstelligen. Hier spielt vor allem der Diskriminator eine Rolle, er erschwert das DNA-Aufschmelzen. Die Initiation bleibt auf der Ebene des geschlossenen Komplexes stehen (*trapping model*).

Alle ppGpp-inhibierten Stadien können jedoch durch Zufuhr von hohen Startnukleotidkonzentrationen aufgehoben werden. Dadurch wird das Verhältnis von ppGpp zu Startnukleotid abgesenkt, was sich auf die Nukleotidzufuhr bzw. die Menge an ppGpp auswirkt, die ins aktive Zentrum gelangen kann. In der Zelle variiert die Konzentration der *rrn*-P1-Startnukleotide ATP und GTP nicht so stark. Eine effektvolle Verschiebung der ATP-Konzentration hätte enorme metabolische Konsequenzen für die Zelle. Wird jedoch im Zuge der Stringenten Kontrolle die Translation vermindert, so steht zusätzliches GTP zur Verfügung. Dadurch wäre jedoch nur das *rrnD*-Operon positiv betroffen, der P1-Promotor dieses Operons startet mit GTP. Diese und vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass der *rrnD*-P1-Promotor in der Tat in Gegenwart von (p)ppGpp am schwächsten betroffen ist [17], jedoch gleichzeitig nicht unbedingt von der Art des Startnukleotids abhängig ist, sondern von dem Konzentrationsbedarf des Nukleotids, der durch die gesamte Promotorarchitektur zu definiert werden scheint.

Bisherige Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro*-Inhibierungsintensitäten bei superhelikalen *templates* in Gegenwart von ppGpp lassen sich durch das erst kürzlich aufgefallene DksA-Protein erklären [14], [91]. *In vitro*-Analysen der *rrn*-P1-Promotoren zeigten stets eine schwächere ppGpp-Inhibierung als die *in vivo*-Analysen. Erst durch Hochsalzbedingungen konnten ähnliche Niveaus erreicht werden [68], [112], diese Arbeit. Mittlerweile ist auch die Struktur der RNA-Polymerase im Komplex mit ppGpp und DksA modelliert worden [92]. Das Protein umfasst 151 Aminosäuren und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Transkriptionsfaktor GreA. Das Protein gelangt mit einem *coiled coil*-Motiv in das aktive Zentrum und koordiniert zusammen mit den Mg^{2+} -Ionen dort das ppGpp-Molekül. Die Auswirkung ist enorm, mittlerweile konnten *in vitro* Analysen mit superhelikalem *template* in Gegenwart von ppGpp und DksA den *in vivo*-Inhibierungslevel erreichen [91].

3.5 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die vorher erwähnten Aspekte vermitteln die Komplexität der Transkriptionsregulation an den *rrn*-P1-Promotoren. Die Transkription wird erheblich durch die Promotorstruktur beeinflusst, die einzelnen Initiationskomplexe sind hauptsächlich von der Konformation der DNA und von der Wechselwirkung mit

der RNA-Polymerase abhängig. Da die ppGpp-bedingte Inhibierung größtenteils auf der Initiationsebene stattfindet, beeinflussen die o.g. Parameter diesen Prozess ebenfalls.

In dieser Arbeit sollte der Effekt der UAS-Regionen auf die differentielle ppGpp-Sensitivität näher analysiert werden. Bereits vorherige Arbeiten hatte diese differentielle ppGpp-Sensitivität detektiert [17], [94]. Dazu wurden *in vitro* Transkriptionen mit allen sieben *rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp durchgeführt.

Durch *in vitro* Transkriptionen mit linearisierten und superhelikalen *templates* sollte den Einfluss der Topologie auf die ppGpp-Sensitivität untersucht werden. Dabei war von Interesse, ob ein ähnliches Inhibierungsniveau wie bei *in vivo*-Analysen erzielt würde, da die superhelikalen *templates* dem topologischen Zustand der DNA *in vivo* entsprechen.

Zudem sollte der Einfluss einzelner Promotorelemente auf die Transkriptionseffizienz bzw. die ppGpp-Sensitivität analysiert werden. Die Elemente UAS-Region, UP-Element und *core*-Promotor des *rrnD*-Operons wurden für diese Analysen verwendet, indem sie mit Elementen des *rrnB*-P1-Promotors fusioniert wurden. Dabei war vor allem von Interesse, ob die einzelnen Elemente einen unterschiedlichen Einfluss auf den Konzentrationsbedarf von Startnukleotid haben, was zu Beginn der Arbeit als Hauptursache der differentiellen ppGpp-Sensitivität vermutet wurde. Der Einfluss der Elemente sollte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Promotoranalysen der sieben *rrn*-Operons von *E. coli*

In *E. coli* existieren sieben verschiedene *rrn*-Operons, die die drei ribosomalen RNAs 16S, 23S und 5S RNA sowie verschiedene tRNAs codieren, siehe Abschnitt 3.1. Die Transkription dieser Operons unterliegt vielen regulatorischen Prozessen, die eine effiziente Anpassung an Umweltveränderungen sicherstellen. Bei Aminosäuremangel wird ein komplexes regulatorisches Netzwerk aktiviert: die Stringente Kontrolle. Dabei vermittelt ein kleines Effektormolekül, Guanosintetraphosphat (ppGpp), die physiologische Antwort auf den Aminosäuremangel: Die Expression von ribosomalen RNAs, der tRNAs und der ribosomalen Proteine wird drastisch reduziert. Damit ist gewährleistet, dass die Zelle keine weitere Energie für die Synthese von Proteinbiosynthesekapazitäten verschwendet, sondern mangelnde Substratpools, wie z.B. Aminosäuren zunächst wieder aufgefüllt werden.

Die sieben verschiedenen *rrn*-Operons zeigen konservierte Promotorbereiche, divergieren jedoch in ihren *upstream* gelegenen Sequenzen (UAS, *upstream activating sequence*) sehr deutlich. Da diese UAS-Regionen eine Rolle bei der Promotorerkennung und Transkriptionsaktivierung spielen [132], [97], [45], [53], stellte sich hier die Frage, ob die unterschiedlichen UAS-Regionen einen Einfluss auf die ppGpp-Sensitivität zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Transkriptionsansätze durchgeführt, die *in vitro* eine unterschiedliche ppGpp-Sensitivität demonstrieren und somit auf eine unterschiedlich stark ausfallende Stringente Antwort *in vivo* hinweisen sollten. In Abbildung 4.1 ist ein *alignment* der sieben *rrn*-P1-Promotoren inklusive vollständiger UAS-Region sowie 17 bp *downstream* des Transkriptionsstarts veranschaulicht. Die Sequenzhomologie ist farblich dargestellt.

Zunächst wurden die sieben *rrn*-P1-Promotoren getestet, die jeweils die vollständige UAS-Region, den *core*-Promotor sowie einige bp *downstream* der *rrn*-Operons von *E. coli* und ein nachgeschaltetes *cat*-Gen enthielten (siehe Abschnitte 6.3.2, 6.2.2). Diese *templates* wurden als Fragmente (*linear templates*) und als Plasmide (*ccc=covalently closed circular*) in *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart und Abwesenheit von unterschiedlichen ppGpp-Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich wurden vier weitere P1-Promotoren konstruiert, die die UAS-Region des *rrnB*-Operons und den *core*-Promotor des *rrnD*-Operons und *vice versa* enthielten. Dabei wurde auch das UP-Element des jeweiligen *rrn*-Operons variiert (siehe Abschnitte 7.2.8, 7.2). Ziel dieser Klonierung war es, die unterschiedliche Transkriptionsstärke und ppGpp-Sensitivität distinkten DNA-Bereichen im Promotor zuzuordnen. Diese vier neuen Konstrukte wurden sowohl in *in vitro* Transkriptionen als auch in *in vivo* Promotoranalysen eingesetzt.

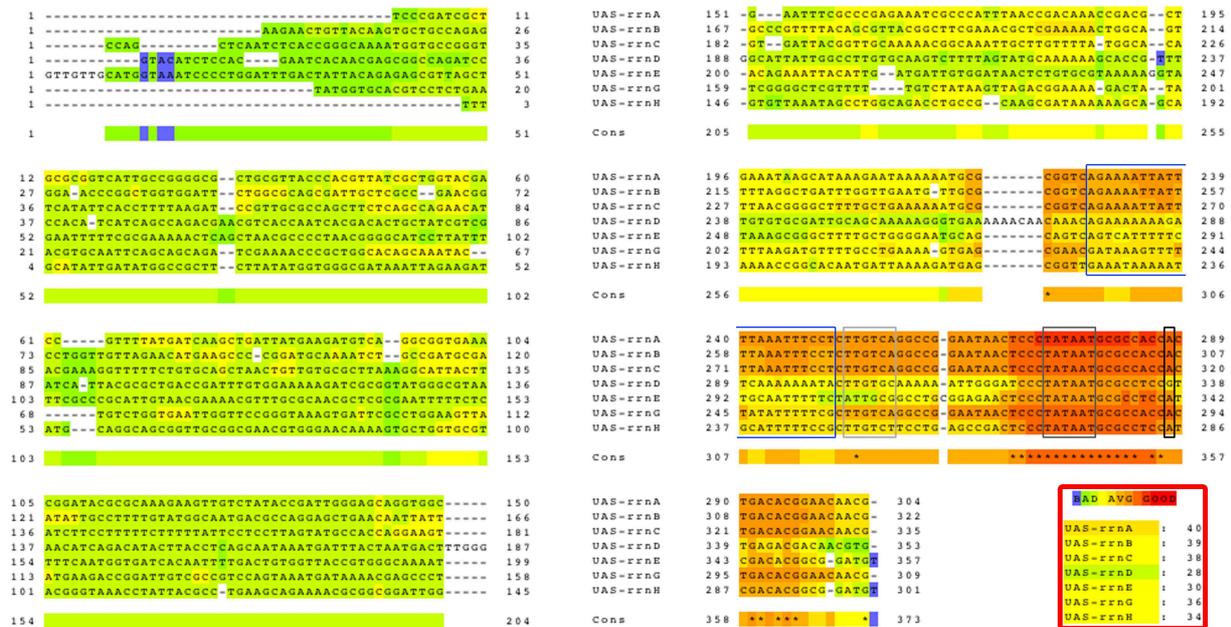


Abbildung 4.1: UAS alignments der sieben *rrn*-Operons von *E. coli*. Abgebildet sind die sieben UAS-Regionen, die *core*-Promotoren sowie 17 bp *downstream* des Transkriptionsstarts der ribosomalen P1-Promotoren von *E. coli*. Die Sequenzhomologie ist chromatisch dargestellt: Rote Bereiche symbolisieren hohe Sequenzhomologie, gelbe bis grüne Bereiche eine durchschnittliche und blaue Bereiche bedeuten keine Sequenzhomologie. Die Legende im roten Rahmen befindet sich unten rechts im Bild. Wichtige Elemente sind mit Boxen markiert: UP-Element (blaue Box), -35-Region (hellgraue Box), -10-Region (dunkelgraue Box), +1-Transkriptionsstart (schwarze Box). Das alignment wurde mit TCOFFEE erstellt [95].

Als Referenz für nicht stringent kontrollierte Promotoren diente in dieser Arbeit der *tac*-Promotor, der eine optimale Konsensus-Sequenz in der -35-Region, dem *spacer* und der -10-Region aufweist. Dieser Promotor ist aufgrund seiner perfekten Konsensushexamere sehr stark und zeigt keine ppGpp-Sensitivität. Als Referenz für stringent kontrollierte Promotoren wurde, wenn nicht anders erwähnt, der *rrnB*-P1-Promotor verwendet, der auch als Standard-*rrn*-P1-Promotor angesehen wird. Der *rrnB*-P1-Promotor wurde im Rahmen dieser Arbeit für die meisten Optimierungsexperimente verwendet.

4.1.1 Konformationsanalyse der sieben *rrn*-P1-Promotoren

Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich ist, weisen die sieben verschiedenen UAS-Regionen bereits ab dem UP-Element deutliche Sequenzheterogenitäten auf, was sich durchaus auf die dreidimensionale Architektur der Nukleinsäureabschnitte auswirken kann.

Mithilfe von Krümmungsanalysen wurde die DNA der sieben *rrn*-P1-Promotoren bezüglich ihrer Konformation näher untersucht. Der Krümmungsgrad von DNA-Fragmenten kann durch Vergleich von Mobilitäten unter nativen und denaturierenden Bedingungen während einer PAA-Gelelektrophorese festgestellt werden. Hier wurden die zu untersuchenden Fragmente bei 4°C und bei 60°C elektrophoretisch aufgetrennt. Bei hohen Temperaturen entspricht das Migrationsverhalten den apparenten Fragmentlängen.

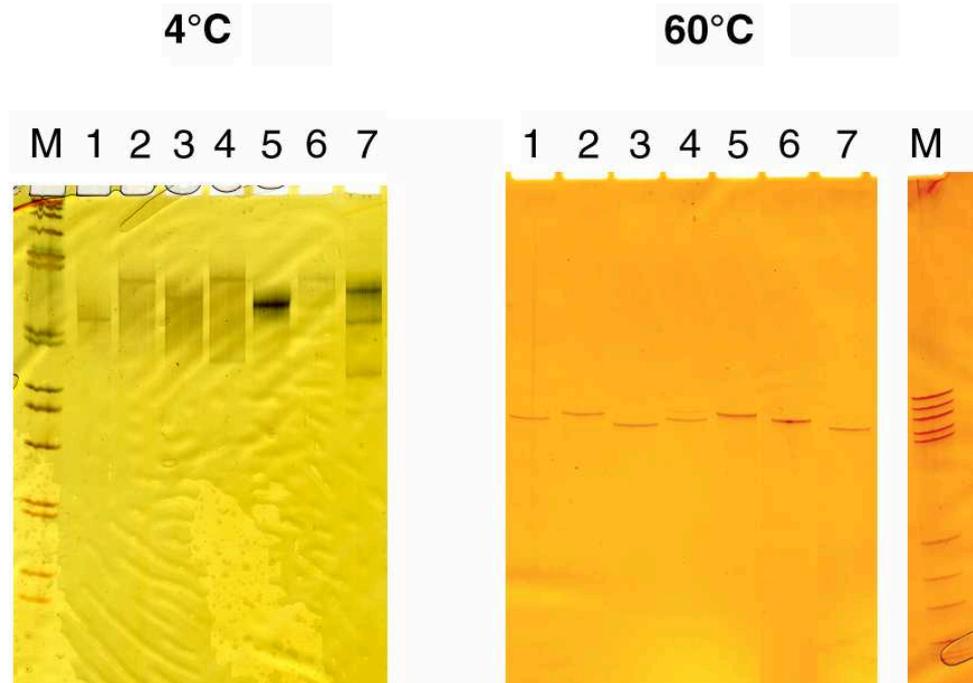


Abbildung 4.2: Krümmungsanalysen der sieben *rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung sind die Ergebnisse von zwei elektrophoretischen Auftrennungen zu sehen: bei 4°C (nativ) und bei 60°C (denaturierend). Beide Gele sind 8%ige PAA-Gele. M bezeichnet den Molekulargewichtsmarker, Spur 1 bis 7 repräsentiert die *rrn*-Operons A bis H. Als Molekulargewichtsmarker wurde in der linken Abbildung (4°C) die GIBCO BRL kb-Leiter verwendet, in der rechten Abbildung (60°C) wurde das Plasmid pBR322 mit *Hae*III verdaut (6.3.1).

Bei niedrigen Temperaturen liegt eine statische Krümmung vor, bedingt durch bestimmte Sequenzmuster, wie z.B. AT-Cluster. Diese Krümmung verschwindet zunehmend bei hohen Temperaturen, die entsprechende Sequenz wird flexibler und erlaubt eine erleichterte Migration durch die Gelmatrix.

Durch eine halblogarithmische Auftragung der Laufweiten gegen die Fragmentgrößen des jeweiligen Molekulargewichtsmarkers können die zu untersuchenden Fragmentgrößen festgestellt werden: Die resultierende Eichgerade erlaubt das Ablesen bzw. mit Hilfe der jeweiligen Funktion das Ausrechnen der entsprechenden Fragmentgrößen. Der Quotient aus den Laufweiten bei 4°C und 60°C ergibt den Krümmungsfaktor k . Die Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis der Krümmungsanalyse mit allen sieben *rrn*-P1-Promotoren.

Bei Vergleich der beiden Temperaturen fallen deutliche Laufunterschiede der *rrn*-Fragmente auf. Die Fragmente *rrnB*, *rrnD* und *rrnG* zeigen bei 4°C signifikante Abweichungen von ihrer apparenten Größe. Zudem treten bei 4°C bei einigen Fragmenten mehrere Konformere auf (siehe Spur 7, *rrnH*-Fragment).

Die halblogarithmische Auftragung der Laufweite gegen die Fragmentgröße bei den Molekulargewichtsmarkern ergab zwei Eichgeraden. Mit der zugehörigen Funktion ließen sich anhand der Laufweite die Fragmentgrößen der *rrn*-Operons ausrechnen, was für die Berechnung des Krümmungsfaktors k verwendet wurde (siehe unten). Die nachfolgenden Gleichungen geben die Berechnung der jeweiligen Fragmentgrößen x bei 4°C (4.1) und bei 60°C (4.2) an:

$$4^{\circ}\text{C} \quad y = 9,6171e^{-0,0012x} \quad (4.1)$$

$$60^{\circ}\text{C} \quad y = 12,318e^{-0,0018x} \quad (4.2)$$

In der Tabelle (4.1) sind die Ergebnisse der Fragmentgrößenberechnungen dargestellt. Der Quotient aus den Fragmentgrößen bei 4°C und bei 60°C gibt den Krümmungsfaktor k wieder (siehe rechte Spalte in Tabelle 4.1). Ist der Krümmungsfaktor $k > 1$, so liegt ein gekrümmtes Fragment vor, beträgt der Quotient = 1, so liegt keine Krümmung vor.

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	Scheinbare Fragmentgröße bei 4°C [bp]	Scheinbare Fragmentgröße bei 60°C [bp]	Tatsächliche Größe [bp]	k-Faktor
<i>rrnA</i>	854	524	467	1,63
<i>rrnB</i>	1192	535	487	2,23
<i>rrnC</i>	999	512	456	1,95
<i>rrnD</i>	1192	535	472	2,23
<i>rrnE</i>	971	529	493	1,84
<i>rrnG</i>	1185	512	480	2,31
<i>rrnH</i>	1059	495	458	2,14

Tabelle 4.1: k-Faktoren der *rrn*-Fragmente

Alle *rrn*-Fragmente weisen bei den k-Faktoren Werte > 1 auf, demnach liegen gekrümmte Nucleinsäuren vor. Wie schon bei der Elektrophorese unter 4°C auffällig, zeigen die Operons *rrnB*, *rrnD* und *rrnG* einen relativ hohen Krümmungsfaktor. Mithilfe von bioinformatischen Programmen lassen sich die entsprechenden Nucleinsäureabschnitte auch dreidimensional darstellen. Dadurch können experimentelle Ergebnisse gut überprüft werden. Die Abbildung 4.3 gibt die Konformationen der sieben *rrn*-P1-UAS-Regionen wieder, das Ergebnis wurde mit dem Programm DIAMOD erhalten [32]. Es wurden folgende Parameter für die Berechnung verwendet: *Trinucleotide model*, Gabrielian-Algorithmus, *Non-repetitive sequence*. Zudem wurden die End-End-Distanzen berechnet, für die native Konformation und für die gestreckte Fragment-DNA (Ideal-Algorithmus). Aus den Quotienten können ebenfalls k-Faktoren berechnet werden. Tabelle 4.2 gibt die berechneten End-End-Distanzen und die daraus resultierenden k-Faktoren an.

Das Resultat bestätigt die experimentell ermittelten Krümmungsdaten. Es können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Bei allen *rrn*-Fragmenten liegt eine Krümmung vor.
- Das *rrnA*-Fragment weist die schwächste Krümmung auf.

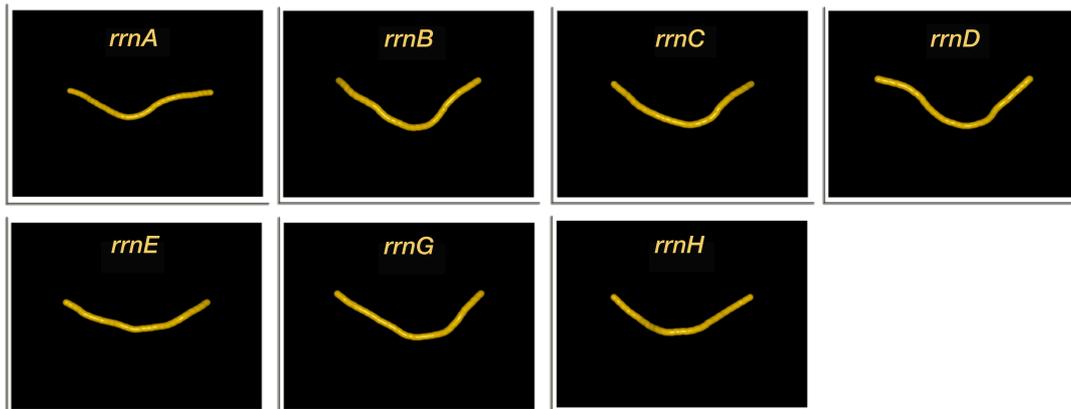


Abbildung 4.3: Konformation der *rrn*-UAS-Regionen. Die Darstellung zeigt die dreidimensionale Konformation der sieben *rrn*-UAS-Regionen. Die entsprechenden DNA-Sequenzen umfassen die vollständige UAS-Region, den P1-*core*-Promotor sowie 17 bp *downstream* vom Transkriptionsstart. Der P1-Promotor befindet sich jeweils am *downstream*-Ende von jedem *rrn*-Fragment. Die Konformation wurde mit dem Programm DIAMOD erstellt [32].

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	Distanz nativ [nm]	Distanz gestreckt [nm]	k-Faktor
<i>rrnA</i>	77,07	86,9	1,13
<i>rrnB</i>	84,67	108,53	1,28
<i>rrnC</i>	79,08	98,05	1,24
<i>rrnD</i>	77,18	103,48	1,34
<i>rrnE</i>	95,04	110,57	1,16
<i>rrnG</i>	83,62	106,18	1,27
<i>rrnH</i>	79,82	98,74	1,24

Tabelle 4.2: End-End-Distanzen nach DIAMOD

- Die End-End-Distanz des *rrnE*-Operons ist unter allen *rrn*-Operons mit 95,04 nm am größten, die Krümmung die zweitschwächste. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass das DNA-Fragment fast 30 bp mehr als das *rrnA*-Fragment aufweist. Die End-End-Distanz muss daher größer sein, daraus ergibt sich zwangsläufig bei der Berechnung ein größerer k-Wert. Es ist möglich, dass bei gleicher Fragmentlänge das *rrnE*-Operon die schwächste Krümmung aufweist.
- Die Fragmente *rrnB*, *rrnD* und *rrnG* weisen eine deutlich stärkere Krümmung als die übrigen *rrn*-Fragmente auf.
- Die theoretischen k-Faktoren geben eine sehr ähnliche Reihung der k-Faktoren wieder, allerdings zeigt hier das *rrnD*-Operon die stärkste Krümmung.
- *rrnG* verfügt bei den experimentell ermittelten k-Faktoren über die stärkste Krümmung, die End-End-Distanz ist jedoch größer als beim entsprechenden *rrnA*-Äquivalent.

- Daraus folgt, dass die Stärke der Krümmung dreidimensional ist und die Unterschiede in den k-Faktoren durch unterschiedliche räumliche Ausrichtung bedingt sein können, sie müssen nicht zwangsläufig eine stärkere Krümmung bedeuten.

Die experimentell und theoretisch ermittelten k-Faktoren unterscheiden sich prozentual, die mit DIAMOD ermittelten Krümmungen sind ca. 10 bis 40 % geringer ausgefallen. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich experimentell bedingt. Da die Marker jeweils am äusseren Gelrand aufgetragen wurden, lässt sich die Laufweite einer bestimmten Bande nur mitteln, woraus sich die entsprechenden Eichgeraden ergeben. Insgesamt können die Daten durch die theoretischen k-Faktoren bestätigt werden: Die drei stärksten gekrümmten DNA-Fragmente können dem *rrnB*-, *rrnD*- und *rrnG*-Operon zugewiesen werden, die zwei schwächsten Krümmungen treten bei dem *rrnA*- und dem *rrnE*-Fragment auf.

4.1.2 Etablierung eines *in vitro* Transkriptions-Systems

Zunächst sollten alle sieben *rrn*-P1-Promotoren als *run off templates* bezüglich ihrer ppGpp-Sensitivität vermessen werden. Zwar existierte bereits ein *in vitro* Transkriptionsprotokoll, aufgrund der geringen Ausbeuten bei Fragment-Präparationen und fällungsbedingten Verlusten wurde jedoch ein neues Protokoll aufgestellt (siehe Abschnitt 7.3.5), welches ein Fünftel an Reaktionsvolumen enthielt und eine Fällung nach Reaktionsstop überflüssig werden liess.

Vor Beginn der eigentlichen ppGpp-Vermessungen wurden zur Optimierung des neuen Protokolls einige Parameter variiert, die im Folgenden besprochen werden.

Elongationskinetik zur Bestimmung optimaler Reaktionszeiten

Bei einer *in vitro* Transkription muss zunächst festgestellt werden, unter welchen Bedingungen ein optimales Ergebnis erzielt werden kann. Als ein wichtiger Parameter gilt die Elongationszeit, unter der das stärkste Transkript und gleichzeitig die stärkste ppGpp-bedingte Inhibierung erzielt werden können.

Daher wurde testweise eine *multiple round run off in vitro* Transkription (siehe Abschnitt 7.3.5) mit dem Standard-*rrn*-Operon, dem linearen *rrnB*-Fragment durchgeführt, die Elongationszeiten wurden variiert. Dabei wurden gleiche Elongationszeiten zweimal durchgeführt, jeweils in Ab- und Anwesenheit von ppGpp (0 bzw. 300 μ M ppGpp). Die Elongationszeiten betragen 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min. Die Abbildung 4.4 gibt das Ergebnis der Zeitreihe wieder.

Trotz der unregelmässigen Bandenintensitäten beim Auftragsstandard kann hier bereits mit blossem Auge erkannt werden, dass die Spuren 6 und 7 die optimalsten Ergebnisse zeigen: Die Transkriptbanden ohne ppGpp sind deutlich erkennbar, und die korrespondierenden Produkte in Gegenwart von 300 μ M ppGpp zeigen eine starke Inhibierung. Die Werte nach 10 min ohne ppGpp zeigen zwar etwas stärkere Produktbanden, weisen jedoch gleichzeitig eine schwächere Inhibierung auf. Kleinere Zeitwerte

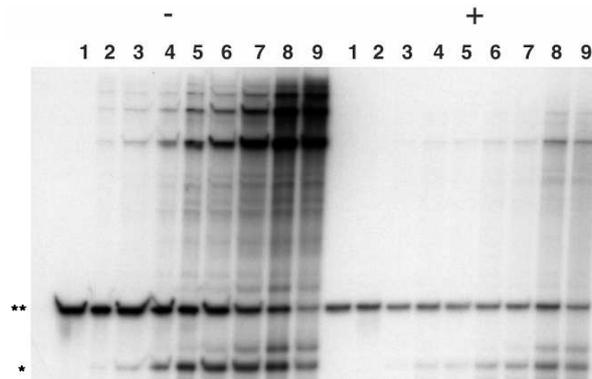


Abbildung 4.4: Elongationskinetik mit linearem *template*. In der Abbildung ist ein Autoradiogramm einer Elongationskinetik in An- und Abwesenheit von ppGpp dargestellt. Die Zahlen von 1 bis 9 stellen folgende Zeitwerte dar: 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 und 30 min Elongationszeit. Minus (-) symbolisiert ppGpp-Abwesenheit. Plus (+) gibt die entsprechenden Zeitwerte in Anwesenheit von 300 μ M ppGpp wieder. * markiert die Volllängentranskripte, ** den Auftragsstandard.

zeigen z.T. keine oder zu schwache Produkte.

Es treten zudem längere Transkripte auf, die ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme zeigen. Dabei kann es sich um sog. Endstarts handeln. In diesem Fall initiiert die RNA-Polymerase am Fragmentende, was bei *sticky* geschnittenen Fragmenten sehr häufig passiert, der überhängende Strang simuliert dabei den Einzelstrang während einer Transkriptionsinitiation.

Die langen Produkte können auch sog. Umkehrprodukte repräsentieren, dabei „wendet“ die RNA-Polymerase am *template*-Ende und liest auf dem Gegenstrang in 5'-3'-Richtung weiter. Diesen Produkten wurde jedoch keine weitere Aufmerksamkeit gewidmet.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine 10 minütige Elongation für weitere *in vitro* Transkriptionen gewählt.

Einfluss der RNA-Polymerase-Konzentration auf die ppGpp-Sensitivität

Bei einer *in vitro* Transkription ist die Konzentration an eingesetzter, aktiver RNA-Polymerase bzw. das molare Verhältnis von RNA-Polymerase zu *template* kritisch. Im einstelligen nM-Bereich sind die auftretenden Produkte bei unterschüssigen bzw. äquimolaren RNA-Polymerase-Konzentrationen sehr schwach. Bei überschüssigem Verhältnis nimmt die ppGpp-bedingte Inhibierung mit zunehmenden RNA-Polymerase-Mengen ab, dies wurde schon in vorherigen Arbeiten beobachtet. Die RNA-Polymerase-Titration wurden hier mit dem *rrnB*- und dem *rrnD*-Fragment durchgeführt. Die *template*-Konzentration betrug stets 1 nM, die RNA-Polymerase-Konzentration wurde variiert: 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 5 nM, 10 nM und 15 nM. Das entspricht folgenden molaren RNA-Polymerase zu *template*-Verhältnissen: 1:3, 1:1, 3:1, 5:1, 10:1 und 15:1. Es wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen (7.3.5) durchgeführt, die Elongationszeit betrug 10 min. In Abbildung 4.5 ist ein Ergebnis einer RNA-Polymerase-Titration mit dem *rrnD*-Fragment dargestellt. Hier konnten mit 0,3 bzw. 1 nM

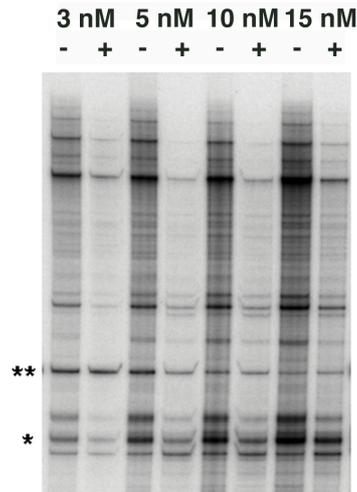


Abbildung 4.5: RNA-Polymerase-Titration mit linearem *template*. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der RNA-Polymerase-Titration mit dem *rrnD*-Fragment. Die Zahlen über dem Autoradiogramm geben die RNA-Polymerase-Konzentrationen wieder: 3 nM, 5 nM, 10 nM und 15 nM. Die Spuren mit 0,3 bzw. 1 nM RNA-Polymerase-Konzentration zeigten keine Produkte, so dass hier auf deren Abbildung verzichtet wurde. - bedeutet 0 μM ppGpp, + repräsentiert Ansätze mit 300 μM ppGpp-Konzentration. * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragungsstandard.

RNA-Polymerase keine Produkte detektiert werden, daher wurde in der Abbildung 4.5 auf die Darstellung dieser Spuren verzichtet.

Hier wird der Effekt der zunehmenden RNA-Polymerase-Konzentration deutlich: Bei 15 nM RNA-Polymerase-Konzentration fällt die ppGpp-bedingte Inhibierung etwas schwächer als bei geringeren RNA-Polymerase-Konzentrationen aus. Mit zunehmender RNA-Polymerase-Konzentration erhöht sich die Menge an Transkripten, auch was die unspezifischen Produkte (längere und kürzere Transkripte) betrifft.

Zudem ist bei >3 nM RNA-Polymerase der Hintergrund deutlich dunkler, der bei der Quantifizierung berücksichtigt werden muss. Aufgrund der geschilderten Ergebnisse wurde für folgende Standard-*in vitro* Transkriptionen stets eine RNA-Polymerase-Konzentration von 3 nM aktiver RNA-Polymerase gewählt, da hier bereits deutliche Produkte auftreten und eine ppGpp-bedingte Inhibierung gut detektierbar ist.

4.1.3 Differentielle ppGpp-Sensitivität bei linearen *rrn*-P1-Promotoren

Nachdem geeignete Parameter für die *in vitro* Transkription gefunden worden waren, konnten nun Promotoranalysen in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp erfolgen, um eine differentielle Sensitivität der *rrn*-P1-Promotoren festzustellen. Es wurden *in vitro* Transkriptionen durchgeführt, die zunächst konstante ppGpp-Konzentrationen aufwiesen. Nachdem eine differentielle Sensitivität festgestellt werden konnte, wurde die ppGpp-Konzentration variiert, um differentielle Inhibierungskurven nachzuweisen. Zudem wurden drei *rrn*-P1-Promotoren, die zuvor in ihrer ppGpp-Sensitivität auffällige Unterschiede

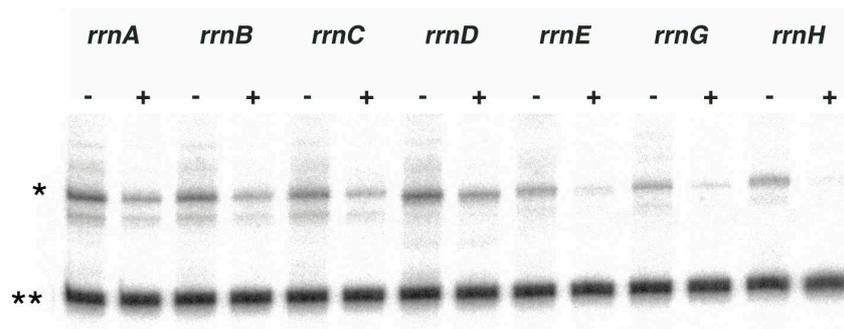


Abbildung 4.6: Differentielle ppGpp-Sensitivität bei sieben linearen *rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung ist ein Autoradiogrammausschnitt zu sehen, der Transkripte von allen sieben *rrn*-P1-Promotoren zeigt. Über den Spuren ist das jeweilige *rrn*-Operon angegeben, - bedeutet 0 µM ppGpp, + repräsentiert Ansätze mit 300 µM ppGpp-Konzentration. * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragungsstandard.

zeigten, in Ab- und Anwesenheit von ppGpp mit variablen Start-NTP-Konzentrationen transkribiert. Auch hier wurden differentielle Inhibierungskurven erwartet, die jedoch einen Bezug zum Start-NTP aufweisen sollten. Aufgrund vorheriger Veröffentlichungen war bekannt, dass die Konzentration des Start-NTP's bei der Stringenten Kontrolle von enormer Bedeutung für die Transkriptionsinitiation ist. Bei hohen Start-NTP-Konzentrationen konnte eine verminderte ppGpp-Sensitivität nachgewiesen werden, in Gegenwart geringer Start-NTP-Konzentrationen fiel die ppGpp-vermittelte Inhibierung dagegen sehr viel drastischer aus, was für das unter 3.4.2 beschriebene Wettbewerbsmodell spricht.

Promotoranalyse in Gegenwart konstanter ppGpp-Konzentrationen

Wie unter 7.3.5 beschrieben, wurden alle sieben *rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart und Abwesenheit von 300 µM ppGpp transkribiert. Dabei traten in der Tat differentielle ppGpp-Sensitivitäten auf, die sieben *rrn*-P1-Promotoren konnten bezüglich ihrer Inhibierungsstärke in mehrere Gruppen unterteilt werden. In Abbildung 4.6 ist das Ergebnis einer solchen *in vitro* Transkription dargestellt.

Bei der Betrachtung des Autoradiogramms fällt auf, dass hier zwischen den verschiedenen *templates* deutliche Unterschiede in den Transkriptionsintensitäten in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp auftreten. Da gleiche Reaktionszeiten eingehalten wurden, ist bei den stärkeren Produktbänden eine schnellere Transkription erfolgt. Dabei kann entweder eine schnellere Elongation oder eine schnellere Initiation zugrunde liegen. Die Elongation sollte jedoch bei den verschiedenen *templates* gleich ablaufen, da identische Sequenzen *downstream* des Transkriptionsstarts vorliegen (*cat*-Gen, 6.3.2, 6.2.2). Die Ursache in den stärkeren Produktbänden des Autoradiogramms wird daher in einer schnelleren Initiation bei dem jeweiligen *template* vermutet. Wie mit bloßem Auge zu erkennen ist, zeigen die individuellen *rrn*-P1-Promotoren bereits ohne ppGpp eine unterschiedliche basale Transkriptionsstärke. Die Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* und *rrnD* weisen deutlich stärkere Produktbänder als *rrnE*, *rrnG* oder *rrnH* auf. Da alle *templates* in gleicher Konzentration eingesetzt wurden, kann hier schon zwischen stärkeren und schwächeren *rrn*-P1-Promotoren unterschieden werden. Demnach scheint hier die Transkriptionsstärke

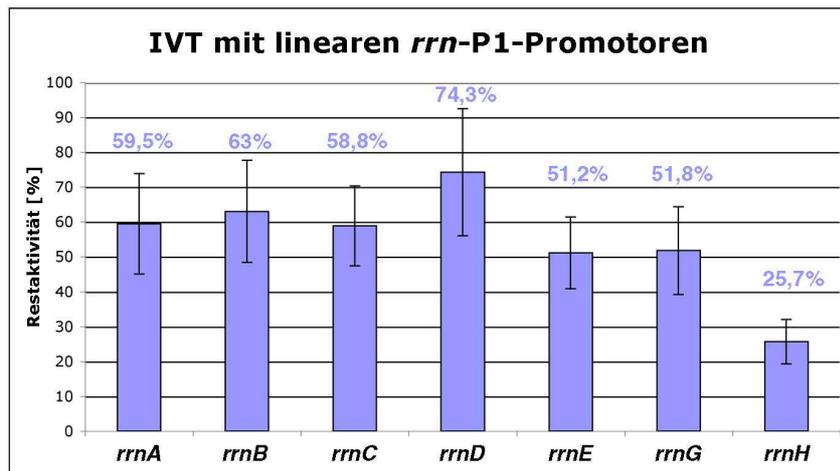


Abbildung 4.7: Histogramm von *in vitro* Transkriptionen mit allen sieben linearen *rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μ M ppGpp. Die Abbildung zeigt ein Histogramm mit der Restaktivität des jeweiligen *rrn*-Operons in Gegenwart von 300 μ M ppGpp. Die Werte über den Balken geben den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen *multiple round in vitro* Transkriptionen an. Die jeweiligen Standardabweichungen sind eingezeichnet.

durchaus mit den unterschiedlichen *upstream* des +1-Starts gelegenen Sequenzen korrelierbar zu sein, die, bedingt durch ihre Heterogenitäten, auch verschiedene Konformationen aufweisen.

Es wurden mehrere *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart und Abwesenheit von 300 μ M ppGpp durchgeführt, anschließend quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis von drei Doppelbestimmungen der ppGpp-bedingten Inhibierung. Die *rrn*-Operons können in drei Gruppen bezüglich ihrer ppGpp-Sensitivität unterteilt werden: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnE*, *rrnG* fallen in eine Gruppe der Inhibierung. Sie werden zu ca. 40 bis 50 % durch ppGpp inhibiert. Innerhalb dieser Gruppe sind die Inhibierungen des *rrnA*-, *rrnB*- und des *rrnC*-Operons sehr ähnlich, die Operons *rrnE* und *rrnG* zeigen eine ca. 7 %ige stärkere Inhibierung. Das *rrnH*-Operon zeigt die stärkste Inhibierung mit ca. 75 %, das *rrnD*-Operon zeigt die schwächste Inhibierung mit ca. 25 %. Die *in vitro* Transkriptionen wurden gemittelt, die Standardabweichungen betragen im Mittel rund 10 %.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass bei den sieben verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren eine deutlich unterscheidbare ppGpp-Inhibierung vorhanden ist. Im Folgenden wurde nun das Inhibierungsverhalten der verschiedenen *rrn*-P1-Promotorgruppen bei ansteigenden ppGpp-Konzentrationen analysiert.

Differentielle Inhibierung bei steigenden ppGpp-Konzentrationen

Nachdem eine differentielle ppGpp-Sensitivität der sieben *rrn*-P1-Promotoren festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern die Inhibierungskurven bei den verschiedenen Promotoren ausfallen würden. Dazu wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen durchgeführt, die eine ansteigende

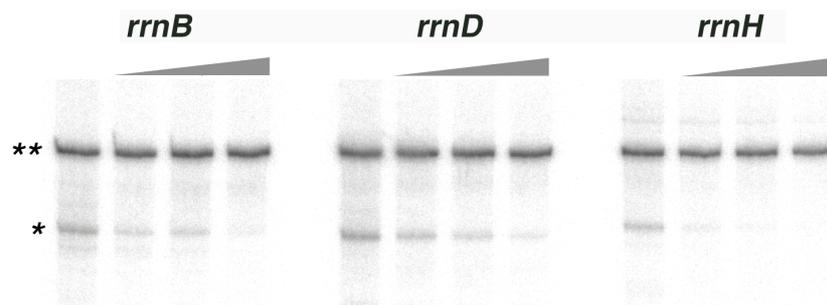


Abbildung 4.8: ppGpp-Titration mit dem *rrnB*-, *rrnD*- und *rrnH*-Fragment. In der Abbildung ist ein Autoradiogramm einer *multiple round in vitro* Transkription mit dem *rrnB*-, *rrnD*- und *rrnH*-Fragment zu sehen. Die grauen Balken über den Spuren symbolisieren steigende ppGpp-Konzentrationen. Jeder *rrn*-P1-Promotor wurde in Gegenwart von 0, 150, 300 und 1000 μM ppGpp transkribiert. * markiert die Volllängentranskripte, ** den Auftragsstandard.

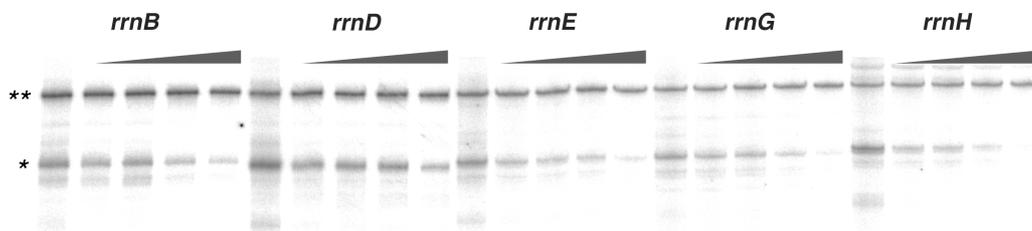


Abbildung 4.9: ppGpp-Titration mit fünf *rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung ist ein Autoradiogramm mit fünf verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren bei steigender ppGpp-Konzentration dargestellt. Die Dreiecke über den Spuren bedeuten steigende ppGpp-Konzentration. Die erste Spur bei einem *rrn*-P1-Promotor repräsentiert die Transkription ohne ppGpp, die folgenden Spuren geben das Ergebnis von 75, 150, 300 und 1000 μM ppGpp wieder. * markiert die Volllängentranskripte, ** den Auftragsstandard.

ppGpp-Konzentration beinhalteten. Zunächst wurden die drei herausstechenden *rrn*-P1-Promotoren bei 0, 150, 300 und 1000 μM ppGpp transkribiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8 zu sehen.

Die Abbildung 4.8 zeigt deutlich, dass das *rrnD*-Fragment am schwächsten, dass *rrnH*-Fragment dagegen am stärksten inhibiert wird. Die Inhibition fällt mit steigenden ppGpp-Konzentrationen ähnlicher aus: bei 1000 μM ppGpp sind kaum noch Unterschiede zwischen den *rrn*-Operons sichtbar, bei 150 μM dagegen sehr deutlich zu erkennen.

Da hier unterschiedliche ppGpp-Sensitivitäten bei drei verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren auftraten, wurden nun fünf herausragende *rrn*-P1-Promotoren mit steigenden ppGpp-Konzentrationen transkribiert: *rrnB* (repräsentiert eine Gruppe mit *rrnA* und *rrnC* bezüglich der ppGpp-Inhibition, siehe oben), *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH*. Die ppGpp-Konzentrationen variierten von 0, 75, 150, 300 bis 1000 μM . Die Abbildung 4.9 gibt das Autoradiogramm dieser *in vitro* Transkription wieder.

Auch hier wurden die Spuren quantifiziert und graphisch ausgewertet, in Abbildung 4.10 ist die Auswertung zu sehen.

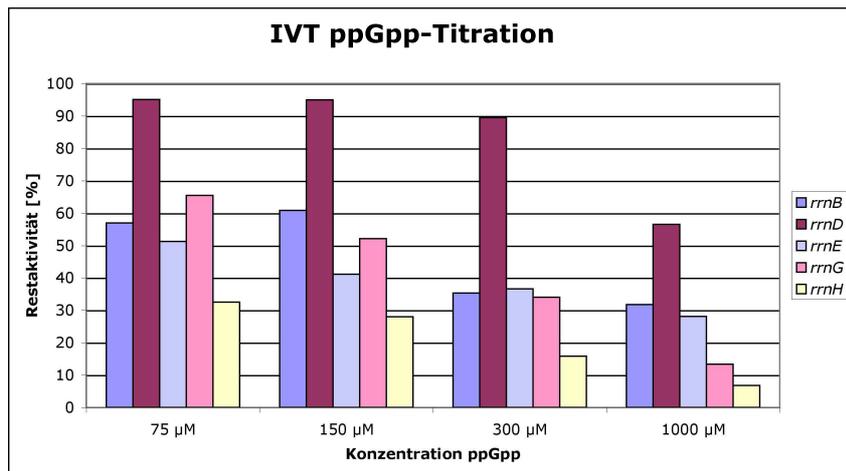


Abbildung 4.10: Graphische Auswertung der ppGpp-Titration mit fünf verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren. Die Abbildung zeigt ein Histogramm mit der Restaktivität bei ansteigenden ppGpp-Konzentrationen.

Es wird deutlich, dass das *rrnD*-Operon die schwächste Inhibierung auch bei ansteigenden Konzentrationen zeigt, das *rrnH*-Operon weist die stärkste Inhibierung auf. Trägt man die Inhibierung in Prozent gegen die ppGpp-Konzentration auf, so resultieren die in Abbildung 4.11 gezeigten Kurven. Hier wurden drei *rrn*-Operons ausgewertet, die die einzelnen Inhibierungsgruppen repräsentieren: *rrnB*, *rrnD* und *rrnH*. Die Inhibierung bei 1000 µM ppGpp wurde gleich 100% gesetzt, um die Inhibierungswerte besser vergleichen zu können. Aus den Kurven lassen sich nun K_i -Werte ablesen. Ein K_i -Wert gibt die ppGpp-Konzentration an, bei der eine halbmaximale Inhibierung vorliegt. Mithilfe einer reziproken Auftragung kann aus den Inhibierungskurven eine Gerade mit zugehöriger Funktion ermittelt werden, aus der sich dann die halbmaximale Inhibierung mathematisch ermitteln lässt. Dabei stellt der Schnittpunkt mit der x-Achse den Kehrwert von K_i dar.

Die ppGpp-Titrationen wurden wiederholt, die resultierenden K_i -Werte zeigten geringfügige Abweichungen. Die Tabelle 4.3 gibt die Mittelwerte der jeweiligen K_i -Werte wieder. Die Werte wurden aus den Inhibierungskurven abgemessen und maßstabsgetreu umgerechnet.

