Analyse des Antisigmafaktors Rsd aus *E. coli*: Charakterisierung von Bindungspartnern, Einfluss von Rsd auf die Transkription und Regulation des *rsd*-Gens

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Nina Hofmann aus Schwelm

> > Mai 2010

Aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Das kleine Protein Rsd ist ein Antisigmafaktor für σ^{70} , den Hauptsigmafaktor in *E. coli*. Beim Übergang in die stationäre Phase bindet Rsd an σ^{70} und verhindert so die Bildung des E σ^{70} Holoenzyms. Dadurch verbessert sich die Möglichkeit der Bindung des alternativen Sigmafaktors σ^{38} an das Coreenzym der RNAP und für eine Initiation der Transkription σ^{38} -abhängiger Gene.

Mittels Retardierungsanalysen und *in vitro* Transkriptionen wurde die Sigmafaktorspezifität von Rsd *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei den Bindungsstudien Rsd beide Holoenzyme inhibieren kann. Erst bei *in vitro* Transkriptionen zeigte sich eine selektive Inhibierung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms, während die Aktivität des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms nicht beeinträchtigt wurde. Bei einer *in vitro* Transkription unter Sigmakompetitionsbedingungen um die Bindung an das Coreenzym, konnte erstmalig die Inhibierung der σ^{70} -abhängigen Transkription bei gleichzeitiger Aktivierung der σ^{38} -abhängigen Transkription direkt gezeigt werden. Mittels *affinitybinding* Experimenten konnte eine Bindung von Rsd an σ^{38} nachgewiesen werden. Allerdings ergaben sich keine Hinweise auf die Bildung eines stabilen Rsd-RNAP-Komplexes. Mit Hilfe von Primer-Extension Analysen wurde der Einfluss von Rsd auf einige σ^{70} und σ^{38} -abhängige Promotoren *in vivo* untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass Rsd die Transkription von σ^{70} -abhängigen Promotoren in der stationären Phase aktiviert. Eine Inhibierung von σ^{70} -abhängigen Promotoren wurde jedoch nicht gefunden.

Den zweiten Teil dieser Arbeit bildete die Analyse der *rsd*-Expression. Die Transkription des *rsd*-Gens wird durch zwei Promotoren gesteuert