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	gemittelte K_i -Werte [µM]
<i>rrnB</i>	52
<i>rrnD</i>	258
<i>rrnH</i>	32

Tabelle 4.3: K_i -Werte verschiedener *rrn*-Operons

Das *rrnD*-Operon zeigt den höchsten K_i -Wert, was zugleich die geringste ppGpp-Sensitivität unter den drei *rrn*-Operons bedeutet. Das *rrnH*-Operon zeigt mit dem geringsten K_i -Wert die stärkste ppGpp-Sensitivität, dort tritt eine halbmaximale Inhibierung bereits bei ca. 30 µM ppGpp auf. Das *rrnB*-Operon

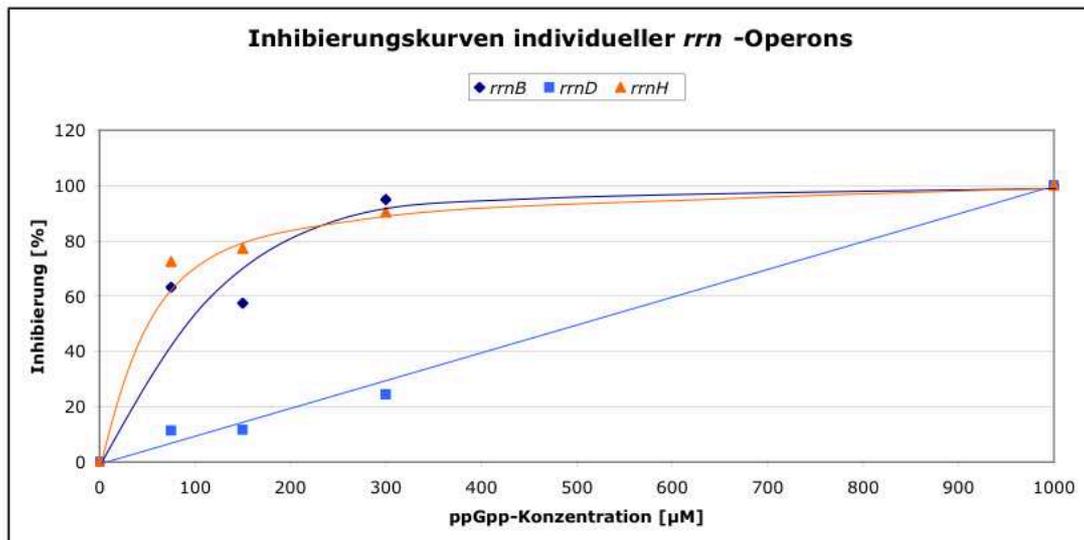


Abbildung 4.11: Inhibierungskurven dreier verschiedener *rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung sind die Inhibierungen in Prozent gegen die ppGpp-Konzentration aufgetragen. Die prozentualen Inhibierungswerte sind als Punkte wiedergegeben, die Inhibierung bei 1000 µM ppGpp wurde gleich 100 % gesetzt.

weist bei ca. 50 µM die halbmaximale Inhibierung vor, es ist demnach deutlich sensitiver als das *rrnD*-Operon mit ca. 260 µM ppGpp für eine halbmaximale Inhibierung.

Die Tatsache, dass unterschiedliche K_i -Werte bei den *rrn*-Operons auftreten, legt die Vermutung nahe, dass auch unterschiedliche K_m -Werte für die Startnukleotide existieren, die mit den K_i -Werten korrelierbar sein sollten. Der K_m -Wert beschreibt die erforderliche NTP-Konzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt, was bei der Initiationsphase eine entscheidende Rolle für die Isomerisierung vom Initiationskomplex zum Elongationskomplex spielt. Der K_m -Wert für das Start-Nukleotid ist bei dem unter 3.4.2 beschriebenen Wettbewerbsmodell von zentraler Bedeutung für die ppGpp-Inhibierung beider ribosomalen P1-Promotoren.

Bei dem *rrnD*-Operon ist GTP das Start-Nukleotid, bei allen anderen *rrn*-Operons liegt ATP als Start-Nukleotid vor. Daher ist ein abweichender K_i - und K_m -Wert vorstellbar. Die restlichen sechs *rrn*-Operons weisen jedoch identische Start-NTPs auf, weswegen unterschiedliche K_i - und K_m -Werte durchaus mit der Sequenz und Konformation der gesamten, *upstream* gelegenen Sequenzen des Transkriptionsstarts korreliert werden können.

Nach diesem Experiment wurden nun die Start-Nukleotid-Abhängigkeiten von drei auffälligen *rrn*-Operons untersucht, die vorher schon bei den K_i -Werten eine differentielle ppGpp-Sensitivität aufzeigten.

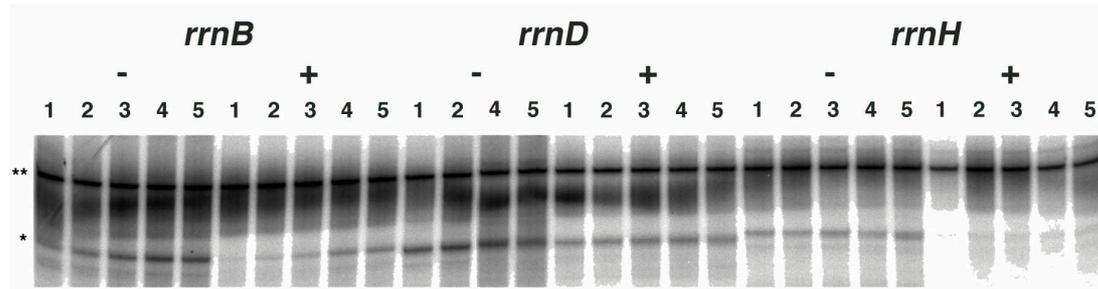


Abbildung 4.12: Start-NTP-Titration mit verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm der Start-NTP-Titration mit dem *rrnB*-, dem *rrnD*- und dem *rrnH*-Operon in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp. Die Zahlen 1 bis 5 repräsentieren folgende Start-NTP-Konzentration: 30, 50, 80, 120 und 250 μM . Die grau dargestellten Zahlen geben Ansätze ohne ppGpp, die schwarz dargestellten Zahlen Ansätze mit 300 μM ppGpp wieder (siehe auch Beschriftung über den Spuren). * markiert die Volllängentranskripte, ** den Auftragungsstandard. Die Spur (3) von *rrnD* ohne ppGpp (0 μM) zeigte keine Produkte, deswegen wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

Einfluss der Start-NTP-Konzentration auf die Transkriptionsaktivität in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp

Im Folgenden wurden nun die drei auffälligen *rrn*-Operons auf ihre Start-NTP-Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Die Operons *rrnB*, *rrnD* und *rrnH* wurden bei verschiedenen Start-NTP-Konzentration transkribiert, jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp. Dabei war zu erwarten, dass unterhalb einer kritischen NTP-Konzentration die Inhibierung stärker ausfällt, bei steigenden Mengen jedoch abnimmt. Liegen ausreichend hohe Konzentrationen von Start-NTP vor, sollte die Konkurrenz um die Wechselwirkung im aktiven Zentrum zugunsten des Start-NTP's ausfallen, die ppGpp-Wechselwirkung ist reversibel und wird daher mit zunehmenden Start-NTP-Konzentrationen schwächer, bis sie schließlich aufgehoben wird.

Die Konzentrationen der Start-NTPs variierten von 30, 50, 80, 120 bis 250 μM . Die Operons *rrnB* und *rrnH* wurden mit ATP, das *rrnD*-Operon mit GTP als Startnukleotid inkubiert. Es wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen durchgeführt (siehe Abschnitt 7.3.5). Die Abbildung 4.12 zeigt das resultierende Autoradiogramm dieser Reaktion.

Der *rrnD*-Ansatz mit 80 μM GTP ohne ppGpp zeigte weder Volllängentranskript noch Durchleseprodukte, daher wurde auf die Darstellung der Spur verzichtet. Bei Betrachtung des Autoradiogramms fällt auf, dass das *rrnB*-Operon die deutlichste Zunahme an Produkt zeigt, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von ppGpp. Die Konzentrationen von 120 und 250 μM Startnukleotid zeigen bei diesem Operon die stärksten Transkripte.

Das *rrnD*-Operon weist schon bei 30 μM sehr starke Produktbanden auf, eine Zunahme ist nicht so deutlich wie bei dem *rrnB*-Operon zu erkennen. Wie schon zuvor beschrieben, weisen die stärkeren Produktintensitäten auf eine schneller ablaufende Initiation hin. Es reichen bereits relativ kleine Mengen an Start-NTP aus, um in gleicher Inkubationszeit deutlich mehr Produktintensität im Verhältnis zu dem *rrnB*-Operon zu erreichen. Die schnellere Initiation könnte einen geringeren K_m -Wert des *rrnD*-Operons

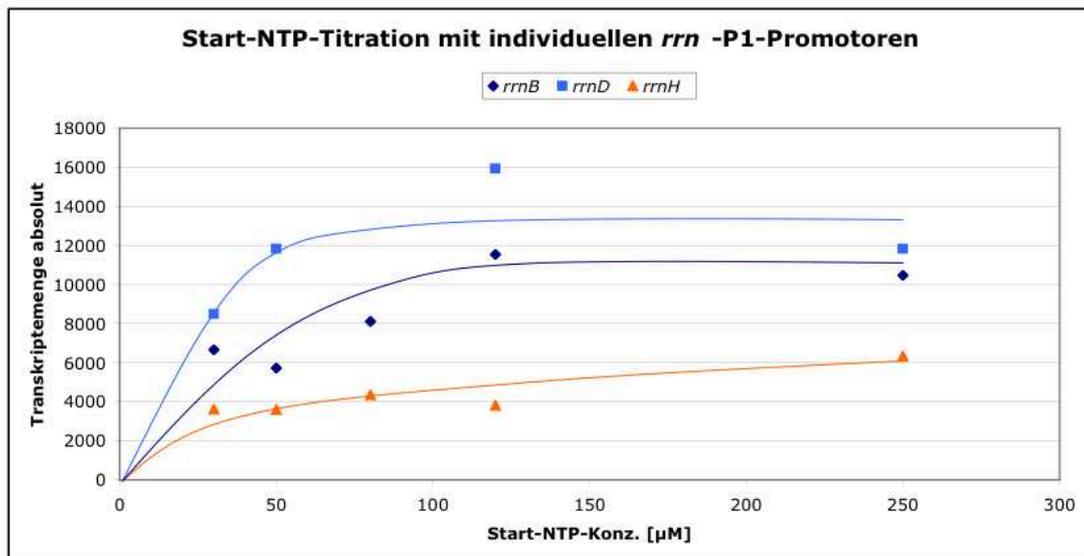


Abbildung 4.13: Graphische Auswertung der Start-NTP-Titration mit drei verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung ist die Transkriptionsstärke in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration dargestellt. Dunkelblau stellt das *rrnB*-Operon dar, hellblau das *rrnD*-Operon und orange repräsentiert das *rrnH*-Operon.

für das Startnukleotid bedeuten.

In Gegenwart von ppGpp fällt die Inhibierung erwartungsgemäß schwächer als bei *rrnB* und *rrnH* aus, die Produktzunahme verhält sich wie bei den Ansätzen ohne ppGpp. Bei dem *rrnD*-Operon muss jedoch berücksichtigt werden, dass das zweite und dritte Nukleotid auf Transkriptebene ein UTP ist. Da hier mit UTP markiert wird, ist selbst bei theoretisch gleich schnell verlaufender Initiation eine stärkere Transkriptbande zu erwarten. Die anderen *rrn*-P1-Promotoren weisen innerhalb der ersten drei Nukleotide auf Transkriptebene nur an zweiter (*rrnH*) oder an dritter Stelle (*rrnB*) ein UTP auf. Es ist jedoch fraglich, wie stark sich diese zweifache Markierung auf die gesamte Produktintensität auswirkt, denn die Transkripte umfassen 216 bzw. 213 (*rrnD*) Nukleotide und besitzen ab Position +15 identische Sequenzen.

Das *rrnH*-Operon zeigt die stärkste Bande bei 250 µM Startnukleotid, allerdings ist auch dort keine so deutliche Zunahme zu erkennen wie bei dem *rrnB*-Operon. Die Produktstärke erreicht zudem nicht die der anderen beiden Operons, die Inhibierung fällt erwartungsgemäß sehr stark aus, zeigt auf den ersten Blick keine deutliche Veränderung. Die Quantifizierung des Autoradiogramms ermöglicht mehrere Auswertungen:

- Die Transkriptionsstärke in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration
- Der Inhibierungsgrad in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration

Die Abbildungen 4.13 und 4.14 geben die graphische Auswertungen wieder.

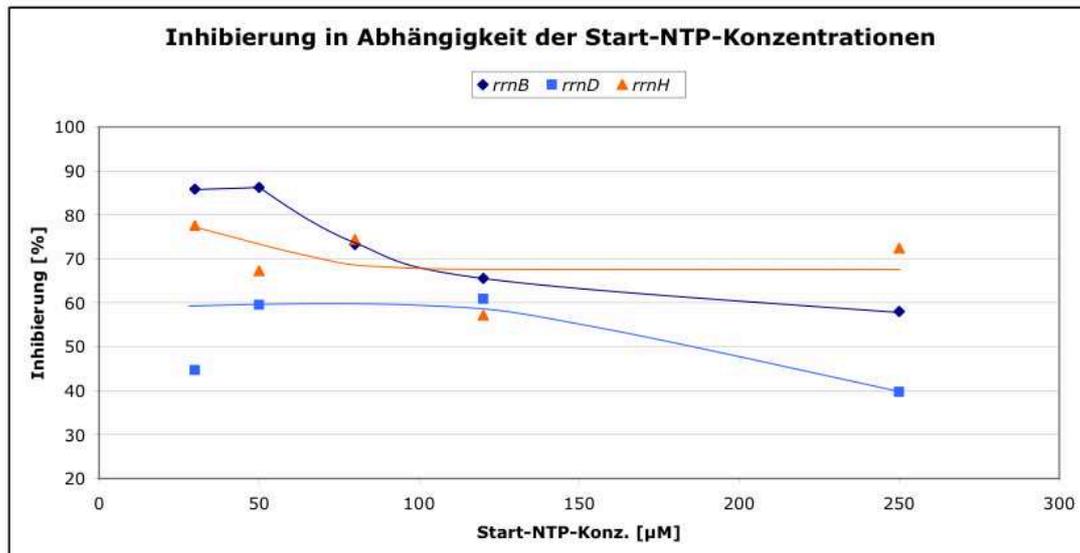


Abbildung 4.14: Inhibierungskurven in Abhängigkeit von Startnukleotid-Konzentrationen. In der Abbildung ist die Inhibierung bei 300 μM ppGpp in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration dargestellt. Dunkelblau stellt das *rrnB*-Operon dar, hellblau das *rrnD*-Operon und orange repräsentiert das *rrnH*-Operon.

Die obere Abbildung zeigt deutlich, dass die drei *rrn*-Operons unterschiedliche Transkriptmaxima erreichen. Das *rrnD*-Operon erreicht schon bei geringen NTP-Konzentrationen relativ hohe Transkriptintensitäten, was durchaus für eine schnelle Initiationszeit im Vergleich zu den anderen *rrn*-Operons spricht. Bei dem *rrnB*-Operon steigt die Kurve nicht so steil an, das Transkriptmaximum liegt unter dem *rrnD*-Operon. Das *rrnH*-Operon zeigt die auffälligste Kurve: Es erreicht nur ca. die Hälfte an Transkriptmenge im Verhältnis zu den anderen beiden *rrn*-Operons, was für eine deutlich verlangsamte Initiation spricht. Da die Plateauwerte sich deutlich unterscheiden, müssen hier neben der NTP-Konzentration noch andere intrinsische Promotor-Eigenschaften für die unterschiedlichen Aktivitäten relevant sein. Anhand der Abbildung lässt sich schon die Vermutung äußern, dass diese drei *rrn*-Operons unterschiedliche Substrat-Konzentrationen brauchen, um die Hälfte an maximaler Transkriptintensität zu erreichen.

Die Inhibierungskurven in Abbildung 4.14 zeigen ein unerwartetes Ergebnis: Das *rrnB*-Operon wird bei geringen Start-NTP-Titrations am stärksten inhibiert und zeigt den deutlichsten Verlauf an Inhibierungsabnahme mit steigender NTP-Konzentration. Aufgrund der vorhergegangenen K_i -Wert-Bestimmungen wurde hier eine schwächere Inhibierung im Vergleich zu dem *rrnH*-Operon erwartet. Das *rrnH*-Operon zeigt dagegen kaum eine Abnahme der Inhibierung, der Verlauf ähnelt eher einer Geraden, hohe Start-NTP-Konzentrationen scheinen sich nicht in einer Inhibierungsabnahme zu äußern.

Bei dem *rrnD*-Operon ist die Inhibierung erwartungsgemäß schwächer ausgefallen, die Werte liegen deutlich unter den anderen beiden *rrn*-Operons und nehmen mit steigender Start-NTP-Konzentration ab. Die Kurven müssen aufgrund einiger Werte jedoch vorsichtig betrachtet werden. Der Inhibierungswert des *rrnD*-Operons bei 30 μM NTP fällt z.B. niedriger als die nachfolgende Inhibierung bei 50 μM Startnukleotid aus. Zudem schwanken die Inhibierungen des *rrnH*-Operons deutlich, die resultierende Kurve

ist als Ausgleichsgerade anzusehen und gibt den gemittelten Verlauf der Inhibierung wieder. Dennoch entsprechen die Kurvenverläufe bezüglich Transkriptintensität und Inhibierungsverlauf den Erwartungen: *rrnD* wird am schwächsten, *rrnH* insgesamt am stärksten inhibiert.

Die Abbildung 4.14 ermöglicht die Bestimmung des K_m -Werts für das jeweilige Startnukleotid bei den verwendeten *rrn*-P1-Promotoren. Als K_m -Wert wird hier vereinfacht die Nukleotidkonzentration bezeichnet, bei der die halbmaximale Produktstärke vorliegt. In Tabelle 4.4 sind die resultierenden Werte angegeben.

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	K_m -Werte [μM]
<i>rrnB</i>	28
<i>rrnD</i>	10
<i>rrnH</i>	48

Tabelle 4.4: K_m -Werte verschiedener *rrn*-Operons

Das *rrnD*-Operon zeigt für das Startnukleotid GTP den geringsten K_m -Wert mit ca. 10 μM . Bei dieser Konzentration sollte die halbmaximale Produktintensität zu sehen sein. Die durchgeführten Start-NTP-Titrations beginnen bei 30 μM , dort liegt wie in Abbildung 4.13 ersichtlich bereits mehr als 50 % der maximalen Transkriptmenge vor.

Das *rrnH*-Operon zeigt den höchsten K_m -Wert mit knapp 50 μM für das Startnukleotid ATP, was gemäß der schwachen Transkriptbanden und der starken ppGpp-Inhibierung zu erwarten war. Das *rrnB*-Operon liegt mit ca. 30 μM für ATP zwischen den beiden anderen Operons.

Insgesamt wurde diese Reihung der K_m -Werte erwartet. Die vorher gegangenen K_i -Wert-Bestimmungen deuteten auf diese Reihung hin. Bei Berücksichtigung des Wettbewerbsmodells (siehe Abschnitt 3.4.2) ist bei einer niedrigen ppGpp-Sensitivität (= hoher K_i -Wert) ein niedriger K_m -Wert plausibel, ebenso sollte bei starker ppGpp-bedingter Inhibierung (= niedriger K_i -Wert) ein entsprechend hoher K_m -Wert für das Startnukleotid korrespondieren. Die erzielten Ergebnisse weisen auf eine unterschiedlich verlaufende Initiation hin.

Die Ergebnisse der Promotoranalysen mit linearen *rrn*-templates lassen sich unter folgenden Punkten zusammenfassen:

- Die sieben verschiedenen *rrn*-P1-Promotoren zeigen eine unterschiedliche basale Transkriptionsaktivität
- Die verschiedenen ppGpp-Sensitivitäten erlauben die Einteilung in drei Gruppen bezüglich der Inhibierungsstärke:
 - *rrnD* wird am schwächsten inhibiert
 - *rrnH* wird am stärksten inhibiert

- Die Inhibierung fällt bei den restlichen *rrn*-Operons mittelstark aus; innerhalb dieser Gruppe werden *rrnE* und *rrnG* ca. 10% stärker inhibiert
- Die ermittelten K_i -Werte unterstreichen die differentielle ppGpp-Sensitivität, der *rrnD*-P1-Promotor zeigt erst bei sehr hohen ppGpp-Konzentrationen eine halbmaximale Inhibierung
- Die ermittelten K_m -Werte korrelieren mit der beobachteten ppGpp-Sensitivität der individuellen P1-Promotoren

Im Folgenden wurden nun die ppGpp-Sensitivitäten bei superhelikalen (*ccc*) *rrn*-P1-Promotoren untersucht. Bei *ccc-templates* kann die Promotorarchitektur anders ausfallen, da hier nicht nur die Krümmung, sondern auch die Topologie einen Einfluss auf die Initiation und somit die ppGpp-Sensitivität haben kann.

4.1.4 Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen *rrn*-P1-Promotoren

Unter diesem Punkt wurden verschiedene *in vitro* Transkriptionsansätze mit *ccc-templates* zusammengefasst.

Zunächst wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um die Bedingungen zu optimieren, ähnlich wie bei Experimenten mit linearen *templates*. Anschließend wurden ebenfalls Promotoranalysen mit konstanter und variierter ppGpp-Konzentration durchgeführt, die eine vergleichbare differentielle ppGpp-Sensitivität der sieben *rrn*-P1-Promotoren zeigten.

Bestimmung der *rrn*-P1-initiierten Transkripte auf Plasmidebene

Bei den *ccc*-Analysen wurden die Plasmide pHD1A-H verwendet (siehe Abschnitt 6.2.2). Diese Plasmide stammen von dem Vektor pKK232-8, in den die vollständige UAS-Region, der P1-Promotor sowie 15 (*rrnD*), 16 (*rrnE*) bzw. 18 bp (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnG* und *rrnH*) *downstream* des jeweiligen *rrn*-P1-Promotors vor ein promotorloses *cat*-Gen kloniert wurden. Dieses Gen ermöglicht nach erfolgreicher Klonierung eines Promotors die Expression der Chloramphenicolacetyltransferase. Bei Expression in Bakterien verleiht dieses Gen eine Chloramphenicolresistenz, weswegen eine selektive Aufzucht in Chloramphenicol-haltigem Medium möglich wird.

Das *cat*-Gen selbst umfasst 660 bp, wird jedoch von der RNA-Polymerase solange weiter transkribiert, bis intrinsische Terminatoren auf dem *template* erreicht werden, die dann einen Transkriptionsabbruch bewirken (siehe Abschnitt 3.3.4). Auf den pHD-Plasmiden sind nacheinander zwei Regionen zu finden, die die 5 S rRNA von *E. coli* sowie die beiden nachfolgenden Terminatoren T1 und T2 codieren.

Da die genaue Terminationsposition bisher unbekannt war, wurden zunächst bioinformatisch Abbruchpositionen gesucht. Mit der Software GCG® WISCONSIN PACKAGE TM PROGRAMS ließen sich exakte Terminationspositionen festlegen. Demnach würde zu 99% an einer Position innerhalb des

T1-Terminators und zu 90 % an einer Position innerhalb des T2-Terminators ein Transkriptionsstopp erfolgen. Die resultierenden Transkripte umfassen dann 1240 bzw. 1402 Nukleotide. Die Größe des P1-initiierten Transkripts sollte auf keine Fall dem Umfang der anderen plasmid-codierten Transkripte gleichen, da sonst eine elektrophoretische Analyse schwierig wird. Die beiden anderen Plasmid-codierten Gene β -Lactamase (β *lac*) sowie RNAI weisen laut Terminationssuche andere Transkriptgrößen auf, sie sollten daher bei elektrophoretischer Auftrennung nicht mit den P1-initiierten Transkripten zusammenlaufen. Die Tabelle 4.5 gibt die resultierenden Transkriptgrößen für die Plasmid-codierten Gene bei den sieben verschiedenen *templates* an.

Bezeichnung des <i>templates</i>	<i>cat</i> -Gen [nt]	β <i>lac</i> -Gen [nt]	RNAI-Gen [nt]
pHD1-A	1240 (429-1668)	1079 (5183-4105)	108 (3971-4078)
pHD1-B	1240 (449-1688)	1079 (5203-4125)	108 (3991-4098)
pHD1-C	1240 (418-1657)	1079 (5172-4074)	108 (3960-4067)
pHD1-D	1237 (437-1673)	1079 (5188-4110)	108 (3976-4083)
pHD1-E	1238 (457-1694)	1079 (5209-4131)	108 (3997-4104)
pHD1-G	1240 (442-1681)	1079 (5197-4118)	108 (3984-4091)
pHD1-H	1240 (420-1659)	1079 (5174-4096)	108 (3962-4069)

Tabelle 4.5: Berechnete Transkriptgrößen der sieben *ccc-templates*

Die Tabelle gibt die nach GCG berechneten Transkriptgrößen der Plasmid-codierten Gene an. In Klammern ist jeweils die Sequenzposition des entsprechenden Gens bis zur bioinformatisch bestimmten Terminationsposition angegeben. Da die β Lactamase auf dem komplementären DNA-Strang codiert ist, wird die Sequenzposition des resultierenden Transkripts in Gegenrichtung (absteigende Zahlen) angegeben. Das *cat*-Gen repräsentiert das *rrn*-P1-initiierte Transkript.

Nachdem die Transkriptgröße theoretisch bestimmt worden war, wurde nun durch eine *in vitro* Transkription das P1-initiierte Transkript experimentell bestimmt. Dazu wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen mit zwei verschiedenen *templates* durchgeführt: mit pHD1-B und dem Vektor ohne *rrn*-P1-Insert, pKK232-8 [13]. Dadurch sollte eine eindeutige Zuordnung des P1-initiierten Transkripts möglich werden. Die Reaktion wurde wie unter Abschnitt 7.3.5 beschrieben bei 160 mM Kaliumglutamat durchgeführt. Hier wurden die Reaktionszeiten variiert, um die Produktzunahme zu erkennen. Die Ansätze wurden zudem in Ab- und Anwesenheit von 300 μ M ppGpp durchgeführt. Nur das P1-initiierte Transkript sollte eine ppGpp-Sensitivität aufweisen, die anderen Plasmid-codierten Gene sind ppGpp-insensitiv. Die Abbildung 4.15 gibt das Autoradiogramm dieser Reaktion wieder.

Die *rrnB*-P1-initiierten Transkripte sind deutlich zuerkennen. Die Produkte nehmen infolge längerer Elongationszeiten zu und zeigen wie erwartet eine ppGpp-Sensitivität. Die Produkte des Vektors zeigen ebenfalls eine ppGpp-Sensitivität, die jedoch deutlich geringer ausfällt. Die schwächeren Produkte in Anwesenheit von ppGpp können durch das *partition model* erklärt werden, wobei unterschiedliche Pools an RNA-Polymerasen auftreten (siehe Abschnitt 3.4.3). ppGpp-haltige RNA-Polymerasen können demnach auch an ppGpp-insensitiven Promotoren schlechter initiieren. Die bei dem *template* pKK232-8

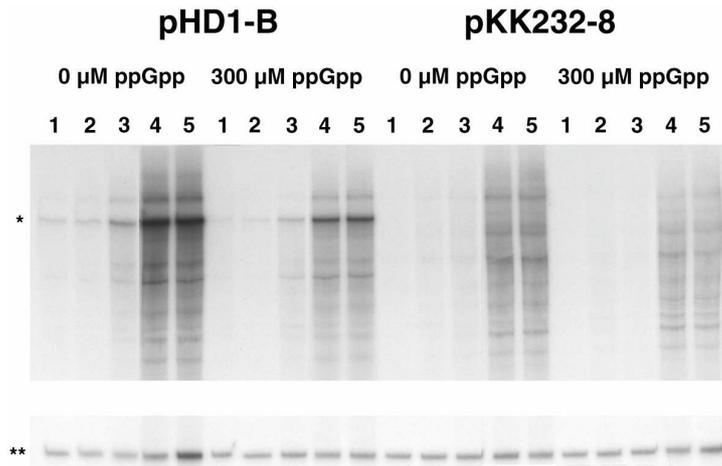


Abbildung 4.15: Vergleichende *in vitro* Transkription von pHD1-B und pKK232-8 zur Bestimmung der P1-initiierten Transkripte. Die Abbildung gibt das Autoradiogramm der *in vitro* Transkription mit pHD1-B und pKK232-8 wieder. Dargestellt sind die Spuren ohne und mit ppGpp (0 μ M und 300 μ M ppGpp), die verschiedenen Reaktionszeiten sind durch Zahlen wieder gegeben: 1, 2, 3, 4 und 5 repräsentieren 0,5, 1, 3, 10 und 12 min Reaktionszeit. * markiert die *cat*-Volllängentranskripte, ** repräsentiert den Auftragsstandard.

auftretende ppGpp-Sensitivität repräsentiert jedoch keinesfalls eine spezifische ppGpp-bedingte Inhibition.

Aus der Abbildung wird zudem deutlich, dass der *rrn*-P1-Promotor mit Abstand die stärksten Produktbanden zeigt. Es handelt sich hier um einen starken Promotor, der aufgrund seiner UAS-Region seine Promotorstärke erreicht [68], [44], [53], [42]. Die *rrn*-P1-Promotoren von *E. coli* werden generell als eine der stärksten Promotoren in der Zelle bezeichnet.

Da hier nach 10 min bereits sehr deutliche Transkripte zu sehen sind, wurde für zukünftige *multiple round in vitro* Transkriptionen mit *ccc*-Plasmiden ebenfalls eine Elongationszeit von 10 min gewählt. Bevor mit den eigentlichen ppGpp-Promotoranalysen begonnen wurde, war es wichtig, die Superhelikalität zu überprüfen, was im nachfolgenden Punkt näher besprochen wird.

Analyse des *ccc*-Gehaltes präparierter Plasmide

Bei *ccc-templates* spielt die Topologie eine große Rolle. Die Superhelikalität erwirkt eine deutlich geringere Aufschmelzenergie, was bei der Transkriptionsinitiation von enormer Bedeutung ist, die Isomerisierung zum offenen Komplex verläuft sehr viel schneller (siehe Abschnitt 3.3.5). Um eine einheitliche Transkription zu gewährleisten, ist es erforderlich, den *ccc*-Gehalt von Plasmiden anzupassen. Bei einer Plasmidpräparation treten neben der *ccc*-Form auch die *oc*-(*open circled*=relaxierte) Form und ungünstigenfalls die lineare Form bedingt durch Scherkräfte auf. Die Transkription von linearen bzw. relaxierten *templates* fällt deutlich schwächer aus.

Zunächst wurde nach jeder Plasmidpräparation der *ccc*-Gehalt auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt

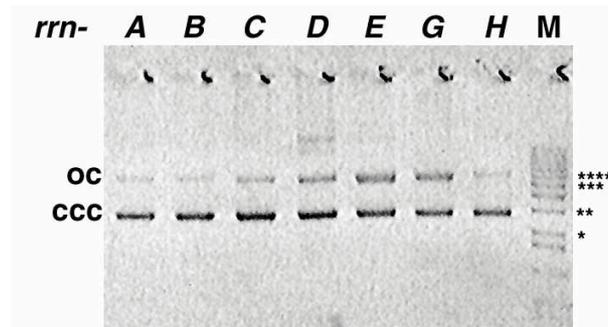


Abbildung 4.16: Analyse des ccc-Gehaltes der sieben pHD1-Plasmide. Die Abbildung zeigt ein invertiertes Agarosegel mit sieben verschiedenen pHD1-Plasmiden. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *rrn*-Operons wiedergegeben. *rrnA* bedeutet der Vektor pKK232-8 mit einklonierter UAS-Region plus P1-*core*-Promotor des *rrnA*-Operons (Plasmid pHD1-A). M bezeichnet den Molekulargewichtsmarker. Die Sterne neben der Molekulargewichtsmarkerspurspur geben DNA-Fragmente mit folgender Größe wieder: * = 2036 bp, ** = 3054 bp, *** = 5090 bp und **** = 6108 bp.

7.2.4) überprüft. Die Abbildung 4.16 zeigt die sieben verschiedenen pHD1-Plasmide nach erfolgter Auftrennung.

Aus Abbildung 4.16 wird deutlich, dass die vorliegenden Plasmide nur in ccc- bzw. in oc-Form vorliegen. Die ccc-Form läuft schneller als die apparente Größe, sie beträgt rund 5300 bp. Die oc-Form retardiert, sie zeigt ein scheinbar größeres Molekulargewicht. Die Superhelikalität wurde aufgrund des Ergebnisses als einheitlich angesehen. Da die Transkription von relaxierten oder linearen *templates* sehr viel schwächer ausfällt, kann der Anteil an oc-*template* vernachlässigt werden, die ccc-Form hat den größten Anteil an der Transkription.

Nach der ccc-Analyse musste ausserdem sichergestellt werden, dass die verwendete RNA-Polymerase keine *nicking* Aktivität besitzt. Eine *nicking* Aktivität führt einen Schnitt (= *nick*) auf einem DNA-Strang aus, was die Relaxierung des Plasmids zur Folge hat. Die *templates* würden infolge dieser Aktivität mit zunehmender Elongationszeit ihre Superhelikalität verlieren, die Transkriptionsrate fiel drastisch ab. Zur Überprüfung der *nicking* Aktivität wurden die Plasmide in 30x Transkriptionsansätzen für unterschiedliche Zeiten transkribiert und anschließend über Agarosegele analysiert. Die 30x Ansätze waren notwendig, um eine Anfärbung mit EtBr zu gewährleisten. Der Standard-*in vitro* Transkriptionsansatz von 10 μ l Volumen wurde mit 1 nM *template* durchgeführt, der Reaktionsstart erfolgte durch die RNA-Polymerase-Zugabe. Bei den verwendeten Plasmiden entspricht 1 nM *template* einer Menge von ca. 3 ng, die Nachweisgrenze für Agarosegele liegt jedoch bei 30 ng. Die 30x Ansätze sollten daher deutlich durch EtBr visualisiert werden können. Die Abbildung 4.17 zeigt das Ergebnis der *nicking* Analyse.

In der Abbildung ist mit zunehmender Elongationszeit keine Abnahme der oc-Form zu erkennen. Die Spur 4 repräsentiert jeweils die Elongationszeit von 10 min, die als Standard-Elongationszeit in vorherigen Experimenten benutzt wurde. Nach diesen Ergebnissen wurden nun die ppGpp-Sensitivitäten aller sieben *rrn*-P1-Promotoren, als ccc-*template* vorliegend, analysiert.

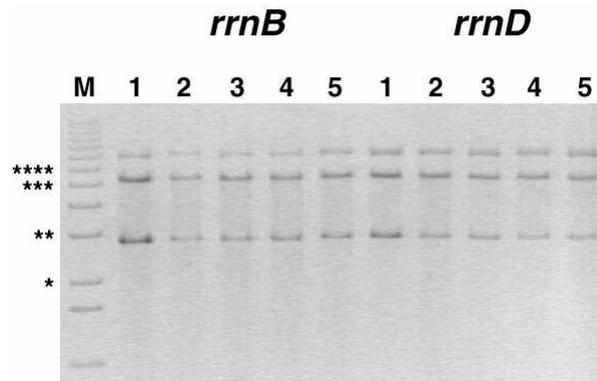


Abbildung 4.17: Analyse der nicking Aktivität der RNA-Polymerase. Die Abbildung zeigt ein invertiertes Agarosegel mit zwei verschiedenen *in vitro* Transkriptionsansätzen. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *rrn*-Operons wiedergegeben. *rrnB* bedeutet der Vektor pKK232-8 mit inklonierter UAS-Region plus P1-*core*-Promotor des *rrnB*-Operons (Plasmid pHD1-B). M bezeichnet den Molekulargewichtsmarker. Die verschiedenen Elongationszeiten sind durch Zahlen wieder gegeben: 1, 2, 3, 4 und 5 repräsentieren 0, 1, 5, 10 und 20 min Elongationszeit. Die Sterne neben der Molekulargewichtsmarkerspura geben DNA-Fragmente mit folgender Größe wieder: * = 2036 bp, ** = 3054 bp, *** = 5090 bp und **** = 6108 bp.

Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen *rrn*-P1-Promotoren

Die sieben *ccc-templates* wurden nun in Gegenwart und Abwesenheit von 300 μM ppGpp transkribiert. Ähnlich wie bei den Fragmenten sollte hier zunächst festgestellt werden, ob und wie stark die ppGpp-Sensitivität unterschiedliche Ausmaße zeigt. Die Reaktionen wurden bei 160 mM Kaliumglutamat durchgeführt, die Elongationszeit betrug 10 min. Die Reaktion wurde wie unter 7.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 7.2.4), autoradiographiert und quantitativ ausgewertet. Die Abbildung 4.18 zeigt das Ergebnis der Reaktion.

Im Autoradiogramm wird bereits ohne Quantifizierung eine differentielle ppGpp-Sensitivität sichtbar. Im Gegensatz zu den *rrn*-Fragmenten fallen die Unterschiede zwischen den *rrn*-Operons jedoch geringer aus. Die basale Transkriptionsaktivität zeigte jedoch deutliche Unterschiede zwischen den *rrn*-P1-Promotoren. Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 4.19 wiedergegeben.

Die Quantifizierung zeigt die Restaktivität bei 300 μM ppGpp. Hier fällt die Reihung bezüglich der ppGpp-Sensitivität etwas anders aus. Das *rrnD*-Operon wird zwar immer noch am schwächsten inhibiert, fällt jedoch mit dem *rrnB*- und dem *rrnC*-Operon in eine Gruppe der Inhibierungsstärke. Die Operons *rrnA*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH* werden stark inhibiert. Insgesamt lässt sich feststellen, dass hier die stärkeren Promotoren schwächer inhibiert werden, und die schwächeren Promotoren zeigen eine stärkere Inhibierung. Diese Tatsache wurde vorher bei den Fragmenten schon festgestellt. Bei diesen *ccc*-Analysen wurde vermutet, dass der Inhibierungswert von 300 μM auf der Inhibierungskurve im Vergleich zu den *rrn*-Fragmenten verschoben liegt. Liegt der Punkt von 300 μM in der Steigung der

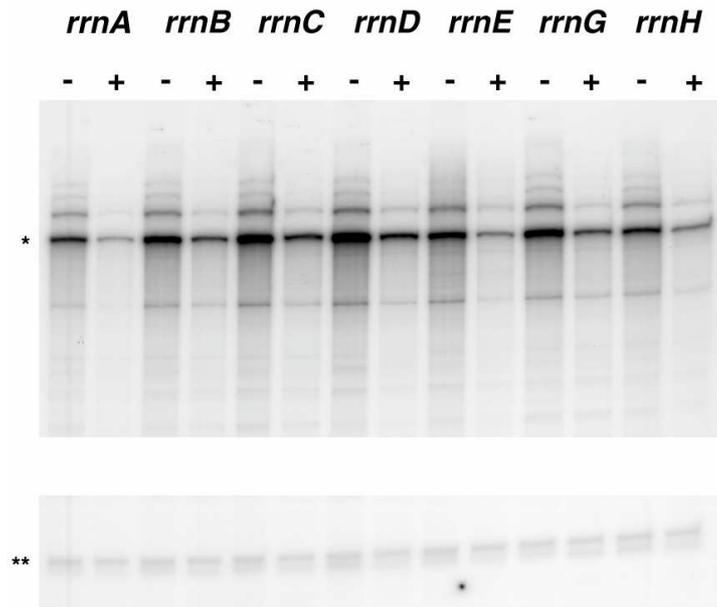


Abbildung 4.18: Differentielle ppGpp-Sensitivität bei *ccc-rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung ist ein Autoradiogramm der *multiple round in vitro* Transkription mit allen *ccc-templates* zu sehen. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *rrn*-Operons angegeben. - bedeutet 0 μM ppGpp, + bedeutet 300 μM ppGpp im Transkriptionsansatz. * markiert die Volllängentranskripte, ** repräsentiert den Auftragungsstandard.

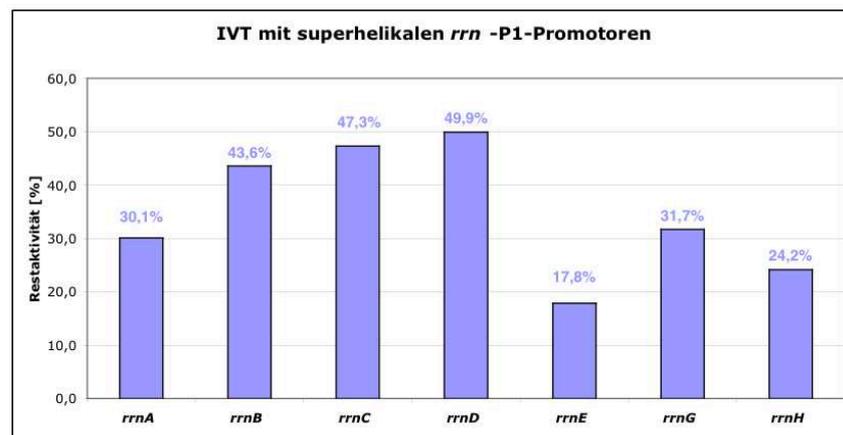


Abbildung 4.19: Histogramm von *in vitro* Transkriptionen mit allen sieben *ccc-rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μM ppGpp. Die Abbildung zeigt ein Histogramm mit der Restaktivität des jeweiligen *rrn*-Operons in Gegenwart von 300 μM ppGpp. Die Werte über den Balken geben die Restaktivität in Prozent an.

Kurve, können minimale Abweichungen einen drastischen Effekt zeigen. Daher wurden im Folgenden die sieben *ccc-templates* bei variierten ppGpp-Konzentrationen vermessen.

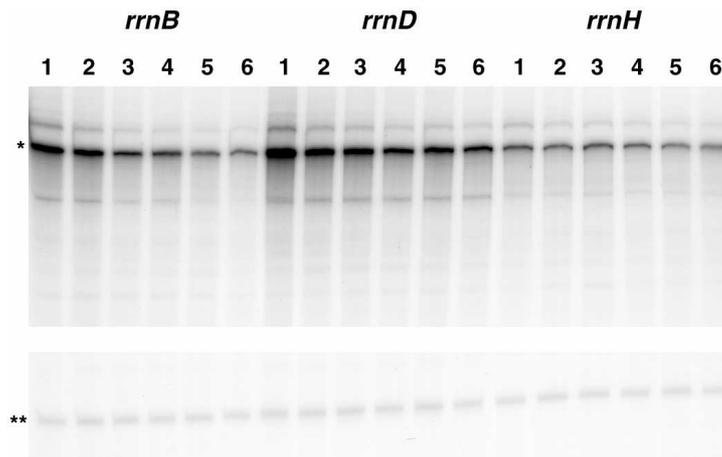


Abbildung 4.20: ppGpp-Titration mit drei ccc-*rrn*-P1-Promotoren. In der Abbildung ist ein Autoradiogramm der *multiple round in vitro* Transkription mit drei *ccc-templates* zu sehen. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *rrn*-Operons angegeben. Die verschiedenen ppGpp-Konzentrationen werden durch die Zahlen repräsentiert: 1, 2, 3, 4, 5 und 6 geben die ppGpp-Konzentrationen von 0, 50, 150, 300, 700 und 1000 µM wieder. * markiert die Vollängentranskripte, ** repräsentiert den Auftragungsstandard.

Differentielle ppGpp-Sensitivität bei steigenden ppGpp-Konzentrationen

Für diese Promotoranalysen wurden drei *rrn*-Operons verwendet: *rrnB*, *rrnD* und *rrnH*. Diese drei Operons sollten die beiden Gruppen bezüglich der Inhibierungsstärke bei den *ccc-templates* repräsentieren und wurden schon zuvor bei den Analysen der linearen *rrn*-P1-Promotoren verwendet. Es wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen wie unter Abschnitt 4.1.4 beschrieben durchgeführt. Die ppGpp-Konzentrationen variierten, es wurden mehrere Titrationen durchgeführt. Die Reihung der ppGpp-Sensitivitäten war gleich, jedoch fielen die Messwerte unterschiedlich stark aus, so dass auf eine statistische Zusammenfassung verzichtet wurde.

In der Abbildung 4.20 ist ein Autoradiogramm einer ppGpp-Titration dargestellt.

In der Abbildung sind auch ohne Quantifizierung schon mit bloßem Auge sehr unterschiedliche ppGpp-Sensitivitäten erkennbar. Das *rrnB*-Operon zeigt die deutlichste Abnahme infolge steigender ppGpp-Konzentrationen. Das *rrnH*-Operon weist schon bei 0 µM ein deutlich geringeres Transkript auf, es nimmt infolge steigender ppGpp-Titrationen nicht so deutlich ab. Das *rrnD*-Operon zeigt die stärksten Transkriptbanden und nimmt schwächer ab, als es bei dem *rrnB*-Operon zu erkennen ist. Es werden wie schon bei den linearen *templates* unterschiedliche Plateaus erreicht. Auch hier zeigt der *rrnD*-P1-Promotor die stärkste basale Transkription. Die unterschiedlichen Plateaus sind auf die intrinsischen Eigenschaften der Promotoren zurückzuführen. Die Promotorarchitektur der drei analysierten *rrn*-Operons unterscheiden sich schon in den *core*-Promotor-Sequenzen, zeigen aber *upstream* der -35-Region deutlichere Abweichungen. Diese Sequenzheterogenitäten in der UAS-Region können die unterschiedliche Transkriptionsstärke durchaus begründen. Unter superhelikalen Bedingungen können diese Eigenschaften die basale Transkription verstärken [68].

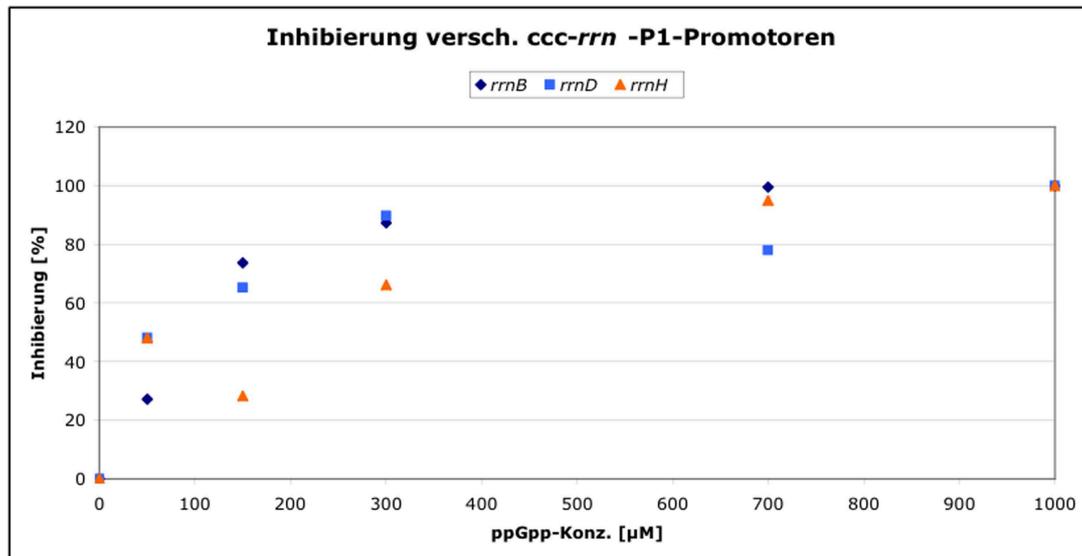


Abbildung 4.21: Inhibierung infolge steigender ppGpp-Konzentrationen bei drei ccc-*rrn*-P1-Promotoren.

Die Abbildung zeigt die Inhibierungsintensität in Abhängigkeit von ppGpp-Konzentrationen. Die drei untersuchten *rrn*-Operons sind farblich dargestellt: dunkelblau repräsentiert *rrnB*, hellblau *rrnD* und orange gibt die Kurve für das *rrnH*-Operon wieder. Die Inhibierung bei der höchsten ppGpp-Konzentration wurde gleich 100% gesetzt.

Das *rrnB*-Operon zeigt die stärkste Inhibierung bei der höchsten ppGpp-Konzentration. Die resultierende Ausgleichsgerade weist die stärkste Steigung auf, die Punkte streuen wenig. Eine 50%ige Inhibierung wird bei dieser Kurve bei der niedrigsten ppGpp-Konzentration erreicht. Dies würde gleichzeitig den kleinsten K_i -Wert bedeuten.

Das *rrnD*-Operon wird am schwächsten inhibiert, zeigt bei geringen ppGpp-Konzentrationen jedoch eine höhere ppGpp-Sensitivität als das *rrnH*-Operon. Die Punkte bei 50 und 150 μM streuen, daher ist eine genaue Aussage schwer möglich.

Das *rrnH*-Operon zeigt mit zunehmenden ppGpp-Konzentrationen eine höhere ppGpp-Sensitivität, es wird ab 300 μM ppGpp am zweitstärksten inhibiert. Allerdings streuen die Werte von 50 bis 300 μM sehr, so dass diese Aussage vorsichtig formuliert wird. Insgesamt sahen die Inhibierungskurven der weiteren ppGpp-Titrationen ähnlich aus, die Reihung blieb stets dieselbe, daher kann die oben gezeigte Abbildung als exemplarisch angesehen werden. Wie bei den linearen *rrn-templates* wurden für die K_i -Wert-Bestimmung die Inhibierungen bei der höchsten ppGpp-Konzentration gleich 100% gesetzt. Die jeweiligen K_i -Werte wurden abgemessen und maßstabsgetreu umgerechnet. In Abbildung 4.21 ist die Inhibierung gegen die ppGpp-Konzentration aufgetragen. Da die Werte z.T. streuen, wurde hier auf eine Ausgleichsparabel verzichtet.

Die drei *rrn*-P1-Promotoren zeigen andere Inhibierungsverläufe als bei den linearen *templates* (Abb. 4.11). Die Promotoren der Operons *rrnB* und *rrnD* zeigen sehr ähnlich zunehmende Inhibierungen, das *rrnH*-Operon zeigt die schwächste Zunahme. Aufgrund dieser Auswertung können zwar die unterschied-

lichen Plateaus mit den linearen *templates* verglichen werden, die Inhibierungskurven zeigen jedoch einen anderen Verlauf. Zum besseren Vergleich wurden auch hier die K_i -Werte ermittelt (Tabelle 4.6).

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	K_i -Werte [μM]
<i>rrnB</i>	67
<i>rrnD</i>	72
<i>rrnH</i>	146

Tabelle 4.6: K_i -Werte verschiedener *rrn*-*templates*

Die Ergebnisse stimmen mit dem Inhibierungsverlauf in Abbildung 4.21 in etwa überein. Das *rrnH*-Operon erreicht eine 50 %ige Inhibierung bei den höchsten ppGpp-Konzentrationen. Das *rrnD*-Operon erreicht jene Inhibierung bei höheren Konzentrationen als das *rrnB*-Operon, die oben gezeigten K_i -Werte fallen niedriger aus, als die Inhibierungskurven vermuten lassen. Die K_i -Werte repräsentieren die ppGpp-Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibierung vorliegt. Bei den *rrn*-Fragmenten stimmte der Wert mit der generell beobachteten ppGpp-Sensitivität überein, das *rrnD*-Operon zeigte den höchsten K_i -Wert, die ppGpp-Sensitivität fiel dort am geringsten aus. Bei den *ccc*-Analysen lässt sich von dem K_i -Wert nicht generell auf die ppGpp-Sensitivität schliessen, hier zeigt das *rrnD*-Operon einen mit *rrnB* vergleichbaren, geringen K_i -Wert, die ppGpp-Sensitivität fällt jedoch deutlich schwächer als bei dem *rrnB*-Operon aus. Das bedeutet, dass die 50 %ige Inhibierung bei *rrnD* zwar relativ schnell erreicht wird, sie steigert sich allerdings nicht in dem Maße weiter, wie es bei *rrnB* und *rrnH* der Fall ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der Transkriptionsinitiation mit *ccc-templates* offenbar eine differente mechanistische Kombination zugrunde liegt, wie es bei der Transkription von linearen *rrn*-P1-Promotoren der Fall ist.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Transkription von superhelikalen Promotoren die Initiationszeit eine große Rolle spielt. Die Vorinkubation mit der RNA-Polymerase wies unter *single round* Transkriptionsbedingungen ein sehr schmales Zeitfenster auf, in der eine ppGpp-bedingte Inhibierung sichtbar wird. Besonders kritisch fiel dieses Zeitfenster bei dem *rrnD*-Operon aus, welches unter diesen *single round* Transkriptionsbedingungen ebenfalls eine schwächere ppGpp-Sensitivität zeigte [57]. Da im Vergleich zu den linearen *templates* die *ccc-templates* offenbar auch hier differente Initiationsabläufe zeigten, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt, um die Ergebnisse näher aufzuschlüsseln zu können: Zum einen wurde die Reaktionszeit in Ab- und Anwesenheit von ppGpp variiert. Hier wurde infolge der Zeitänderung eine veränderte ppGpp-Sensitivität erwartet. Dieses Experiment wurde mehrmals mit verschiedenen *ccc-rrn*-P1-Promotoren durchgeführt.

Das andere Experiment umfasst die Transkription unter Hochsalzbedingungen. In vergangenen Arbeiten konnte die ppGpp-bedingte Inhibierung bei *ccc-templates* nur unter hohen Salzbedingungen detektiert werden [68], [112]. Die *rrn*-P1-Promotoren wurden bereits als sehr salzempfindlich beschrieben. Da die *ccc-templates* auch hier eine optimale Produktstärke erst bei 160 mM Kaliumglutamat zeigten, wurde vermutet, dass eine ähnlich instabile Initiation, wie bei den linearen *rrn*-Fragmenten bereits bei

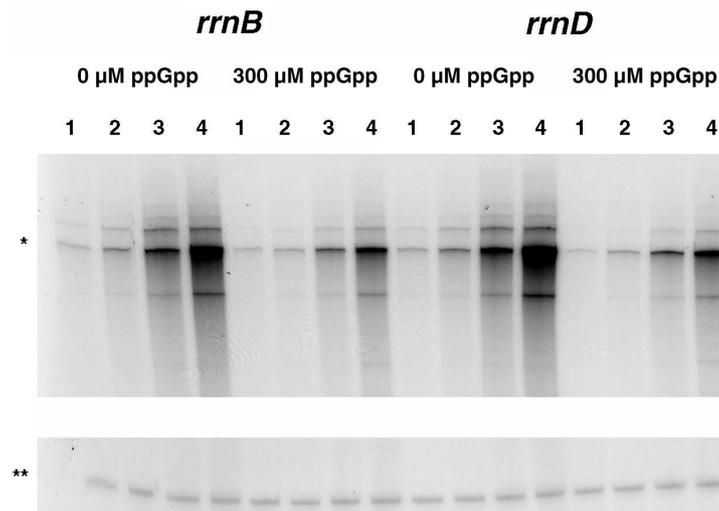


Abbildung 4.22: Elongationskinetik bei zwei *ccc-rrn*-P1-Promotoren. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm von einer Elongationsreihe bei dem *rrnB*- und dem *rrnD*-Operon in Ab- und Anwesenheit von ppGpp. Über den Spuren sind die ppGpp-Konzentrationen sowie die Bezeichnung des verwendeten *ccc-templates* angegeben. Die Zahlen eins bis vier repräsentieren folgende Elongationszeiten: 1, 2, 5 und 10 min. * markiert die Vollängentranskripte, ** repräsentiert den Auftragungsstandard.

80 mM Kaliumglutamat existierend, erst unter Hochsalzbedingungen auftritt. Somit könnte auch eine gleich verlaufende ppGpp-Sensivität erst unter Hochsalzbedingungen erfolgen.

Verändern variable Reaktionszeiten die ppGpp-bedingte Inhibierung bei *ccc-templates*?

Die *rrn*-Operons B und D wurden verwendet, um den Einfluss der Reaktionszeit auf die ppGpp-Inhibierung bei *ccc-templates* zu analysieren. Es wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen durchgeführt, wobei die Zeitwerte von 1, 2, 5 bis 10 min variierten. Im Vergleich zu *single round* Analysen geben die *multiple round in vitro* Transkriptionen einen multiplen Effekt wieder, da hier beliebig viele Initiationen zugelassen werden. Wie schon unter 4.1.3 beschrieben, sollte die Elongation eine vergleichbare Geschwindigkeit bei den verschiedenen *templates* aufweisen. Unterschiede in den Transkriptintensitäten sollten auf eine unterschiedlich schnell verlaufende Initiation zurückführbar sein. Unter *multiple round* Bedingungen multipliziert sich dieser Effekt, die Ergebnisse sind qualitativ deutlicher zu erwarten als unter *single round* Bedingungen. Die Ansätze wurden in An- und Abwesenheit von ppGpp durchgeführt. Die Abbildung 4.22 gibt ein Autoradiogramm dieser Reaktion wieder.

Schon bei Betrachtung des Gels fällt auf, dass beide Operons auf ein sehr ähnliches Niveau in Gegenwart von ppGpp reguliert werden. Die Transkripte ohne ppGpp zeigen wie erwartet ein stärkeres Produkt bei dem *rrnD*-Operon, dieser Promotor scheint eine deutlich schnellere Initiation im Vergleich zum *rrnB*-Operon durchführen zu können.

Die Abbildung demonstriert, dass bei der Transkription von *ccc-templates* das *rrnD*-Operon eine höhere basale Transkription als das *rrnB*-Operon aufweist. Dies war ebenfalls bei *in vitro* Transkriptionen mit linearen *templates* zu beobachten. Die Inhibierung des *rrnD*-Operons fällt schwächer aus, allerdings nicht in dem Maße, wie es bei den linearen *templates* zu erkennen war.

Die Differenz in der Zunahme der Transkripte ohne ppGpp ist bei geringeren Reaktionszeiten größer, verläuft bei längeren Inkubationszeiten jedoch zunehmend parallel. In Gegenwart von ppGpp verläuft die Zunahme nahezu linear, was die etwas stärkere Inhibierung des *rrnB*-Operons bei einer Elongationszeit von 10 min erklärt. Bei kürzeren Elongationszeiten fällt die Inhibierung jedoch geringer aus, hier wird das *rrnD*-Operon stärker inhibiert. Das kann jedoch auch dadurch bedingt sein, dass bei der ppGpp-Präparation ATP-Kontaminationen auftreten, die bei der chromatographischen Präparationsanalyse nicht sichtbar sind. Sie reichen jedoch aus, um bei dem *rrnB*-Operon Transkripte hervorzurufen. Da das *rrnD*-Operon mit GTP startet, haben derartige Kontaminationen keinen Einfluss auf die Transkription. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei *multiple round in vitro* Transkriptionen mit *ccc-templates* bereits ohne die Anwesenheit von Startnukleotid Transkripte produziert werden (Daten nicht gezeigt). Es reichen daher minimale Kontaminationen im submikromolaren Bereich aus, um eine Transkription hervorzurufen. Die ATP-Konzentration in der ppGpp-Präparation kann durchaus in diesem Bereich liegen. Eine Kontamination der radioaktiven Nukleotiden ist ebenfalls denkbar. Eine chromatographische Auftrennung zeigte, dass ATP auch in anderen radioaktiven NTP-Lösungen vorliegt, eine GTP-Kontamination trat nicht auf. Dies würde ebenfalls verfälschte Werte bei dem *rrnB*-Operon auslösen, nicht aber bei *rrnD*. Die Kontamination bei den Nukleotiden erklärt jedoch nicht die stärkeren Transkripte in Gegenwart von ppGpp bei dem *rrnB*-Operon, weshalb hier die Ursache in einer Kontamination von ppGpp-Chargen als wahrscheinlicher angesehen wird.

Die Abbildung 4.23 gibt die Auswertung graphisch wieder. Hier wurde auf die Transkriptintensität ohne ppGpp bei 10 min normiert (= 100%). Die Auswertung ermöglicht die Bestimmung der Reaktionszeiten für die halbmaximale Produktmenge.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Elongationszeit für die halbmaximale Produktmenge bei dem *rrnB*-Operon ohne ppGpp erheblich größer ist, als für das *rrnD*-Operon. Für das *rrnD*-Operon beträgt dieser Wert etwa 5,5 min, für das *rrnB*-Operon etwa 7,5 min. Bei dem *rrnD*-Operon steigen die entsprechenden Zeitwerte ohne und mit ppGpp proportional zueinander an. Das *rrnB*-Operon zeigt erst ab 5 min auseinander driftende Produktintensitäten, was sich durch eine ATP-Kontamination der ppGpp-Präparation erklären lässt. Im Gegensatz zu den *in vitro* Transkriptionen mit linearen *templates* läuft die Initiation bei *ccc-templates* sehr viel stabiler und auch schneller ab. Schon durch einstellige, mikromolare oder submikromolare NTP-Kontaminationen können Initiationen stattfinden.

Insgesamt lässt sich folgendes festhalten:

- Die präsentierten Ergebnisse spiegeln das Zusammenspiel aus Initiation und Elongation wieder
- Die Differenzen sind höchstwahrscheinlich auf der Initiationsebene zu finden, hier existieren die größten Sequenzheterogenitäten zwischen den Operons, die Transkriptsequenzen sind identisch

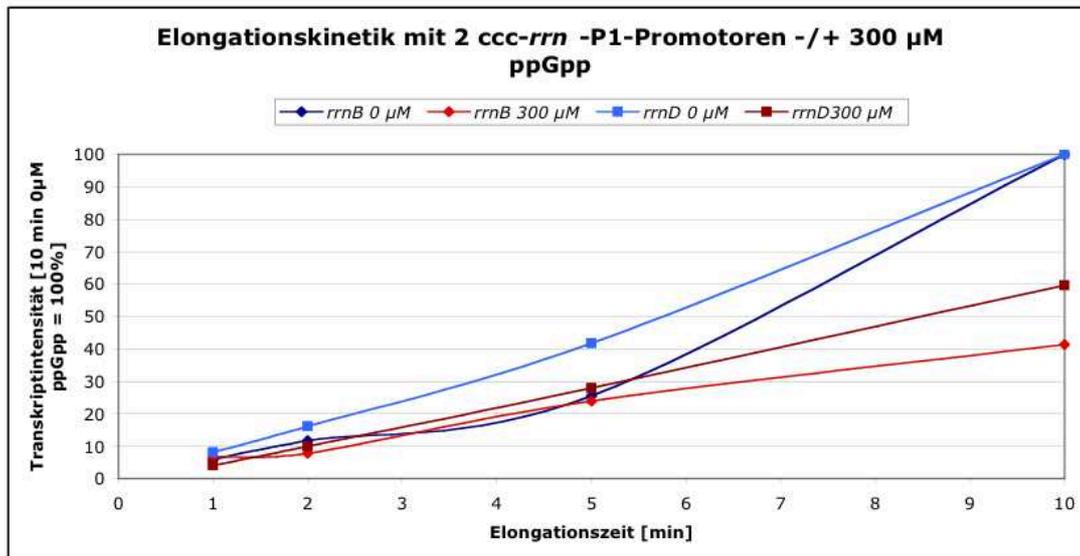


Abbildung 4.23: Graphische Auswertung der relativen Elongationskinetik mit zwei *ccc-rrn*-templates. Die Abbildung zeigt ebenfalls die Transkriptzunahme infolge steigender Elongationszeiten unter *multiple round in vitro* Transkriptionsbedingungen. Hier wurde jedoch die Transkriptintensität bei 10 min Elongationszeit ohne ppGpp (= 0 µM) gleich 100% gesetzt. Abgebildet sind die Transkriptionen ohne (blau) und mit (rot) 300 µM ppGpp. Das *rrnD*-Operon wird durch hellblaue (0 µM) und dunkelrote (300 µM) Quadrate bzw. Linien wiedergegeben, das *rrnB*-Operon wird durch dunkelblaue (0 µM) bzw. hellrote (300 µM) Rauten und Linien repräsentiert.

- Das *rrnD*-Operon zeigt in superhelikaler Form eine stärkere Transkription als das *rrnB*-Operon
- Die kürzere Inkubationszeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Transkriptmenge bei dem *rrnD*-Operon kann eine schneller verlaufende Initiationszeit bedeuten, und wird in Zusammenhang mit dem kleineren K_m -Wert für das Start-NTP bei den linearen Fragmenten sehr plausibel
- Der Punkt erklärt auch die geringere ppGpp-bedingte Inhibierung: Bei einer schneller verlaufenden Initiation, die durchaus auf stabilere Initiationskomplexe zurückgeführt werden kann, fällt eine kompetitive Hemmung bei einer bestimmten ppGpp-Konzentration nicht so stark aus, wie bei einer länger dauernden Initiation (*rrnB*-Operon)
- Die zugrundeliegenden Mechanismen scheinen sehr komplex zu sein, sie werden daher ausführlicher in der Diskussion behandelt.

Die Ergebnisse spiegeln wieder, dass bei *ccc-templates* andere Mechanismen bei der Transkription eine Rolle spielen, die die Initiation betreffen. Die zu Beginn des Unterkapitels gestellte Frage (Verändern variable Reaktionszeiten die ppGpp-bedingte Inhibierung bei *ccc-templates*?) kann durchaus mit ja beantwortet werden, kann jedoch die ähnlichen Inhibierungsniveaus nicht ausreichend ohne spekulative Diskussion erklären. Im Folgenden wurden die Operons *rrnB* und *rrnH* unter Hochsalzbedingungen transkribiert, um eine ähnlich bei den Fragmenten instabilere Initiationssituation zu erzeugen.

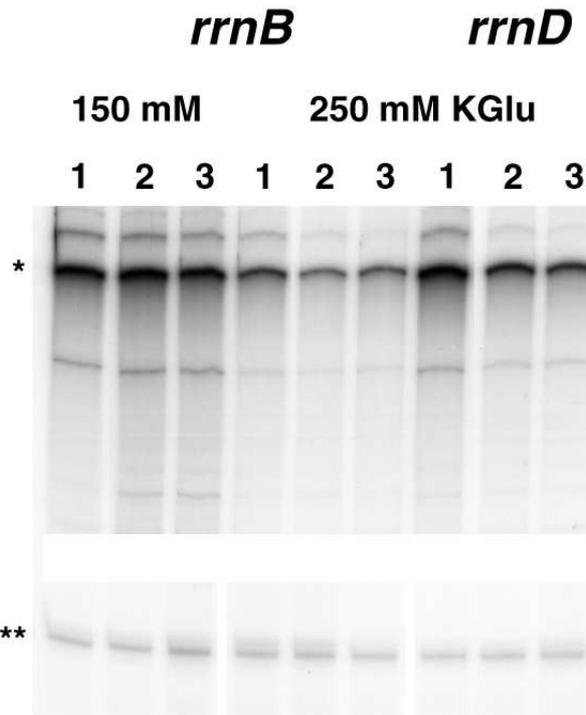


Abbildung 4.24: *In vitro* Transkription unter Hochsalzbedingungen mit zwei ccc-*rrn*-P1-Promotoren. In dem Autoradiogramm sind die Transkripte unter Standard- und Hochsalzbedingungen (250 mM Kaliumglutamat) in Ab- und Anwesenheit von ppGpp zu sehen. Die Bezeichnung der verwendeten *rrn*-P1-Promotoren als superhelikales *template* ist über den Spuren angegeben. Die Zahlen 1 bis 3 geben folgende ppGpp-Konzentrationen wieder: 0, 50 und 500 μM. Die Salzkonzentrationen sind über den Spuren angegeben (150 und 250 mM KCl). * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragungsstandard.

Verändern Hochsalzbedingungen die Inhibierungsniveaus der *rrn*-Operons?

Es wurde eine *in vitro* Transkription mit 250 mM Kaliumglutamat durchgeführt, in An- und Abwesenheit von 50 und 500 μM ppGpp. Die Elongationszeit betrug 10 min. Als *templates* wurden mehrere superhelikale *rrn*-*templates* verwendet, hier werden jedoch nur die Ergebnisse von *rrnB* und *rrnD* gezeigt. Die Abbildung 4.24 gibt das Autoradiogramm dieser Reaktion wieder.

Die als Überschrift formulierte Frage kann aufgrund der Ergebnisse eindeutig mit ja beantwortet werden. Schon bei der Betrachtung des Autoradiogramms fällt auf, dass das *rrnB*-Operon unter Hochsalzbedingungen deutlich schwächere Produkte im Vergleich zu den Standard-Salzbedingungen (150 mM KCl) zeigt. Dieses Verhalten konnte auch bei anderen *rrn*-Operons beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Inhibierung bei diesem Operon fällt unter Hochsalzbedingungen stärker aus. Das *rrnD*-Operon weist bei 250 mM KCl deutlich stärkere Transkriptbanden als das *rrnB*-Operon auf, die Salzkonzentrationen scheinen sich bei diesem Promotor nicht so instabilisierend auf die Transkription auszuwirken. Die Produktbanden bei 250 mM KCl sind im Histogramm 4.25 quantitativ dargestellt.

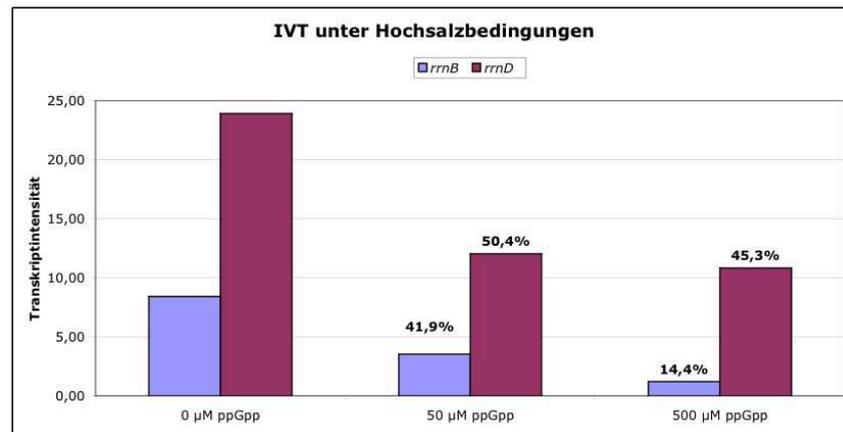


Abbildung 4.25: Histogramm der *in vitro* Transkription unter Hochsalzbedingungen. Die Abbildung zeigt die Transkriptintensitäten der Operons *rrnB* und *rrnD* bei 250 mM KGlu mit 0, 50 und 500 µM ppGpp. Das *rrnB*-Operon wird durch hellblau repräsentiert, magenta stellt das *rrnD*-Operon dar. In Gegenwart von ppGpp sind die Restaktivitäten im Verhältnis zum 0 µM ppGpp-Ansatz in Prozent angegeben.

Die quantitative Auswertung unterstützt die Aussage, dass die Transkription des *rrnD*-Operons unter Hochsalzbedingungen weitaus stärker im Vergleich zu dem *rrnB*-Operon ausfällt. Interessant sind die Inhibierungen bei steigenden ppGpp-Konzentrationen: Das *rrnD*-Operon zeigt eine insgesamt schwächere Inhibierung, die Unterschiede fallen zwischen den Operons bei hohen ppGpp-Konzentrationen drastisch aus, und sind ähnlich different wie bei den linearen *templates*. Der Grad der Inhibierung unterstützt die zuvor beobachtete Tatsache, dass das *ccc-rrnD*-Operon bei 160 mM KGlu zwar schon bei geringen ppGpp-Konzentrationen halbmaximal inhibiert wird, danach aber keine großartige Steigerung mehr aufweist. Hier scheinen die erhöhten Salzkonzentrationen eine ähnlich stabile Transkription zu erlauben, wie es bei 160 mM KGlu der Fall ist. Bei dem *rrnB*-Operon ist dies nicht der Fall. Die basale Transkriptintensität ist im Vergleich zum *rrnD*-Operon sehr viel geringer ausgefallen. Bei 160 mM KGlu sind die Transkripte doppelt so stark, die Inhibierung fiel deutlich schwächer aus. Der *rrnB*-P1-Promotor zeigt eine instabilere Transkription unter Hochsalzbedingungen, er scheint sehr viel salzsensitiver als der *rrnD*-P1-Promotor zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassend für die *in vitro* Transkription mit *ccc-templates* folgendes festhalten:

- Die superhelikalen *rrn-templates* zeigen eine deutlich stärkere Transkription im Vergleich zu den linearen *templates*
- Die Inhibierung fällt insgesamt schwächer aus
- Aufgrund der Stärke der Inhibierung lassen sich die *rrn*-Operons nur noch in zwei Gruppen einteilen:
 - *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* und *rrnD* werden schwach inhibiert, die Niveaus von *rrnB*, *rrnC* und *rrnD* liegen näher beieinander; das *rrnD*-Operon wird innerhalb dieser Gruppe mit ca. 50 % bei 300 µM ppGpp am schwächsten inhibiert

- Die Operons *rrnE*, *rrnG* und *rrnH* werden stärker inhibiert, die Niveaus liegen bei rund 70 % Inhibierung; innerhalb dieser Gruppe wird das *rrnH*-Operon am zweitstärksten inhibiert
- Bei den ccc-Analysen scheint im Vergleich zu den linearen Analysen eine andere Kombination von Einflüssen vorzuliegen, die bei der ppGpp-Inhibierung eine Rolle spielen
- Die Reaktionszeit scheint eine Veränderung der ppGpp-Inhibierung zu zeigen. Die Inhibierung bleibt bei stärkeren *rrn*-P1-Promotoren eher konstant, bei schwächeren Promotoren scheint sie zuzunehmen.
- Die schwächeren Promotoren brauchen etwas länger, bis sie die halbmaximale Transkriptionsgeschwindigkeit zeigen (vgl. *rrnB* und *rrnD*: 7,5 und 5,5 min)
- Stärkere *rrn*-P1-Promotoren zeigen deutlich niedrigere Salzsensitivitäten als schwächere Promotoren
- Die Inhibierung durch ppGpp fällt entsprechend aus: Der salzempfindlichere *rrnB*-P1-Promotor wird unter hohen Salzbedingungen stark inhibiert, der *rrnD*-P1-Promotor wird nahezu identisch schwach inhibiert
- Unter Hochsalzbedingungen scheint der *rrnD*-P1-Promotor keine veränderte basale Transkriptionsaktivität sowie ppGpp-bedingte Inhibierung zu zeigen, die halbmaximale Inhibierung wird schon bei geringen ppGpp-Konzentrationen erreicht, verändert sich jedoch infolge 10fach höherer Konzentrationen ($50 \mu\text{M} \Leftrightarrow 500 \mu\text{M}$ ppGpp) kaum.

Da auch hier das *rrnD*-Operon niedrige ppGpp-Sensitivität zeigte und sich als stärkster *rrn*-P1-Promotor erwies, scheint die Gesamtarchitektur dieses Promotors einen deutlichen Einfluss auf die Transkription zu nehmen. Der *rrnB*-P1-Promotor zeigt sowohl in Form eines linearen als auch in Form eines *ccc-templates* eine schwächere Transkription und eine stärkere ppGpp-Sensitivität.

Im Folgenden wurden Promotorelemente des *rrnD*-Operons näher untersucht. Es war von Interesse, ob die gesamte UAS-Region, das UP-Element, der *core*-Promotor oder das Startnukleotid oder auch die Kombination mehrerer Elemente die Differenzen in den Transkriptionen hervorrufen. Dazu wurden Promotoraustauschmutanten hergestellt (siehe Abschnitt 7.2.8, siehe auch Abbildung 7.1). Die UAS-Region des *rrnD*-Operons wurde mit dem *core*-Promotor des *rrnB*-Operons fusioniert (bis inkl. Position -38, *upstream*-Ende der -35-Region). Diese Konstrukte existierten doppelt: zum einen wurde das UP-Element des *rrnD*-Operons kloniert, das andere Konstrukt enthielt das UP-Element des *rrnB*-Operons. Das nachfolgende Kapitel erläutert ausführlich die Promotoranalysen dieser vier neuen Konstrukte.



Abbildung 4.26: Vier synthetische rRNA-P1-Promotor-Konstrukte. Die Abbildung gibt den Aufbau der vier neuen *rrn*-P1-Promotor-Konstrukte wieder. Das jeweilige UP-Element ist in der einem *rrn*-Operon zugehörigen hellen Farbe dargestellt. Rechts sind die Namen der neuen Konstrukte angegeben. Plus oder minus beziehen sich auf das UP-Element, das entweder von dem *rrn*-Operon der entsprechenden UAS-Region stammt (+) oder dem entsprechenden *rrn*-Operon des *core*-Promotors zugehörig ist (-).

4.2 Welche Promotorelemente des *rrnD*-P1-Promotors beeinflussen die Transkription?

Unter diesem Punkt wurden alle Promotoranalysen zusammengefasst, die mit den vier neuen Promotor-konstrukten durchgeführt wurden. Zunächst wurden auch hier Krümmungsanalysen durchgeführt. Anschließend wurden die *templates* als lineare Fragmente, als ccc-Plasmide und *in vivo* auf ihre ppGpp-Sensitivität und Promotorstärke analysiert. Es stellte sich heraus, dass die vier neuen Konstrukte im Vergleich zu den Referenzpromotoren des *rrnB*- und des *rrnD*-Operons sehr viel stärkere Transkriptionsintensitäten aufwiesen. Es handelt sich hier um die in dieser Arbeit verwendeten stärksten Promotoren. Die ppGpp-Sensitivität unterschied sich zwischen den einzelnen Promotoren, der UP-Element-Austausch zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die ppGpp-Inhibierung. Die Austauschmutanten wurden paarweise zusammengefasst:

- Die UAS-Region des *rrnD*-Operons und der *core*-Promotor des *rrnB*-Operons wurde als *rrnD*(+) bzw. *rrnD*(-) bezeichnet
- Je nach UP-Element wurde unterschieden, *rrnD*(+) beinhaltet das UP-Element des *rrnD*-Operons, *rrnD*(-) beinhaltet das UP-Element des *rrnB*-Operons; plus und minus beschreiben die Zugehörigkeit des UP-Elements zu der jeweils vorgeschalteten UAS-Region
- Die UAS-Region des *rrnB*-Operons fusioniert mit dem *core*-Promotor des *rrnD*-Operons wurde dementsprechend als *rrnB*(+) oder *rrnB*(-) bezeichnet.

Die Abbildung 4.26 gibt den Aufbau der Konstrukte schematisch wieder. Die Konstrukte wurden durch eine Sequenzierung verifiziert. Es wurden keine Sequenzabweichungen detektiert.

4.2.1 Konformationsanalyse mit vier synthetischen *rrn*-P1-Promotorkonstrukten

Hier wurde wie bereits unter Abschnitt 4.1.1 verfahren. Die Konstrukte wurden als Fragmente bei 4°C (nativ) und bei 60°C (denaturierend) elektrophoretisch aufgetrennt. Die jeweils mit aufgetragenen Mo-

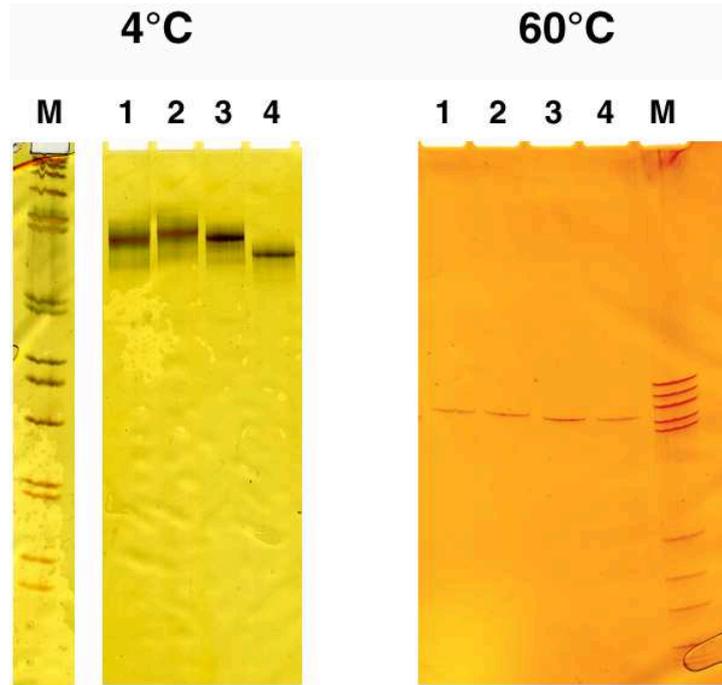


Abbildung 4.27: Krümmungsanalysen der vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der nativen (4°C) und der denaturierenden (60°C) Elektrophorese. Beide Gele sind 8 %ige PAA-Gele. M bezeichnet den Molekulargewichtsmarker, Spur 1 bis 4 repräsentiert die vier neuen Konstrukte: *rrnB*(+), *rrnB*(-), *rrnD*(+) und *rrnD*(-). Als Molekulargewichtsmarker wurde in der linken Abbildung (4°C) die GIBCO BRL kb-Leiter verwendet, in der rechten Abbildung (60°C) wurde das Plasmid pBR322 mit *Hae*III verdaut (6.3.1).

lekulargewichtsmarker dienen auch hier zur Erstellung einer Eichgerade. Die Abbildung 4.27 gibt die Gele nach der Auftrennung wieder.

Die vier synthetischen *rrn*-P1-Promotorfragmente zeigen deutliche Konformationsunterschiede bei 4°C. Der größte Unterschied tritt zwischen *rrnD*(+) und *rrnD*(-) auf. Hier scheint der UP-Elementaustausch innerhalb eines Promotorpaares einen Einfluss auf das Migrationsverhalten bei 4°C zu haben. Den Erwartungen entsprechend zeigen die Promotorpaare bei 60°C keinen Laufunterschied. Die Fragmente *rrnB*(+) und *rrnB*(-) sind um 9 bp größer als die *rrnD*-UAS-Region enthaltenden Äquivalente und laufen daher etwas verzögerter. Da die vier neuen Konstrukte über das gleiche Gel aufgetrennt wurden, wie vorher bei den Konformationsanalysen der sieben *rrn*-P1-Promotoren, konnten die Logplots auch hier verwendet werden. Die Tabelle 4.7 gibt die resultierenden Fragmentgrößen bei 4°C und bei 60°C, die tatsächlichen Größen sowie den berechneten k-Faktor wieder.

Die Fragmente zeigen eine hohe Krümmung. Im Vergleich zu den sieben *rrn*-Operons weisen sie bis auf das *rrnD*(-)-Fragment höhere Krümmungswerte auf. Es ist auffällig, dass das UP-Element des *rrnD*-Operons einen deutlichen Einfluss auf die Krümmung hat. Die beiden *rrnD*-UP-Element-haltigen Fragmente *rrnB*(-) und *rrnD*(+) zeigen eine deutlich stärkere Krümmung als die jeweiligen *rrnB*-UP-Element-haltigen Äquivalente. Obwohl das UP-Element in der Literatur bisher als ungekrümmt beschrie-

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	Fragmentgröße bei 4°C	Fragmentgröße bei 60°C	Tatsächliche Größe	k-Faktor
<i>rrnB</i> (+)	1192	507	484	2,35
<i>rrnB</i> (-)	1229	501	484	2,45
<i>rrnD</i> (+)	1211	490	475	2,47
<i>rrnD</i> (-)	1049	490	475	2,14

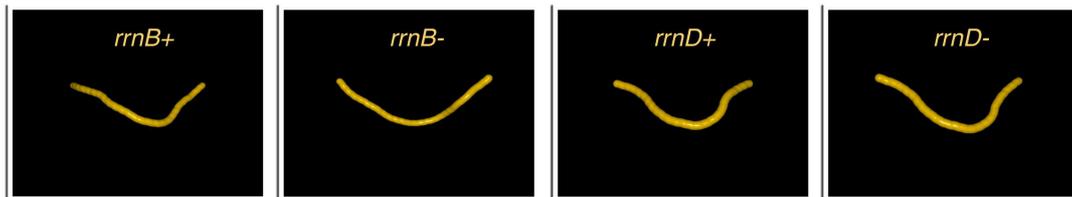
Tabelle 4.7: k-Faktoren der 4 synthetischen *rrn*-Fragmente

Abbildung 4.28: Konformation der 4 synthetischen *rrn*-UAS-Regionen. Die Darstellung zeigt die dreidimensionale Konformation der vier synthetischen *rrn*-P1-Konstrukte. Die entsprechenden DNA-Sequenzen umfassen die vollständige UAS-Region, den P1-core-Promotor sowie 17 bp *downstream* vom Transkriptionsstart. Der P1-Promotor befindet sich jeweils am *downstream*-Ende von jedem *rrn*-Fragment. Die Konformation wurde mit dem Programm DIAMOD erstellt [32].

ben wurde [45], scheint es hier eindeutig in der Mitte der verwendeten Fragmente eine Krümmung hervorzurufen, die bei dem *rrnD*-UP-Element unzweifelhaft stärker ausfällt. Es ist vorstellbar, dass das *rrnD*-UP-Element die beiden Enden gekrümmter zueinander ausrichtet, als bei dem *rrnB*-UP-Element beobachtbar. Zusätzlich wurden auch hier die Konformationen mit dem Programm DIAMOD berechnet. Die Parameter unterschiedenen sich zu den Berechnungen der sieben *rrn*-Fragmente nicht. Ebenfalls wurden die End-End-Distanzen der resultierenden Konformationen sowie der gestreckten Fragmente berechnet, woraus sich theoretische k-Faktoren ergeben. Die Abbildung 4.28 zeigt die resultierenden Konformationen der vier neuen Konstrukte, Tabelle 4.8 gibt die End-End-Distanzen sowie die nach DIAMOD berechneten k-Faktoren an.

Die nach DIAMOD berechneten Konformationen der vier synthetischen *rrn*-P1-Konstrukte zeigen eine deutlich abweichende Konformation unter den Promotorpaaren. Infolge des UP-Element-Austausches ergeben sich bei *rrnB*(+) und *rrnB*(-) unterschiedlich räumlich ausgerichtete Promotorelemente. Während

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	Distanz nativ [nm]	Distanz gestreckt [nm]	k-Faktor
<i>rrnB</i> (+)	67,38	88,95	1,32
<i>rrnB</i> (-)	65,66	88,95	1,36
<i>rrnD</i> (+)	65,02	84,88	1,31
<i>rrnD</i> (-)	64,73	84,88	1,31

Tabelle 4.8: End-End-Distanzen der vier neuen Konstrukte nach DIAMOD

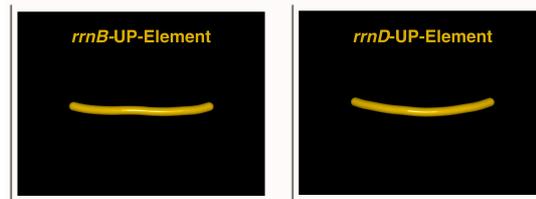


Abbildung 4.29: Konformation der zwei UP-Elemente. Die Darstellung zeigt die dreidimensionale Konformation der beiden UP-Elemente des *rrnB*- und *rrnD*-Operons. Die entsprechenden DNA-Sequenzen umfassen 27 bp. Die Konformation wurde mit dem Programm DIAMOD erstellt [32].

Bezeichnung des UP-Elements	Distanz nativ [nm]	Distanz gestreckt [nm]	k-Faktor
<i>rrnB</i>	8,19	8,84	1,079
<i>rrnD</i>	8,18	8,84	1,081

Tabelle 4.9: End-End-Distanzen der UP-Elemente nach DIAMOD

bei *rrnB*(-) die UAS-Region und der *core*-Promotor eher in einer Ebene liegen, sind diese Elemente bei *rrnB*(+) räumlich zueinander verdreht.

Das bestätigt die schon unter Abschnitt 4.1.1 geäußerte Vermutung, dass der k-Faktor zwar ein Maßstab für die Krümmung ist, die Krümmung jedoch nicht zweidimensional zu verstehen ist, sondern durchaus wie bei *rrnB*(+) sehr gut sichtbar auch in die Papierebene hinein zu interpretieren ist.

Bei den Konstrukten *rrnD*(+) und *rrnD*(-) ist der Effekt des UP-Elements besser zu erkennen. Beide Moleküle zeigen eine sehr ähnliche Konformation, das *rrnD*(+) scheint jedoch näher beieinander liegende Enden zu haben, es fällt gekrümmter aus.

Im Folgenden wurden nun die beiden UP-Elemente mit DIAMOD analysiert. Die Basenzusammensetzung unterscheidet sich deutlich, daher wurde eine differente Konformation erwartet. Die Sequenzen der beiden Elemente sind:

rrnB-UP-Element 5' GGTCAGAAAATTATTTTAAATTCCTC 3'

rrnD-UP-Element 5' AAACAGAAAAAAGATCAAAAAAATAC 3'

Die Abbildung 4.29 gibt die resultierenden Konformationen wieder, in Tabelle 4.9 sind die berechneten End-End-Distanzen und k-Faktoren festgehalten.

Die Abbildung und die Tabelle zeigen eine etwas stärkere Krümmung des *rrnD*-UP-Elements. Die k-Faktoren unterscheiden sich erst an zweiter Nachkommastelle, die Werte liegen sehr dicht an 1, was ein nicht-gekrümmtes DNA-Molekül bedeuten würde. Die Ursache dafür kann in der Kürze der Fragmente liegen. Werden die jeweiligen Sequenzen repetitiv aneinander gereiht, zeigt sich der

Krümmungsunterschied sehr viel deutlicher. Das *rrnB*-UP-Element zeigt ein fast gestrecktes Molekül, wie es nach Literaturangaben auch vorliegen sollte. Das *rrnD*-UP-Element scheint durchaus zur Krümmung beizutragen, es zeigt keine gestreckte Form, was sicherlich durch die *A-cluster* hervorgerufen wird.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Aufzählung zusammengefasst:

- Die vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren zeigen eine sehr starke Krümmung
- Die Krümmungsstärke fällt zum Teil größer als bei den sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren aus
- *rrnB*(-) und *rrnD*(+) sind am stärksten gekrümmt, der experimentell bestimmte k-Faktor weicht in der zweiten Nachkommastelle ab. Bei 4°C zeigt *rrnB*(-) die stärkste Krümmung, der nach DIAMOD berechnete k-Faktor weist das Fragment als am stärksten gekrümmt aus
- Innerhalb eines Promotorpaares zeigen die *rrnD*-UP-Element-enthaltenden Konstrukte eine stärkere Krümmung
- Das *rrnD*-UP-Element scheint eine stärkere Krümmung hervorzurufen
- Die nach DIAMOD berechneten UP-Elemente können die Behauptung, dass die UP-Elemente generell als ungekrümmte DNA-Abschnitte zu verstehen sind, nicht aufrecht erhalten, das *rrnD*-UP-Element zeigt aufgrund seiner *A-cluster* eine Krümmung, die bei dem *rrnB*-UP-Element nicht auftritt
- Die Krümmungsintensität ist auf die Komposition einzelner Elemente zurückzuführen, sie kann nicht allein auf ein Element reduziert werden (vgl. *rrnD* und *rrnB*(+)).

Nachdem diese Analysen durchgeführt worden waren, wurden die vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren auf ihre ppGpp-Sensitivität und Promotorstärke getestet.

4.2.2 Differentielle ppGpp-Sensitivität vier synthetischer linearer *rrn*-P1-templates

Es wurde eine *in vitro* Transkription wie unter Abschnitt 4.1.3 schon beschrieben durchgeführt. Es wurden alle sieben *rrn*-templates sowie die vier synthetischen *rrn*-P1-Promotorkonstrukte in Ab- und Anwesenheit von 300 μ M ppGpp transkribiert. Die Abbildung 4.30 gibt einen Ausschnitt des Autoradiogramms wieder.

Das Autoradiogramm lässt die Einteilung in schwache und starke Promotoren zu. Das *rrnB*-Operon zeigt eine sehr schwache Bande, die Expositionszeit des Phosphoimagerscreens ist zu gering gewählt worden. Es wird gemäß früherer Beobachtungen stark inhibiert. Das *rrnD*-Operon zeigt deutlich stärkere Produkte und wird schwach inhibiert, was ebenfalls vorherige Ergebnisse bestätigt.

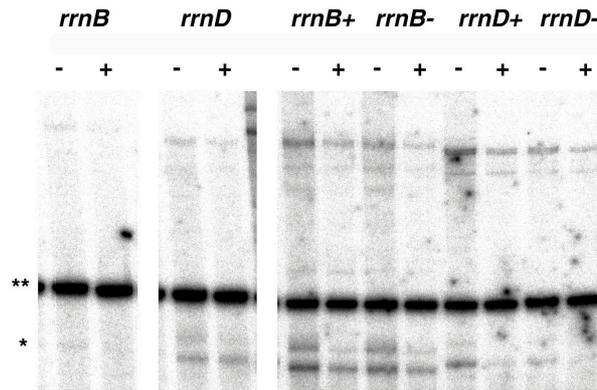


Abbildung 4.30: *In vitro* Transkription mit linearen templates bei 0 und 300 μM ppGpp. Das Autoradiogramm zeigt die Produkte der Referenz-Promotoren *rrnB* und *rrnD* sowie der vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren. Über den Spuren ist die Bezeichnung des templates wiedergegeben. - bedeutet 0 μM ppGpp, + bedeutet 300 μM ppGpp. * markiert die Volllänge transkripte, ** den Auftragungsstandard.

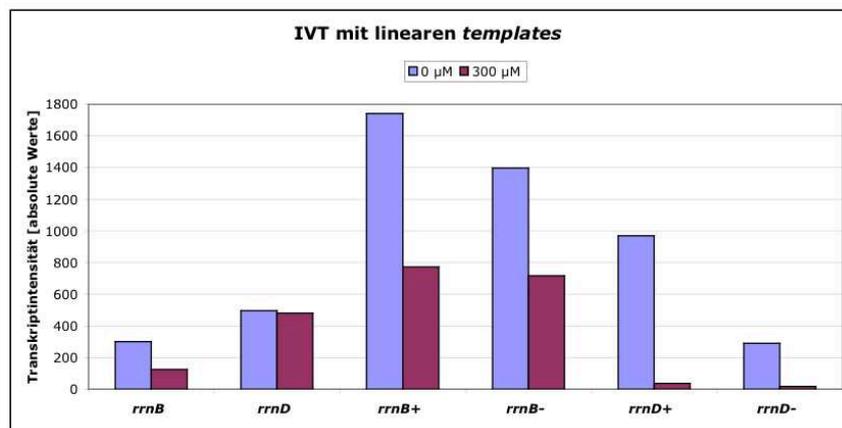


Abbildung 4.31: Quantitative Auswertung der oben gezeigten *in vitro* Transkription. Die Abbildung zeigt die absoluten Transkriptintensitäten in Gegenwart und Abwesenheit von 300 μM ppGpp. Die Bezeichnung der *rrn*-Operons ist auf der x-Achse angegeben. Hellblau repräsentiert die basale Transkriptintensität (0 μM ppGpp), in magenta sind die Restaktivitäten der inhibierten Transkription (300 μM ppGpp) dargestellt.

Die vier neuen Konstrukte lassen sich aufgrund ihres *core*-Promotors ebenfalls in schwache und starke Promotoren einteilen. Die Fragmente *rrnB*(+) und *rrnB*(-) enthalten die UAS-Regionen des *rrnB*-Operons und den *core*-Promotor des *rrnD*-Operons. Beide Konstrukte zeigen deutlich stärkere Produkte als die den *rrnB*-*core*-Promotor enthaltenden templates *rrnD*(+) und *rrnD*(-). Die den *rrnD*-*core*-Promotor tragenden Fragmente scheinen im Vergleich zu dem anderen *rrnB*-*core*-Promotor-Paar schwächer inhibiert zu werden. Die in Abbildung 4.31 gezeigte quantitative Auswertung gibt die präzisen prozentualen Transkriptintensitäten dieses Autoradiogramms wieder, Abbildung 4.32 zeigt die resultierenden Restaktivitäten von zwei voneinander unabhängigen *in vitro* Transkriptionen.

Die erste der beiden quantitativen Auswertungen (Abb. 4.31) unterstützt die schon vorher geäußerten Beobachtungen. Die vier neuen Konstrukte zeigen bis auf *rrnD*(-) eine sehr starke Promotoraktivität und

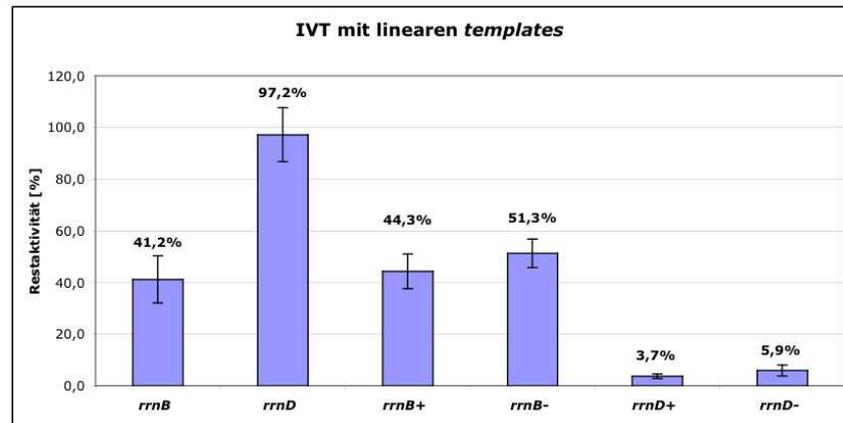


Abbildung 4.32: Quantitative Darstellung der Restaktivität von zwei *in vitro* Transkriptionen mit linearen templates bei 0 und 300 μM ppGpp. Die Abbildung zeigt die Restaktivitäten der individuellen *rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μM ppGpp. Das Histogramm repräsentiert Werte von zwei voneinander unabhängigen *in vitro* Transkriptionen. Über den Balken ist die Prozentzahl der Restaktivität angegeben. Die Standardabweichungen sind schwarz in die Balken eingezeichnet.

übertreffen die Aktivität der nativen *rrn*-Operons bei weitem. Hier erzeugten die Fusionen einzelner Promotorelemente demnach bei drei von vier Konstrukten die stärksten Promotoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Da die Transkriptionsaktivität und die Inhibierung innerhalb der Konstrukte unterschiedlich ausfallen, lassen sich die Transkriptions- und Inhibierungsintensität nicht generell auf ein einzelnes Promotorelement reduzieren, sondern durchaus auf die Komposition der Elemente zurückführen. Es kann entweder innerhalb eines Promotorpaares oder zwischen den Paaren ein Kontext formuliert werden, in dem sich einzelne Elemente entweder auf die basale Transkription oder die Inhibierung vorteilhaft auswirken. Anhand der Ergebnisse kann dies genauer erläutert werden.

Bezüglich der Inhibierung scheint sich das *rrnD*-UP-Element bei einem Promotorpaar als vorteilhaft herauszustellen (siehe Abb. 4.31 und 4.32). Die Konstrukte *rrnB*(+) und *rrnB*(-) demonstrieren, dass das *rrnD*-UP-Element zwar keine Transkriptionsaktivierung hervorruft (Abb. 4.31), wohl aber bei der Inhibierung eine Rolle spielt. Das *rrnB*(-)-Konstrukt enthält das *rrnD*-UP-Element und zeigt eine schwächere Inhibierung als *rrnB*(+) (Abb. 4.32). Bei dem zweiten Promotorpaar scheint es sich dagegen umgekehrt zu verhalten: Das Konstrukt *rrnD*(+) trägt das UP-Element des *rrnD*-Operons, es zeigt eine vielfach höhere basale Transkriptionsaktivität als das *rrnD*(-)-Konstrukt (Abb. 4.31). Hier fällt jedoch die Inhibierung in Anwesenheit des *rrnD*-UP-Elements (*rrnD*(+)) stärker aus (Abb. 4.32).

Zudem ist interessant, dass innerhalb eines Promotorpaares die absolute Transkriptintensität in Gegenwart von 300 μM ppGpp auf ein sehr ähnliches Niveau abfällt. Die Restaktivitäten in Abbildung 4.32 spiegeln diese Beobachtung wieder. Die Konstrukte *rrnB*(+) und *rrnB*(-) werden zu ca. 50 % inhibiert, die Konstrukte *rrnD*(+) und *rrnD*(-) werden ca. 95 % inhibiert. Beide Paare enthalten denselben Promotor und dieselbe UAS-Region.

In Anbetracht der vorher analysierten ppGpp-Sensitivitäten bei den sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren kann hier vorsichtig formuliert werden, dass sowohl die basale Transkriptionsintensität als auch die

ppGpp-Sensitivität mit dem Verhalten des *core*-Promotors in seiner natürlichen Umgebung korrelieren: Der *rrnD*-P1-Promotor zeigt starke basale Transkriptionsraten und eine schwache ppGpp-Inhibierung, wie es bei den Konstrukten *rrnB*(+) und *rrnB*(-) ebenfalls zu beobachten ist. Dieses Promotorpaar trägt die UAS-Region des *rrnB*-Operons und den *core*-Promotor des *rrnD*-Operons. Die Tatsache jedoch, dass die basalen Promotorstärken der vier neuen Konstrukte im Vergleich zu den nativen *rrn*-P1-Promotoren durch die Fusion enorm gesteigert wurden, ist sicherlich auch auf die Kombination der UAS-Region mit dem jeweiligen Promotor zurückzuführen.

Auch die auftretenden Unterschiede innerhalb eines Promotorpaares bei den vier neuen Konstrukten zeigen, dass sich das Transkriptionsverhalten nicht auf ein einzelnes Element zurückführen lässt (vgl. UP-Element-Auswirkung innerhalb der Promotorpaare, einmal aktivierend auf die basale Transkription bei *rrnD*(+) und *rrnD*(-), bei dem anderen Promotorpaar vorteilhaft bezüglich der ppGpp-Sensitivität). Vorherige Arbeiten zeigten vergleichbare Schlussfolgerungen, in denen ein Promotorelement (Diskriminatorregion) am *rrnB*-P1-Promotor mit Austauschmutanten analysiert wurde [98], [134], [132].

Im Folgenden wurden *in vitro* Transkriptionen mit *ccc-templates* durchgeführt, jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp. Es war hier von Interesse, ob sich unter superhelikalen Bedingungen die neuen Konstrukte bezüglich der basalen Transkriptionsaktivität und der ppGpp-Sensitivität ähnlich wie die linearen *templates* verhalten, oder ob die Topologie diese Transkriptionsparameter anders beeinflusst.

4.2.3 Differentielle ppGpp-Sensitivität bei superhelikalen synthetischen *ccc-rrn*-P1-Promotoren

Es wurden mehrere *in vitro* Transkriptionen wie schon unter 4.1.4 beschrieben durchgeführt. Die vier neuen Konstrukte sowie die Referenzpromotoren *rrnB* und *rrnD* wurden bei 160 mM K₂Glu transkribiert, jeweils in An- und Abwesenheit von 300 μ M ppGpp. Die Abbildung 4.33 zeigt ein Autoradiogramm dieser Reaktion.

Die Abbildung 4.33 zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die Promotoranalysen mit linearen *templates*. Auch hier fallen die basalen Transkriptionsaktivitäten bei drei von vier neuen Konstrukten höher im Vergleich zu den Referenzpromotoren *rrnB* und *rrnD* aus. Das *template rrnD*(-) zeigt auch hier eine geringere Transkriptionsaktivität, es fällt innerhalb der synthetischen P1-Promotoren am schwächsten aus. Dieses Experiment wurde mehrmals wiederholt, die Reihung der basalen und ppGpp-inhibierten Transkriptintensitäten fiel stets gleich aus, z.T. unterschieden sich die Messungen jedoch um zweistellige Prozentzahlen, so dass auf eine statistische Zusammenfassung verzichtet wurde. Die Auswertung in Abbildung 4.34 gibt daher exemplarisch die relativen Inhibierungen wieder.

Die Ergebnisse bestätigen die schon bei der Betrachtung des Autoradiogramms gezogenen Schlüsse. Zwar fallen die Standardabweichungen bei den stärkeren der vier neuen *rrn*-P1-Promotoren sehr hoch aus, der Trend ist jedoch bei den verschiedenen *in vitro* Transkription eindeutig ausgefallen. Ähnlich wie bei den *in vitro* Transkriptionen mit den linearen *template*-Konstrukten lassen sich auch die Parameter basale und ppGpp-inhibierte Transkriptintensität nicht generell auf ein Promotorelement zurückführen.

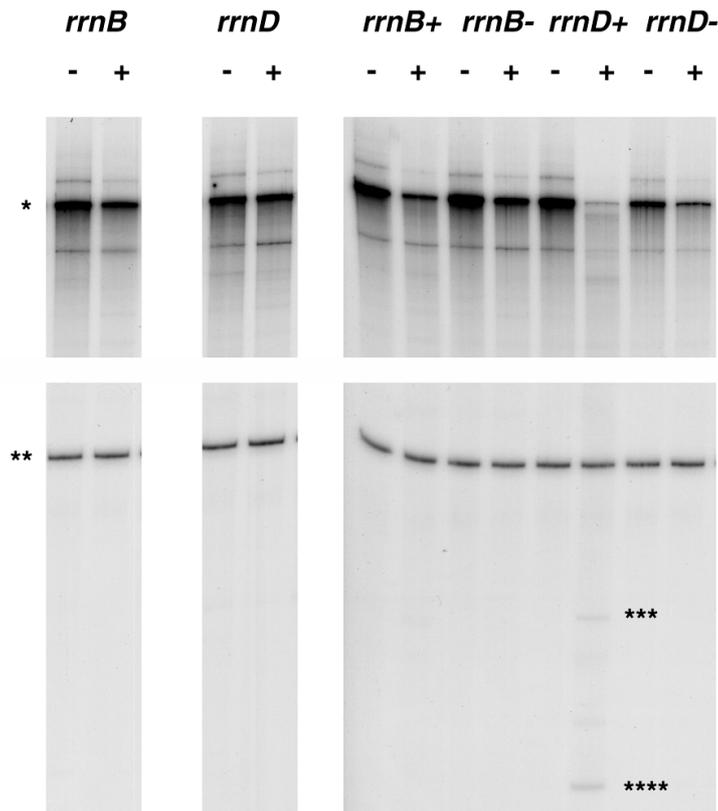


Abbildung 4.33: IVT mit synthetischen *ccc-rrn*-P1-Promotoren bei 0 und 300 μ M ppGpp. Das Autoradiogramm zeigt die Produkte der *in vitro* Transkription von zwei nativen *ccc-rrn*-P1-Promotoren (*rrnB* und *rrnD*) sowie der vier neuen Konstrukte. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *templates* angegeben. - bedeutet 0 μ M, + bedeutet 300 μ M ppGpp. * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragsstandard. *** und **** markieren auftretende kürzere Transkripte bei dem *rrnD*(+)-*template*, die bei 300 μ M ppGpp auftreten. Es kann sich hier um Abbrüche an pausierenden Elongationskomplexen während der Elongation handeln. Die Banden wurden nach einer Langzeitexposition bei allen Transkripten sichtbar.

Die Ergebnisse lassen hier dieselben Schlüsse, wie schon unter 4.2.2 erwähnt, zu.

Bei dem Promotorpaar *rrnB*(+) und *rrnB*(-), welches den *rrnD*-core-Promotor trägt, fällt die Inhibierung bei *rrnB*(-) schwächer aus. Dieses Konstrukt trägt das *rrnD*-UP-Element. Die basale Transkriptionsaktivität ist jedoch bei *rrnB*(+) höher. Diese Ergebnisse traten schon bei den linearen *templates* auf.

Das Promotorpaar *rrnD*(+) und *rrnD*(-) trägt den *rrnB*-core-Promotor. Hier scheint das *rrnD*-UP-Element einen aktivierenden Einfluss auf die basale Transkriptionsrate zu zeigen, die Inhibierung fällt jedoch stärker als bei *rrnD*(-) aus.

Interessanterweise tritt in Gegenwart von ppGpp bei dem *rrnD*(+)-Konstrukt kaum Vollängentranskript auf, hier scheint die Transkription sehr stark inhibiert zu werden, es treten auch ppGpp-bedingte Transkriptionspausen auf. Diese Banden traten infolge einer Langzeitexposition bei allen Ansätzen auf und zeigten z.T. eine Verstärkung in Gegenwart von ppGpp. In vergangenen Arbeiten konnten bei ppGpp-sensitiven Promotoren während der Elongation ppGpp-Effekte beobachtet werden,

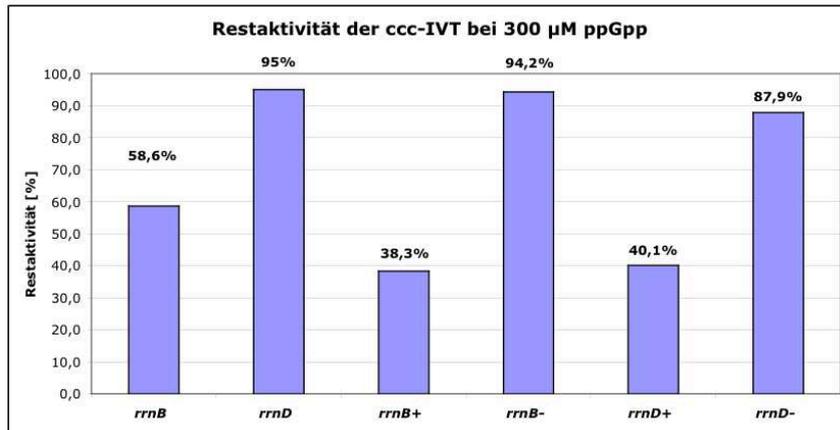


Abbildung 4.34: Histogramm der Restaktivitäten der *in vitro* Transkription mit synthetischen ccc-P1-Promotoren. Die Abbildung zeigt die Restaktivitäten der jeweiligen *rrn*-P1-Promotoren in Gegenwart von 300 μM ppGpp. Die prozentualen Werte sind über den Balken angegeben. Auf der x-Achse ist die Bezeichnung des jeweiligen *templates* angegeben.

template bedingte Pausen wurden in Gegenwart von ppGpp verstärkt. Bei einer näheren Analyse der Transkriptpausen konnten mit Hilfe einer DNA- und einer RNA-Sequenzierung die Positionen festgestellt werden. Es handelt sich dabei um zwei Adenosine, die an Position 180 und 215 liegen. Durch eine bioinformatische Simulation mit dem Programm SEQFOLD wurden metastabile Sekundärstrukturen während der Elongation sichtbar, die Position 180 befand sich innerhalb eines sehr großen *loops*, an dem ein Transkriptionsabbruch sehr wahrscheinlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den diskutierten Banden um unspezifischen Abbau handelt. Jedoch wird diese Möglichkeit aufgrund der Anwesenheit bei allen Ansätzen (Langzeitexposition) und aufgrund der bioinformatischen Analyse als unwahrscheinlich angesehen.

Im Vergleich zu den *in vitro* Transkriptionen mit linearen *templates* wird hier jedoch nicht innerhalb eines Promotorpaares ein ähnliches Inhibierungsniveau erreicht. Es wird sehr deutlich, dass unter superhelikalen Bedingungen erst recht keine einzelnen Promotorelemente definiert werden können, die sich generell aktivierend oder reprimierend auf die basale Transkription oder die ppGpp-bedingte Inhibierung auswirken. Hier wird besonders deutlich, dass der Promotorkontext, in dem sich die jeweiligen Elemente befinden, die Transkription beeinflusst, nicht jedoch ein einzelnes Element generell.

Einfluss von verschiedenen Inhibierungssubstanzen auf unterschiedlich strukturierte *rrnB*-P1-Promotor-Konstrukte

Hier wurde der Einfluss von GDP, ppGpp und NaCl auf die *in vitro* Transkription getestet. Als *templates* wurden die superhelikalen *rrnB*-P1-Promotoren verwendet: *rrnB*, *rrnD*(+) und *rrnD*(-). Der

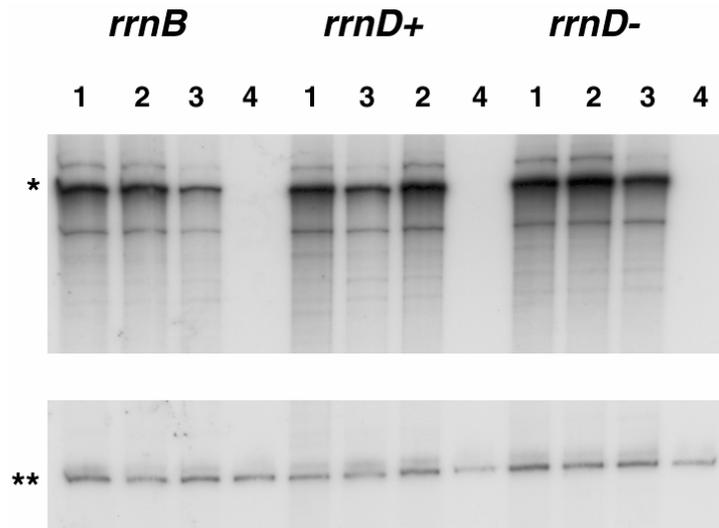


Abbildung 4.35: Autoradiogramm der *in vitro* Transkription mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen. Das Autoradiogramm zeigt einen Ausschnitt der *in vitro* Transkription mit verschiedenen Inhibitoren. Über den Spuren ist die Bezeichnung des *templates* wiedergegeben. Die Zahlen eins bis vier repräsentieren folgende Ansätze: 1 = ohne Inhibitor, 2 = 300 µM GDP, 3 = 300 µM ppGpp und 4 = 170 mM NaCl. * markiert die Volllängentranskripte, ** den Auftragungsstandard. Bei *rrnD(+)* wurden bei dem Probenauftrag zwei Proben vertauscht, deswegen folgt nach dem Kontrollansatz ohne Inhibitor (Spur1) Spur 3 (300 µM ppGpp) vor Spur 2 (300 µM GDP).

rrnB-Promotor zeigte bereits unter 4.1.4 eine stärkere ppGpp-Inhibierung, die infolge höherer Salzkonzentrationen an das Inhibierungsniveau der *in vitro* Transkription mit linearem *template* heranreichte. Da vergangene Arbeiten unter ccc-Bedingungen eine starke ppGpp-Inhibierung erst bei 170 mM NaCl zeigten, wurde der Effekt auch hier getestet. Es war von Interesse, ob die *upstream* gelegenen *rrnD*-Sequenzen (UAS-Region, UP-Element) die starke Salzsensitivität und das Inhibierungsverhalten mit anderen nicht einbaubaren Substanzen den *rrnB-core*-Promotor beeinflussen. Zudem wurde GDP eingesetzt. Nach dem Kompetitionsmodell sollte dieses nicht einbaufähige Nukleotid die Transkription beeinflussen. In anderen Arbeiten zeigte GDP keinen inhibierenden Einfluss, wurde jedoch nicht unter diesen Bedingungen getestet [73]. Außerdem wurde ppGpp verwendet, es zeigt die gleiche Architektur wie GDP, am 3'-Ende befindet sich jedoch eine weitere Diphosphatgruppe. Die Konzentrationen der Nukleotide GDP und ppGpp betragen 300 µM, die Kaliumglutamatkonzentration betrug 250 mM in diesen Ansätzen. NaCl wurde zu 170 mM eingesetzt. Die Abbildung 4.35 zeigt das resultierende Autoradiogramm, in Abbildung 4.36 ist die quantitative Auswertung wiedergegeben.

Die Abbildungen zeigen, dass die Transkription in Gegenwart von GDP bei allen drei *rrnB*-P1-Promotoren kaum eine Inhibierung hervorruft. Die Ursache kann in einer anderen Wirkkonzentration liegen. Das bedeutet, obwohl GDP ebenfalls wie ppGpp nicht eingebaut werden kann und daher inhibierend wirken sollte, dass die Konformation im aktiven Zentrum bei beiden Hemmstoffen unterschiedlich ausfällt. Bei ppGpp wird schneller bei gleichen Konzentrationen eine Inhibierung erreicht, wahrscheinlich wechselwirken die beiden Diphosphatgruppen sehr viel effizienter mit Aminosäureresten der

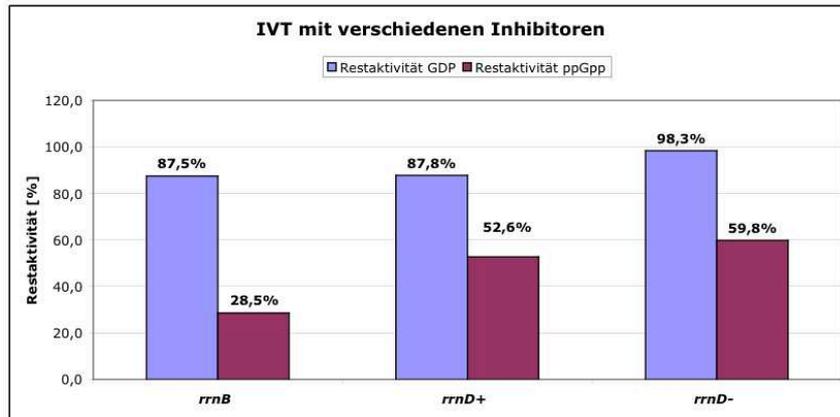


Abbildung 4.36: Histogramm der *in vitro* Transkription mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen. Die Graphik zeigt die quantitative Auswertung der *in vitro* Transkription mit verschiedenen Inhibitoren. Ausgewertet wurden die Spuren mit 300 μM GDP und ppGpp. Die Bezeichnung des *templates* ist auf der x-Achse angegeben. Die y-Achse gibt die Restaktivität in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors wieder. Hellblau repräsentiert 300 μM GDP, magenta stellt die Restaktivität bei 300 μM ppGpp dar.

RNA-Polymerase im katalytischen Zentrum. Da GDP nur eine Diphosphatgruppe am 5'-Ende besitzt, kann hier die Wechselwirkung nicht so effizient stattfinden, eine vergleichbare Inhibierung kann erst bei höheren GDP-Konzentrationen sichtbar werden. In der Diskussion wird ausführlicher darauf eingegangen.

Die Inhibierungen in Gegenwart von ppGpp fallen stärker als bei GDP aus. Der native *rrnB*-P1-Promotor wird am stärksten inhibiert, das *rrnD*(-) Konstrukt zeigt unter den *rrnB*-Promotor-haltigen *templates* die schwächste Inhibierung. Die Inhibierungsniveaus des Promotorpaares *rrnD*(+) und *rrnD*(-) fallen hier ähnlich aus. Unter den hohen Salzbedingungen (250 mM Kaliumglutamat) ist hier demnach der Einfluss der vorgeschalteten *upstream* Region des *rrnD*-Operons deutlich sichtbar. Die Inhibierung durch ppGpp fällt an den Konstrukten geringer aus, sie enthalten den *rrnB*-core-Promotor, die Konformation des gesamten Konstrukts scheint jedoch unter hohen Salzkonzentrationen günstiger für eine stabile Initiation zu sein.

Die Ansätze mit 170 mM NaCl zeigten erst infolge einer Langzeitexposition auftretende Transkripte, die P1-initiierten Produkte waren nur bei den Konstrukten *rrnD*(+) und *rrnD*(-) sehr schwach zu erkennen. Die Transkripte der β *lac* und der RNAI traten bei allen drei *templates* sehr schwach auf. Das spricht erneut für die hohe Salzsensitivität der *rrnB*-P1-Promotoren, allerdings scheinen die *upstream* geschalteten Sequenzen des *rrnD*-Operons bei *rrnD*(+) und *rrnD*(-) einen Einfluss auf die Salzsensitivität des *rrnB*-P1-Promotors zu zeigen. Es bleibt jedoch fraglich, warum andere Arbeitsgruppen unter diesen Bedingungen deutliche Transkripte produzieren konnten. Denn hier konnte nur eine äusserst schwache Transkriptionsaktivität festgestellt werden, eine ppGpp-Inhibierung sollte noch geringere Produkte zeigen. Die Ursache dafür kann in der Konzentration des ersten Startnukleotids liegen, die angesprochenen Arbeiten wurden mit 10fach höherer ATP-Konzentration durchgeführt, als es hier der Fall war.

Insgesamt lassen die *in vitro* Transkriptionen mit den vier neuen Konstrukten folgende Schlüsse zu:

- Durch die Fusionen wurden sehr starke Promotoren generiert
- Drei der vier Konstrukte zeigten eine deutlich höhere Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren
- Die zu Beginn des Kapitels als Überschrift formulierte Frage erfordert eine differenzierte Antwort:
 - Es kann nicht ein einzelnes Promotorelement definiert werden, was generell einen starken Promotor bzw. eine schwache ppGpp-Sensitivität bewirkt
 - Innerhalb eines Promotorpaares kann dem UP-Element entweder ein aktivierender Einfluss auf die basale Transkription oder auf die ppGpp-Sensitivität zugeordnet werden
 - Bei den Analysen der linearen *templates* korreliert die basale Transkriptionsstärke und die ppGpp-Sensitivität mit dem jeweils enthaltenen *core*-Promotor. Die den *rrnD*-*core*-Promotor enthaltenden Konstrukte *rrnB*(+) und *rrnB*(-) zeigen eine starke basale Transkription und eine schwächere ppGpp-Sensitivität im Vergleich zu den *rrnB*-*core*-Promotor tragenden Äquivalenten *rrnD*(+) und *rrnD*(-)
- Bei den *ccc*-Analysen zeigt das UP-Element des *rrnD*-Operons die gleichen Effekte wie bei den Analysen der linearen *templates*. Die Transkriptintensitäten fallen innerhalb eines Promotorpaares jedoch different aus, die Aktivitäten und die Inhibierungen korrelieren nicht mehr mit dem jeweils enthaltenen *core*-Promotor
- Der *rrnB*-P1-Promotor ist sehr salzsensitiv, er zeigt in seiner nativen Umgebung bei 170 mM NaCl keine Produkte. Die anderen Promotoren auf dem Vektor können unter diesen Bedingungen noch eine schwache Transkription durchführen.
- Die *rrnD*-UAS-Region übt offenbar einen positiven Einfluss auf die Salzsensitivität und die ppGpp-Inhibierung aus. Die Konstrukte *rrnD*(+) und *rrnD*(-) zeigen bei 170 mM NaCl sehr schwache, aber im Gegensatz zu dem nativen *rrnB*-P1-Promotor detektierbare Produkte. Zudem fällt unter 250 mM KGlu die ppGpp-Inhibierung schwächer aus.

Die vier neuen Konstrukte wurden nun *in vivo* auf ihre ppGpp-Sensitivität getestet. In vergangenen Arbeiten wurden bereits die sieben nativen *rrn*-Operons unter stringenten Bedingungen analysiert. Dabei konnte ebenfalls dem *rrnD*-Operon die schwächste ppGpp-Sensitivität zugeordnet werden. Hier wurden nun die vier neuen Konstrukte in zwei verschiedenen *E. coli*-Stämmen stringenten Bedingungen ausgesetzt. Das nachfolgende Kapitel schildert die Ergebnisse ausführlich.

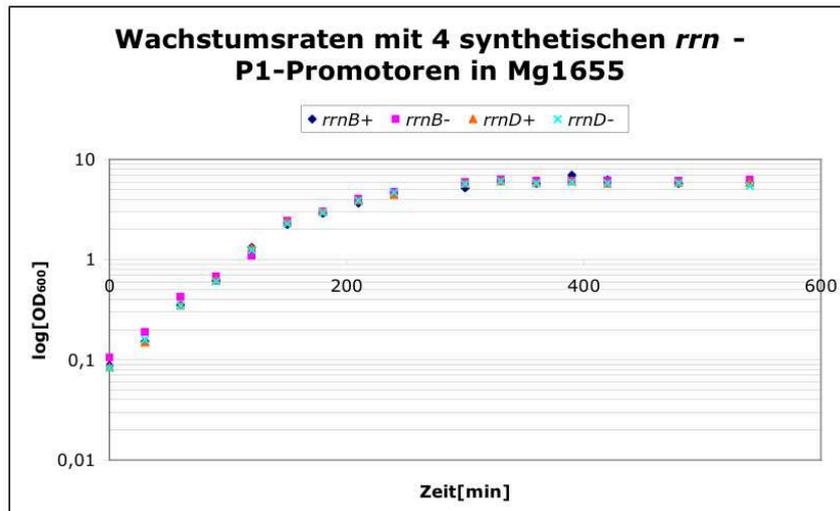


Abbildung 4.37: Wachstumsraten der vier neuen Konstrukte im Wildtyp MG1655. Die Abbildung zeigt die Wachstumsverläufe der vier neuen Konstrukte im Stamm MG1655 (Wildtyp). Die x-Achse gibt die Zeit in Minuten an, die y-Achse zeigt den Logarithmus der gemessenen optischen Dichte bei 600 nm. Die verschiedenen Konstrukte werden durch folgende Symbole dargestellt: blaue Raute = *rrnB*(+), pinkes Quadrat = *rrnB*(-), orangefarbenes Dreieck = *rrnD*(+) und türkises Kreuz = *rrnD*(-).

4.3 *In vivo* Analysen der vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren während der Stringenten Kontrolle

Die vier neuen Konstrukte *rrnB*(+), *rrnB*(-), *rrnD*(+) und *rrnD*(-) wurden als Plasmide pCP2 bis pCP5 in zwei Stammpaare transformiert: MG1655 repräsentiert den *E. coli* K12-Stamm, dessen Genom zuerst sequenziert wurde [8]. Der Stamm wurde als Wildtyp (MG1655) und als *relA*-Mutante (CF1651, von V. Hernandez) eingesetzt. Diese Mutante kann keine stringente Kontrolle mehr ausüben, in das *relA*-Gen wurde eine Kanamycin-Kassette eingesetzt. Man bezeichnet diesen Phänotyp auch als relaxiert. Zudem wurden die Stämme CP78/79 eingesetzt. Diese Stämme wurden zuvor in den Analysen der sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren verwendet [17]. CP78 entspricht dem Wildtyp, CP79 ist die entsprechende *relA*-Mutante. Beide Stämme besitzen eine Reihe von Mutationen in Aminosäureloci (siehe Tabelle 6.1) und zeigten etwas langsamere Wachstumsraten als die MG1655-Stämme.

Die Abbildungen 4.37 und 4.38 zeigen die Wachstumskurven der Stämme MG1655 und CF1651 mit den transformierten Plasmiden.

Die Wachstumsverläufe unterschieden sich hier innerhalb eines Stammpaares nur minimal, die stationären Niveaus fielen bei der *relA*-Mutante etwas geringer aus. Zudem scheinen die enthaltenen Plasmide kaum einen unterschiedlichen Effekt auf das Wachstum zu zeigen. Bei der *relA*-Mutante CF1651 scheint das Konstrukt *rrnD*(-) ein etwas geringeres stationäres Niveau zu erreichen. Die Wachstumsverläufe sahen bei den CP-Stämmen ähnlich aus, allerdings erreichten beide Stämme eine geringere optische Dichte in der stationären Phase, die *relA*-Mutante erreichte auch hier ein geringeres Niveau als der entsprechen-

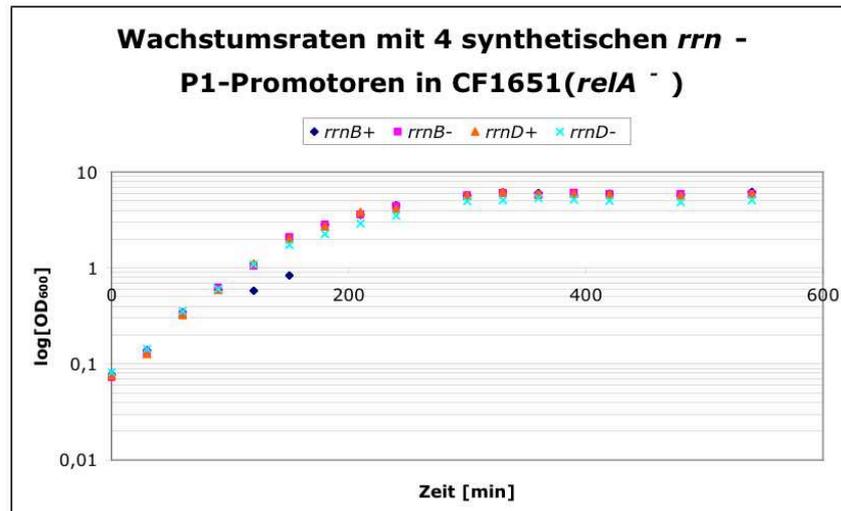


Abbildung 4.38: Wachstumsraten der vier neuen Konstrukte in der *relA*⁻-Mutante CF1651. Die Abbildung zeigt die Wachstumsverläufe der vier neuen Konstrukte im Stamm CF1651 (*relA*⁻-Mutante). Die x-Achse gibt die Zeit in Minuten an, die y-Achse zeigt den Logarithmus der gemessenen optischen Dichte bei 600 nm. Die verschiedenen Konstrukte werden durch folgende Symbole dargestellt: blaue Raute = *rrnB*(+), pinkes Quadrat = *rrnB*(-), orangefarbenes Dreieck = *rrnD* + und türkises Kreuz = *rrnD*(-).

de Wildtyp. Bei den CP-Stämmen konnten keine Unterschiede innerhalb der verschiedenen Vektoren detektiert werden.

4.3.1 Analyse der ppGpp-Akkumulation in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

In vergangenen Arbeiten wurde die Stringente Kontrolle *in vivo* mit einer Serinhydroxamat-Konzentration von 1 mg/ml Medium ausgelöst. Hier wurde zum ersten mal getestet, ob eine geringere Konzentration von 0,7 mg/ml verwendet werden kann. Zur Detektion von ppGpp wurde der Einbau von radioaktivem ortho-Phosphat gewählt. Es wurde wie unter 7.3.3 beschrieben verfahren. Die vier Stämme MG1655, CF1651, CP78 und CP79 wurden bei unterschiedlichen Zeitwerten auf die Akkumulation von ppGpp getestet, jeweils vor (0 min) und nach Auslösen der Stringenten Kontrolle (5, 10 und 20 min). Die Abbildung 4.39 zeigt die Autoradiogramme der chromatographischen Auftrennung von Nukleotid-Isolaten bei dem Wildtyp MG1655 und der Mutante CF1651.

Die Abbildung zeigt, dass die *relA*⁻-Mutante als relaxiert bezeichnet werden kann, dort tritt kein ppGpp nach Serinhydroxamat- (SHx) Zugabe auf. Das Ergebnis fiel bei der Analyse mit CP78 und CP79 sehr ähnlich aus, die Banden zeigten etwas schwächere Intensitäten (Daten nicht gezeigt). Bei dem Wildtyp MG1655 ist schon bei den 0-Werten ein schwaches Produkt auf Höhe der ppGpp-Bande zu erkennen. Es kann sich hierbei um ppGpp handeln, welches in der Zelle durch das Protein *spoT* in mikromolaren Konzentrationen synthetisiert wird. Die geringen Konzentrationen dienen zur Wachstumsraten-Angleichung, was als *fine tuning* angesehen werden kann. Die Synthese der ribosomalen RNAs wird dabei minimal den Wachstumsbedingungen angepasst. Die Bande kann jedoch auch

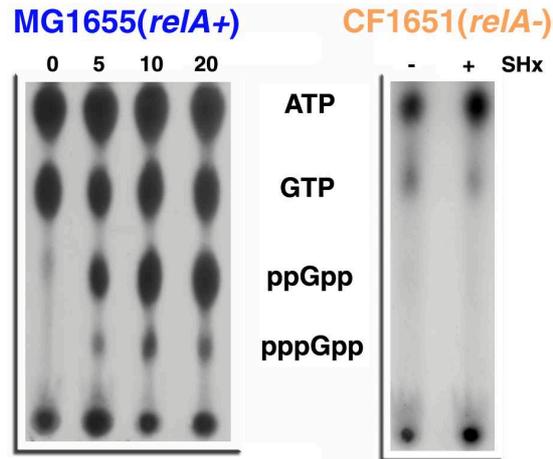


Abbildung 4.39: Akkumulation von ppGpp in den Stämmen MG1655 und CF1651. Das Autoradiogramm gibt die chromatographische Auftrennung der Nukleotid-Isolate vor und nach Auslösen der Stringenten Kontrolle wieder. Bei dem Wildtyp MG1655 wurden vier verschiedene Zeitwerte analysiert: 0, 5, 10 und 20 min nach Zugabe von Serinhydroxamat (SHx). Bei der Mutante CF1651 wurden lediglich vor und 20 min nach Zugabe von SHx die Produkte aufgetrennt (- bzw. + SHx). In der Mitte der Autoradiogramme sind die auftretenden Nukleotide abgebildet (ATP, GTP, ppGpp und pppGpp).

auftretende Cyclophosphate repräsentieren, die als Stoffwechselintermediate in der Zelle auftreten. Infolge steigender Zeitwerte akkumuliert ppGpp im Wildtyp MG1655. Hier zeigte MG1655 eine deutlich stärker ausfallende ppGpp-Intensität als CP78. Bei MG1655 ist sogar das Pentaphosphat pppGpp deutlich zu erkennen. Insgesamt fielen die Nukleotid-Intensitäten bei MG1655 sehr viel stärker aus. Das kann durchaus an einer höheren optischen Dichte zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses liegen. Zwar wurden zuvor die Bedingungen ohne radioaktiven Einbau so eingestellt, dass jeweils gleiche optische Dichten vorliegen (siehe 7.3.3). Dennoch sind die Bedingungen mit radioaktivem Einbau nicht identisch mit den Bedingungen, unter denen vorher getestet wurden (Räumlichkeiten, Verwendung von radioaktivem ortho-Phosphat).

Die Zeitwerte zeigen zudem, dass nach 10 min keine Steigerung der ppGpp-Intensität auftritt. In der Zeit zwischen 10 und 20 min halten sich Abbau- und Syntheserate die Waage, der *turnover* des Moleküls bleibt gleich. Die nachfolgenden *in vivo* Analysen der vier neuen Konstrukte wurden infolge dieser Ergebnisse bei 20 min durchgeführt, somit konnte ein reibungsloser Ablauf der Zellernte der vier Kulturen sicher gestellt werden.

4.3.2 Isolation der Gesamt-RNA aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Hier wurde wie unter 7.3.4 beschrieben verfahren. Die Stämme wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,6 herangezogen. Anschliessend wurden Proben für den Nullwert (ohne ppGpp) genommen. Danach erfolgte direkt das Auslösen der Stringenten Kontrolle durch Zugabe von 0,7 mg/ml SHx zur restlichen Kultur. Nach 20 min wurden erneut Zellen geerntet. Es folgte der Zellaufschluss mit der nachfolgenden RNA-Isolation. Die Präparate wurden über ein Agarosegel analysiert.

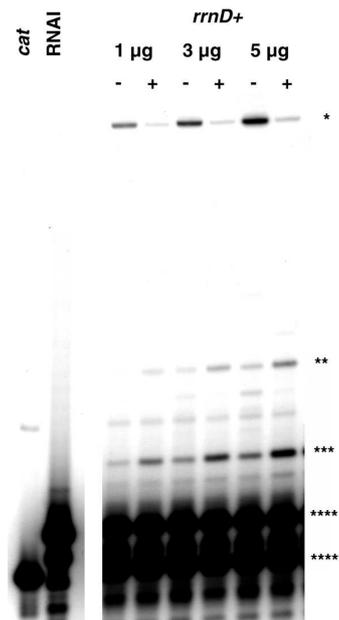


Abbildung 4.40: Analyse der Oligonukleotidkonzentration mit verschiedenen Gesamt-RNA-Konzentrationen.

Das Autoradiogramm zeigt einen Ausschnitt der *primer extension* mit verschiedenen Gesamt-RNA-Mengen vor und nach Auslösen der Stringenten Kontrolle bei dem Konstrukt *rrnD*(+). Die verwendeten Oligos *cat* und RNAI wurden isoliert aufgetragen, um die Bandenzugehörigkeit in den *primer extension*-Reaktionen zuordnen zu können. Die eingesetzte RNA-Menge ist über den Spalten angegeben. - bedeutet isolierte Gesamt-RNA vor Auslösen der Stringenten Kontrolle, + repräsentiert Ansätze von 20 min nach SHx-Zugabe. * markiert das P1-Promotor induzierte Transkript. ** und *** markieren die RNAI-spezifischen Transkripte. **** und ***** repräsentieren die RNAI- bzw. die *cat*-Oligo-Bande.

Die Bandenmuster sahen bei allen RNA-Präparationen ähnlich aus. Die Präparationen aus *re-1A*-Mutanten zeigten stets schwächere Konzentrationen, innerhalb eines Stammes fielen die Konzentrationen stets sehr ähnlich aus. Zeigten die Gele einen zu hohen Anteil an chromosomaler DNA, welche präparationsbedingt schon mal mit isoliert wird, wurde ein DNaseI-Verdau vor der *primer extension*-Reaktion durchgeführt.

4.3.3 *Primer Extension* Analyse der vier neuen Konstrukte nach Auslösen der Stringenten Kontrolle

Die Reaktion wurde wie unter 7.3.6 beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob das eingesetzte *cat*-Oligonukleotid im richtigen Konzentrationsbereich liegt. Liegt das Desoxyoligonukleotid nicht überschüssig vor, so können die Produktintensitäten nur limitiert detektiert werden. Daher wurde eine Testtitration mit steigenden RNA-Konzentrationen durchgeführt. Es wurden 1, 3 und 5 μ M Gesamt-RNA des Konstrukts *rrnD*(+) in die *primer extension* eingesetzt. Die Abbildung 4.40 zeigt das Autoradiogramm dieser Reaktion.

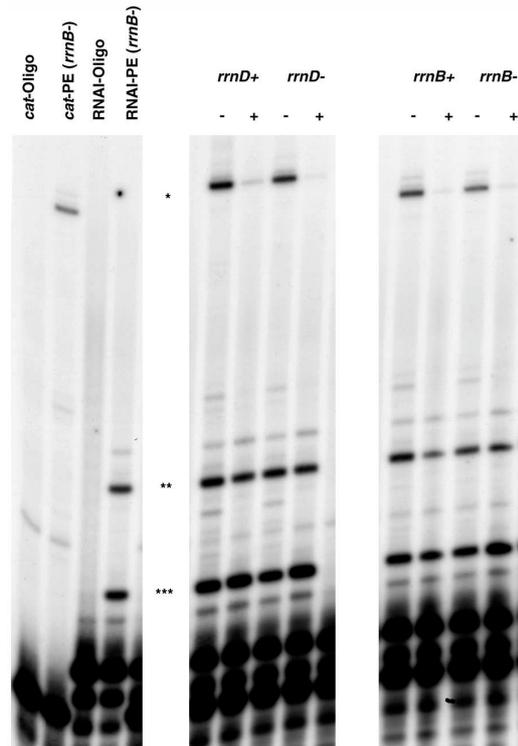


Abbildung 4.41: Primer Extension Analyse der vier neuen Konstrukte in MG1655. Das Autoradiogramm zeigt einen Ausschnitt der *primer extension* mit den vier neuen Konstrukten aus MG1655 vor und nach Auslösen der Stringenten Kontrolle (- und + über den Spuren). Links wurden die Oligos aufgetragen (*cat*- und RNAI-Oligo), sowie eine *primer extension*-Reaktion mit dem jeweiligen Oligonukleotid allein, um die Bandenzugehörigkeit der Produkte eindeutig zuordnen zu können. Über den Spuren ist die Bezeichnung des Konstrukts angegeben. * markiert die *cat*-spezifischen Transkripte, ** und *** die RNAI-spezifischen Transkripte.

Die Abbildung zeigt, dass die Menge des eingesetzten Oligos nicht limitierend ist. Infolge steigender RNA-Mengen nehmen die Bandenintensitäten sowohl der P1-gestarteten Transkripte als auch der RNAI-Transkripte linear zu. Hier wurde auf eine Quantifizierung verzichtet, das Ergebnis ist eindeutig ausgefallen, die absoluten Transkriptintensitäten waren hier nicht Gegenstand des Experiments. In folgenden *primer extension* Analysen wurde aufgrund der Ergebnisse stets 5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt.

Die *primer extension*-Reaktionen wurden stets mit *cat*- und RNAI-Oligo durchgeführt. Die RNAI-Transkripte sollten hier als interner Quantifizierungsstandard dienen. Die *primer extensions* wurden mehrmals durchgeführt. Die Reihungen bezüglich der Inhibierungen blieben bei den Wildtypen stets gleich, die absoluten Werte wichen z.T. um 30% voneinander ab, was durch eine unterschiedliche Expositionszeit der Phosphoimagerscreens erklärbar ist. Bei den *relA*-Mutanten wurde keine Inhibierung beobachtet. Zum Teil ergab die Quantifizierung eine leichte Aktivierung. Die nachfolgende Abbildung 4.41 zeigt ein Autoradiogramm einer *primer extension* mit Gesamt-RNA aus MG1655.

Die Inhibierungen fallen hier relativ stark aus. Bei den ccc-Analysen der vier neuen Konstrukte 4.2.3 wurden z.T. nur einstellige prozentuale Inhibierung beobachtet. Das *rrnB*(-)-Konstrukt wies dort eine Inhibierung von lediglich ca. 5% auf. Bei den *in vivo* Analysen werden die Transkriptionen untereinander

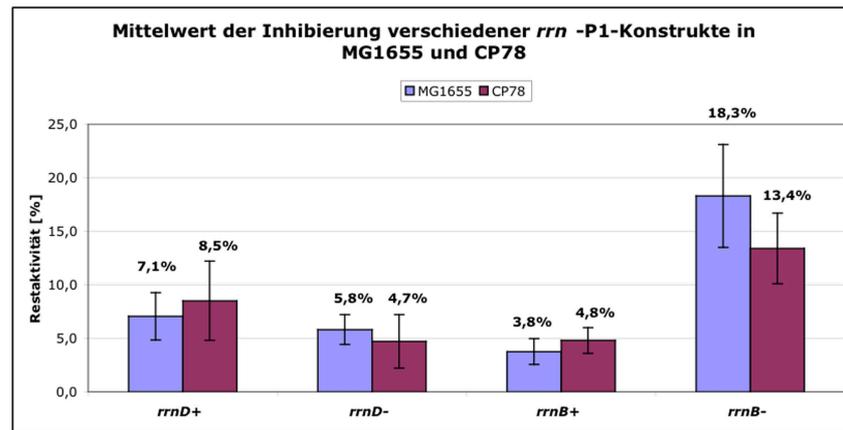


Abbildung 4.42: Quantitative Auswertung der *Primer Extension* Analyse der vier neuen Konstrukte in MG1655 und CP78. Die Auswertung zeigt die Mittelwerte der Restaktivitäten nach Auslösen der Stringenten Kontrolle in den Wildtypen MG1655 und CP78. Über den Balken ist die Restaktivität in Prozent angegeben. Die Standardabweichung sind schwarz in die Balken eingezeichnet.

auf ein ähnliches Niveau reduziert. Unter *in vivo*-Bedingungen müssen weitere Effektoren beteiligt sein, die bei der Transkription bzw. dem Inhibierungsmechanismus eine Rolle spielen, denn hier wurden die identischen Plasmide verwendet, die zuvor bei den *ccc*-Analysen eingesetzt worden waren. Die basalen Transkriptionsraten sind bei dem Promotorpaar *rrnD*(+) und *rrnD*(-) am höchsten, sie tragen den *rrnB*-P1-Promotor. Das Konstrukt *rrnB*(-) zeigt die schwächste basale Transkriptionsaktivität. Es beinhaltet den *rrnD*-*core*-Promotor. Die Abbildung 4.42 zeigt die quantitative Auswertung der Wildtypen MG1655 und CP78. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte.

Die Abbildung zeigt die höchste Restaktivität für das *rrnB*(-)-Konstrukt, was gleichbedeutend mit der schwächsten Inhibierung ist. Die Standardabweichungen sind bei *rrnD*(+) und *rrnB*(+) sehr hoch ausgefallen. Die Ursache dafür sind Schwankungen bei den beiden Wildtypstämmen, beide Konstrukte zeigten bei MG1655 einen höheren Mittelwert als bei dem Stamm CP78. Dennoch wird hier die Reihung, die bei allen *primer extension* Reaktionen gleich auftrat, deutlich. Die Inhibierungsniveaus der drei Konstrukte *rrnB*(+), *rrnD*(+) und *rrnD*(-) sind sehr ähnlich. Lediglich *rrnB*(-) fällt aus der Reihe, es zeigt die schwächste Inhibierung oder die stärkste Restaktivität.

Bei den *in vivo* Analysen der sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren konnte bezüglich der basalen Transkriptionsaktivitäten und der ppGpp-Sensitivität ein ähnliches Verhalten der *core*-Promotoren beobachtet werden. Das native *rrnB*-Operon zeigte eine viel stärkere basale Aktivität als das *rrnD*-Operon, wurde jedoch stärker inhibiert als das *rrnD*-Operon. Auch hier traten ähnliche Transkriptionsniveaus während der Stringenten Kontrolle auf [17].

Das Konstrukt *rrnB*(-) zeigte schon bei *in vitro* Transkriptionen mit linearen und *ccc-templates* (siehe Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3) eine schwache ppGpp-Sensitivität. Unter *in vivo* Bedingungen scheint es hier das einzige der neuen Konstrukte zu sein, was eine schwache ppGpp-Sensitivität zeigt. Das Konstrukt trägt die UAS-Region des *rrnB*-Operons, das UP-Element und den *core*-Promotor des

rrnD-Operons. Der *core*-Promotor allein kann die schwache ppGpp-Sensitivität nicht hervorrufen, das *rrnB*(+)-Konstrukt trägt diesen Promotor ebenfalls. Hier kann erneut die Aussage unterstrichen werden, dass ein einzelnes Promotorelement nicht generell eine starke Promotoraktivität oder/und eine schwache ppGpp-Sensitivität begründen kann. In der Diskussion wird dieser Punkt ausführlich besprochen.

4.4 Bestimmung der K_m -Werte für den *rrnB*- und *rrnD*-P1-Promotor

Unter diesem Kapitel wurden mehrere *in vitro* Transkriptionen zur Bestimmung des K_m -Werts für das Startnukleotid zusammengefasst. Der K_m -Wert wird hier als die Startnukleotid-Konzentration bezeichnet, bei der die halbmaximale Menge an Transkript gebildet wird.

Da im Rahmen dieser Arbeit sich das *rrnD*-Operon als herausstechendes *rrn*-Operon erwies, was sowohl die ppGpp-Inhibierung als auch die basale Transkriptionsaktivität betraf, wurden zusammen mit dem *rrnB*-Operon und den vier neuen Konstrukten die K_m -Werte an superhelikalen *templates* untersucht. Die *ccc-templates* wurden verwendet, da ihnen eine größere Nähe zu den *in vivo*-Bedingungen attestiert wird, die K_m -Werte sollten näher an den *in vivo* Werten liegen.

4.4.1 Testtitration mit Startnukleotiden bei dem *rrnB*- und *rrnD*-Operon

Um den Konzentrationsbereich, in dem eine Feintitration stattfinden sollte, näher zu kommen, wurde zunächst ein grobes Konzentrationsspektrum getestet. Es wurden folgende Konzentrationen verwendet: 5, 10, 30, 65, 100 und 200 μM Startnukleotid. Da die untersuchten *rrn*-P1-Promotoren unterschiedliche Basenzusammensetzungen innerhalb der ersten drei Nukleotide aufweisen, wurden zwei verschiedene Reaktionsbedingungen aufgestellt:

- Das *rrnB*-Operon startet mit A-C-U, die Start-NTP-Titration wurde mit ATP durchgeführt
- Das *rrnD*-Operon startet mit G-U-U, hier wurde die Konzentration von GTP variiert
- Unter *single round* Bedingungen dürfen nur die ersten beiden Nukleotide angeboten werden, da sonst direkt die Isomerisierung zum Elongationskomplex bei superhelikalen *templates* erfolgt. Ein radioaktiver Einbau muss daher mit dem zweiten Nukleotid erfolgen. Bei *rrnB* wurde CTP gewählt, bei *rrnD* wurde UTP gewählt. Hier ist UTP das zweite und dritte Nukleotid. Eine vorher durchgeführte Analyse der Initiationszeit wurde jedoch unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, dort konnte die *single round* Bedingung nachgewiesen werden (Schwäche der Transkripte im Vgl zu *multiple round-ccc*- Analysen, Produktabnahme mit zunehmenden Zeitwerten)

Die Abbildung 4.43 zeigt das Autoradiogramm sowie die quantitative Auswertung. Dabei wurde die Transkriptintensität bei der höchsten Start-NTP-Konzentration gleich 100 % gesetzt.

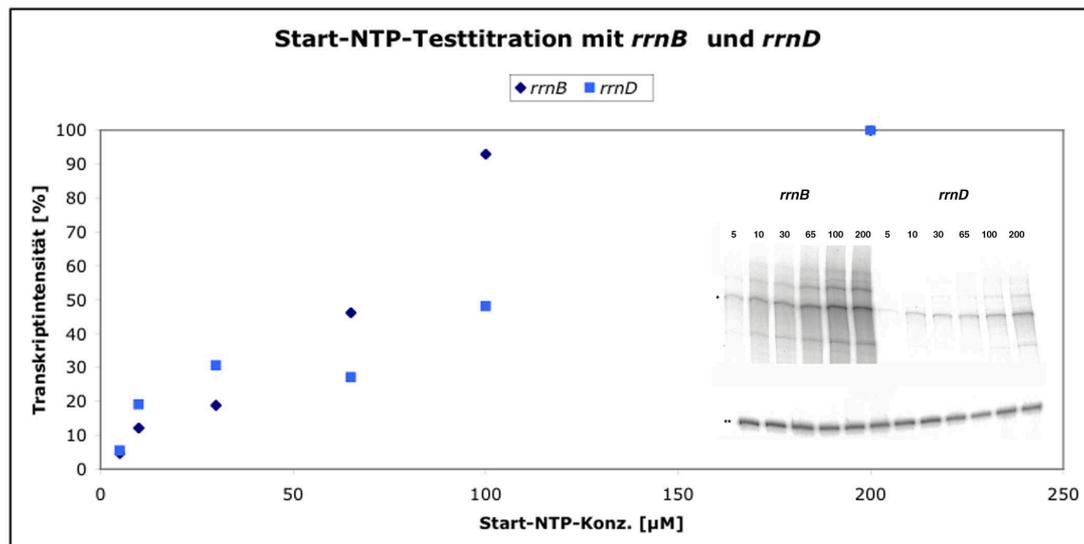


Abbildung 4.43: Testtitration zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches bei der Startnukleotid-Konzentration. Die Abbildung gibt das Autoradiogramm sowie die quantitative Auswertung der Start-NTP-Testtitration wieder. Die Bezeichnung des *templates* und der Startnukleotidkonzentration ist über den Spuren angegeben. * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragsstandard. In der graphischen Auswertung wurden Transkriptintensitäten in Abhängigkeit von Start-NTP-Konzentration aufgetragen. Dunkelblau repräsentiert das *rrnB*-Operon, orange stellt das *rrnD*-Operon dar.

Das Autoradiogramm zeigt, dass die Transkriptintensitäten bei dem *rrnB*-Operon deutlich stärker ausfallen. Das liegt an der Einbaufähigkeit des radioaktiven Nukleotids. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass radioaktives CTP ca. 10 mal besser eingebaut wird als das entsprechende Nuklid von UTP. Dieses Verhältnis war zuvor nur bei nicht radioaktiven Nukleotiden und der *E. coli* RNA-Polymerase bekannt. Dort konnten die Substratkonzentrationen bestimmt werden, bei denen die Elongationsgeschwindigkeit am T7 A1-Promotor halbmaximal ist ($K_s(\text{NTP})$). Dort traten folgende Werte auf:

- $K_s(\text{ATP}) = 200 \mu\text{M}$
- $K_s(\text{CTP}) = 50 \text{ bis } 80 \mu\text{M}$
- $K_s(\text{GTP}) = 400 \mu\text{M}$
- $K_s(\text{UTP}) = 500 \mu\text{M}$

Die Werte sind nicht allgemeingültig und können für diskrete *template* Positionen variieren [69]. Dennoch zeigt auch hier das radioaktive CTP einen deutlich höheren Einbau als das radioaktive UTP. Im Folgenden wurden Start-NTP-Konzentrationen von 1 bis $65 \mu\text{M}$ gewählt, die aufgrund dieses Ergebnisses für sinnvoll sind. Die K_m -Werte sollten sich im einstelligen mikromolaren Bereich bewegen, daher wurde auf hohe Konzentrationen verzichtet.

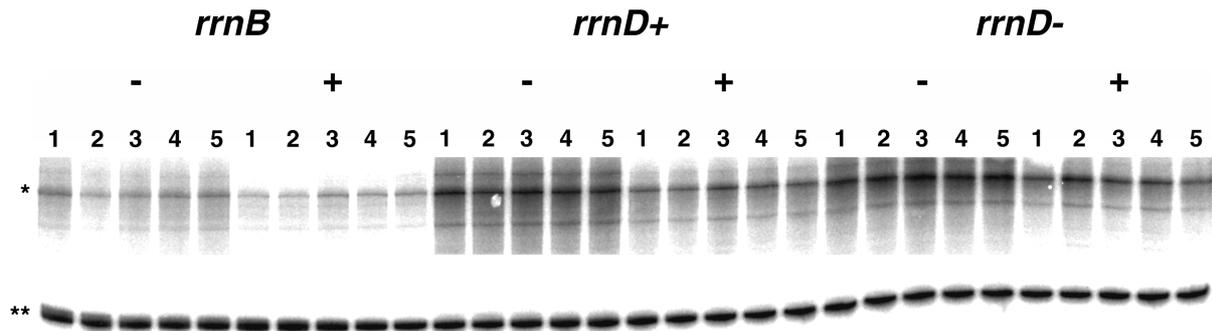


Abbildung 4.44: Start-NTP-Titration bei *rrnB*-P1-Promotoren in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp.

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des resultierenden Autoradiogramms der ATP-Titration mit *rrnB*-P1-Promotoren. Über den Spuren ist die Bezeichnung des jeweiligen *templates* angegeben. Die Zahlen 1 bis 5 repräsentieren folgende Konzentrationen an ATP: 1 = 1 μM , 2 = 5 μM , 3 = 10 μM , 4 = 30 μM und 5 = 65 μM ATP. Die Proben wurden in Ab- (0 μM = -) und Anwesenheit (300 μM = +) von ppGpp transkribiert. * markiert die Vollängentranskripte, ** den Auftragungsstandard.

4.4.2 Bestimmung der K_m -Werte für das *rrnB* und das *rrnD*-Operon sowie der vier neuen Konstrukte

Es wurden mehrere Titrationen mit Start-NTP durchgeführt. Die Konzentrationen betragen 2, 5, 10, 30 und 65 μM . Eine Reaktion wurde auch in Gegenwart von 300 μM ppGpp durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 4.44 zeigt das Autoradiogramm der Reaktion mit *rrnB*-Promotoren (*rrnB*, *rrnD*(+) und *rrnD*(-)).

Die Abbildung zeigt, dass die synthetischen *rrn*-Konstrukte deutlich stärkere Banden sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von ppGpp aufweisen. Da hier gleiche Konzentrationen an *template* eingesetzt wurden, bedeutet dieses Ergebnis, dass sowohl die K_m -Werte niedriger liegen als auch mehr Initiationen stattfinden können. Die letztere Möglichkeit kann dadurch begründet sein, dass die gesamte Architektur des Promotors bei der Initiation eine erhebliche Rolle spielt, was sich auch auf die ppGpp-Sensitivität auswirkt. Die Konformation von *rrnD*(+) und *rrnD*(-) scheint deutlich günstiger auf die Initiation mit der RNA-Polymerase zu wirken, als es bei dem *rrnB*-P1-Promotor ersichtlich ist. Die Produkte bei allen drei *templates* zeigen schon bei sehr geringen Start-NTP-Konzentrationen keine Zunahme mehr. Das spricht für sehr geringe Konzentrationen, bei denen die halbmaximale Menge an Produkt erreicht wird.

Die Titrationen mit den *rrnD*-Promotoren sahen sehr ähnlich aus. Auch zeigte der native P1-Promotor die schwächsten Transkripte, die synthetischen Konstrukte wiesen auch hier deutlich stärkere Banden auf. Die Quantifizierungen ergaben sehr ähnliche Werte. Die Startnukleotid-Konzentrationen, bei welchen die halbmaximale Produktmenge erreicht wird, lagen sehr dicht beieinander. Es wurden Mittelwerte aus drei Experimenten verwendet. Die einzelnen Werte streuten bei den synthetischen *rrn*-P1-Promotoren etwas stärker als bei den nativen *rrn*-P1-Promotoren *rrnB* und *rrnD*. Die nachfolgende Abbildung 4.45 zeigt die reziproke Auswertung der Start-NTP-Titration mit den *rrnB*-P1-Promotoren.

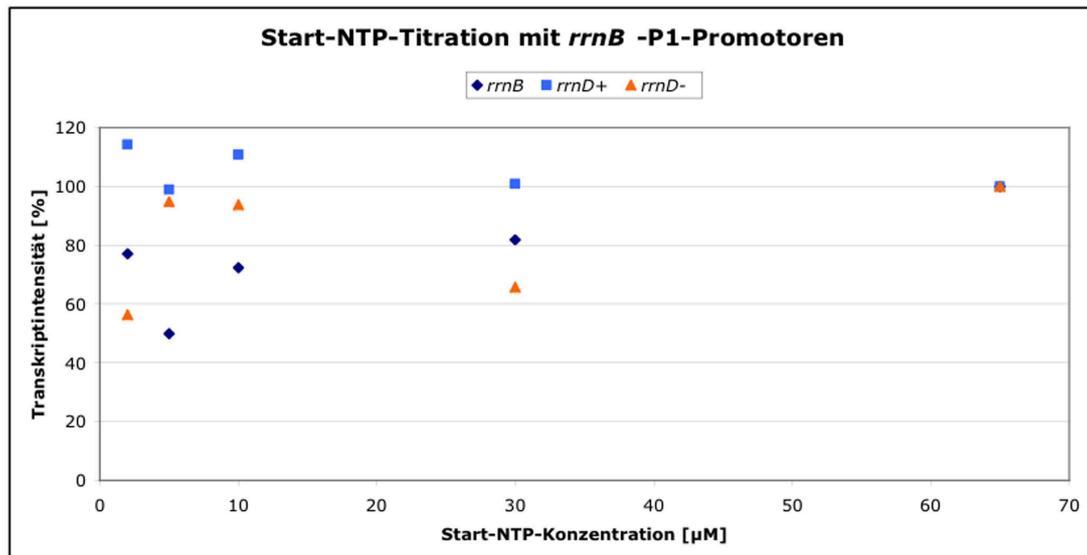


Abbildung 4.45: Transkriptintensitäten in Abhängigkeit der Startnukleotid-Konzentration bei *rrnB*-P1-Promotoren. Hier wurde die Transkriptintensität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration (Start-NTP bei den *rrnB*-Promotoren) aufgetragen. Die Transkriptintensitäten bei der höchsten ATP-Konzentration wurden nicht gleich 100% gesetzt, da z.T. Werte bei niedrigen Konzentrationen die maximalen Intensitäten aufwiesen. Dunkelblau repräsentiert *rrnB*, hellblau stellt *rrnB*(+) und orange stellt *rrnD*(-) dar.

Die Werte streuen z.T. sehr, deswegen wurde auf eine Ausgleichskurve verzichtet. Die synthetischen Konstrukte *rrnD*(+) und *rrnD*(-) erreichen deutlich schneller die höchste Transkriptintensität. Die Werte bei kleinen ATP-Konzentrationen sind z.T. höher als bei der maximalen Konzentration von 65 µM ATP ausgefallen. Es kann durchaus sein, dass der Wert bei dem *rrnD*(+)-Konstrukt bei 65 µM ATP zu gering ausgefallen ist. Von den drei *rrnB*-P1-Promotoren scheint der native *rrnB*-P1-Promotor den höchsten K_m -Wert zu zeigen: Die Transkriptintensitäten fallen schwächer aus, der Anstieg verläuft nicht so rapide wie bei den synthetischen Promotoren.

Bei den *rrnD*-Promotoren verhielt es sich umgekehrt: Das Experiment ergab den niedrigsten K_m -Wert für den nativen *rrnD*-Promotor, die synthetischen Konstrukte lagen jedoch sehr dicht an den Werten des *rrnD*-Operons.

Die Quantifizierungen ergaben z.T. streuende Werte bei den synthetischen *rrn*-Promotoren und erreichten sehr schnell das Intensitätsmaximum. Die ppGpp-Inhibierung nahm mit steigenden Startnukleotid-Konzentrationen ab. Im Folgenden wurden reziproke Auswertungen für die beiden nativen *rrn*-P1-Promotoren *rrnB* und *rrnD* in Ab- und Anwesenheit von 300 µM ppGpp erstellt. In Abbildung 4.46 ist die reziproke Auswertung für den nativen *rrnB*-P1-Promotor exemplarisch dargestellt.

Der Verlauf unterscheidet sich in Gegenwart von 300 µM ppGpp deutlich: Die Transkriptintensität fällt schwächer aus und steigt nicht so rapide an. Die resultierenden K_m -Werte wurden auch hier bestimmt. In Tabelle 4.10 sind die resultierenden Werte für den *rrnB*- und den *rrnD*-P1-Promotor in Ab- und Anwesenheit von 300 µM ppGpp angegeben.

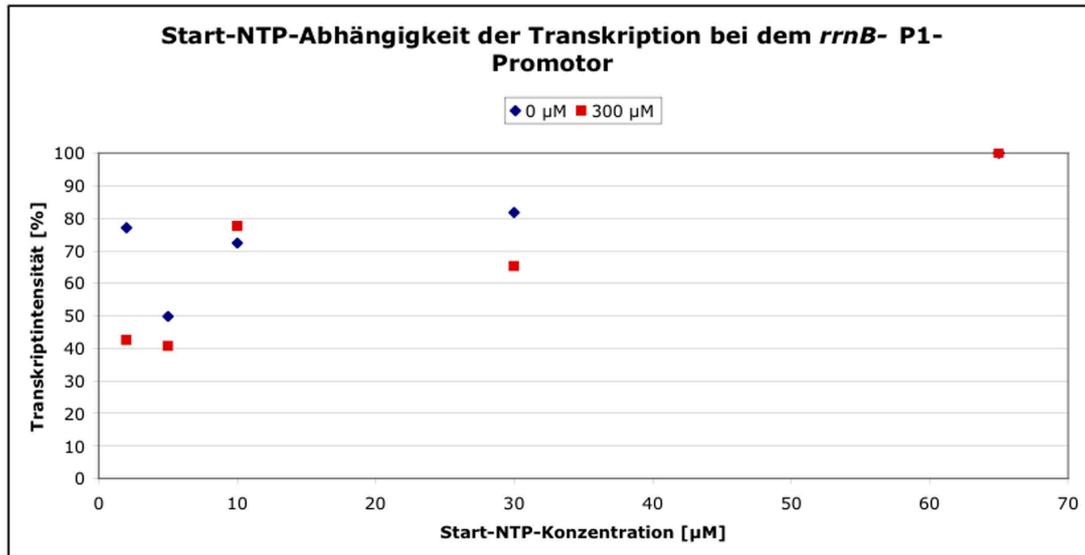


Abbildung 4.46: Transkriptintensitäten in Abhängigkeit von der Start-NTP-Konzentration bei *rrnB* -/+ 300 µM ppGpp. Hier wurde die Transkriptintensität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration (Start-NTP bei den *rrnB*-Promotoren) aufgetragen. Die Transkriptintensitäten bei der höchsten ATP-Konzentration wurden gleich 100% gesetzt. Dunkelblau repräsentiert 0 µM ppGpp, rot stellt die Werte bei 300 µM ppGpp dar. Da die Werte bei geringen ATP-Konzentrationen streuen, wurde auf eine Ausgleichskurve verzichtet.

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	K_m -Wert ohne ppGpp [µM]	K_m -Wert mit ppGpp [µM]
<i>rrnB</i>	3,3	6,6
<i>rrnD</i>	1,0	2,0

Tabelle 4.10: K_m -Werte von *rrnB* und *rrnD* in An- und Abwesenheit von 300 µM ppGpp

Bei beiden *rrn*-P1-Promotoren scheint die ppGpp-Anwesenheit eine Verdopplung des K_m -Werts zu bewirken. Die höher ausfallenden absoluten Werte bei dem *rrnB*-P1-Promotor können die stärkere ppGpp-Sensitivität gut erklären.

Die Tabelle 4.11 zeigt die K_m -Werte für alle sechs verwendeten *templates rrnB*, *rrnD*, *rrnB*(+), *rrnB*(-), *rrnD*(+) und *rrnD*(-). Die Standardabweichungen sind angegeben.

Bezeichnung des <i>rrn</i> -Operons	K_m -Wert [µM]	Standardabweichung
<i>rrnB</i>	4,0	0,7
<i>rrnD</i>	1,1	0,1
<i>rrnB</i> (+)	3,0	0,2
<i>rrnB</i> (-)	2,2	0,5
<i>rrnD</i> (+)	0,7	0,2
<i>rrnD</i> (-)	1,7	0,4

Tabelle 4.11: K_m -Werte der sechs verwendeten *rrn*-templates

Die Werte zeigen, dass von den beiden nativen *rrn*-Operons das *rrnD*-Operon einen 4fach kleineren K_m -Wert als das *rrnB*-Operon aufweist. Von den sechs insgesamt untersuchten Promotoren wies das Konstrukt *rrnD*(+) mit $0,7 \mu\text{M}$ für ATP den geringsten Wert auf. Die Werte liegen dicht beieinander. Die neuen Konstrukte zeigen alle einen geringeren K_m -Wert als der *rrnB*-P1-Promotor. Diese Tatsache lässt die Frage nach der Entstehung des K_m -Werts aufkommen, denn die Startposition allein kann diesen Wert nicht determinieren, sonst würden die *rrnD*-Promotor-haltigen *templates* alle den gleichen Wert zeigen. Die Umgebung des Startnukleotids bzw. die Architektur scheint Parameter zu beeinflussen, die den K_m -Wert einer Nukleotidposition determinieren. Wie schon bei den Analysen der ppGpp-Sensitivitäten und der Promotorstärken mit den vier neuen Konstrukten (Abschnitte 4.2.2 und 4.2.3) festgestellt, ist ein einziges Promotorelement nicht generell für das Transkriptionsverhalten eines Promotors verantwortlich. Dennoch konnten Kombinationen der Elemente mit der ppGpp-bedingten Inhibierung und der basalen Transkriptionsstärke korreliert werden.

Bei den K_m -Wert-Bestimmungen kann das UP-Element als Parameter für einen geringen K_m -Wert innerhalb eines Promotorpaares definiert werden. Die Konstrukte *rrnB*(-) und *rrnD*(+) enthalten das *rrnD*-UP-Element, sie zeigen einen jeweils geringeren Wert als das jeweilige Äquivalent mit dem *rrnB*-UP-Element. Das Konstrukt *rrnD*(+) zeigt den geringsten K_m -Wert, es enthält den *rrnB*-core-Promotor, die UAS-Region und das UP-Element des *rrnD*-Operons. Diese Kombination scheint einen sehr geringen K_m -Wert im Vergleich zu den anderen hervorzurufen. Bei den experimentellen Krümmungsanalysen wies dieses Konstrukt die stärkste Krümmung auf. Auch bei den basalen Transkriptionsaktivitäten zeigte dieser Promotor mit die stärksten Produkte. Das spricht erneut für eine Kombination von den Promotorelementen UAS-Region, UP-Element und *core*-Promotor, die für das Transkriptionsverhalten verantwortlich sind. *rrnD*(+) zeigte jedoch eine im Vergleich zu dem *rrnB*(+)/*rrnB*(-)-Paar eine gesteigerte ppGpp-Sensitivität. Die Tatsache, dass der K_m -Wert hier jedoch am geringsten ausfällt, zeigt, dass das Konkurrenzmodell nicht ausschliesslich mit den K_m -Werten der Startposition erklärt werden kann. Die Konformation des Promotors scheint einen Einfluss auf die Konformation des Initiationskomplexes zu haben, wahrscheinlich sehen die Komplexe bei den verschiedenen *templates* etwas anders aus und sind unmittelbar von dem Startnukleotid und der Architektur des Promotors abhängig. In der Diskussion wird ausführlicher darauf eingegangen.

Die Ergebnisse der K_m -Wert-Bestimmung sind unter den folgenden Punkten zusammengefasst:

- Das native *rrnB*-Operon zeigt den höchsten K_m -Wert mit $4 \mu\text{M}$
- Das Konstrukt *rrnD*(+) zeigt den niedrigsten K_m -Wert mit $0,7 \mu\text{M}$
- Das *rrnD*-Operon zeigt einen K_m -Wert von $1 \mu\text{M}$, es wurde hier auf jeden Fall ein geringerer K_m -Wert aufgrund der unterschiedlichen ppGpp-Sensitivitäten als bei dem *rrnB* erwartet
- Das *rrnD*-UP-Element scheint sich positiv auf einen geringen K_m -Wert auszuwirken
- Die Konformation bzw. Krümmung scheint ebenfalls einen Einfluss auf den K_m -Wert zu zeigen

- Generell ist die Kombination von den Promotorelementen UAS-Region, UP-Element und *core*-Promotor sowie Startnukleotid entscheidend für das Transkriptionsverhalten, das gilt auch für den K_m -Wert eines Promotors.

5 Diskussion

5.1 Intrinsische Eigenschaften der ribosomalen P1-Promotoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der UAS-Region auf die Transkription in Gegenwart oder Abwesenheit von ppGpp bei den ribosomalen P1-Promotoren von *E. coli* untersucht. Die Promotoren zeigten *in vitro* und *in vivo* eine differentielle ppGpp-Sensitivität.

Durch die *in vitro* Analysen liessen sich die sieben P1-Promotoren in drei Gruppen einteilen:

- Der *rrnD*-P1-Promotor wird am schwächsten inhibiert
- Der *rrnH*-P1-Promotor wird am stärksten inhibiert
- Die P1-Promotoren der Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnE* und *rrnG* zeigten eine mittelstarke Inhibition durch ppGpp.

Weitere Promotoranalysen mit vier synthetischen Konstrukten zeigten, dass ein optimaler Promotorkontext für die ppGpp-Sensitivität definiert werden kann: Das Konstrukt *rrnB*(-) wurde *in vitro* und *in vivo* am schwächsten durch ppGpp inhibiert. Es trägt die UAS-Region des *rrnB*-Operons, das UP-Element und den *core*-Promotor des *rrnD*-Operons.

Die Promotoranalysen in Gegenwart von ppGpp stellen eine faktorunabhängige Regulation dar, d.h. die *in vitro* Transkription wird allein durch die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit dem Promotor und dem Inhibitor definiert. Daher müssen für die Interpretation der Ergebnisse die intrinsischen Eigenschaften der ribosomalen P1-Promotoren betrachtet werden, die die Promotorstärke beeinflussen, bzw. in denen sich die *rrn*-P1-Promotoren unterscheiden und daher eine differentielle Transkription begründen könnten. Die Stärke eines Promotors ergibt sich aus folgenden Parametern:

1. Durch flankierende Promotorsequenzen:

- a) *Upstream* flankierende Sequenzen wie die UAS-Region. Die dreidimensionale Architektur bestimmt die Aktivierung durch *cis*- und *trans*-aktivierende Faktoren. Die Architektur fällt bei den sieben *rrn*-P1-Promotoren stark heterogen aus und ist augenscheinlich der Hauptgrund für das differentielle Transkriptionsverhalten
- b) *Downstream* liegende Sequenzen der *rrn*-P1-Promotoren, sie fallen hier jedoch identisch aus und tragen daher nicht zur differentiellen Regulation bei

2. Die Übereinstimmung mit dem Konsensus-Promotor, siehe Abbildung 5.1
3. Die Lage auf dem Chromosom beeinflusst zudem die Gendosis, näher am *oriC* liegende Gene liegen in höherer Kopienzahl vor.
4. Das Startnukleotid, im Fall des *rrnD*-Operons liegt Guanosin statt Adenosin vor. Alle anderen *rrn*-P1-Promotoren starten mit Adenosin. Daher können unterschiedliche Transkriptionseffizienzen durchaus auf das differente Startnukleotid zurückführbar sein.

Die Sequenzabweichungen innerhalb der sieben verschiedenen *rrn*-Operons tragen sicherlich in unterschiedlichem Ausmaß zur unterschiedlichen Promotorstärke bei. Im Folgenden werden die Unterschiede in der UAS-Region bzw. in dem *core*-Promotor besprochen, bevor ausführlich deren Einfluss auf die Transkription diskutiert wird.

5.1.1 Vergleich der verschiedenen *rrn*-UAS-Regionen

Die UAS-Regionen definieren die Architektur eines Promotors und zeigen einen aktivierenden Einfluss auf die faktorabhängige und faktorunabhängige Transkription (*trans*- und *cis*-wirkende Faktoren) [133], [68], [97]. Die in Abbildung 4.1 gezeigten UAS-Regionen weisen eine starke Heterogenität auf, weswegen eine Gruppeneinteilung nicht möglich ist. Die Konformationsanalysen unter 4.1.1 spiegeln diese Unterschiede klar wieder. Dagegen erlauben die Sequenzen der UP-Elemente eine Einteilung der Operons in fünf Gruppen:

- *rrnA*, *rrnB* und *rrnC* besitzen ein identisches UP-Element, sie bilden eine Gruppe
- *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH* zeigen abweichende UP-Elemente, das *rrnD*-UP-Element weist die stärkste Abweichung auf

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass sowohl die UAS-Region als auch das UP-Element einen aktivierenden Einfluss auf die faktorunabhängige Transkription ausüben [44], [111], [25]. In dieser Arbeit konnte erstmals bei allen sieben *rrn*-Operons von *E. coli* gezeigt werden, dass diese Aktivierung *in vitro* unterschiedlich stark ausfällt. Eine korrelierende ppGpp-Inhibierung würde daher einen indirekten Einfluss der UAS-Region und des UP-Elements bedeuten. Dieser Punkt wird unter 5.2.1 noch ausführlicher diskutiert.

5.1.2 Vergleich der verschiedenen *rrn*-*core*-P1-Promotoren

Die *core*-P1-Promotoren der sieben *rrn*-Operons sind z.T. sehr homolog. Sie erlauben die Einteilung in vier Gruppen:

	-35 - Region	spacer	-10 - Region	Start
<i>rrnA/-B/-C/-G</i>	5' TTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCACT 3'			
<i>rrnD</i>	5' TTGTGCAAAAAATTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTT 3'			
<i>rrnE</i>	5' TTGCGGCCTGCGGAGAACTCCCTATAATGCGCCTCCATC 3'			
<i>rrnH</i>	5' TTGTCTTCCTGAGCCGACTCCCTATAATGCGCCTCCATC 3'			
<i>tac</i>	5' TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAAT 3'			

Abbildung 5.1: Sequenzen der ribosomalen P1-core-Promotoren. In der Abbildung sind die verschiedenen Sequenzen individueller P1-core-Promotoren von *E. coli* sowie des synthetischen *tac*-Promotors dargestellt. Wichtige Elemente sind markiert: -35-Region, *spacer*, -10-Region, Diskriminator (unterstrichen) und Transkriptionsstart (+1). Sequenzabweichungen sind hervorgehoben: blau markiert Abweichungen in der -35-Region, grau zeigt Abweichungen im *spacer* und zwischen dem -10-Element und der Startposition, rot repräsentiert Abweichungen des Startnukleotids oder in dem zweiten und dritten Nukleotid. Der *tac*-Promotor entspricht dem idealen Konsensus-Promotor mit einem 17 bp langen *spacer*.

- Die Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* und *rrnG* weisen identische *core*-Promotor-Sequenzen auf. Die Konsensus-Hexamere -35- und -10-Region sowie der *spacer*, das Startnukleotid sowie die nachfolgenden Sequenzen sind identisch. Diese Operons bilden eine Gruppe
- Die Operons *rrnD*, *rrnE* und *rrnH* weichen von der ersten Gruppe ab. Sie zeigen differente -35-Regionen, andere *spacer*-Sequenzen und Sequenzabweichungen in den ersten drei Startnukleotiden

In Abbildung 5.1 sind die Sequenzen der einzelnen Gruppen sowie des synthetischen *tac*-Promotors dargestellt, er zeigt die Sequenz des idealen Konsensus-Promotors.

Die geschilderten Sequenzunterschiede in den UAS-Regionen, den UP-Elementen bzw. den *core*-P1-Promotoren beeinflussen die Transkription in unterschiedlichem Ausmaß. Die Transkription lässt sich in mehrere Schritte aufteilen, die alle unterschiedliche Stabilitäten und Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen (Abbildung 5.2). Prinzipiell kann jeder Schritt durch die Sequenzunterschiede in den *rrn*-P1-Promotoren beeinflusst werden. Es gibt jedoch Hinweise, die eine Unterscheidung zwischen der UAS-Region und dem *core*-Promotor ermöglichen:

Die dreidimensionale Struktur eines Promotors wird durch die UAS-Region beeinflusst und beinhaltet zusätzliche Informationen, die die Effizienz der Transkriptionsinitiation beeinflussen. Sequenzunterschiede in einzelnen Positionen wirken sich nicht so drastisch auf die faktorunabhängige Transkription aus. Die dreidimensionale Architektur wirkt sich hauptsächlich auf die Bindung der RNA-Polymerase an den *core* Promotor (K_B) sowie auf die Isomerisierung zum offenen Komplex aus (k_2) [97], [108], [30].

Beide Konstanten werden ebenfalls durch die Sequenz des *core*-Promotors beeinflusst, die Isomerisierung zum Initiationskomplex (k_3) wird jedoch hauptsächlich durch den *core*-Promotor determi-

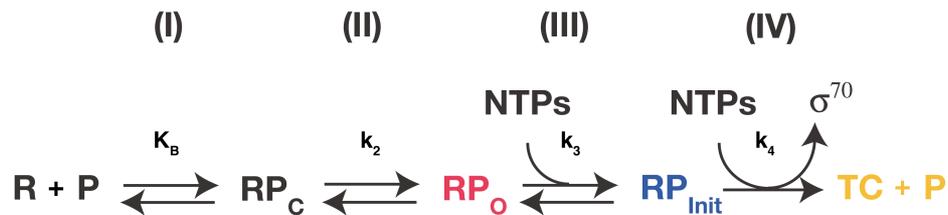


Abbildung 5.2: Initiationschema nach Record *et al.*, 1996. Die römischen Buchstaben kennzeichnen den jeweiligen Isomerisierungsschritt. R: RNA-Polymerase, P: Promotor, RP_c : geschlossener (*closed*) Komplex, RP_o : offener (*open*) Komplex, TC: Ternärer Komplex. Nach Record *et al.* [100].

niert [126], [57]. Hier wirken sich Sequenzunterschiede bereits in einer einzelnen Position erheblich auf die Transkription aus. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Einflüsse anhand der Ergebnisse ausführlicher diskutiert.

5.2 Welche Parameter beeinflussen die Transkription?

Um die differentielle ppGpp-Sensitivität mit den verschiedenen Promotorabschnitten zu korrelieren, ist es erforderlich, deren Einflüsse auf die Transkription zu verstehen. Die erzielten Ergebnisse ermöglichen die Betrachtung einzelner Promotorstrukturen bzw. deren Einflüsse auf die Transkription und die ppGpp-Sensitivität. Zudem beeinflusst die Superhelikalität die Transkription bzw. die Ausrichtung der einzelnen Promotorabschnitte deutlich, weswegen dieser Abschnitt gesondert diskutiert wird (siehe 5.3).

5.2.1 Einfluss der Krümmung auf die ppGpp-Sensitivität

Die Konformation eines Promotors trägt direkt zur Promotorstärke bei. Vergangene Arbeiten zeigten eine Korrelation zwischen der Krümmung der Promotor-Region und einer Transkriptionsaktivierung [11]. Experimente, bei denen die Distanz des Krümmungszentrums zum *core*-Promotor variiert wurde, beweisen, dass eine bestimmte räumliche Orientierung für eine Aktivierung notwendig ist [93]. Zudem wurde gezeigt, dass die Position des Krümmungszentrums des *rrmB*-P1-Promotors bei -90 lokalisiert ist und dass Deletionen *upstream* von Position -100 relativ zum Transkriptionsstart keinen Einfluss auf die faktorunabhängige Aktivierung haben [108]. Die Ursache für die faktorunabhängige Aktivierung einer gekrümmten Promotorregion liegt in der erleichterten Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit der DNA, was sich auf mehrere Schritte bei der Initiation positiv auswirken kann. Der initiale Schritt, d.h. die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor wird durch eine intrinsische DNA-Krümmung erleichtert. Bei diesem Schritt wird die DNA um die RNA-Polymerase gewickelt (*wrapping*), die Lage des Krümmungszentrum ist hier von entscheidender Bedeutung.

Die unter 4.1.1 und 4.2.1 analysierten ribosomalen Promotoren zeigten eine unterschiedlich starke Krümmung, die Krümmungszentren sind ähnlich wie bei dem *rrnB*-P1-Promotor lokalisiert. Bei allen *rrn*-P1-Promotoren korrelierte die Stärke der Krümmung mit der basalen Transkriptionsaktivität. Das bedeutet, dass stärker transkribierte Promotoren wie der *rrnD*-P1-Promotor für ihre Transkriptionsaktivierung optimaler räumlich ausgerichtet sind. Die vier synthetischen *rrn*-P1-Konstrukte zeigten die stärkste Krümmung, ihre Transkriptionseffizienz übertraf die der Referenzpromotoren *rrnB*-P1 und *rrnD*-P1 bei weitem (Abbildung 4.30 und Abbildung 4.33). Die Ergebnisse demonstrieren, dass die ribosomalen P1-Promotoren krümmungssensitiv sind.

Die *in vitro* aufgetretenen ppGpp-Sensitivitäten der vier synthetischen *rrn*-P1-Promotoren zeigen, dass keine direkte Korrelation zwischen der krümmungsbedingten Aktivierung und einer schwächeren ppGpp-Sensitivität vorliegt. Die vier synthetischen Konstrukte zeigen eine unterschiedliche ppGpp-Sensitivität (Abbildung 4.32 und 4.34). Bei diesen Promotoren scheint die Kombination von UP-Element und dem *core*-Promotor und die Superhelikalität die Transkriptionseffizienz entscheidend zu beeinflussen:

- Der native *rrnD*-P1-Promotor wird am schwächsten als lineares und superhelikales *template* inhibiert (Abbildung 4.31 und 4.34)
- Der *rrnD-core*-P1-Promotor mit seinem UP-Element wird bei *in vitro* Transkriptionen mit linearen *templates* schwächer als die drei anderen synthetischen Promotoren inhibiert (Abbildung 4.31, *rrnB*(-))
- Bei superhelikalen *templates* scheint die Kombination des UP-Elements mit dem zugehörigen nativen P1-Promotor schwächer inhibiert zu werden (Abbildung 4.34, *rrnB*(-) und *rrnD*(-))

Das UP-Element wurde in der Vergangenheit als drittes Promotorerkennungselement bezeichnet und zeichnet sich durch einen hohen AT-Gehalt aus [134], [107], [37], [114]. Entgegen früherer Beobachtungen trägt dieses Element durchaus zur Krümmung bzw. gekrümmten Ausrichtung der flankierenden Sequenzen bei, siehe Abschnitt 4.2.1 und Abbildung 4.29. Das UP-Element besteht aus einem proximalen und distalen Bereich [109]. Mutationsanalysen und *footprinting* Experimente konnten einen Kontakt mit der α -CTD-Untereinheit der RNA-Polymerase nachweisen [124], [106], [25]. Bei Kontakt mit dem proximalen Teil des UP-Elements wechselwirkt die α -CTD mit der Region 4.2 des σ^{70} -Faktors der RNA-Polymerase [108] und steigert die Transkription bis zu 30fach [97]. Vergleichende Analysen der sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren von *E. coli* zeigten, dass das *rrnD*-UP-Element die stärkste Aktivierung hervorruft [53]. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Korrelation zwischen Sequenzkontext des UP-Elements und der ppGpp-Sensitivität gezeigt werden. Die basale Transkription wurde je nach Topologie des *templates* unterschiedlich durch das *rrnD*-UP-Element beeinflusst. Allgemein kann gesagt werden, dass das *rrnD*-UP-Element in Kombination mit seinem *core*-Promotor die schwächste ppGpp-Sensitivität zeigt (Abbildung 4.31 und 4.34, siehe *rrnD* und *rrnB*(-)).

Wie kann die unterschiedliche ppGpp-Sensitivität erklärt werden? In der Vergangenheit wurde der Einfluss von ppGpp auf die verschiedenen Transkriptionskomplexe kontrovers diskutiert. Dabei kristallisierten sich der offene und der Initiationskomplex als *target* für die ppGpp-bedingte Inhibierung heraus [5], [57]. Die Formation des geschlossenen Komplexes (K_B) sowie die offene Komplexbildung (k_2) werden beide durch die Interaktion des UP-Elements mit der RNA-Polymerase beeinflusst [134], [108].

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die RNA-Polymerase eine ppGpp-Bindung zeigt [101], [24], [121], [3]. Eine dadurch hervorgerufene Konformationsänderung kann das Schließen der „Klaue“ der RNA-Polymerase durch die β - und die β' -Untereinheit und somit die Isomerisierung zum offenen Komplex betreffen (siehe Abbildung 3.3). Die Bildung des offenen Komplexes ist jedoch in erster Linie von dem σ^{70} -Faktor abhängig, siehe nächster Abschnitt 5.2.2.

Bei einer starken Aktivierung durch die intrinsische Krümmung der UAS-Region und der nachfolgend erleichterte Kontakt zwischen UP-Element, α -CTD und dem σ^{70} -Faktor kann die Konformation und Isomerisierung des Transkriptionskomplexes unempfindlich gegenüber einer ppGpp-Bindung der RNA-Polymerase machen, ppGpp könnte aufgrund der Konformationsänderungen nicht mehr optimal im aktiven Zentrum binden und die frühen Schritte der Initiation beeinflussen.

Auch die nachfolgenden Isomerisierungen können durchaus noch durch ppGpp beeinflusst werden. Bei dem Einbau der Initiationsnukleotide kann das Kompetitionsmodell eine ppGpp-Inhibierung sehr gut erklären [57], [3], [83]. Der Punkt wird im nächsten Abschnitt ausführlicher diskutiert.

5.2.2 Einfluss der *core*-Promotor-Struktur auf die ppGpp-Sensitivität

Bei der Transkriptionsinitiation spielen drei *core*-Promotorelemente eine wichtige Rolle: Die beiden Konsensushexamere -35- und -10-Region sowie der *spacer*. Die RNA-Polymerase erkennt durch Interaktion des σ^{70} -Faktors mit den beiden Hexameren den Promotor. Beide Elemente sind räumlich durch den *spacer* in einer fixierten Position zueinander ausgerichtet. Bei der Interaktion werden die Hexamersequenzen auf dem *non template*-Strang durch den σ^{70} -Faktor gebunden, es folgen weitere Isomerisierungsschritte, wobei die einzelnen Transkriptionskomplexe unterschiedlich weite Bereiche auf dem *template* abdecken. Anhand der Sequenzunterschiede der *core*-Promotoren kann sich der Effekt von ppGpp unterschiedlich stark auf die Transkription auswirken. Die verschiedenen Promotorelemente werden nun im einzelnen betrachtet.

Die Konsensushexamere -35- und -10-Region

Im Rahmen dieser Arbeit fielen die P1-Promotoren von *rrnB*, *rrnD* und *rrnH* bezüglich ihrer unterschiedlichen ppGpp-Sensitivität auf. Der *rrnB*-P1-Promotor repräsentierte eine mittelstarke ppGpp-Inhibierung, der *rrnD*-P1-Promotor wurde am schwächsten inhibiert und der *rrnH*-Promotor zeigte die stärkste ppGpp-Inhibierung. Die *core*-Promotoren zeigen Sequenzunterschiede in der -35-Region, dem

spacer und den Initiationsnukleotiden (Abbildung 5.1). Die -10-Regionen sind identisch. Können die Sequenzunterschiede in der -35-Region mit der unterschiedlichen ppGpp-Sensitivität korreliert werden?

Es gibt Hinweise, dass die Affinität der RNA-Polymerase zum σ^{70} -Faktor in Gegenwart von ppGpp gesenkt wird [122], [125], [86]. *In vivo* Experimente zeigten, dass in Gegenwart von ppGpp eine verminderte Fraktion von σ^{70} gebundenen RNA-Polymerasen vorliegt [49]. Wenn der Sequenzunterschied der *rrnD*-35-Region einen stabileren Kontakt mit dem σ^{70} -Faktor verursacht, könnte dadurch eine schwächere ppGpp-Sensitivität dieses Promotors resultieren. Eine stabilere Interaktion des σ^{70} -Faktors mit der -35-Region kann gleichzeitig die Interaktion zu dem UP-Element positiv beeinflussen, was sich ebenfalls auf die ppGpp-Sensitivität auswirken wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von UP-Element und dem *core*-Promotor entscheidend für die ppGpp-Sensitivität ist. Hier zeigte der synthetische *rrnB*(-)-Promotor bei *in vivo*-Analysen die schwächste ppGpp-Sensitivität, er enthält den *core*-P1-Promotor und das UP-Element des *rrnD*-Operons. Das gleiche Konstrukt mit dem UP-Element des *rrnB*-Operons wies jedoch eine deutlich stärkere ppGpp-Inhibierung auf, weswegen der Kontakt zwischen UP-Element und -35-Region sicherlich eine Bedeutung bei der ppGpp-Inhibierung hat.

Der *spacer*

Der *spacer* trennt die beiden Konsensushexamere und richtet sie räumlich in einer fixierten Position aus. Der Kontakt des σ^{70} -Faktors zu den beiden Konsensuselementen wird daher enorm von dem *spacer* beeinflusst. Vergangene Arbeiten zeigten, dass die σ^{70} -Region 4.2 mit der -35-Region, die Region 2.4 des Faktors mit der -10-Region interagiert [46], [80]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionseffizienz von der *spacer*-Länge abhängt. Dabei erwies sich für die meisten Promotoren eine Länge von 17 bp als optimal, bei dieser Länge scheinen die beiden Konsensushexamere optimal für die Erkennung und Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor ausgerichtet zu sein [78], [129], [74]. 17 bp entsprechen in etwa 1,5 Helixwindungen in der B-DNA, die Zentren der beiden Konsensushexamere sind jedoch durch 23 bp getrennt, was mehr als zwei Helixwindungen bedeutet. Betrachtet man die angulare Orientierung der beiden Hexamere zueinander, so resultiert bei einem 17 bp langen *spacer* bei einem idealen Konsensus-Promotor ein Winkel von ca. 70°. In Abbildung 5.3 wird diese Orientierung veranschaulicht.

Die Abbildung zeigt, dass Insertionen und Deletionen von Basenpaaren in den *spacer* nicht nur den Abstand sondern auch die angulare Ausrichtung der Konsensushexamere verändert. Die Windung der Basenpaare um die Helixachse wird als *twist* bezeichnet. Die angulare Orientierung der Konsensushexamere ist daher *twist*-sensitiv, durch kürzere oder längere *spacer*-Sequenzen bewirkt der veränderte *twist* eine Erniedrigung bzw. Erhöhung des Winkels. Zudem können Sequenzänderungen, wie z.B. Veränderungen im Purin zu Pyrimidin-Verhältnis, den *twist* bei gleicher *spacer*-Länge ändern.

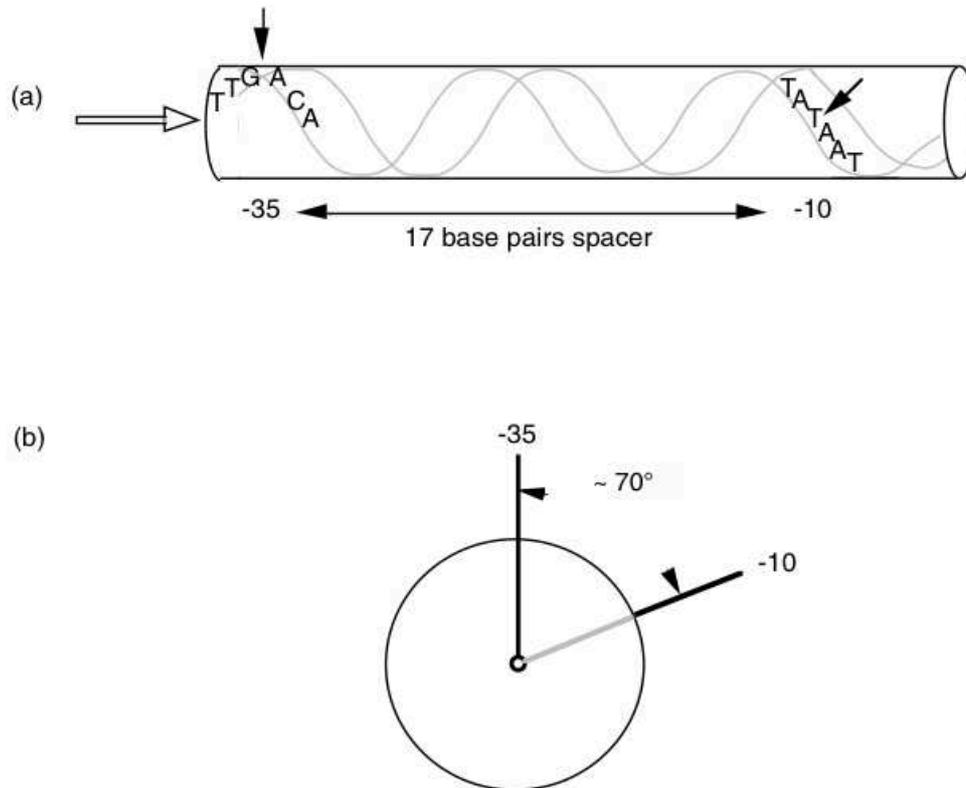


Abbildung 5.3: Angulare Orientierung der Promotorelemente. a) Darstellung der Konsenselemente schematisch auf dem *non template*-Strang entlang der Helix einer B-DNA. Beide Regionen werden durch einen 17 bp langen *spacer* getrennt. b) Projektion entlang der Helixachse. Die Zentren der beiden Hexamere sind als schwarze Linien dargestellt. Beide Zentren sind durch den *spacer* 23 bp voneinander entfernt, in dieser Position sind beide Elemente durch die Helixwindungen in der B-DNA ca. 70° zueinander ausgerichtet. Aus Wagner [128].

Die sieben ribosomalen P1-Promotoren von *E. coli* weisen alle einen 16 bp langen *spacer* auf. Man bezeichnet den *spacer* als unterwunden. Der Winkel zwischen den beiden Konsensushexameren entlang der Helixachse fällt zu gering für eine optimale Ausrichtung aus, wodurch der Kontakt zum σ^{70} -Faktor suboptimal für die Initiation ausfällt. Die *rrn*-P1-Promotoren erfordern für eine reibungslose Initiation eine *twist*-Erhöhung.

Bei Vergleich der *spacer*-Sequenzen (Abbildung 5.1) fällt der *rrnD*-*spacer* auf, er zeigt die stärkste Abweichung im Vergleich zu den anderen *rrn*-Operons. Direkt *downstream* der -35-Region befindet sich ein *A-cluster*. Der *twist* kann durch diese Sequenzabfolge so verändert werden, dass die Ausrichtung der beiden Konsensushexamere im Vergleich zu den anderen *rrn*-P1-Promotoren optimaler für die Initiation ausfällt. Da die Ausrichtung der beiden Konsensushexamere zueinander für eine optimale Interaktion mit dem σ^{70} -Faktor kritisch ist, kann der Sequenzunterschied des *rrnD*-*spacers* eine erleichterte Isoomerisierung zum offenen Komplex bedeuten oder die Stabilität dieses Komplexes erhöhen. Damit kann durchaus eine verminderte ppGpp-Sensitivität einher gehen [5]. Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Position von *A-cluster* innerhalb des *spacers* kritisch ist [61] und die Geschwindigkeit der offe-

nen Komplexbildung (k_2) enorm dadurch beeinflusst wird.

Im Gegensatz zu den unterwundenen *spacern* der *rrn*-P1-Promotoren existieren Promotoren mit *spacern* von 18 bzw. 19 bp (*his*-Promotor, *mer*-P_T-Promotor, [22], [90]). Diese überwundenen *spacer* erfordern eine Reduktion des *twists*. Viele Promotoren, die positiv durch ppGpp reguliert werden, weisen eine überwundenen *spacer* auf (*his*-Promotor, [104], [20]). Bei *twist*-sensitiven Promotoren beeinflusst die Superhelikalität den *twist* des *spacers* und somit die Ausrichtung der Konsensushexamere enorm, daher wird dieser Punkt in Abschnitt 5.3 ausführlicher diskutiert.

Der Diskriminator

Bei den sieben *rrn*-P1-Promotoren wurde direkt *downstream* der -10-Region der Diskriminator als notwendiges Element für die ppGpp-Sensitivität gefunden [134] (siehe Abbildung 5.2). Das Motiv GCGC tritt bei einigen negativ ppGpp-regulierten Promotoren auf, bei positiv regulierten Promotoren ist oft ein ATAT-Motiv an dieser Position vorhanden [67]. Es wurde postuliert, dass das GCGC-Motiv das Aufschmelzen im Vergleich zu einem ATAT-Motiv erschwert, was bei der Transkriptionsinitiation kritisch für die Stabilität des offenen und des ternären Komplexes ist. Das Element ist notwendig, aber nicht ausreichend für eine ppGpp-Sensitivität. Da bei allen sieben *rrn*-P1-Promotoren dieses GCGC-Motiv vorhanden ist, kann eine unterschiedliche ppGpp-Sensitivität nicht dadurch erklärt werden, wohl aber die generelle ppGpp-Inhibierung. Aktuelle Strukturaufklärungen legen eine Interaktion von ppGpp und Cytosinen nahe [3]. Die Cytosine des Diskriminators sind potentielle Kandidaten für diese Interaktion und erklärt, warum ein GCGC-Diskriminator im Gegensatz zu einem ATAT-Motiv die ppGpp-Inhibierung an dieser Position notwendig ist.

Die Initiationsnukleotide +1 und +2

Die meisten Promotoren starten mit einem Adenosin, in weniger als 5% liegt ein Guanosin oder ein Cytosin als Startnukleotid vor. Sechs der ribosomalen P1-Promotoren von *E. coli* starten ebenfalls mit A, das *rrnD*-Operon weist ein G vor. Die Startposition wird durch die Promotorumgebung definiert, abweichende Startpositionen treten unter artifiziiellen Transkriptionsbedingungen durchaus auf [55], [127], [130].

In der Vergangenheit kristallisierte sich heraus, dass der Einbau des Startnukleotids die grösste Barriere für eine erfolgreiche Initiation darstellt [57], [70], der ppGpp-Effekt scheint sich hier am stärksten auszuwirken und betrifft unmittelbar den ternären Komplex bei der Initiation (RP_{init} , siehe Abbildung 5.2). Strukturaufklärungen der RNA-Polymerase lassen mittlerweile die molekulare Betrachtung der ppGpp-Interaktion zu [115], [3], [92]. In Abbildung 5.4 ist die RNA-Polymerase-Struktur dargestellt.

Wie kann die ppGpp-Inhibierung molekular erklärt werden?

ppGpp gelangt durch den *secondary channel* ins aktive Zentrum der RNA-Polymerase und interagiert dort mit Mg^{2+} -Ionen und dem *template*-Strang. Es wurde eine Interaktion mit Cytosinen an den Positio-

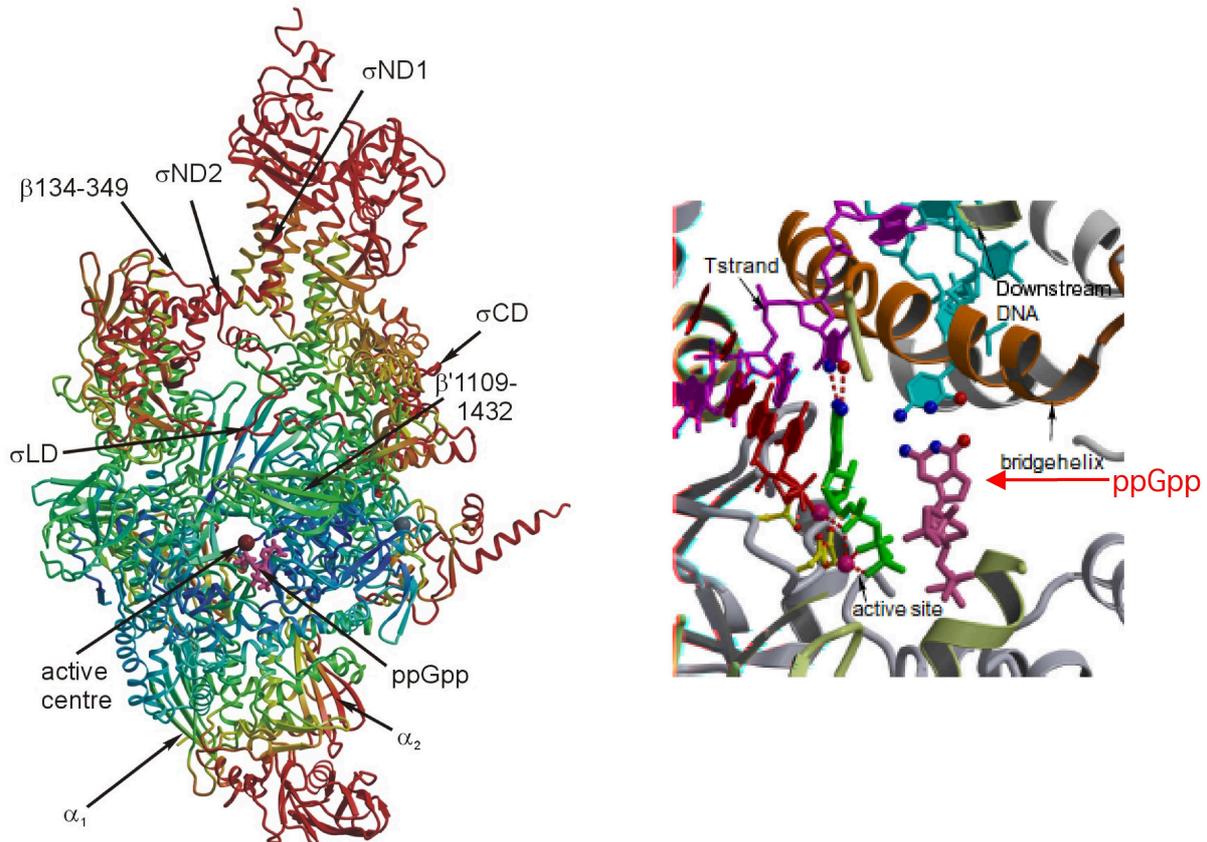


Abbildung 5.4: Molekulare Architektur der RNA-Polymerase von *Thermus thermophilus* in Komplex mit dem Effektormolekül ppGpp nach Perederina *et al.* Die Abbildung zeigt die resultierende dreidimensionale Struktur, die aufgrund von Röntgenstrukturanalysen im Komplex mit ppGpp erhalten wurden. In der linken Hälfte ist das gesamte Molekül dargestellt, rechts ist der Bereich des aktiven Zentrums vergrößert abgebildet. Zwei Nucleotide repräsentieren die beiden unterschiedlichen Orientierungen, die bei der Strukturaufklärung entdeckt wurden: grün stellt das einzubauende Nucleotid ATP dar, pink repräsentiert den Inhibitor ppGpp. Die Wechselwirkungen von ATP (grünes Molekül) mit den Magnesium-Ionen (magenta, Kugeln) und dem *template*-Strang (violett) sind eingezeichnet. Als *template* wurde der *rrnB*-P1-Promotor verwendet. Nach Perederina *et al.* [3].

nen -1 und -2 postuliert, was die Inhibierung an den *rrn*-P1-Promotoren erklären würde (siehe Abbildung 5.1). Andere Arbeiten widersprechen dieser Hypothese, die Position der aufgeschmolzenen DNA müsste für die Interaktion mit Cytosinen komplett neu ausgerichtet werden [76], [79]. Zudem konnte auch ein ppGpp-Effekt bei *templates* gezeigt werden, die an den erwähnten Positionen keine Cytosine aufweisen [5]. Es ist wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung zwischen ppGpp und Cytosinen des Diskriminators stattfinden kann, dafür müsste keine Konformationsänderung erfolgen.

In Zusammenhang mit dem Kompetitionsmodell [57] kann die Inhibierung plausibel erklärt werden. Der Einbau des Startnucleotids ist kritisch an solchen *template*-Positionen, bei denen ein hoher K_m -Wert für das einzubauende Nucleotid vorliegt. Gelangt ppGpp in das aktive Zentrum während des Initiationsprozesses, interagiert es dort mit den katalytisch wirkenden Mg^{2+} -Ionen. Der Prozess ist nicht irreversibel. Da die Position des ppGpp-Moleküls mit der Position für den Nucleotideinbau überlappt,

inhibiert ppGpp den Nukleotideinbau vor allem dort, wo eine hohe Konzentration an NTP erforderlich ist. ppGpp selbst kann nicht um den Einbau in das naszierende Transkript konkurrieren. Durch hohe NTP-Konzentrationen kann diese Inhibierung wieder aufgehoben werden.

Wie kann eine differentielle ppGpp-Sensitivität der ribosmalen P1-Promotoren von *E. coli* erklärt werden? Vergangene Arbeiten zeigten, dass für eine erfolgreiche Initiation an den *rrn*-P1-Promotoren die Startnukleotid-Konzentration kritisch ist. Grund dafür ist die Instabilität der offenen Komplexe, die die Anwesenheit von hohen NTP-Konzentrationen brauchen, damit eine Reaktion zum Initiationskomplex erfolgen kann. Da die *rrn*-P1-Promotoren einen auffallend hohen Konzentrationsbedarf für das Startnukleotid zeigen, konnte erst bei hohen Nukleotid-Konzentrationen eine maximale Transkriptionseffizienz nachgewiesen werden, die ppGpp-Inhibierung wurde mit zunehmenden Startnukleotid-Konzentrationen schwächer [4], [57], diese Arbeit. Eine differentielle ppGpp-Sensitivität wird daher plausibel durch unterschiedliche Konzentrationsbedürfnisse, die durch K_m -Werte repräsentativ ausgedrückt werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Startnukleotidkonzentration auf die ppGpp-Inhibierung ausführlich untersucht. Dabei konnte in der Tat sowohl bei linearen als auch bei superhelikalen *templates* ein unterschiedlicher K_m -Wert für das Startnukleotid festgestellt werden. Promotoren, die eine starke ppGpp-Sensitivität zeigten (*rrnB*, *rrnH*), wiesen schon bei geringen ppGpp-Konzentrationen eine halbmaximale Inhibierung auf (siehe K_i -Wert-Bestimmungen, 4.1.3, Tabelle 4.3 und 4.1.4, Tabelle 4.6). Diese Promotoren zeigten gleichzeitig einen höheren Bedarf an Startnukleotid für eine vergleichbare Transkriptionseffizienz (siehe 4.1.3, Tabelle 4.4 und 4.4, Tabelle 4.11).

Der *rrnD*-P1-Promotor zeigte die schwächste ppGpp-Sensitivität und wurde schon bei geringen Startnukleotid-Konzentrationen maximal transkribiert, der K_m -Wert für das Startnukleotid fiel bei diesem Promotor am geringsten aus.

Wodurch wird der Konzentrationsbedarf für eine diskrete Nukleotidposition beeinflusst? Wie bei der Determination des Transkriptionsstarts beeinflusst die gesamte Promotorstruktur auch den Nukleotidbedarf an der Startposition. Alle bisher besprochenen Parameter, die die Transkription bzw. die Stabilitäten der einzelnen Transkriptionskomplexe beeinflussen, können dazu beitragen:

- Die dreidimensionale Ausrichtung der UAS-Region, sie beeinflusst frühe Schritte der Initiation. Die Krümmung und der Kontakt mit dem UP-Element erleichtern die Bildung vom geschlossenen und offenen Komplex. Unterschiedliche Konformationen äußern sich somit in unterschiedlichen Transkriptionseffizienzen.
- Die Konsensushexamere. Der Kontakt der σ^{70} -Untereinheit zu den Konsensushexameren wird durch die Sequenz dieser Hexamere und durch deren Ausrichtung zueinander maßgeblich bestimmt, Unterschiede in den Sequenzen scheinen auch hier mit der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz zu korrelieren.
- Der *spacer*. Er ist für die angulare Orientierung der beiden Konsensushexamere essentiell. Der *rrnD*-*spacer* könnte eine optimalere Struktur als die restlichen sechs Promotoren besitzen.

Vergangene Arbeiten zeigten, dass die Konzentration des zweiten Initiationsnukleotids ebenfalls eine erhebliche Rolle bei der Transkriptionseffizienz spielt. Gralla *et al.* konnten nachweisen, dass die Konzentration von CTP für Position +2 bei dem *rrnB*-P1-Promotor zwar einen niedrigeren K_m -Wert im Vergleich zu dem Startnukleotid aufweist, im Vergleich zu dem dritten Nukleotid jedoch einen deutlichen Einfluss auf die Transkriptionseffizienz zeigt [71]. Dies wurde bisher nicht für den *rrnD*-P1-Promotor gezeigt, er weist an zweiter und dritter Position ein Thymin auf. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionen wurde alle in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ +2-NTP (C oder U) durchgeführt. Experimente mit nicht-radioaktiven Nukleotiden zeigten, dass zwar die Transkriptionseffizienz in Gegenwart von hohen Konzentrationen gesteigert wird, der ppGpp-Effekt jedoch gleich stark ausfällt (Daten nicht gezeigt). Daher wird die Relevanz der Ergebnisse nicht abgeschwächt. Der Konzentrationsbedarf am +2-Nukleotid wird sicherlich ebenfalls stark durch die Promotorumgebung beeinflusst. Durch Austauschsubstitution konnten mehrere Arbeiten nachweisen, dass die Position unveränderliche Konzentrationen benötigt, d.h. die Art des Nukleotids spielt bei dem Konzentrationsbedarf eine untergeordnete Rolle. Wie bei der Beeinflussung des Konzentrationsbedarfs für das Startnukleotid wird auch hier die Promotorumgebung den Konzentrationsbedarf des +2-Nukleotids beeinflussen [71], [62].

Die Promotorelemente können alle durch ihren Einfluss auf den Konzentrationsbedarf für das Startnukleotid zur differentiellen ppGpp-Sensitivität der ribosomalen P1-Promotoren von *E. coli* beitragen. Mutationsanalysen in den Konsensushexameren, im *spacer*, im Diskriminator und im Startnukleotid bewirkten entweder eine abgeschwächte Inhibierung oder eine vollkommene Insensitivität gegenüber ppGpp [31], [56], [62]. Daher können Sequenzabweichungen innerhalb der *core*-Promotorregion einen grossen Einfluss auf die differentielle ppGpp-Sensitivität ausüben, ein direkter Zusammenhang zwischen Konzentrationsbedarf und ppGpp-Sensitivität konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

5.3 Einfluss der Superhelikalität auf die ppGpp-Sensitivität

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Superhelikalität auf die Transkriptionseffizienz der ribosomalen P1-Promotoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription um ein vielfaches gesteigert wird, wenn superhelikale *templates* verwendet werden. Die ppGpp-Sensitivität fiel unter gleichen Voraussetzungen schwächer als bei linearen *templates* aus. Wie kann das erklärt werden?

Die Superhelikalität beeinflusst die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor und die Bildung des offenen Komplexes [123], [102]. Experimente mit verschiedenen Promotoren zeigten, dass diese durch entweder positive oder negative Superhelikalität aktiviert werden. Im Fall des *rrnB*-P1-Promotors wurde eine Aktivierung durch negative Superhelikalität detektiert [102].

In Bakterien werden superhelikale Windungen durch die Enzyme Topoisomerase I und II (Gyrase) eingeführt. Diese Enzyme reagieren auf Umweltveränderungen, die superhelikale Dichte resultiert aus dem Gleichgewicht der beiden Enzymaktivitäten (homöostatische Regulation) [33]. Bei optimalen Wachstumsbedingungen liegt eine mittlere superhelikale Dichte von -0,05 der chromosomalen und

der Plasmid-DNA vor [123], [34], [35]. Negativ superhelikale DNA ist leichter aufzuschmelzen. Dadurch wird die gesteigerte Transkriptionseffizienz bei *in vitro* und *in vivo* Analysen von superhelikalen *rrn-P1*-Promotoren plausibel.

Bei einer superhelikalen Dichte von -0,05 liegt alle 200 bp eine superhelikale Drehung vor. Die gesamte Promotorstruktur wird dadurch räumlich verändert, die Krümmung der UAS-Region und der Kontakt mit dem UP-Element können optimaler für eine Promotorerkennung ausgerichtet werden. Auch die beiden Konsensushexamere erfahren eine optimalere Orientierung, der *twist* wird verändert und die Promotorerkennung verläuft sehr viel effizienter. Die erforderliche Konzentration an Startnukleotid kann dadurch gesenkt werden, was ebenfalls in dieser Arbeit beobachtet werden konnte (vergleiche K_m -Werte bei linearen und bei superhelikalen *templates*, Abschnitte 4.1.3 und 4.4). Die Konsequenz daraus ist logisch: Die Inhibierung durch gleiche ppGpp-Konzentrationen fallen bei superhelikalen *rrn-P1*-Promotoren schwächer aus.

5.4 Kann die Konformation der *upstream* gelegenen Sequenzen der *rrn-P1*-Promotoren direkt mit der ppGpp-Sensitivität korreliert werden?

Die Beantwortung der Frage erfordert eine Differenzierung. Die basale Transkriptionsstärke wird deutlich durch die UAS-Regionen beeinflusst. Bei den sieben *rrn-P1*-Promotoren korreliert die Stärke der Krümmung mit der Transkriptionseffizienz. In dieser Arbeit zeigten die starken nativen P1-Promotoren auch gleichzeitig eine schwache ppGpp-Sensitivität.

Die *in vivo* und *in vitro* Analysen mit vier synthetischen Konstrukten zeigten jedoch, dass die Stärke der Krümmung und die basale Transkription nicht allein ausreichen, um eine schwache ppGpp-Sensitivität zu erklären. Vielmehr trat der gesamte Promotorkontext in den Vordergrund, die Kombination der einzelnen Elemente und ihr Einfluss auf die Gesamtarchitektur determinierten den K_m -Wert und die ppGpp-Inhibierungsstärke.

Daher kann resümiert werden, dass die UAS-Region inklusive dem UP-Element die dreidimensionale Struktur definieren und sich maßgeblich auf den K_m -Wert des Startnukleotids auswirken, diesen jedoch nicht allein bestimmen. Daran sind die Promotorelemente -35- und -10-Region sowie der *spacer* zusätzlich beteiligt. Alle Elemente tragen zu den K_m -Werten bei, was mit der ppGpp-Sensitivität korrelieren kann, jedoch nicht zwingend einher gehen muss.

5.5 Kann bei den *rrn*-P1-Promotoren ein Promotorkontext formuliert werden, der eine schwache ppGpp-Sensitivität hervorruft?

Die Frage kann mit ja beantwortet werden. Die *in vitro* Analysen mit den nativen *rrn*-P1-Promotoren identifizierten den *rrnD*-P1-Promotor mit der schwächsten ppGpp-Sensitivität. Durch die Erstellung vier neuer Promotorkonstrukte wurde der Einfluss einzelner Promotorelemente auf die basale Transkription und die ppGpp-Sensitivität sichtbar. Alle vier Konstrukte wiesen bei *in vitro*-Analysen mit linearen *templates* eine sehr starke Transkriptionseffizienz auf, die die Effizienz der nativen Promotoren z.T. drastisch übertraf.

Die ppGpp-Sensitivität fiel jedoch stärker als bei dem *rrnD*-Promotor aus. Erst bei *in vitro* Analysen mit superhelikalen *templates* zeigten zwei Konstrukte eine vergleichbar schwache ppGpp-Sensitivität: *rrnB*(-) und *rrnD*(-). Bei diesen Promotoren ist eine starke Abhängigkeit von der DNA-Topologie ersichtlich. Die Kombination der Promotorelemente scheint unter superhelikalen Bedingungen für eine schwache ppGpp-Sensitivität ähnlich stark wie bei dem *rrnD*-Promotor zu sein. Beide Konstrukte weisen jeweils das UP-Element und den *core*-Promotor von einem *rrn*-Operon auf, die UAS-Region stammt jeweils von einem anderen *rrn*-Operon. Die Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

- Die Kombination von UAS-Region und dem zugehörigen UP-Element ist für die ppGpp-Sensitivität nicht so relevant
- Die Kombination von UP-Element mit dem zugehörigen Promotor wirkt sich drastisch auf die ppGpp-Sensitivität aus
- Der Einfluss der *rrnD*-UAS-Region auf die ppGpp-Sensitivität ist stark, die Kombination aller drei Elemente fällt bei dem *rrnD*-Promotor am günstigsten aus.

Wird die UAS-Region des *rrnD*-Promotors durch die *rrnB*-UAS-Region ausgetauscht, fällt die ppGpp-Sensitivität höher als beim nativen Promotorkontext aus. Bei dem *rrnB*-Promotor verhält es sich umgekehrt: Wird die UAS-Region des *rrnD*-Operons mit dem UP-Element und den *core*-Promotor des *rrnB*-Operons fusioniert, so zeigt der resultierende Promotor eine viel schwächere ppGpp-Sensitivität als der native *rrnB*-P1-Promotor.

Demnach ist die UAS-Region des *rrnD*-Operons sowohl für den *rrnD*- als auch für den *rrnB*-P1-Promotor mit den zugehörigen UP-Elementen durchaus für eine schwache ppGpp-Sensitivität *in vitro* verantwortlich. Insgesamt kristallisiert sich der native *rrnD*-P1-Promotor als „der“ Promotorkontext für eine schwache ppGpp-Sensitivität heraus.

5.6 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ppGpp-Sensitivität der vier neuen Konstrukte *in vivo* durch Auslösen der Stringenten Kontrolle mit Serinhydroxamat analysiert. Im Vergleich zu vorherigen Arbeiten wurden alle vier Konstrukte stärker als der *rrnD*-P1-Promotor inhibiert [17], *rrnB*(-) zeigte die schwächste ppGpp-Sensitivität. Wie kann die Diskrepanz zu den *in vitro* Analysen erklärt werden? Warum zeigen die *in vitro* Analysen im Vergleich zu den *in vivo* Analysen nicht ein gleiches Transkriptionsniveau? Bei den *in vitro* Analysen kann der reine ppGpp-Effekt auf die Transkription beobachtet werden, unabhängig von beeinflussenden Proteinen. Die Transkriptionseffizienz in Abwesenheit von ppGpp resultiert aus den Einflüssen der oben besprochenen Promotorelemente auf die Interaktion mit der RNA-Polymerase. Unter *in vivo* Bedingungen spielt das Protein DksA eine tragende Rolle bei der ppGpp-Inhibierung [14], [91]. Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Anwesenheit des Proteins für eine effiziente Inhibierung absolut essentiell ist [91]. Es ist daher möglich, dass die Stringente Kontrolle in Kombination mit DksA die Transkription der jeweiligen P1-Promotoren auf ein Niveau herunter reguliert wird. Die Bedeutung der einzelnen Promotorelemente auf die Transkription bzw. die ppGpp-Sensitivität tritt aufgrund der effizienten Inhibierung zurück.

Einen Grund für die Diskrepanzen können zudem die Transkriptionseffizienzen der Promotoren liefern. Die basalen Transkriptionsraten unterschieden sich bei den vier Konstrukten deutlich, hier wurde jedoch im Vergleich zu den *in vitro* Analysen ein gegensätzlicher Zusammenhang zwischen basaler Transkription und ppGpp-Sensitivität beobachtet: Die starken Promotoren wurden stark durch ppGpp inhibiert. Dieses Verhalten konnte schon vorher beobachtet werden [17]. Die basale Transkription wird in einer Bakterienzelle nicht durch die Startnukleotide limitiert, sie wird durch viele Faktoren positiv oder negativ beeinflusst. Proteine wie FIS und H-NS beeinflussen die *rrn*-Transkription wachstumsphasenabhängig. Das in der exponentiellen Phase exprimierte FIS-Protein stimuliert die Transkription der ribosomalen P1-Promotoren [39], [84], H-NS reprimiert die *rrn*-P1-Promotoren in der stationären Phase [117], [1]. Beide Proteine verursachen durch die Bindung an die DNA eine Krümmung [2].

Hier wurden die *in vivo* Analysen während der exponentiellen Phase durchgeführt, daher kann eine schwache basale Transkriptionseffizienz mit einer schwachen Aktivierung durch Fis einhergehen. Im Falle einer schwachen Aktivierung durch FIS würde die Inhibierung durch ppGpp nicht so drastisch wie bei stark aktivierten Promotoren ausfallen. Die Abbildung 4.41 zeigt, dass die Transkriptionsniveaus nach Auslösen der Stringenten Kontrolle sehr ähnlich ausfallen, was darauf hin deutet, dass die Inhibierung im Vergleich zur basalen Transkription zwar unterschiedlich stark ausfällt, ppGpp jedoch einen nahezu gleichen Effekt auslöst. Für die Bestätigung dieser Hypothese müssten jedoch Analysen in *fis*⁻-Stämmen durchgeführt werden.

5.7 Korrelation zu anderen Arbeiten

Analysen der Stringenten Kontrolle bei allen oder individuellen *rrn*-P1-Promotoren lassen einen detaillierten Einblick in die unterschiedliche Regulation durch ppGpp zu.

In vivo Analysen mit allen sieben nativen *rrn*-P1-Promotoren zeigten, dass das *rrnD*-Operon die schwächste ppGpp-Sensitivität aufweist und in der exponentiellen Phase am schwächsten transkribiert wird. Die ppGpp-Sensitivität der restlichen sechs rRNA-Operons unterschieden sich nur leicht und fielen deutlich stärker aus. Die basale Transkription aller anderen sechs *rrn*-Operons übertraf die des *rrnD*-Operons bei weitem [17].

In dieser Arbeit konnte das *rrnD*-Operon ebenfalls als schwächstes durch ppGpp inhibiertes Operon nachgewiesen werden.

Experimente, in denen das Startnukleotid +1 bzw. die Position +3 des *rrnD*-P1-Promotors mutiert wurde, zeigten, dass die ppGpp-Sensitivität dadurch verändert wird, jedoch nicht allein von der Art der Initiationsnukleotide allein abhängt.

In der Vergangenheit wurden alle sieben *rrn*-P1-Promotoren auf die faktorabhängige und faktorunabhängige Regulation untersucht. Bindungsstudien mit H-NS, StpA, FIS und Lrp zeigten eine unterschiedliche Affinität der Proteine zu den ribosomalen P1-Promotoren, was sich einer unterschiedlich starken oder schwachen Aktivierung der Transkription äußerte [52]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die 70S-Ribosomen von *E. coli* aus unterschiedlichen Populationen bestehen, was sich in einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Untereinheiten 30S und 50S bezüglich der drei rRNAs von unterschiedlichen *rrn*-Operons äußerte. Je nach Zusammensetzung konnte unter Stressbedingungen wie *heat shock* oder *cold shock* eine unterschiedliche Fitness nachgewiesen werden [113], [75].

Alle bisher genannten Arbeiten zeigen, dass die Transkription der ribosomalen RNAs in *E. coli* stark durch die erwähnten Promotorelemente reguliert werden. Die Sequenzunterschiede, die in einer veränderten dreidimensionalen Konformation vorliegen, tragen maßgeblich zu dieser differenzierten Regulation bei. Sequenzunterschiede innerhalb der UAS-Region bewirken Konformationsunterschiede und verändern somit die Erkennung bzw. Bindung von Proteinen an diese Region, wovon die RNA-Polymerase-Bindung, die Aktivierung durch FIS und weitere regulatorische Proteine betroffen sind. Sequenzunterschiede in den *core*-Promotoren wirken sich vor allem auf die Transkriptionsinitiation aus, die Isomerisierungen der verschiedenen RNA-Polymerase-Promotorkomplexe wird hier stark beeinflusst. Unterschiede in den Strukturgenen der 16S, 23S und 5S RNA resultieren in unterschiedlichen Ribosomenpools, die eine unterschiedliche Translationsfitness unter Stressbedingungen zeigen. Die differentielle Regulation der sieben *rrn*-Operons muss daher einen physiologischen Sinn haben. In *E. coli* können Stresssituationen durch diskrete Operons bewältigt werden.

Zukünftige Arbeiten sollten die Bedeutung des *spacers* fokussieren. Durch Austausch der *spacer*-Region des *rrnD*-P1-Promotors könnte die Relevanz des *spacers* bezüglich der ppGpp-Sensitivität näher analysiert werden. Er kann durchaus den i-Punkt der schwachen ppGpp-Sensitivität bei dem *rrnD*-P1-Promotor darstellen.

6 Material

6.1 Allgemeines

Verwendete Lösungen und Medien wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser hergestellt, im Folgenden als *Aqua dest.* bezeichnet. *Aqua dest.* wurde von der hauseigenen Anlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Est. 41237-MA-1“ der MILIPORE GmbH aus Neu-Isenburg bezogen. Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien betrug, wenn nicht explizit erwähnt, „pro analysis“.

6.2 Bakterienstämme und Plasmide

6.2.1 Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DG 156	RNaseI ⁻	Gesteland (1966)
HB101	F ⁻ , <i>proA2</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL20</i> , Str ^r , <i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), λ ⁻	Boyer und Roulland-Dussoix (1969)
MRE 600	RNaseI ⁻	Laborstamm
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> ⁻¹ , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , [F ⁻ , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10 (Tetr)]	Stratagene (William Bullock, nicht publiziert)
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph</i> ⁻¹	Mark Guyer, urspr. W1485 von Joshua Lederberg, stammt direkt von K-12 ab
CF 1651	F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph</i> ⁻¹ , <i>relA251::kan-r</i> (=Δ(209-2302)::kan)	Metzger <i>et al.</i> 1989
CP78	F ⁺ , <i>thi</i> ⁻ , <i>leu</i> ⁻ , <i>thr</i> ⁻ , <i>his</i> ⁻ , <i>arg</i> ⁻ , <i>mal</i> ⁻ , <i>xyl</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>str</i> ^s , <i>relA</i> ⁺	Fiil, N. and Friesen, D. (1968)
CP79	siehe CP78 ausser: <i>relA</i> ⁻	siehe CP78

Tabelle 6.1: Verwendete *E. coli*-Stämme

6.2.2 Plasmide

- pKK232-8 Derivat aus pBR322 (Amp^r und pKK232-8 (*cat*-Gen); Promotortestvektor durch promotorloses Chloramphenicolacetyltransferase- (*cat*-) Gen zwischen der *multiple cloning site* (MCS) und der Terminatorregion des *rrnB*-Operons (Brosius, 1984)
- pHD1-A Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnA*-Operons von -244 bis +18 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-B Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnB*-Operons von -264 bis +18 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-C Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnC*-Operons von -234 bis +18 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-D Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnD*-Operons von -252 bis +15 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-E Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnE*-Operons von -273 bis +16 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-G Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnG*-Operons von -257 bis +18 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pHD1-H Derivat von pKK232-8 mit einklonierter Promotorsequenz vor dem *cat*-Gen; Region des *rrnH*-Operons von -245 bis +18 bp des P1-Promotors; Freundliche Gabe von A. Hillebrand
- pUC18-1 Derivat von pUC18 (Viera und Messing 1982; Yarnish-Perron *et al.* 1985). Enthält ein 235 bp langes Fragment des *rrnB*-Operons von *E. coli* aus pKK 3535 in der *SmaI*-Schnittstelle (Zacharias *et al.*, 1990)
- pCP1 Derivat von pUC18 mit einklonierter Terminatorsequenz (siehe T₁T₂-Fragment) des *rrnB*-Operons von *E. coli*. Die Grösse beträgt 2981 bp, die Terminatorregion reicht von Position 249 bis 543
- pCP2 Derivat von pKK232-8: UAS-Region des *rrnB*-Operons mit UP-Element des *rrnB*-Operons ligiert mit core-Promotor des *rrnD*-Operons
- pCP3 Derivat von pKK232-8: UAS-Region des *rrnB*-Operons mit UP-Element des *rrnD*-Operons ligiert mit core-Promotor des *rrnD*-Operons
- pCP4 Derivat von pKK232-8: UAS-Region des *rrnD*-Operons mit UP-Element des *rrnD*-Operons ligiert mit core-Promotor des *rrnB*-Operons
- pCP5 Derivat von pKK232-8: UAS-Region des *rrnD*-Operons mit UP-Element des *rrnB*-Operons ligiert mit core-Promotor des *rrnB*-Operons

6.3 Nukleinsäuren

6.3.1 Molekulargewichtsmarker

Kb-Leiter GIBCOBRL, Eggenstein
 Smartladder (SmL) EUROAGENTEC, Seraing, Belgien
 pBR322xHaeIII freundliche Gabe von B. Esters

6.3.2 DNA-Fragmente

Bezeichnung	Beschreibung	Grösse
P1-Fragment	Durch Restriktion aus pUC18-1 erhaltene Region des <i>rrnB</i> -P1-Promotors	262 bp (Sequenz von -200 bis +62 des P1-Starts)
<i>rrnA</i> -Fragment	Durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pHD1-A gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region plus 18 bp „downstream“ vom P1 des <i>rrnA</i> -Operons, sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	467 bp (Sequenz von 177 bis 644 des pHD1-A)
<i>rrnB</i> -Fragment	Äquivalent zum <i>rrnA</i> -Fragment, entsprechende Sequenzen des <i>rrnB</i> -Operons	487 bp (Sequenz von 177 bis 664 des pHD1-B)
<i>rrnC</i> -Fragment	Äquivalent zum <i>rrnA</i> -Fragment, entsprechende Sequenzen des <i>rrnC</i> -Operons	456 bp (Sequenz von 177 bis 633 des pHD1-C)
<i>rrnD</i> -Fragment	Durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pHD1-D gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region plus 15 bp „downstream“ vom P1 des <i>rrnD</i> -Operons, sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	472 bp (Sequenz von 177 bis 649 des pHD1-D)
<i>rrnE</i> -Fragment	Durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pHD1-E gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region plus 16 bp „downstream“ vom P1 des <i>rrnE</i> -Operons, sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	493 bp (Sequenz von 177 bis 670 des pHD1-E)

Bezeichnung	Beschreibung	Grösse
<i>rrnG</i> -Fragment	Äquivalent zum <i>rrnA</i> -Fragment, entsprechende Sequenzen des <i>rrnG</i> -Operons	480 bp (Sequenz von 177 bis 657 des pHD1-G)
<i>rrnH</i> -Fragment	Äquivalent zum <i>rrnA</i> -Fragment, entsprechende Sequenzen des <i>rrnH</i> -Operons	458 bp (Sequenz von 177 bis 635 des pHD1-H)
<i>rrnB</i> (+)-Fragment	Durch Klonierung erhaltenes Fragment, durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pCP2 gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region inkl. UP-Element des <i>rrnB</i> -Operons von <i>E. coli</i> , fusioniert mit dem <i>core</i> -Promotor des <i>rrnD</i> -Operons inkl. 15 bp downstream des P1-Promotors sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	484 bp
<i>rrnB</i> (-)-Fragment	Durch Klonierung erhaltenes Fragment, durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pCP3 gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region des <i>rrnB</i> -Operons von <i>E. coli</i> , fusioniert mit dem UP-Element und dem <i>core</i> -Promotor des <i>rrnD</i> -Operons inkl. 15 bp downstream des P1-Promotors sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	484 bp
<i>rrnD</i> (+)-Fragment	Durch Klonierung erhaltenes Fragment, durch Restriktion mit <i>EcoRI</i> und <i>PvuII</i> aus pCP4 gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region inkl. UP-Element des <i>rrnD</i> -Operons von <i>E. coli</i> , fusioniert mit dem <i>core</i> -Promotor des <i>rrnB</i> -Operons inkl. 18 bp downstream des P1-Promotors sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	475 bp

Bezeichnung	Beschreibung	Grösse
<i>rrnD</i> (-)-Fragment	Durch Klonierung erhaltenes Fragment, durch Restriktion mit <i>Eco</i> RI und <i>Pvu</i> II aus pCP5 gewonnenes Fragment, enthält die vollständige UAS-Region des <i>rrnD</i> -Operons von <i>E. coli</i> , fusioniert mit dem UP-Element und dem <i>core</i> -Promotor des <i>rrnB</i> -Operons inkl. 18 bp downstream des P1-Promotors sowie 198 bp des nachfolgenden <i>cat</i> -Gens	475 bp

Tabelle 6.2: Verwendete DNA-Fragmente

6.3.3 Desoxyoligonukleotide

Bezeichnung	Beschreibung	Sequenz
Oligo 220196	Komplementär von +30 bis +13 zum (+)-Strang des <i>cat</i> -Gens in pKK232-8; Komplementär zu +53 bis +36 relativ zum P1-Start der Plasmide pHD1-A, -B, -C, -G und -H; Komplementär zu +51 bis +34 zum P1-Start von pHD1-E; Komplementär zu +50 bis +33 zum P1-Start von pHD1-D	5' CCTACT- CAAGCTTGGCTG 3'
Oligo 5-B	Komplementär von -264 bis -245 relativ zum P1-Start des <i>rrnB</i> -Operons (<i>template</i> -Strang)	5' GATTCTGGCG- CAGCGATTGC 3'
Oligo 5-D	Komplementär von -252 bis -233 relativ zum P1-Start des <i>rrnD</i> -Operons (<i>template</i> -Strang)	5' CGATCATTACG- CGCTGACCG 3'
Oligo 5-AatII	Hybridisiert von 5263 bis 5282 an den unteren Strang des pHD1-B-Plasmids, wurde als <i>upstream</i> -Oligo für die PCR der vier neuen Konstrukte verwendet	5' GGGGTTCCGCGCA- CATTTCC 3'
Oligo 3'-UAS-B+up	Hybridisiert von 388 bis 412 an den oberen Strang von pHD1-B, stellt die komplementäre Sequenz des <i>rrnB</i> -UP-Elements dar	5' GAGGAAATT- TAAAATAATTTTCT- GACC 3'

Bezeichnung	Beschreibung	Sequenz
Oligo 3'-UAS-B-up	Hybridisiert von 366 bis 387 an den oberen Strang von pHD1-B	5' GCGCAACATTCAA- CCAAATC 3'
Oligo 3'-UAS-D+up	Hybridisiert von 373 bis 400 an den oberen Strang von pHD1-D, stellt die komplementäre Sequenz des <i>rrnD</i> -UP-Elements dar	5' GTATTTTTTTGAT- CTTTTTTCTGTTG 3'
Oligo 3'-UAS-up	Hybridisiert von 352 bis 373 an den oberen Strang von pHD1-D	5' GTTGTTTTTTCAC- CCTTTTTGCTGC 3'
Oligo 5'-core-B+up	Hybridisiert von 388 bis 412 an den unteren Strang von pHD1-B, stellt die Sequenz des <i>rrnB</i> -UP-Elements dar	5' GGTCAGAAAAT- TATTTTAAATTCCTC 3'
Oligo 5'-core-B-up	Hybridisiert von 413 bis 433 an den unteren Strang von pHD1-B, <i>upstream</i> -Ende beinhaltet die -35-Region von <i>rrnB</i>	5' TTGTCAGGCCG- GAATAACTCC 3'
Oligo 5'-core-D+up	Hybridisiert von 373 bis 400 an den unteren Strang von pHD1-D, stellt die Sequenz des <i>rrnD</i> -UP-Elements dar	5' AAACA- GAAAAAAGAT- CAAAAAATAC 3'
Oligo 5'-core-D-up	Hybridisiert von 401 bis 422 an den unteren Strang von pHD1-D, <i>upstream</i> -Ende beinhaltet die -35-Region von <i>rrnD</i>	5' TTGTG- CAAAAAATTGG- GATCC 3'
Oligo 3'-core-cat	Hybridisiert von 723 bis 746 im <i>cat</i> -Gen bei pHD1-B und von 708 bis 731 bei pHD1-D	5' GGCGGGCAA- GAATGTGAATAAAG 3'

Tabelle 6.3: Verwendete Desoxyoligonukleotide

6.3.4 Nukleotide/Desoxyoligonukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
Adenosin-5'-($\gamma^{32}\text{P}$)triphosphat	HARTMANN, Braunschweig
Adenosin-5'-triphosphat, <i>ultra pure</i>	PFIZER PHARMA GMBH, Karlsruhe
Cytidin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
Cytidin-5'-($\alpha^{32}\text{P}$)triphosphat	HARTMANN, Braunschweig
Cytidin-5'-triphosphat, <i>ultra pure</i>	PFIZER PHARMA GMBH, Karlsruhe
Guanosin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
Guanosin-5'-($\alpha^{32}\text{P}$)triphosphat	HARTMANN, Braunschweig
Guanosin-5'-triphosphat, <i>ultra pure</i>	PFIZER PHARMA GMBH, Karlsruhe
Uridin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim

Uridin-5'-($\alpha^{32}\text{P}$)triphosphat	HARTMANN, Braunschweig
Uridin-5'-triphosphat, <i>ultra pure</i>	PFIZER PHARMA GMBH, Karlsruhe
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	BOEHRINGER, Mannheim

6.4 Proteine

6.4.1 Nukleasen

RNaseA	SIGMA, St. Louis/USA
<i>AatII</i>	NEW ENGLAND BIOLABS (NEB), Massachusetts/USA
<i>BsrBI</i>	NEW ENGLAND BIOLABS (NEB), Massachusetts/USA
<i>EcoRI</i>	MBI FERMENTAS, Maryland/USA
<i>PvuII</i>	MBI FERMENTAS, Maryland/USA
<i>SalI</i>	MBI FERMENTAS, Maryland/USA

6.4.2 Polymerasen

RNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Holoenzym-Präparation durch R. Wurm, Präparation nach Jendrisak [15], Protokoll verändert nach Gonzales <i>et al.</i> [43]; Charakterisierung der Präparation nach Chamberlin <i>et al.</i> [23] Konz. an aktiver RNA-Polymerase = 121,672 ng/ μl (22,7% aktives Enzym)
T7-DNA-Polymerase (Sequense 2.0)	UNITED STATES BIOCHEMICALS/USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PROMEGA, Wisconsin/USA
AMV Reverse Transkriptase	PROMEGA, Wisconsin/USA
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	STRATAGENE, California/USA
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	PROMEGA, Wisconsin/USA

6.4.3 Sonstige Proteine

<i>calf intestine phosphatase</i> (CIP)	ROCHE, Mannheim
T4-DNA-Ligase	ROCHE, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	NEW ENGLAND BIOLABS (NEB), Massachusetts/USA

6.5 Allgemeine Puffer und Medien

Formamid-Probenpuffer	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol 95 % deionisiertes Formamid 50 mM Tris-Borat, pH 8,3 25 mM EDTA, pH 8,0
1xTAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
2xTAE-Probenpuffer	0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin in 2xTAE-Puffer
1xTBE-Puffer	89 mM Tris-Borat, pH 8,3 2,5 mM EDTA, pH 8,0
2xTBE-Probenpuffer	0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol 30 % Glycerin in 2xTBE-Puffer
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
Top-Agar	10 g/l Trypton 8 g/l NaCl 6 g/l Agar in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren

L-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Natriumchlorid 5 g/l Hefe-Extrakt in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7,4 mit NaOH eingestellt
SOB-Medium	20 g/l Trypton 0,5 g/l Natriumchlorid 5 g/l Hefe-Extrakt 50 mM MgSO ₄ in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7,4 mit NaOH gestellt
SOC-Medium	SOB-Medium 20 ml/l 20% Glucose
YT-Medium	8 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt
YT-Medium mit Chloramphenicol	YT-Medium 20 oder 30 µg/ml Chloramphenicol
YT-Festmedium	YT-Medium mit 15 g/l Agar
1xKaliumglutamat-Puffer	50 mM Tris-Acetat, pH 8,0 10 mM Magnesiumacetat 1mM Dithiothreitol 0,1 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml BSA _{acetyliert} 80 bis 250 mM Kaliumglutamat
AB-Diluent	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 10 mM β-Mercaptoethanol 50 mM NaCl 100 µg/ml BSA _{acetyliert} 0,1 mM EDTA, pH 8,0 5% (v/v) Glycerin
<i>chase</i> -Lösung	2 mM ATP, CTP, GTP und UTP 2 mg/ml Heparin

1 mM Tris/HCl, pH 7,0

6.6 Feinchemikalien

Bezeichnung	Quelle
Acrylamid	SERVA, Heidelberg
Agar	GIBCO BRL, Eggenstein
Agarose	SIGMA, St. Louis/USA
Agarose ultrapure	SEAKEM, Hamburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK, Darmstadt
Brij 35	ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
Chloramphenicol	BOEHRINGER, Mannheim
Dichlormethylsilan	JANSSEN CHIMICA, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	JANSSEN, Beerse/Belgien
Ethidiumbromid	BOEHRINGER, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	MERCK, Darmstadt
Formaldehyd	RIEDEL-DE-HAEN
Formamid	J.T.BAKER, Gross-Gerau
Glycerin	J.T. BAKER, Gross-Gerau
Glycogen	BOEHRINGER, Mannheim
Harnstoff	BOEHRINGER, Mannheim
Hefeextrakt	GIBCO BRL, Eggenstein
Heparin	SIGMA, St. Louis/USA
Hydroxychinolin	GIBCO BRL, Eggenstein
Kaliumglutamat	ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Lithiumchlorid	MERCK, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	SERVA, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	MERCK, Darmstadt
Natriumborhydrid	MERCK, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	ROTH, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG ₆₀₀₀)	SIGMA, St. Louis/USA
Saccharose	J.T. BAKER, Gross-Gerau
Sephadex DEAE A25	PHARMACIA, München
Sephadex G10	PHARMACIA, München
Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan (Tris)	MERCK, Darmstadt

Trypton.....	DIFCO, Detroit/USA
Xylencyanol.....	SERVA, Heidelberg

6.7 Diverses

Bezeichnung	Quelle
Chromatographiepapier 3 MM.....	WHATMAN, England
DC-Kieselgel-Platte 60 F254, Schichtdicke 0,2 mm, Breite 20 cm.....	MERCK, Darmstadt
DE-52 Papier.....	WHATMAN, England
Dialysemembran VA 0.025 μm , \varnothing 2,5 cm.....	MILIPORE, Neu-Isenburg
Dialyseschlauch Spectra/Por.....	SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES, Houston/Texas/USA
Nylonmembran Hybond N.....	AMERSHAM
Phosphoimager screen BAS-MS 2340, 23x40cm....	FUJI PHOTO FILM (EUROPE) GMBH, Düsseldorf
Phosphoimager FLA-3000.....	FUJI PHOTO FILM (EUROPE) GMBH, Düsseldorf
Röntgenfilme RX.....	FUJI PHOTO FILM (EUROPE) GMBH, Düsseldorf
Röntgenfilm X-OMAT AR.....	KODAK, New Heaven/USA
Röntgen-Rapid-Entwickler (Tetenal Roentogen liquid).....	TETENAL PHOTOWERK, Norderstedt
Röntgenfixierer (Tetenal Roentogen Superfix).....	TETENAL PHOTOWERK, Norderstedt
Sequenzierungskit.....	(FIXME)
Sterilfilter FB 030/3 (0,2 μm).....	SCHLEICHER UND SCHUELL, Dassel
SW-Kamera (CCD-Kamera) VC 25-12.....	SANYO FISHER SALES (EUROPE) GMBH, München
Thermopapier K65HM-CE.....	MITSUBISHI ELECTRIC EUROPE, UK Branch/England/UK
Verstärkerfolie DuPont Cronex (lightning plus screen).....	DUPONT, Bad Homburg

7 Methoden

7.1 Allgemeine und mikrobiologische Methoden

Bei Arbeiten mit Bakterienstämmen wurden strikt sterile Bedingungen eingehalten. Anfallender mikrobiologischer Abfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert.

7.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation für 20 min bei 120°C und 2-3 bar autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen wurden sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

7.1.2 Haltung und Lagerung von Zellstämmen

Verwendete Bakterienstämme wurden vor ihrer Benutzung aus tiefgefrorenen Glycerinkulturen auf YT-Platten mit einer sterilen Platinimpföse ausgestrichen. Die YT-Platten wurden ggf. mit selektivem Antibiotikum supplementiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis sichtbare Einzelkolonien auftraten. Zur kurzfristigen Lagerung wurden diese YT-Platten verwendet, die im Turnus von ca. 4 Wochen wieder neu ausgestrichen wurden.

7.1.3 Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen

Hier wurde eine Einzelkolonie einer YT-Platte gepickt und in 3 ml YT-Medium, ggf. mit selektivem Antibiotikum supplementiert, über Nacht (üN) bei 37°C auf einem Rundschüttler (Gio Gyrotory der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) bei 220 rpm angezogen. Für nachfolgende Nukleinsäurepräparationen im grossen Maßstab wurde diese üN-Kultur über Tag (üT) in 25 ml und anschliessend üN in 800 ml YT-Medium (ggf. Antibiotikum-supplementiert) bei gleichen Bedingungen angezogen.

7.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Bei allen Arbeiten wurden sterile Lösungen und Materialien verwendet. Einsatz von radioaktivem Material erfolgte ausschließlich im Isotopenlabor unter vorgeschriebenen gesetzlichen Bedingungen. Anfallender Abfall wurde vorschriftsmässig entsorgt.

7.2.1 Isolation von Nukleinsäuren

Plasmidisolation im analytischen Maßstab

Das hier verwendete Protokoll wurde erstmals durch Birnboim und Doyle 1979 beschrieben und wird allgemein als *Alkalischen Lyse* bezeichnet. Es wurden 3 ml einer üN-Kultur pelletiert (2x5 min, 12 000 rpm) (HERAEUS, Biofuge 15). Das Pellet wurde in 100 μ l Lyselösung I aufgenommen, resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Lyselösung II und Mischen durch kurzes Vortexen folgten 5 min Inkubation auf Eis. Es folgte eine Fällung durch Zugabe von 150 μ l Kaliumacetat pH 4,8 und Inkubation für 5 min auf Eis, wobei nur chromosomale DNA und Zelltrümmer ausgefällt werden, die plasmidäre DNA renaturiert durch diese Prozedur. Nach anschließender Zentrifugation bei 12 000 rpm für 5 min wurde der Überstand mehrmals Phenol/Chloroform extrahiert (7.2.2) und anschließend mit 3 Vol. absolutem Ethanol bei -70°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 12 000 rpm, das Pellet wurde lyophilisiert (HETO, Speedvac VR-1) und in unterschiedlichen Volumina TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

Lyselösung I	25 mM Tris/HCl, pH 8,0
	50 mM Glukose
	10 mM EDTA, pH 8.0
	3 mg/ml Lysozymchlorid

Lyselösung II	0,2 N NaOH
	1 % (w/v)SDS

Plasmidpräparation im präparativen Maßstab

Die Isolation erfolgte nach der von Hillen *et al.* 1981 beschriebenen Methode. Hierzu wurde eine 3 ml üN-Kultur mit einer Einzelkolonie angelegt (7.1.3). Am nächsten Tag wurde davon eine 25 ml üT-Kultur 1:100 angeimpft und davon erneut eine üN-Kultur von 800 ml 1:100 angesetzt. Bei den Anzuchtmedien wurden YT-Medien ggf. mit selektiven Antibiotikum angereichert verwendet.

Die üN-Kultur wurde am nächsten Morgen durch Zentrifugation für 10 min bei 8000 rpm und 4°C in einem JA10-Becher (BECKMANN Zentrifuge J2-21, JA10-Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde sorgfältig in 8 ml Saccharosepuffer resuspendiert und anschliessend in ein Ti55.2-Polycarbonatröhrchen (BECKMANN) überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 und 3 ml Lysozymlösung wurde die Suspension mehrmals invertiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Brij/Doc-Lösung pH 8,0 zugegeben, die Röhrchen austariert und für 10 min erneut auf Eis inkubiert.

Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 44000 rpm und 4°C (BECKMANN L8-Ultrazentrifuge, Ti55.2-Rotor), der klare Überstand wurde in einen Messzylinder abgegossen und mit RNase A (50 µg Enzym pro ml Überstand) für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Proteinase K (50 µg pro ml) und Inkubation für 30 min bei 37°C wurden vorhandene Proteine abgebaut. Es folgte eine Fällung durch $\frac{1}{2}$ Volumen PEG₆₀₀₀ bei -20°C für 30 min, die nachfolgende Zentrifugation (BECKMANN Zentrifuge J2-21, JA17-Rotor) für 30 min bei 4°C pelletierte die vorhandenen Plasmide. Das Pellet wurde in 3 ml TE-Puffer (6.5), auf Eis gelöst und zweimal Phenol/Chloroform bzw. einmal mit Chloroform extrahiert (7.2.2). Es folgte die Fällung durch $\frac{1}{10}$ Volumen Natriumacetat pH 5,0 und 2 Volumen absolutem Ethanol für 30 min bei -20°C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 6000 rpm und 4°C (HERAEUS Megafuge1.0 R) wurde das Pellet mit 1-2 ml 80%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet (HETO, Speedvac VR-1) und in unterschiedlichen Volumina TE-Puffer (6.5) aufgenommen.

Saccharosepuffer	25% Saccharose (w/v) 50 mM Tris/HCl pH 8,0
Lysozymlösung	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (Jedesmal frisch angesetzt)
Brij-Doc-Lösung	2 Volumen 10% (w/v) Brij 35 1 Volumen 10% Natriumdesoxycholat in <i>Aqua dest.</i> pH 8,0 mit NaOH eingestellt
RNase A	200 µg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 die RNase wurde vor der Benutzung nach Maniatis <i>et al.</i> (1982) von DNase-Aktivität befreit
Proteinase K	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG ₆₀₀₀ -Lösung	30% PEG ₆₀₀₀ in 1,5 M NaCl

7.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Methode eignet sich zur sicheren Entfernung von Proteinen aus einer Nukleinsäurelösung, wie es z.B. während einer Plasmidisolierung oder nach einer Restriktionshydrolyse notwendig wird. Die Phenol/Chloroform-Lösung (1:1-Gemisch) denaturiert alle Proteine, die sich nach einer Zentrifugation in der Interphase ansammeln. Der wässrige Überstand enthält die Nukleinsäuren. Bei jeder Extraktion wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform-Lösung auf den Ansatz pipettiert, für 1 min gevortext und anschliessend für 5 min bei RT und 12000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäss überführt. Dieser Schritt wurde solange mit Phenol/Chloroform wiederholt, bis keine Interphase mehr zu sehen war. Anschliessend wurde mit 1 Volumen Chloroform extrahiert, um phenolische Reste aus der Lösung zu entfernen. Der Ansatz wurde 1 min gevortext und 5 min bei RT und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäss überführt und für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Ethanolfällung

Diese Methode dient zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren sowie zu deren Befreiung von geringen Verunreinigungen. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Nukleinsäurelösung $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) sowie 2,5 bis 3 Volumen eisgekühlter, absoluter Ethanol zugefügt. Durch das Salz und die ethanolische Umgebung wird das die Nukleinsäure umgebende Wasser verdrängt. Der Ansatz wurde kurz invertiert und für 30 min bis 16 h bei -20°C inkubiert. Während dieser Zeit kristallisiert die Nukleinsäure und präzipitiert. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bis 1 Stunde bei 4°C . Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet mit 2 Volumen eisgekühlten, 80 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bis 1 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet anschliessend in einer Speedvac VR-1 der Firma HETO getrocknet. Das Lyophilisat wurde dann in *Aqua dest.* oder TE-Puffer (6.5) aufgenommen und spektralphotometrisch auf seine Konzentration (7.2.3) überprüft.

Mikrotropfendialyse

Nukleinsäuren von bis zu $100\ \mu\text{l}$ wurde durch diese Methode von störenden Rückständen befreit. Für die Dialyse wurden sterile Petrischalen verwendet, die mit 30 bis 40 ml TE-Puffer (6.5) gefüllt wurden. Auf den Flüssigkeitsspiegel wurde eine VS MILIPORE Dialysemembran (6.7) mit der glänzenden Seite nach oben aufgelegt, die zu dialysierende Lösung wurde vorsichtig auf die Membran pipettiert. Die Probe wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert, von der Membran vorsichtig abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäss überführt. Anschliessend erfolgte stets eine Konzentrationsbestimmung durch UV/VIS-Spektroskopie (7.2.3).

7.2.3 Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mit einem BECKMANN Spektralphotometer (Typ DU 64) gearbeitet. Als Reaktionsgefäß wurde eine 50 μl Quarzküvette gewählt.

Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Hier wurde neben der Konzentration auch stets die Reinheit der vorliegenden Probe überprüft. Für die Konzentration wurde eine Wellenlänge von 260 nm gewählt, für die Reinheitsbestimmung ein Spektrum von 220 bis 320 nm. Die Proben wurden vor der Messung geeignet verdünnt, als Kalibriermedium wurde das jeweils entsprechende Lösungsmittel verwendet. Für die Berechnung der Konzentration wurde vereinfacht folgende Beziehung verwendet:

$$\begin{aligned} 1,0 \quad A_{260} &= 37 \mu\text{g ss NS/ml} \\ 1,0 \quad A_{260} &= 50 \mu\text{g ds NS/ml} \end{aligned} \quad (7.1)$$

Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden

Hier wurde wie unter 7.2.3 beschrieben vorgegangen, die Berechnung der Konzentration erfolgte jedoch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E_{260} = \varepsilon_{260} \cdot c \cdot d \quad (7.2)$$

E_{260} = Extinktion bei der Wellenlänge λ_{260}

ε_{260} = Extinktion bei der Wellenlänge λ_{260}

c = Konzentration [mol/l]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

In Tabelle 7.1 sind die molaren Extinktionskoeffizienten in $\text{l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ bei neutralem pH-Wert für die verschiedenen Nukleotide bei bestimmten Wellenlängen wiedergegeben.

7.2.4 Analytische Gelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese

Diese Methode wurde zur Analytik und für präparative Auftrennung von doppelsträngiger DNA verwendet. Der Agarosegehalt variierte von 0.8 bis 2 % (w/v) Agarose (6.6) in 1xTAE-Puffer (6.5). Die Gellösung wurde kurz aufgekocht, abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und als

Nukleotid	molarer Extinktionskoeffizient [l/(mol · cm) = M ⁻¹ · cm ⁻¹]	Wellenlänge λ [nm]
ATP	15 400	259
CTP	9 100	271
GTP	13 700	253
TTP	7 400	260
ppGpp	13 100	252

Tabelle 7.1: Molare Extinktionskoeffizienten nach Fasman (1979)

Flachbettgel gegossen. Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer verwendet, der ebenfalls mit Ethidiumbromid versetzt war (0,5 µg/ml). Die Proben wurden vor Auftrag mit 2xTAE- oder 5xTAE-Probenpuffer (6.5) versetzt. Die Proben wurden bei 90 bis 120 Volt aufgetrennt. Eine visuelle Detektion wurde durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids ermöglicht, die Anregung erfolgte durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht durch einen Transilluminator (HETOLAB UVT 2035). Für die Dokumentation wurde eine SW-Kamera (SANYO B/W CCD Kamera, Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter sowie ein Videoprinter verwendet.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nativen Bedingungen

Aufgrund des höheren Auflösungsvermögen ist diese Methode für den Nachweis kleiner Nukleinsäuren bzw. kleiner Nukleinsäurefragmente geeignet. Der Auftrennungsbereich ergibt sich aus dem Vernetzungsgrad und der Prozentigkeit der Acrylamidlösung. Die Polymerisation ist eine Radikalkettenreaktion: Als Katalysator dient N, N, N', N'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED), als Startmolekül dient Ammoniumperoxodisulfat (APS), es bildet in wässriger Lösung SO₄⁻-Radikale und funktioniert daher als Radikalstartermolekül für die Kettenreaktion. Vor dem ersten Gebrauch sollte die Lösung durch Anionenaustauschern (hier: Amberlite MB-1) von Fremdionen befreit werden. Die gewünschte Prozentigkeit wurde durch Verdünnung mit *Aqua dest.* angesetzt, als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1xTBE-Puffer (6.5). Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation gestartet und für mindestens 30 min ohne äusseren Einfluss inkubiert. Nach Zugabe von ½ Volumen 2xTBE-Probenpuffer (6.5) und bei 200-250 Volt für bis zu 5 Stunden aufgetrennt. Für die Krümmungsanalysen (4.1.1) wurde die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt, ansonsten wurde bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wurden dann entweder durch Silberfärbung (7.2.5) oder durch Ethidiumbromidfärbung (7.2.5) visualisiert. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt und ausgedruckt oder mit einer CCD-Kamera von SANYO (6.7) auf Thermopapier (6.7) gedruckt.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen

Zur Analyse von Nukleinsäuren, bei denen die apparente Länge durch Sekundärstrukturen nicht in dem Auftrennungsmuster entsprechen, empfiehlt sich diese Art der Elektrophorese. Sie wurde für die Auftrennung von Sequenzierungen (7.3.1), *primer extensions* (7.3.6) und Transkriptionen (7.3.5) verwendet. Durch die Verwendung von 7M Harnstoff und einer hohen Geltemperatur werden die Proben während der Elektrophorese denaturiert. Es wurden entweder 6, 8, 10 oder 15%ige Gellösungen (20:1-Vernetzung) hergestellt. Die Dimensionen betragen 39x33,5 cm, die Dicke betrug 0,35 oder 0,4 mm. Vor Gebrauch wurden die Glasplatten mit *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt, und hin und wieder mit 2% Repelcote silikonisiert, um die Gele besser von den Platten ablösen zu können.

Die Gellösung wurde vor der Polymerisation entgast, um störende Luftblasen bei der Polymerisation zu vermeiden. Als Elektrophoresepuffer diente 1xTBE-Puffer (6.5), die Proben wurden vor dem Auftrag mit Formamid-Probenpuffer (6.5) versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend direkt auf Eis überführt, damit eventuelle Restrukturierungen innerhalb der Nukleinsäure verhindert werden. Anschliessend erfolgte eine schrittweise Erwärmung: für je 10 min wurden nacheinander 25, 50 und 75 Watt gewählt, die Elektrophorese wurde dann bei 90 Watt durchgeführt. Bei dieser Leistung beträgt die Aussentemperatur der Glasplatten ca. 70°C, so dass von einer denaturierenden Wirkung allein durch die Temperatur ausgegangen werden kann. Die Fragmente wurden ihrer Länge entsprechend unterschiedlich lange aufgetrennt (i.d. Regel 2-3 Stunden).

7.2.5 Nukleinsäurenachweismethoden

Ethidiumbromid-Färbung

Die Nachweisgrenze von doppelsträngiger DNA beträgt bei dieser Methode 5-10 ng pro Bande in PAA-Gelen (7.2.4), in Agarosegelen liegt sie bei etwa 10-15 ng pro Bande. Vor allem bei präparativen Elektrophoresen wurde diese Färbung gewählt, da sie reversibel ist. Bei Agarosegelen (7.2.4) ist diese Färbemethode üblich, so dass hier nur die Färbung von PAA-Gelelektrophorese-aufgetrennten Proben erwähnt wird. Nach der Auftrennung wurde das PAA-Gel für 20 min in einer EtBr-Färbelösung geschüttelt, deren Konzentration 2 µg/ml Ethidiumbromid in *Aqua dest.* betrug. Durch Anregung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) konnten anschliessend die jeweiligen Bandenmuster detektiert und dokumentiert werden (UV-Quelle: HETOLAB UVT 2035, SW-Kamera: CCD-Kamera VC 25-12 siehe 6.7).

Silberfärbung

Mit dieser Methode kann man auch noch im dreistelligen pg-Bereich doppelsträngige DNA detektieren, einzelsträngige Nukleinsäuren lassen sich im einstelligen ng-Bereich nachweisen. Die Metho-

de beruht auf einer reduktiven Einlagerung von Silberionen an Oberflächen, die Reduktion wird durch Formaldehyd im Entwickler ausgelöst. Hier wurde wie von Beidler *et al.* [7] beschrieben vorgegangen: Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 20 min in Fixierlösung I unter leichtem Schwenken fixiert. Anschliessend erfolgte die Färbung mit Silbernitratlösung (1.9 g/l AgNO₃) für 20 min. Nach mehrmaligem Waschen mit *Aqua dest.* erfolgte die Reduktion und damit die Visualisierung des Bandenmusters durch Schwenken in Entwicklerlösung. Bei Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde die Reaktion durch 10 min Inkubation mit Fixierlösung II gestoppt.

Fixierlösung I	10% (v/v) Ethanol 0,5% (v/v) Essigsäure
Entwicklerlösung (frisch)	15 g NaOH 0,08 g Na ₂ BH (Natriumborhydrid) 4 ml CH ₂ O (Formaldehyd) ad 1 l mit <i>Aqua dest.</i>
Fixierlösung II	0,75% (w/v) Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)

UV-Shadowing

Das Prinzip der Detektion beruht hier auf der Anregbarkeit der aromatischen Basen in Nucleinsäuren durch UV-Licht, wobei das delokaliserbare π -Elektronensystem die Absorption der Strahlung ermöglicht. Legt man das entsprechende Gel auf eine Dünnschichtchromatographieplatte, die mit einem Fluoreszenzindikator beschichtet ist (DC-Plastikrolle Kieselgel 60F254, Schichtdicke 0,2 mm, MERCK, Darmstadt) (6.7), so erscheinen die nukleinsäurehaltigen Banden unter UV-Licht dunkel, da sie die Strahlung absorbieren, das restliche Indikatormaterial fluoresziert deutlich. Mit dieser Methode wurden präparative Restriktionen aus PAA-Gelen eluiert, da hier nur grosse Mengen an Nucleinsäuren sichtbar werden.

Autoradiographie

Hier wird durch den Einbau eines radioaktiv markiertes Nucleotids der Nachweis im pg-Bereich möglich. Durch Exposition des Gels mit einem Röntgenfilm oder einem Phosphoimagerscreen (6.7) kann das Bandenmuster visualisiert werden. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die PAA-Gele (7.2.4) in eine Expositionskassette überführt und je nach Intensität (cpm gemessen mit Punktzintillationszähler) über ein oder mehrere Nächte mit einem Röntgenfilm bei -20°C inkubiert. Anschliessend wurde der Film in einer Dunkelkammer entwickelt: Im Entwicklerbad (6.7) erfolgte die Reduktion der im Film enthaltenen Silberionen, im Essigsäurebad wurde die Entwicklungsreaktion gestoppt, im Fixierer wurde das

Bandenmuster festgehalten, indem störende Restsalze der Entwicklerlösung herunter gewaschen wurden. Die Inkubationszeit betrug in der o.g. Reihenfolge 3, 1 und 3 min. Der Film wurde anschließend gewaschen, bei 37°C getrocknet und gescannt.

Für die quantitative Auswertungen wurde ein Phosphoimagerscreen (6.7) für mehrere Stunden aufgelegt. Bei dieser Methode werden in dem Screen befindliche Kristalle durch die Strahlung angeregt und geben nach Entwicklung mit einem Phosphoimager (6.7) das Bandenmuster wieder. Diese Methode ist empfindlicher als die Exposition mit Röntgenfilmen und ökonomisch sowie ökologisch sinnvoller, da ein Screen durchaus 1000x wieder verwendbar ist.

Densitometrie

Die Auswertung der eingescannten Phosphoimager Bilder erfolgte ausschliesslich mit der Software „Image Gauge“ (FUJI PHOTO FILM (EUROPE) GMBH, Düsseldorf). Ausgewertet wurden Bandenmuster, die durch Radioaktivität erzeugt worden waren. Dabei wurde für jede Bande nach Abzug von Hintergrund ein Schwärzungswert bestimmt, der mit anderen Schwärzungsgraden verglichen werden konnte.

7.2.6 Präparation von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Elution aus Agarosegelen durch Zentrifugation

Diese Methode erlaubt eine sehr schnelle Elution von Nukleinsäurefragmenten aus Agarosegelen (7.2.4). Für die Elution wurde ein 100 μ l PCR-Gefäß verwendet, das zur Hälfte mit silikonisierter Glaswolle gefüllt war und am Boden ein Loch aufwies (\varnothing 1 mm). Auf die Glaswolle wurde das ausgeschnittene, fragmenthaltige Agarosestück gelegt, das Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt. Durch zweimalige Zentrifugation für 5 min bei 12 000 rpm und RT (HERAEUS BIOFUGE 15) wurde die DNA eluiert. Anschließend wurde das Eluat zweimal mit Phenol/Chloroform, anschließend einmal mit Chloroform extrahiert (7.2.2) und wie unter (7.2.2) beschrieben gefällt, zentrifugiert, gewaschen und lyophilisiert. Das Pellet wurde in TE-Puffer (6.5) aufgenommen und anschließend dialysiert (7.2.2). Die erhaltene DNA wurde dann im Spektralphotometer auf die Konzentration überprüft. Es wurden Ausbeuten zwischen 30 und 60 % erzielt.

Passive Elution aus PAA-Gelen

Diese Methode erlaubt eine deutlich präzisere Isolation, da durch PAGE (7.2.4) eine deutlich bessere Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten ermöglicht wird. Die Färbung wurde hier mit Ethidiumbromid vorgenommen, da durch entsprechende Aufarbeitung das Ethidiumbromid im Gegensatz zur Silberfärbung wieder entfernt werden kann. Nach erfolgter Auftrennung wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die

Proben wurden mit 300 μ l Elutionspuffer versetzt und für 12 bis 24 Stunden bei RT geschüttelt (EPPENDORF MIXER 5432). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das PAA-Gelstück erneut mit 300 μ l Elutionspuffer versetzt und für weitere 6 Stunden geschüttelt (EPPENDORF MIXER 5432). Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und wie unter 7.2.2 beschrieben gefällt, zentrifugiert, gewaschen und lyophilisiert. Das Pellet wurde in TE-Puffer (6.5) aufgenommen, dialysiert (7.2.2) und im Spektralphotometer auf die Konzentration analysiert. Die Ausbeute lag bei 30 - 60 %.

Elutionspuffer 0,3 M NaOAc, pH 7,0
1 mM EDTA, pH 8,0

7.2.7 Enzymatische Reaktionen

Restriktionshydrolysen

Die verwendeten Restriktionsenzyme gehören der Klasse II an: Die palindromische Erkennungssequenz und die Spaltungssequenz sind identisch, die entsprechende Sequenz erstreckt sich über 4 bis 6 Nucleotide auf der DNA und führt nach der Spaltung zu glatten oder überhängenden Enden (5'- bzw. 3'-überhängende Enden). Jede Restriktion wurde den Herstellerangaben entsprechend angesetzt. Wurden die resultierenden Fragmente in weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt, erfolgte nach der Restriktion eine Phenol/Chloroform-Extraktion (7.2.2) mit anschließender Ethanol-fällung (7.2.2). Für eine Analytik der Restriktionen wurde ein Aliquot der Ansätze durch Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese (7.2.4) überprüft.

Alkalische Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um eine Religation von kompatiblen DNA-Fragmenten zu verhindern, die in eine Ligation (7.2.8) eingesetzt werden sollten. Bei dieser Reaktion wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende eines DNA-Doppelstrangs abgespalten, das hier verwendete Enzym stammt aus Rindern (CIP = *calf intestine phosphatase*). Das Enzym wurde den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt, meist wurde für eine Stunde inkubiert und anschließend für 10 min bei 60°C die Reaktion gestoppt. Um sicherzustellen, dass jegliche dephosphorylierende Aktivität in der nachfolgenden Ligation unterbleibt, wurde sicherheitshalber eine Phenol/Chloroform-Extraktion (7.2.2) mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt (7.2.2). Die dann erhaltenen Nucleinsäuren wurden sofort in die Ligation eingesetzt.

5'-Endmarkierung

Da synthetisch hergestellte Desoxyoligonucleotide am 5'-Ende keine Phosphatgruppe besitzen, können diese für einen Einsatz als Sonde nachträglich enzymatisch markiert werden. Dabei wird die γ -

Phosphatgruppe von ATP mit einer freien 5'-OH-Gruppe durch das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) kovalent verknüpft. Aufgrund von Erfahrung wurden bei der Reaktion 75 μCi statt der üblichen 50 μCi eingesetzt, da bei den hier verwendeten Oligonukleotiden stets schlechtere Markierungen beobachtet wurden. Das Enzym wurde auf 1U/ μl mit PNK-Verdünnungspuffer verdünnt, in die Reaktion wurde 1 Unit eingesetzt. Für das Oligonukleotid wurde eine Menge von 10 pmol gewählt, der Reaktionspuffer wurde einfach eingesetzt, das Volumen wurde auf 25 μl mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Die Reaktionszeit betrug 30 min bei 37°C, anschliessend wurde die Reaktion für 10 min bei 68°C gestoppt. Der Ansatz wurde mit 1/20 Ammoniumacetat, 1/25 Glycogen und drei Volumen Ethanol für 2 min auf flüssigem Stickstoff gefällt, zentrifugiert, anschliessend gewaschen und lyophilisiert. Das Pellet wurde in 25 μl TE-Puffer (6.5) aufgenommen. Die Zählausbeute betrug laut Szintillationszähler zwischen 300000 und 1 Million cpm/ μl . Die markierten Oligonukleotide wurden anschliessend in eine *primer extension*-Reaktion (7.3.6) oder in eine Sequenzierung (7.3.1) eingesetzt.

1xKinase-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,6
	10 mM MgCl ₂
	5 mM DTT
	0,1 mM EDTA, pH 8,0

Klenowreaktion mit DNA-Fragmenten

Mit dem Klenow-Fragment der bakteriellen DNA-Polymerase I kann man 5'-überhängende Enden von DNA-Fragmente auffüllen. Diese Methode wurde hier verwendet, um DNA-Fragmente radioaktiv aufzufüllen. Dazu wurden in 25 μl 1 μg DNA-Fragment mit je 250 μM dNTP, 5 U Klenow-Enzym in 1x-Reaktionspuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (7.2.2) sowie Fällung des Ansatzes (7.2.2). Das lyophilisierte Pellet wurde anschliessend in TE-Puffer (6.5) zurückgelöst und die Ausbeute im Szintillationszähler bestimmt.

1x Polymerase-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM MgCl ₂
	5 mM DTT
	1 mM Spermidin
	1 mM EDTA

7.2.8 Klonierungstechniken

In dieser Arbeit wurden Promotoraustauschmutanten erstellt. Dabei wurde die UAS-Region des *rrnB*-Operons mit dem *core*-Promotor des *rrnD*-Operons fusioniert. Entsprechend wurde mit der UAS-Region

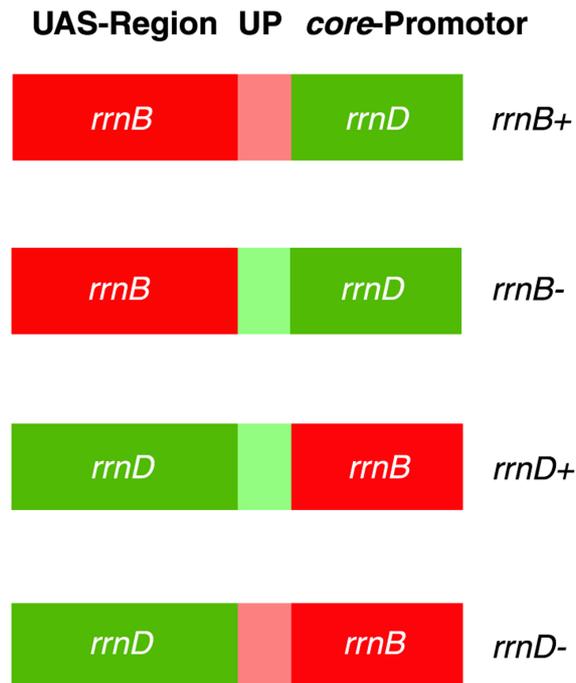


Abbildung 7.1: Vier synthetische rRNA-P1-Promotor-Konstrukte. Die Abbildung gibt den Aufbau der 4 neuen *rrn*-P1-Promotor-Konstrukte wieder. Das jeweilige UP-Element ist in der einem *rrn*-Operon zugehörigen hellen Farbe dargestellt. Rechts sind die Namen der neuen Konstrukte angegeben. Plus oder minus beziehen sich auf das UP-Element, das entweder von dem *rrn*-Operon der entsprechenden UAS-Region stammt (+) oder dem entsprechenden *rrn*-Operon des *core*-Promotors zugehörig ist (-).

des *rrnD*-Operons und dem *core*-Promotor des *rrnB*-Operons verfahren. Beide Austauschmutanten wurden jeweils zweimal erstellt, einmal trug die UAS-Region das UP-Element des *rrnB*-Operons, einmal das UP-Element des *rrnD*-Operons. Alle vier Konstrukte wurden in den Vektor pKK232-8 kloniert. Dieses Plasmid enthält neben einer Ampicillin-Resistenz ein promotorloses *cat*-Gen, welches bei Einklonierung eines Promotors eine Chloramphenicolresistenz in Form der Chloramphenicolacetyltransferase (*cat*) exprimieren kann. Mit diesen Konstrukten wurden dann Promotoranalysen durchgeführt. In vorheriger Arbeit waren bereits alle 7 *rrn*-P1-Promotoren inkl. der UAS-Region in diesen Vektor einkloniert worden [52], so dass im Rahmen dieser Arbeit mit insgesamt 11 Konstrukten Promotoranalysen durchgeführt werden konnten. Die Abbildung (7.1) zeigt den Aufbau der 4 neuen Konstrukte.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt eine spezifische Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten. Dabei hybridisieren spezifische Primer flankierend an den zu amplifizierenden Nukleinsäureabschnitt (*annealing*), die durch eine Polymerase verlängert werden (*primer extension*). Als Template kann lineare oder Plasmid-DNA dienen. Bei dieser Methode wird die Hitzestabilität der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*

ausgenutzt, deren Temperaturoptimum über 70°C liegt. Die Hitzestabilität erlaubt eine zyclische Reaktion, in der nach erfolgter Hybridisierung der Desoxyoligonukleotide und deren Verlängerung eine Denaturierung erfolgen kann, wonach die Desoxyoligonukleotide wieder einzelsträngig vorliegen. Dadurch können die Desoxyoligonukleotide über viele Cyclen als Primer dienen, die dann auch an bereits neu synthetisierte Fragmente binden können, es kann somit eine exponentielle Amplifikation erfolgen. Die *Taq*-DNA-Polymerase erlaubt keine *proof reading* Korrektur, da eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Die Fehlerrate liegt bei einem Falscheinbau pro 9000 Nukleotide. Für grosse PCR-Fragmente sollte daher eine korrekturfähige DNA-Polymerase verwendet werden, wie z.B. die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Sie besitzt eine 12fach genauere Polymerisationsrate im Vergleich zur *Taq*-Polymerase. Vor der Reaktion müssen die *annealing*-Temperaturen der Desoxyoligonukleotide festgesetzt werden. Dabei wurden hier 2 bis 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) gewählt. Für die PCR-Ansätze, die abschließend mit Paraffinöl überschichtet worden waren, wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

PCR-Ansätze je 15 pmol Desoxyoligonukleotide
 175 ng Plasmid-DNA
 0,3 mM dNTPs
 7,5 U *Pfu*- oder 5 U *Taq*-DNA-Polymerase
 1x PCR-Puffer

Cyclen	Denaturierung	3 min 94°C
	Amplifikationszyklen	1 min, 94°C (<i>Denaturierung</i>) 1 min, verschiedene Temperaturen (<i>annealing</i>) 1 min, 72°C (<i>primer extension</i>)
	Finale Produktverlängerung	10 min, 72°C (<i>primer extension</i>) 10 min, 38°C (schrittweises Abkühlen) 10 min, 4°C (Kühlen)

Nach der Reaktion wurde der Ansatz ohne Paraffin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Phenol/Chloroform (7.2.2) extrahiert, gefällt (7.2.2) und ggf. auf einem Agarosegel analysiert (7.2.4). Entweder erfolgte dann eine Aufreinigung oder die Ligation mit Vektor-DNA (7.2.8).

10x <i>Pfu</i> -Puffer	100 mM KCl
	200 mM Tris/HCl, pH 8,8
	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	20 mM MgSO ₄
	1 mg/ml BSA
	1% (v/v) Triton X-100

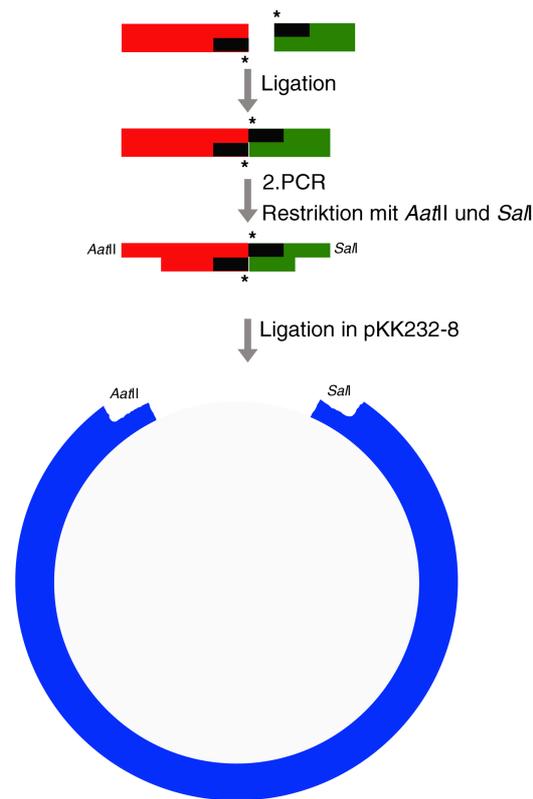


Abbildung 7.2: Gerichtete *blunt end*-Ligation. Schematische Darstellung der gerichteten *blunt-end*-Ligation. In die 1. PCR wurden selektiv phosphorylierte Desoxyoligonukleotide eingesetzt (schwarz, die Phosphatgruppe ist mit einem * markiert). Die erhaltenen Fragmente wurden in die Ligation eingesetzt. Dabei war zu erwarten, dass die phosphorylierten Enden bevorzugt verknüpft werden. Anschliessend wurde von diesen Ligationsprodukten erneut eine PCR durchgeführt. Die langen Produkte wurden eluiert (7.2.6) und anschliessend mit den Restriktionsenzymen *AatII* und *SalI* verdaut. Die entstandenen *rrn*-P1-haltigen Fragmente wurden erneut eluiert (7.2.6) und in den vorverdauten Vektor pKK232-8 inkliniert.

Ligation

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Moleküle wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Vektor und Fragment wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l entsprechend den Herstellerangaben mit 1 U Enzym in 1x Ligasepuffer inkubiert. Bei der Klonierung von *rrn*-P1-Austauschpromotoren wurden die *blunt*-Fragmente gerichtet ligiert, indem selektiv phosphorylierte Desoxyoligonukleotide vorher in die PCR (7.2.8) eingesetzt wurden. Nach der Ligation wurde eine erneute PCR durchgeführt, die dann als Produkt die ligierten Fragmente enthalten sollte. Anschliessend konnten die Fragmente mit Restriktionsenzymen verdaut (7.2.7) und gerichtet in den ebenfalls verdauten Vektor inkliniert werden. Die Abbildung (7.2) gibt die Vorgehensweise dieser speziellen Klonierung wieder.

Die Ansätze wurden anschliessend mit PEG₆₀₀₀ gefällt, sorgfältig gewaschen und in die Transformation (7.2.8) bzw. erneut in eine PCR (7.2.8) eingesetzt.

1x Ligase-Puffer	66 mM Tris/HCl, pH 7,5
	5 mM MgCl ₂
	5 mM DTE
	1 mM ATP

Transformation

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Elektroporation benötigt man Zellen, die in einem möglichst salzarmen Medium vorliegen, da es sonst auf Grund der erhöhten Leitfähigkeit des Ansatzes zu einer explosionsartigen Entladung während der Elektroporation kommt. Hierzu wurden nach Sherman (1992) 500 ml L-Medium (lowsalt) (6.5) mit 5 ml der entsprechenden üN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und bei 4°C für 15 min abzentrifugiert (BECKMANN Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor). Nach diesem Schritt wurden die Zellen 4°C weiter behandelt. Das Zellpellet wurde in 500 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Dieses Vorgehen wurde insgesamt noch zweimal mit 250 ml und 125 ml 10%igem Glycerin wiederholt. Das nun salzarme Zellpellet wurde in 1,5 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, welche anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte nach Sherman (1992). Zellen für die Elektroporation wurden schnell aufgetaut und auf Eis gestellt. Dann wurden die Zellen mit 1 bis 5 µl Ligationsansatz gemischt und für 1 bis 2 min auf Eis inkubiert und dann die Elektroporations-Küvette (P/N 620) überführt. Die Elektroporation erfolgte im „Elektro Cell Manipulator 600“ nach unten angegebenen Einstellungen. Sofort nach der Poration wurde der Ansatz mit 950 µl SOC-Medium (6.5) gemischt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dieser Schritt ist kritisch und muß immer direkt nach der Elektroporation erfolgen. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert und dabei leicht geschüttelt. 50 bis 200 µl der Zellsuspension wurden dann auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Einstellungen am „Electro Cell Manipulator“

Choose Mode:	T	2,5 kV/Resistance Hight Voltage (HV)
Set Capacitance:	C	Not used in Hight Voltage Mode
Set Resistance:	R	R5 (129 ohms)
Chamber Gap:		BTX Disposable Cuvette P/N 620(2 mm gap)
Set Charging Voltage:	S	2,5 kV
Desired Field Strength:		12,5 kV/cm
Desired Pulse Length:	t	5,1 msec

7.3 Spezielle Methoden

7.3.1 Sequenzierung nach Sanger

Mit dieser erstmals durch Sanger *et al.* beschriebenen Methode wurde doppelsträngige DNA unter Verwendung des „Sequenase Kit, Version 2.0“(USB) sequenziert. Für die Hybridisierung musste die DNA aufgeschmolzen werden: 1 bis 3 μg DNA in 16 μl wurden durch Zugabe von 4 μl 1 N NaOH und Inkubation für 10 bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden 6 μl 3 M NaOAc (pH 5,0) sowie 60 μl absoluter Ethanol zugegeben, für 3 min auf flüssigem Stickstoff gefällt und für 30 min bei 12 000 rpm und RT zentrifugiert (HERAEUS BIOFUGE 15). Nach einmaligem Waschen mit 80 %igem Ethanol und anschließender Lyophilisation wurde das Pellet entweder für eine spätere Verwendung bei -20°C aufbewahrt oder bei sofortiger Weiterverwendung in 7 μl *Aqua dest.* aufgenommen und in die Hybridisierung eingesetzt. Dem Ansatz wurden dazu 2 μl Sequenase-Reaktionspuffer sowie 1 μl Sequenzieroligonukleotid (0,1 - 0,4 pmol/ μl) zugefügt und für 2 min bei 65°C inkubiert. Die Abkühlung erfolgte langsam (1°C/min) bis auf RT. Der vorbereitete Markierungsansatz wurde dem Hybridisierungsansatz zugefügt und für 3 min bei RT stehen gelassen. Nach bereits 2 min wurden je 2,5 μl Abbruchmix bei 37°C inkubiert, nach 1 min wurde dann jeweils 3,5 μl des Markierungs-Hybridisierungs-Mixes zugefügt und für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 4 μl Stopplösung wurde die Reaktion abgebrochen, die Proben wurden dann für 3 min bei 96°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen (7.2.4). Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie (7.2.5).

1x-Reaktionspuffer 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
 10 mM MgCl₂
 25 mM NaCl

Markierungsansatz 1 μl 0,1 M DTT
 2 μl Markierungsmix (je 7,5 μM dCTP, dGTP, dTTP,
 1:5-Verdünnung in *Aqua dest.*)
 0,5 μl [$\alpha_{32}\text{P}$]-dATP [3000 Ci/mmol]
 2 μl Sequenase 2.0 (1:8-Verdünnung in Enzymverdünnungspuffer)

Enzymverdünnungspuffer 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
5 mM DTT
0,5 mg/ml BSA

Abbruchmix 50 mM NaCl
je 80 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP plus je 8 μ M entsprechendes ddNTP

7.3.2 Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp)

Die Synthese von ppGpp wurde in dieser Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert. Für *in vitro* Transkription wurde ppGpp in präparativen Mengen nach dem von [64] beschriebenen Protokoll hergestellt, die *in vivo* Analysen wurden radioaktiv zum Nachweis von ppGpp in *relA*⁺- bzw. *relA*⁻-Stämmen durchgeführt.

In vitro Synthese von ppGpp nach Krohn und Wagner

Diese Methode erlaubt eine Ausbeute von bis zu milimolaren Konzentrationen von ppGpp. Dazu werden isolierte Ribosomen, die noch ribosomen-assoziiertes *relA*-Protein (ppGpp-Synthetase I, PSI) enthalten, für mehrere Stunden mit ATP und GDP inkubiert. Dies entspricht nicht der *in vivo* Situation, wo GTP anstelle von GDP als Substrat dient und zuerst das Pentaphosphat synthetisiert wird. In Abschnitt 3.4, Abbildung (3.7) wird der ppGpp-Syntheseweg gezeigt, wie er *in vivo* vorkommt.

In einem Volumen von 11 ml wurden 4 mM ATP, 2 mM GDP sowie 693 OD₂₆₀ Ribosomen für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Analyse der Produktbildung wurden zu unterschiedlichen Zeiten 10 μ l Aliquots entnommen, die dann nach einer chromatographischen Auftrennung (7.3.2) visualisiert werden konnten. Die Reaktion wurde durch mehrmalige Phenol/Chloroform-Extraktion (7.2.2) gestoppt. Der Überstand wurde einmalig mit Chloroform extrahiert und für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Analytischer Nachweis von ppGpp

Der Nachweis der ppGpp-Synthese erfolgte in dieser Arbeit über Dünnschichtchromatographie (DC). Diese Methode erlaubt eine Visualisierung über UV-Strahlung. Das Trägermaterial besteht aus Polyethylenimin (PEI), welches bei einer Wellenlänge von λ_{254} nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Die hier aufgetragenen Ansätze enthalten phosphathaltige Substanzen, welche bei dieser Wellenlänge nicht fluoreszieren, der entsprechende Bereich ist nach Auftrennung in Phosphatpuffer (pH 3,4) dunkel verfärbt. Die Abbildung (7.3) gibt ein typisches Ergebnis einer DC von verschiedenen ppGpp-Synthese-Ansätzen wieder.

1 2 3 4 5 6 7 8

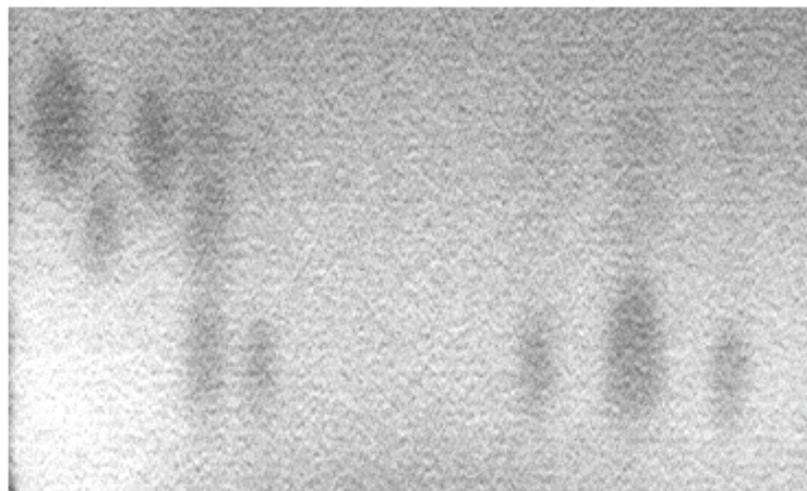


Abbildung 7.3: Chromatogramm der ppGpp-Synthese *in vitro*. Ergebnis einer DC nach ppGpp-Synthese. Als Referenzwerte wurden folgende Substanzen aufgetragen: (1) ATP, (2) GTP, (3) GDP, (4) ppGpp, alte Präparation, verunreinigt, (5) ppGpp, alte Präparation. In den Spuren (6), (7) und (8) wurden verschiedene Fraktionen von bereits säulengereinigten ppGpp-Präparationen aufgetragen. Die Konzentrationen der aufgetragenen Substanzen betrug im Durchschnitt 10 mM, aufgetragen wurden meist 8-10 μ l.

Anionenaustauschchromatographie

Diese Methode erlaubt eine chromatographische Auftrennung aufgrund der Ladung, wenn mehrere Substanzen ähnlicher Grösse vorliegen. Das Prinzip beruht auf einer Matrix, die durch ihre positiv geladenen Restgruppen negativ geladene Moleküle über ionische Wechselwirkung unterschiedlich stark binden kann. Je stärker die negative Ladung, desto stärker erfolgt die Wechselwirkung. Die aufgetragenen Proben werden dann mit einem Salzgradienten von der Matrix herunter gewaschen und fraktioniert aufgefangen. Ein angeschlossenes Spektralphotometer erlaubt eine präzise Zuordnung von verschiedenen Elutionspeaks, die entsprechenden Fraktionen können dann z.B. über DC näher analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde als Matrix eine DEAE Sephadex A25 mit 12 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser gewählt, der Salzgradient bestand aus einem Tris/HCl-LiCl-Puffer (TL-Puffer). Vor Beladung wurde die Säule stets mit 1 M TL-Puffer gewaschen und anschliessend mit 200 ml 0,1 M TL-Puffer äquilibriert. Der ppGpp-Syntheseansatz wurde aufgetragen und für 30 min ruhen gelassen, um eine Bindung der Nukleotide an das Säulenmaterial zu gewährleisten. Mit einer Flussrate von 0,6 ml/min wurde dann der Salzgradient von 0,1 bis 0,5 M LiCl angelegt, die Fraktionen wurden zu je 4,5 ml aufgefangen. Vor Auffangen im Fraktionssammler wurden die Proben spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm überprüft. Die auftretenden Peaks wurden anschliessend auf einer PEI-Platte chromatographisch aufgetrennt (7.3.2), wonach die ppGpp-haltigen Fraktionen einer ungefähren LiCl-Elutionskonzentration von 0,35 M zugeordnet werden konnten. Nach einer Volumeneinengung erfolgte eine weitere Aufreinigung über ein Molekularsieb (7.3.2).

TL0,1-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 100 mM LiCl
TL0,5-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 500 mM LiCl
TL1,0-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 1M LiCl

Gelfiltration

Hier handelt es sich ebenfalls um eine chromatographische Auftrennung, deren Prinzip jedoch nicht auf Ladung, sondern auf Molekulargröße besteht. Diese Methode wurde angewandt, um die erhaltene ppGpp-Lösung von störenden LiCl-Ionen zu befreien. Als Matrix diente hier eine Sephadex G10-Säule, die Masse betrug 70 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Als Elutionslösung wurde entgastes, 2x autoklaviertes *Aqua dest.* verwendet. Nach Beladung und Äquilibrierung erfolgte die Elution mit einer Flussrate von 0,6 ml/min, die Fraktionen wurden ebenfalls zu je 4,5 ml aufgefangen. Hier wurde nur ein Elutionspeak bei frühen Fraktionen detektiert (Frakt. 10 bis 15), eine anschließende DC (7.3.2) konnte ppGpp in diesen Fraktionen identifizieren. Anschliessend wurde die Konzentration der Lösung bei $\lambda=254$ nm bestimmt.

Messung der Leitfähigkeit

Für die *in vitro* Transkription wurde bereits eine hohe Salzepfindlichkeit nachgewiesen [64]. Für eine ppGpp-bedingte Inhibierungsmessung muss daher stets ausgeschlossen werden können, dass der Effekt nicht auf einer zu hohen LiCl-Konzentration beruht. Daher ist nach jeder ppGpp-Präparation eine Leitfähigkeitsmessung obligatorisch. Zuerst wurde ein LiCl-Eichreihe erstellt, von der dann ein die vorliegende LiCl-Konzentration in der ppGpp-Lösung abgelesen werden konnte. Da das enthaltene ppGpp ebenfalls ein Ladungsträger ist, spiegelt die abgelesene Konzentration somit einen höheren Wert wider, als allein durch LiCl hervorgerufen. Die hier aufgetretenen LiCl-Konzentrationen bewegten sich nicht in störendem Bereich, so dass von einer erneuten Gelfiltration abgesehen wurde.

7.3.3 *In vivo* Nachweis von ppGpp

In Bakterienzellen kann die stringente Kontrolle durch Zugabe von Serinhydroxamat ausgelöst werden. Serinhydroxamat inhibiert die Aminoacylierung der tRNA^{Ser} durch die Seryl-tRNA-Synthetase [119], [118]. Es werden jedoch hohe Konzentrationen (meist 1 mg/ml) benötigt, die Probleme durch die Hydroxamat-Reaktivität hervorrufen könnten.

Hier wurde die ppGpp-Synthese durch Einbau von radioaktivem ortho-Phosphat ($\alpha^{32}\text{PO}_3^-$) nachgewiesen. Dazu wurden in Glasgreinergefässen mit Schraubverschluss 3 ml verschiedene *E. coli*-Zellkulturen üN bei 37°C in einem Wasserbad-Rundschüttler (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) herangezogen, die dann in 2 ml üT bis zur logarithmischen Phase herangezogen wurden. Die hier verwendeten Stämme waren MG1655, MG1655*relA*, CP78 und CP 79 (6.2.1). Die MG1655-Zellen benötigten 3 h, die CP-Zellen 4 h für eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,6. Als Nährmedium wurde ein phosphatfreies ZPM⁰-Medium gewählt, das mit 0,2 mM KH_2PO_4 versetzt wurde. Ein Vollmedium würde zuviel Phosphat enthalten, um einen radioaktiven Einbau nachzuweisen. Der üT-Kultur wurde vor Animpfen 270 $\mu\text{Ci } \alpha^{32}\text{PO}_3^-$ zugefügt.

Nach entsprechender Wachstumszeit wurde Serinhydroxamat mit einer Endkonzentration von 0,7 mg/ml zugefügt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten 300 μl Proben entnommen, die auf 300 μl 1N Formiat in 1,5 ml Reaktionsgefässe gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert wurden. Das Formiat macht die Zellmembran porös und erlaubt den Durchtritt niedermolekularer Verbindungen, wie z.B. ppGpp. Anschliessend wurden die Proben für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet enthält nun Zelltrümmer, im Überstand sind niedermolekulare Verbindungen enthalten. Die Überstände wurden für eine chromatographische Auftrennung über PEI-Platten (7.3.2) verwendet.

Für die chromatographische Auftrennung wurde eine PEI-Platte 2x mit 2N Formiat-Lösung (pH 2,2, eingestellt mit Pyridin) sowie 1x mit *Aqua dest.* gewaschen und getrocknet. Anschliessend wurden je 8 μl der zuvor präparierten Proben schrittweise aufgetragen. Als Referenzwerte wurden je 10 $\mu\text{l } \alpha^{32}\text{PO}_3^-$, $\alpha^{32}\text{P-ATP}$, $\alpha^{32}\text{P-CTP}$ sowie $\alpha^{32}\text{P-GTP}$ aufgetragen. Diese Referenzphosphate wurden zuvor 1:100 in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt, da ihre Signalstärke auf der Autoradiographie sonst zu intensiv ausfallen würden.

Nach Auftrag auf die PEI-Platte wurden die Proben getrocknet und zuerst mit *Aqua dest.* als Laufmittel von störenden Rückständen befreit. Dabei laufen die phosphathaltigen Substanzen nicht mit, es laufen ausschliesslich wasserlösliche Rückstände mit der Laufmittelfront. Nach dem ersten Lauf wurde eine chromatographische Auftrennung mit 1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 3,4) als Laufmittel durchgeführt. Die Chromatographie erfolgte solange, bis die Lauffront 2 cm unterhalb des oberen Randes der PEI-Platte gelaufen war. Nach Trocknen wurde die PEI-Platte autoradiographiert (7.2.5).

ZPM⁰-Medium 50 mM Tris/HCl
 1,7 mM Natriumcitrat
 2 mM KCl
 0,41 mM MgSO_4
 2 μM FeCl_3
 2 g Glucose
 2 g phosphatfreies Casaminosäurehydrolysat
 1 μg Thiamin
 mit HCl auf pH 7,4 einstellen, Endvolumen 1 l

Herstellen von 100 ml phosphatfreiem Casaminosäurehydrolysat

10 g Casaminsäuren
2,5 ml 2 M MgCl₂
mit 25% NH₄OH auf pH 10 einstellen
mit *Aqua dest.* auf 100 ml auffüllen
1 h bei 4°C rühren, dabei fällt MgNH₄⁺PO₃⁻ aus
Lösung in JA17-Rotor (BECKMANN, J2-21 Zentrifuge)
bei 4°C, 10000 rpm für 20 min abzentrifugieren
pH 7,0 mit HCl einstellen, Medium autoklavieren

7.3.4 Isolation von Gesamt-RNA aus *E. coli*

10 ml einer Flüssigkultur gewünschter optischer Dichte wurden in einem Greiner Zentrifugenröhrchen sedimentiert (HERAEUS Megafuge 1.0 R oder BECKMANN COULTER, GPKR Zentrifuge, Ausschwingrotor, 4°C) und in 0,5 ml Puffer I resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 0,5 ml 60°C heissem Phenol (mit 20 mM NaOAc, pH 5,5 gesättigt) versetzt. Nach sorgfältigem Vortexen wurden die Phenolgemische 5 min bei 60°C inkubiert. Anschliessend wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm HERAEUS Biofuge 1.5) und die wässrige Phase erneut mit 0,5 ml heissem Phenol versetzt, inkubiert und zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis keine Interphase mehr zu sehen war. Anschliessend erfolgte eine Chloroform-Extraktion, um phenolische Reste aus der wässrigen Lösung zu entfernen. Danach wurde die wässrige Phase mit dem dreifachen Volumen absolutem Ethanol versetzt und für 30 min auf Eis gefällt. Nun wurden die Proben bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden mit 80%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgehoben und die Pellets in der *SpeedVac* (HETO Speedvac VR-1) getrocknet. Die RNA wurde schliesslich in 10 bis 30 µl TE-Puffer (6.5) aufgenommen, spektroskopisch auf Konzentration und Reinheit geprüft (7.2.3) und auf einem 1,5 %igen Agarosegel bezüglich der stöchiometrischen Zusammensetzung ribosomaler RNAs geprüft.

Puffer I 20 mM NaOAc
1 mM EDTA, pH 8,0
0,5 % (w/v) SDS

7.3.5 *In vitro* Transkription (IVT)

Die *in vitro* Transkription stellt in dieser Arbeit einen grossen Teil dar, viele Ergebnisse wurden durch *in vitro* Transkription erhalten, darum wird diese Methode im Folgenden besonders ausführlich behandelt. Jede *in vitro* Transkription wurde bei 30°C durchgeführt. Nach der Reaktionszeit wurden die Proben über denaturierende PAA-Elektrophorese (7.2.4) analysiert, autoradiographisch (7.2.5) detektiert und ggf. quantifiziert.

RNA-Polymerase

Für die *in vitro* Transkription einer DNA (=template) werden Ribonukleotide (ATP, CTP, GTP und UTP), eine DNA-abhängige RNA-Polymerase und ein geeignetes Ionenmilieu benötigt. Hier wurde die RNA-Polymerase von *E. coli* verwendet, die vorher selbst präpariert wurde (6.4.2). Die Konzentrationen variierten, als Standardansatz wurde jedoch 3 nM aktives Enzym verwendet.

Ribonukleotide

Als Ribonukleotide wurden hochreine NTPs verwendet, auch hier variierten die Konzentrationen. Für die Visualisierung der Transkripte wurde, wenn nicht anders angegeben, radioaktiver Einbau gewählt. Hierfür wurde $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP verwendet, da es bei den hier verwendeten templates an zweiter oder dritter Stelle eingebaut wird. Dies spielt bei der Transkriptionsinitiation eine grosse Rolle, denn das radioaktive Nukleotid muss limitiert eingesetzt werden. Das bedeutet hier, dass die Konzentration an nicht radioaktivem UTP gering gehalten werden muss, da sonst der statistisch verteilte Einbau von radioaktivem UTP für eine Detektion durch Autoradiographie zu gering wäre. Würde hier der Einbau des Startnukleotids (ATP oder GTP) gewählt werden, würde die Limitation des ersten Nukleotids eine sehr geringe Transkriptionsrate und somit artifizielle Effekte ergeben. Die Konzentration des radioaktiven Nukleotids betragen 167 nM (superhelikale templates) bzw. 333 nM (lineare templates). Das entsprechende nicht radioaktive Nukleotid wurde zu 10 μM (superhelikale templates) bzw. zu 5 μM eingesetzt.

Templates

Als templates wurden, wenn nicht anders angegeben, isolierte Fragmente bzw. superhelikale Plasmide verwendet, die die vollständige UAS-Region, den P1-Promotor sowie einige bp *upstream* eines jeweiligen *rrn*-Operons von *E. coli* und ein nachgeschaltetes *cat*-Gen enthielten (6.3.2, 6.2.2). Die Transkription von Fragmenten wurde durch Abfallen der RNAP am Fragmentende terminiert. Bei superhelikalen templates wurde die Transkription durch intrinsische Terminatoren auf dem Plasmid terminiert (siehe Abschnitt ??). Wenn nicht anders angegeben, wurde die *in vitro* Transkription mit 1 nM template-Konzentration durchgeführt, es wurden für eine bessere Reproduktivität 10 nM Stammlösungen der templates verwendet.

Pufferbedingungen

Für *in vitro* Transkription wurde bereits in der Vergangenheit eine hohe Salzeempfindlichkeit beschrieben [112]. Daher ist es wichtig, ein geeignetes Ionenmilieu für die *in vitro* Transkription einzustellen. Hier wurde mit Kaliumglutamationen (KGlu) gearbeitet, denn es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden,

dass entsprechende Puffersysteme mit Chloridionen die Transkription inhibieren. Für *in vitro* Transkription mit linearen *templates* wurde ein 80 mM KGlu-Puffer (6.5) gewählt, die *in vitro* Transkription mit superhelikalen *templates* wiesen jedoch bei einer 160 mM KGlu-Konzentration die stärksten Produktbanden auf. Es wurden hier jeweils 10x-Puffer hergestellt, um das Reaktionsvolumen von 10 μ l einzuhalten.

Reaktionsansatz

Vor Beginn jeder *in vitro* Transkription wurden, wenn nicht anders angegeben, die *templates* einzeln vorgelegt. Für eine präzisere Reproduktivität wurden dann sog. Prämixe hergestellt, die Nukleotide, Puffer und ggf. ppGpp enthielten. Dieser Prämix wurde auf die *templates* pipettiert, der Reaktionsstart erfolgte, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von RNA-Polymerase. Insgesamt wurde ein Reaktionsvolumen von 10 μ l inkl. der RNA-Polymerase eingehalten. Die RNA-Polymerase wurde vorher behutsam in AB-Diluent verdünnt und stets in 3 μ l-Volumina hinzugegeben.

Reaktionsablauf

Nach Transkriptionsstart wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Elongationszeit von 10 min eingehalten. Anschliessend wurde jede Probe mit 1,5 μ l *chase*-Lösung versetzt (6.5). Diese Lösung enthält u.a. Heparin (ein negativ geladenes Polysaccharid), welches eine Neuintiation am Promotor verhindert, indem es freie RNA-Polymerasen mit hoher Affinität bindet. Zudem sind alle vier Ribonukleotide in hoher Konzentration enthalten. Durch Zugabe der *chase*-Lösung wird eine effiziente Elongation der bereits begonnenen Transkripte sichergestellt, die unter vorherigen Bedingungen (Limitierung eines NTP's) nicht möglich ist.

Nach weiteren 10 min wurde dann die Transkription durch Zugabe von 10 μ l Formamid-Probenpuffer (6.5) gestoppt. Zur präziseren Quantifizierung der Produktbanden wurde dem Puffer stets radioaktiv markiertes P1-Fragment (6.3.2) hinzugegeben, um eventuelle Abweichungen durch Pipettierfehler mathematisch aufzuschlüsseln. Anschliessend wurden die Proben bei 96°C für drei min denaturiert, 3 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und über verschieden prozentige Harnstoffgele elektrophoretisch aufgetrennt (7.2.4). Die Detektion erfolgte dann entweder über Röntgenfilme oder über Phosphorimager (7.2.5).

In vitro Transkription unter *multiple round* Bedingungen

Bei dieser Reaktion werden beliebig viele Initiationen während der Elongationszeit zugelassen. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von RNA-Polymerase gestartet, die Elongationszeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 10 min. Anschliessend wurde zu jeder Probe die *chase*-Lösung pipettiert, für weitere 10 min inkubiert und anschliessend durch Formamid-Probenpuffer gestoppt. Anschliessend wurden die Proben über verschieden prozentige Harnstoffgele (7.2.4) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie (7.2.5) visualisiert.

***In vitro* Transkription unter *single round* Bedingungen**

Hier wird pro *template* nur eine Initiation zugelassen. Die *templates* wurden zunächst mit Puffer und dem ersten und zweiten Startnukleotid zusammen pipettiert. Anschliessend wurde die RNA-Polymerase hinzugefügt und die Ansätze für 10 min inkubiert. In dieser Zeit kann die RNA-Polymerase die Transkriptionsinitiation starten. Da jedoch zwei weitere NTPs fehlen, kann der Initiationskomplex nicht in den Elongationskomplex isomerisieren, die RNA-Polymerase wird festgehalten. Nach 10 min wurde die *chase*-Lösung hinzu pipettiert, so dass die Initiationskomplexe in die Elongationsphase übertreten konnten, aufgrund des Heparin Gehalts in der *chase*-Lösung wurde jedoch eine Neuinitiation verhindert. Da in der *chase*-Lösung alle 4 NTPs in hohen Konzentrationen vorlagen, ist hier der radioaktive Einbau eines NTPs für eine Visualisierung über Autoradiographie nicht effizient genug. Daher wurde bereits auf Initiationsebene der radioaktive Einbau gewählt: das zweite Startnukleotid wurde sowohl radioaktiv als auch nicht radioaktiv angeboten. Da nur eine Initiation erfolgte, wurde pro Transkript nur einmal markiert. Daher war die Stärke der Transkriptbanden deutlich schwächer als bei *multiple round in vitro* Transkription (7.3.5). Auch hier wurden die Ansätze nach Zugabe von Formamid-Probenpuffer (6.5) über Harnstoffgele (7.2.4) aufgetrennt und anschliessend autoradiographiert (7.2.5).

7.3.6 *Primer Extension* zur Analyse von RNA

Diese Methode wurde verwendet, um Gesamt-RNA zu analysieren. Dabei wurde durch Verwendung eines radioaktiv markierten Oligonukleotids eine bestimmte RNA nachgewiesen. Bei dieser Methode wird *in vitro* cDNA synthetisiert, das verwendete Enzym ist eine Reverse Transkriptase (AMV, 6.4.2). Zunächst wurde eine Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden 5 μg Gesamt-RNA mit 10^6 cpm radioaktiv markiertem Oligonukleotid in Gegenwart von 100 mM KCl und 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 in 4,5 μl für 10 min bei 68°C inkubiert. Anschliessend wurde der Ansatz schonend auf Raumtemperatur abgekühlt (1°C/min). Von diesem Ansatz wurden 3 μl mit 1 μl 5x *primer extension*-Puffer, 2 μl 4 dNTP-Lösung und 1 U AMV-Reverse Transkriptase für 30 min bei 42°C inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μl Formamid-Probenpuffer (6.5) und Inkubation bei 96°C für 3 min gestoppt. Die Proben wurden dann über ein 15%iges Harnstoffgel (7.2.4) aufgetrennt und autoradiographisch und ggf. densitometrisch ausgewertet (7.2.5, 7.2.5).

5x <i>primer extension</i> -Puffer	125 mM Tris/HCl, pH 8,3 125 mM KCl 125 mM MgCl ₂ 125 mM DT
4 dNTP-Lösung	je 250 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

7.3.7 *Primer Extension* Sequenzierung von RNA

Die Sequenzierung von RNA erfolgte analog der *primer extension* wie unter 7.3.6 beschrieben. Das Hybridisierungsvolumen betrug hier jedoch 8,5 μl . Nach der Hybridisierung wurden in einem Volumen von 6 μl 2 μl Hybridisierungsansatz mit 2 μl ddNTP-Lösung und 1 U AMV-Reverse Transkriptase in 1x *primer extension*-Puffer für 30 min bei 42 °C inkubiert. Anschliessend wurde wie unter 7.3.6 beschrieben fortgeföhren.

ddNTP-Lösung je 250 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
zusätzlich enthielten der
A-Mix: 50 μM ddTTP
C-Mix: 50 μM ddGTP
G-Mix: 50 μM ddCTP
T-Mix: 50 μM ddATP

8 Literaturverzeichnis

- [1] Afflerbach, H., Schröder, O. & Wagner, R. (1998). Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*. *Mol. Microbiol.*, 28(3), 641–53.
- [2] Afflerbach, H., Schröder, O. & Wagner, R. (1999). Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* *rrnB* P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.*, 286(2), 339–53.
- [3] Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S. & Vassylyev, D. G. (2004). Structural Basis for Transcription Regulation by Alarmone ppGpp. *Cell*, 117(3), 299–310, 0092-8674 Journal Article.
- [4] Barker, M. M., Gaal, T. & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.*, 305, 689–702.
- [5] Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 305, 673–688.
- [6] Bear, D. G. & Peabody, D. S. (1988). The *E. coli* Rho protein: an ATPase that terminates transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 13, 343–347.
- [7] Beidler, J. L., Hillard, P. R. & Rill, R. L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical. Biochem.*, 126, 374–380.
- [8] Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453–1462.
- [9] Borukhov, S., Sagitov, V., Josaitis, C. A., Gourse, R. L. & Goldfarb, A. (1993). Two modes of transcription initiation *in vitro* at the *rrnB* P1 promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268, 23477–23482.
- [10] Bosch, L., Nilsson, L., Vijgenboom, E. & Verbeek, H. (1990). Fis-dependent trans-activation of tRNA and rRNA operons of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1050, 293–301.
- [11] Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. & Buc, H. (1989). Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 8, 4289–4296.
- [12] Bremer, H & Ehrenberg, M. (1995). Guanosine tetraphosphate as a global regulator of bacterial RNA synthesis: A model involving RNA polymerase pausing and queuing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1262, 15–36.
- [13] Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene*, 27, 151–160.
- [14] Brown, L., Gentry, D., Elliot, T. & Cashel, M. (2002). DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J. Bacteriol.*, 184, 4455–4465.
- [15] Burgess, R. R. & Jendrisak, J. J. (1975). A procedure for the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography. *Biochemistry*, 14, 4636–4638.
- [16] Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. & Bautz, E. K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221(175), 43–6, 0028-0836 Journal Article.

- [17] Calles, Christian (2002). Untersuchungen zum Einfluss von Guanosintetraphosphat auf individuelle *E. coli* rRNA-Promotoren *in vivo*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [18] Cashel, M. (1969). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid starved stringent strains. *J. Biol. Chem.*, 244, 3133–3141.
- [19] Cashel, M. (1975). Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. *Annu. Rev. Microbiol.*, 29, 301–18, Using Smart Source Parsing.
- [20] Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J. & Vinella, D. (1996). The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. (Neidhard, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E., Hrsg.), volume 2, S. 1458–1496. ASM Press, Washington, D. C.
- [21] Cashel, M. & Kalbacher, B. (1970). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V) Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. *J. Biol. Chem.*, 245, 2309–2318.
- [22] Caslake, L. F., Ashraf, S. I. & Summers, A. O. (1997). Mutations in the α and σ -70 subunits of RNA polymerase affect expression of the mer operon. *J. Bacteriol.*, 179(5), 1787–95.
- [23] Chamberlin, M. J., Nierman, W. C., Wiggs, J. & Neff, N. (1979). A quantitative assay for bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, 254, 10061–10069.
- [24] Chatterji, D., Fujita, N. & Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells*, 3(5), 279–87.
- [25] Chen, H., Tang, H. & Ebright, R. H. (2003). Functional interaction between RNA polymerase α subunit C-terminal domain and σ 70 in UP-element- and activator-dependent transcription. *Mol Cell*, 11(6), 1621–33, 1097-2765 Journal Article.
- [26] Condon, C., Philips, J., Fu, Z.-Y., Squires, C & Squires, C. L. (1992). Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 11, 4175–4185.
- [27] Condon, C., Squires, C. & Squires, C. L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 59, 623–645.
- [28] Craig, M. L., Tsodikov, O. V., McQuade, K. L., Schlx, P. E., Capp, M. W., Saecker, R. M. & Record, M. T. (1998). DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *J. Mol. Biol.*, 283, 741–756.
- [29] d'Aubenton Carafa, Y., Brody, E. & Thermes, C. (1990). Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol*, 216(4), 835–58.
- [30] Davis, C. A., Capp, M. W., Record, M. T., Jr. & Saecker, R. M. (2005). The effects of upstream DNA on open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2), 285–90, 0027-8424 Journal Article.
- [31] Dickson, R. R., Gaal, T., deBoer, H., L., Haseth, P. & Gourse, R. L. (1989). Identification of promoter mutants defective in growth-rate-dependent regulation of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 171, 4862–4870.
- [32] Dlakic, M. & Harrington, R. E. (1998). Diamod: display and modeling of DNA bending. *Bioinformatics*, 14, 326–331.
- [33] Drlica, K. (1984). Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiological Reviews*, 84, 273–289.
- [34] Drlica, K. (1990). Bacterial topoisomerases and the control of DNA supercoiling. *Trends in Genetics*, 6, 433–437.
- [35] Drlica, K. (1992). Control of bacterial DNA supercoiling. *Molecular Microbiology*, 6, 425–433.

- [36] Erie, D. A., Yager, T. D. & von Hippel, P. H. (1992). The single-nucleotide addition cycle in transcription: a biophysical and biochemical perspective. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 379–415.
- [37] Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W. & Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(17), 9761–6.
- [38] Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. W. S., Niu, W., Ebright, R. H. & Gourse, R. L. (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes and Development*, 13, 2134–2147.
- [39] Finkel, S. E. & Johnson, R. C. (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol Microbiol.*, 6(22), 3257–65.
- [40] Fredrick, K., Caramori, T., Chen, Y. F., Galizzi, A. & Helmann, J. D. (1995). Promoter architecture in the flagellar regulon of *Bacillus subtilis*: high-level expression of flagellin by the σ D RNA polymerase requires an upstream promoter element. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(7), 2582–6, 0027-8424 Journal Article.
- [41] Fredrick, K. & Helmann, J. D. (1997). RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(10), 4982–7, 0027-8424 Journal Article.
- [42] Gaal, T., Rao, L., Estrem, S. T., Yang, J., Wartell, R. M. & Gourse, R. L. (1994). Localization of the intrinsically bent DNA region upstream of the *E. coli* *rrnB* P1 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 22, 2344–2350.
- [43] Gonzales, N., Wiggs, J. & Chamberlin, M. J. (1977). A simple procedure for resolution of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 182, 404–408.
- [44] Gourse, R. L., deBoer, H. A. & Nomura, M. (1986). DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: Growth rate-dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell*, 44, 197–205.
- [45] Gourse, R. L., Ross, W. & Gaal, T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the α subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol.*, 37(4), 687–95.
- [46] Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. & Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of σ factors in transcription. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 63, 141–155.
- [47] Guajardo, R. & Sousa, R. (1997). A model for the mechanism of polymerase translocation. *J. Mol. Biol.*, 265, 8–19.
- [48] Heinemann, M. & Wagner, R. (1997). Guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.*, 247, 990–999.
- [49] Hernandez, V. J. & Cashel, M. (1995). Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ 70 mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, 252, 536–549.
- [50] Heumann, H., Zaychikov, E., Denissova, L. & Hermann, T. (1997). Translocation of DNA-dependent *E. coli* RNA polymerase during RNA synthesis. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*. (Eckstein, F. & Lilley, D. M. J., Hrsg.), volume 11, S. 151–177. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [51] Hill, C. W. & Harnish, B. W. (1982). Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes into other rRNA genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 149, 449–457.
- [52] Hillebrand, Annette (2001). Transkriptionsfaktor- und wachstumsabhängige Regulation der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons in *Escherichia coli*. Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [53] Hirvonen, C. A., Ross, W., Wozniak, C. E., Marasco, E., Anthony, J. R., Aiyar, S. E., Newburn, V. H. & Gourse, R. L. (2001). Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183, 6305–6314.

- [54] Igarashi, K., Fujita, N. & Ishihama, A. (1991). Identification of a subunit assembly domain in the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 218, 1–6.
- [55] Jin, D. J. (1994). Slippage synthesis at the galP2 promoter of *Escherichia coli* and its regulation by UTP concentration and cAMP-cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.*, 269, 17221–17227.
- [56] Josaitis, C. A., Gaal, T. & Gourse, R. L. (1995). Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 1117–1121.
- [57] Jöres, L. & Wagner, R. (2003). Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. *J. Biol. Chem.*, 278, 16834–16843.
- [58] Kingston, R. E., Nierman, W. C. & J., Chamberlin, M. (1981). A direct effect of guanosine tetraphosphate on pausing of *Escherichia coli* RNA polymerase during RNA chain elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 2787–2797.
- [59] Knutsson Jenvert, R. M. & Holmberg Schiavone, L. (2005). Characterization of the tRNA and ribosome-dependent pppGpp-synthesis by recombinant stringent factor from *Escherichia coli*. *Febs J*, 272(3), 685–95, 1742-464x Journal Article.
- [60] Kolasa, I. K., Lozinski, T. & Wierzchowski, K. L. (2002). Effect of a(n) tracts within the up element proximal subsite of a model promoter on kinetics of open complex formation by *Escherichia coli* rna polymerase. *Acta Biochim Pol*, 49(3), 659–69, 0001-527x Journal Article.
- [61] Kolasa, I. K., Lozinski, T. & Wierzchowski, K. L. (2003). Effects of distortions by a-tracts of promoter b-dna spacer region on the kinetics of open complex formation by *Escherichia coli* rna polymerase. *Acta Biochim Pol*, 50(4), 909–20, 0001-527x Journal Article.
- [62] Kolmsee, Tim (2005). Welche Rolle spielen die Startnukleotide für den Mechanismus der Transkriptionsregulation unter den Bedingungen der Stringenten Kontrolle? Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [63] Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A. & Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science*, 289, 619–625.
- [64] Krohn, M. & Wagner, R. (1995). A procedure for the rapid preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) from *Escherichia coli* ribosomes. *Anal. Biochem.*, 225, 188–190.
- [65] Krohn, M & Wagner, R. (1996). Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J. Biol. Chem.*, 271, 23884–23894.
- [66] Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, S. L., Rogulja, D., Nickels, B. E., Hochschild, A., Heyduk, T. & Severinov, K. (2002). A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the σ subunit in promoter recognition. *Science*, 295, 855–857.
- [67] Kvint, K., Hosbond, C., Farewell, A., Nybroe, O. & Nyström, T. (2000). Emergency derepression: stringency allows RNA polymerase to override negative control by an active repressor. *Molecular Microbiology*, 35, 435–443.
- [68] Leirmo, S. & Gourse, R. L. (1991). Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription. I. Kinetic analysis of the roles of the upstream activator region and supercoiling on transcription of the *rrmB* P1 promoter *in vitro*. *J Mol Biol*, 220(3), 555–68.
- [69] Levin, J. R., B., Krummel, & Chamberlin, M. J. (1987). Isolation and properties of transcribing ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase positioned at a single template base. *J. Mol. Biol.*, 196, 85–100.
- [70] Lew, C. M. & Gralla, J. D. (2004). Mechanism of stimulation of ribosomal promoters by binding of the +1 and +2 nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 279(19), 19481–5, 0021-9258 Journal Article.
- [71] Lew, C. M. & Gralla, J. D. (2004). Mechanism of stimulation of ribosomal promoters by binding of the +1 and +2 nucleotides. *J Biol Chem*, 279(19), 19481–5, 0021-9258 Journal Article.

- [72] Li, X.-Y. & McClure, W. R. (1998). Characterization of the closed complex intermediate formed during transcription initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 23548–23557.
- [73] Maitra, A., Shulgina, I. & Hernandez, V. J. (2005). Conversion of active promoter-RNA polymerase complexes into inactive promoter bound complexes in *E. coli* by the transcription effector, ppGpp. *Mol Cell*, 17(6), 817–29, 1097-2765 Journal Article.
- [74] McKane, M. & Gussin, G. N. (2000). Changes in the 17 bp spacer in the P(R) promoter of bacteriophage lambda affect steps in open complex formation that precede DNA strand separation. *J Mol Biol*, 299(2), 337–49.
- [75] Meissner, Marc (2004). Analyse bakterieller Ribosomenpools - gibt es stressbedingte Unterschiede? Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [76] Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A. N., Niu, W., Ebright, Y. W., Levy, R. & Ebright, R. H. (2002). Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*, 108, 599–614.
- [77] Meng, W., Belyaeva, T., Savery, N. J., Busby, S. J. W., Ross, W., Gaal, T., Gourse, R. L. & T., Mark. S. (2001). UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase a subunit linker. *Nucleic Acids Res.*, 29, 4166–4178.
- [78] Mulligan, M. E., Brosius, J. & McClure, W. R. (1985). Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the *tac* promoter. *J Biol Chem*, 260(6), 3529–38, 0021-9258 Journal Article.
- [79] Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. & Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, 296, 12185–1290.
- [80] Murakami, K. S. & Darst, S. A. (2003). Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol*, 13(1), 31–9, 0959-440x Journal Article Review Review, Tutorial.
- [81] Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC.
- [82] Nickels, B. E., Garrity, S. J., Mekler, V., Minakhin, L., Severinov, K., Ebright, R. H. & Hochschild, A. (2005). The interaction between sigma70 and the beta-flap of *Escherichia coli* RNA polymerase inhibits extension of nascent RNA during early elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(12), 4488–93, 0027-8424 Journal Article.
- [83] Nickels, B. E. & Hochschild, A. (2004). Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. *Cell*, 118(3), 281–4, 0092-8674 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [84] Nilsson, L., Vanet, A., Vijgenboom, E. & Bosch, L. (1990). The role of Fis in trans activation of stable RNA operons of *E. coli*. *The EMBO Journal*, 9, 727–734.
- [85] Nudler, E., Gusarov, I., Avetissova, E., Kozlov, M. & Goldfarb, A. (1998). Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science*, 281, 424–428.
- [86] Nystrom, T. (2002). Translational fidelity, protein oxidation, and senescence: lessons from bacteria. *Ageing Res Rev*, 1(4), 693–703, 1568-1637 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [87] Ohlsen, K. L. & Gralla, J. D. (1992). DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *J. Biol. Chem.*, 267, 19813–19818.
- [88] Ohlsen, K. L. & Gralla, J. D. (1992). Melting during steady-state transcription of the *rrnB* P1 promoter *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.*, 174, 6071–6075.

- [89] Opalka, N., Chlenov, M., Chacon, P., Rice, W. J., Wriggers, W. & Darst, S. A. (2003). Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. *Cell*, 114(3), 335–45, 0092-8674 Journal Article.
- [90] Parkhill, J. & Brown, N. L. (1990). Site-specific insertion and deletion mutants in the mer promoter-operator region of Tn501; the nineteen base-pair spacer is essential for normal induction of the promoter by MerR. *Nucleic Acids Res.*, 18(17), 5157–62.
- [91] Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W. & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118(3), 311–22, 0092-8674 Journal Article.
- [92] Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I. & Vassilyev, D. G. (2004). Regulation through the secondary channel–structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell*, 118(3), 297–309, 0092-8674 Journal Article.
- [93] Plaskon, R. R. & Wartell, R. M. (1987). Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res*, 15(2), 785–96, 0305-1048 Journal Article.
- [94] Pohl, Corinna (2001). Differentielle Regulation der Transkription bakterieller ribosomaler RNA-Operons unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [95] Poirot, O., Suhre, K., Abergel, C., O’Toole, E. & Notredame, C. (2004). 3DCoffee: a web server for mixing sequences and structures into multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res.*, 32, 37–40.
- [96] Polyakov, A., Severinova, E. & Darst, S. A. (1995). Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell*, 83, 365–373.
- [97] Rao, L., Ross, W., Appleman, J. A., Gaal, T., Leirmo, S., Schlax, P. J., Record, M. T. & Gourse, R. L. (1994). Factor-independent activation of *rrnB* P1: An extended promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J. Mol. Biol.*, 235, 1421–1435.
- [98] Reckendrees, Britta (2000). *In vitro* Analysen prokaryotischer Transkriptionsmechanismen während der exponentiellen und stationären Phase der Genexpression. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [99] Reckendrees, Britta (2000). Strukturelle und funktionelle Analysen von RNA-Polymerasekomplexen mit "mismatch bubble" templates in Gegenwart von Guanosintetraphosphat. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [100] Record, M. T., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. & Schlax, P. J. (1996). *Escherichia coli* RNA polymerase (Es70), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. (Neidhard, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E., Hrsg.), volume I, S. 792–821. ASM Press, Washington, D. C.
- [101] Reddy, P. S., Raghavan, A. & Chatterji, D. (1995). Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol Microbiol*, 15(2), 255–65.
- [102] Revyakin, A., Ebright, R. H. & Strick, T. R. (2004). Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(14), 4776–80, 0027-8424 Journal Article.
- [103] Richardson, J. P. (1993). Transcription termination. *Critical Reviews in Biochemistry and -Molecular Biology*, 28, 1–30.
- [104] Riggs, D. L., Müller, R. D., Kwan, H.-S. & Artz, S. W. (1986). Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 83, 9333–9337.

- [105] Rivellini, F., Alifano, P., Piscitelli, C., Blasi, V., Bruni, C. B. & Carlomagno, M. S. (1991). A cytosine-over guanosine-rich sequence in RNA activates rho-dependent transcription termination. *Molecular Microbiology*, 5, 3049–3054.
- [106] Ross, W., Ernst, A. & Gourse, R. L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: α subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev*, 15(5), 491–506, 0890-9369 Journal Article.
- [107] Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. & Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science*, 262, 1407–1413.
- [108] Ross, W. & Gourse, R. L. (2005). Sequence-independent upstream DNA- α CTD interactions strongly stimulate *Escherichia coli* RNA polymerase-*lacUV5* promoter association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2), 291–6, 0027-8424 Journal Article.
- [109] Ross, W., Schneider, D. A., Paul, B. J., Mertens, A. & Gourse, R. L. (2003). An intersubunit contact stimulating transcription initiation by *E. coli* RNA polymerase: interaction of the α C-terminal domain and σ region 4. *Genes Dev*, 17(10), 1293–307, 0890-9369 Journal Article.
- [110] Ross, W. R., Aiyar, S. E., Salomon, J. & Gourse, R. L. (1998). *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strength: modular structure of bacterial promoters. *J. Bacteriol.*, 180, 5375–5383.
- [111] Sander, P., Langert, W. & Müller, K. (1993). Mechanism of upstream activation of the *rrnD* promoter P1 of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268(16907-16916).
- [112] Schneider, D. A., Gaal, T. & Gourse, R. L. (2002). NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(13), 8602–7, 0027-8424 Journal Article.
- [113] Sribar, Martina (2002). Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die heterologe Zusammensetzung der rRNAs in bakteriellen Ribosomen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [114] Strainic, M. G., Sullivan, J. J., Velvis, A. A. & deHaseth, P. L. (1998). Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase: Effects of the UP element on open complex formation and promoter clearance. *Biochemistry*, 37, 18074–18080.
- [115] Tahirov, T. H., Temiakov, D., Anikin, M., Patlan, V., McAllister, W. T., Vassylyev, D. G. & Yokoyama, S. (2002). Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature*, 420(6911), 43–50, 0028-0836 Journal Article.
- [116] Theißen, G. and Pardon, B. and Wagner, R. (1990). A quantitative assessment for transcriptional pausing of DNA-dependent RNA polymerase *in vitro*. *Analytical Biochemistry*, 189, 254–261.
- [117] Tippner, D., Afflerbach, H., Bradacsek, C. & Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol Microbiol*, 11(3), 589–604.
- [118] Tosa, T. & Pizer, L. I. (1971). Biochemical bases for the antimetabolite action of l-serine hydroxamate. *J Bacteriol*, 106(3), 972–82, 0021-9193 Journal Article.
- [119] Tosa, T. & Pizer, L. I. (1971). Effect of serine hydroxamate on the growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 106(3), 966–71, 0021-9193 Journal Article.
- [120] Toulmé, F. and Mosrin-Huaman, C. and Sparkowski, J. and Das, A. and Leng, M. and Rahmouni, A. R. (2000). GreA and GreB proteins revive backtracked RNA polymerase *in vivo* by promoting transcript trimming. *EMBO J.*, 19, 6853–6859.
- [121] Toulkhonov, I. I., Shulgina, I. & Hernandez, V. J. (2001). Binding of the transcription effector ppGpp to *E. coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N-terminus of the β' -subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1220–1225.
- [122] Travers, A. (1985). Sigma factors in multitude. *Nature*, 313(5997), 15–6, 0028-0836 News.

- [123] Tsao, Y.-P., Wu, H.-Y. & Liu, L. F. (1989). Transcription-dependent supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell*, 56, 111–118.
- [124] van Ulsen, P., Hillebrand, M., Kainz, M., Collard, R., Zulianello, L., van de Putte, P., Gourse, R. L. & Goosen, N. (1997). Function of the C-terminal domain of the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in basal expression and integration host factor-mediated activation of the early promoter of bacteriophage Mu. *J. Bacteriol.*, 179(2), 530–7.
- [125] VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 5589–5593.
- [126] Vo, N. V., Hsu, L. M., Kane, C. M. & Chamberlin, M. J. (2003). *In vitro* studies of transcript initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. 3. Influences of individual DNA elements within the promoter recognition region on abortive initiation and promoter escape. *Biochemistry*, 42(13), 3798–811, 0006-2960 Journal Article.
- [127] Wagner, L. A., Weiss, R. B., Driscoll, R., Dunn, D. S. & Gesteland, R. F. (1990). Transcriptional slippage occurs during elongation at runs of adenine or thymine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 18, 3529–3535.
- [128] Wagner, R. (2000). *Transcription Regulation in Prokaryotes*. Oxford University Press, Oxford.
- [129] Warne, S. E. & deHaseth, P. L. (1993). Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Effects of single base pair deletions and insertions in the spacer DNA separating the -10 and -35 regions are dependent on spacer DNA sequences. *Biochemistry*, 32, 6134–6140.
- [130] Xiong, X. F. & Reznikoff, W. S. (1993). Transcriptional slippage during the transcription initiation process at a mutant lac promoter *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, 231, 569–580.
- [131] Zacharias, M., Göringer, H. U. & Wagner, R. (1989). Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth rate control and stringent sensitivity. *EMBO J.*, 11, 3357–3363.
- [132] Zacharias, M., Göringer, H. U. & Wagner, R. (1990). The signal for growth rate control and stringent sensitivity in *E. coli* is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6271–6275.
- [133] Zacharias, M., Göringer, H. U. & Wagner, R. (1992). Analysis of the Fis-dependent and independent transcription activation mechanism of the *E. coli* ribosomal RNA P1 promoter. *Biochemistry*, 31, 2621–2628.
- [134] Zacharias, M., Theissen, G., Bradaczek, C. & Wagner, R. (1991). Analysis of sequence elements important for the synthesis and control of ribosomal RNA in *E. coli*. *Biochimie*, 73(6), 699–712.

9 Danksagung - Abschied

@Chef: Danke für die halbe Dekade, die ich unter Deinen Fittichen verbracht habe. Ich habe nicht nur exzellentes Wissen vermittelt bekommen, sondern auch erfahren, wie man an Problemen in der Forschung wachsen kann. Ich habe auch gelernt, wie wichtig Spass mit Kollegen, Frauenfussball und Grillen ist.....

@Gerhard und Schmitzi: Ohne euch wäre diese Arbeit print- und mactechnisch nicht machbar gewesen.....

@Wagners: Danke an Reini, Olli Z., an Larsi-Harsi und an Janni-Bunny, an Marc, Britta und Bibi, Martina, Toby, Calles, Artur, an Nina, Tom und Ümi. Die fünf Jahre mit euch waren ürre, die Tage mit euch sind schnell vorbei gegangen.....

@users.biophys.uni-duesseldorf.de: Danke an euch, für eine spaßige Atmosphäre, für viele Freundschaften.....

@Korrekturleser: Britta, Marc, Tom und Fränzchen, ohne euch gäbe es kein „ß“, dafür aber „Pornotore“ in meiner Arbeit.....

@Olli B.: Danke Olli, auch für´s Korrekturlesen. Der grösste Dank jedoch für alles, was mich zum Lachen gebracht hat.....

@lady´s: Nina, Britta, Angel, Martina. Für Eure Geduld und Zuneigung, die grenzenlos zu sein scheinen.....

@alle, die in einer ziemlich finsternen Zeit an meiner Seite standen, und mich zurückgeholt haben.....

@Familie: Danke. Für alles, für euch. Ihr seid mein Rückhalt.

Ein abgefallenes Blatt kehrt nicht zum Baum zurück.

Aus Rhodesien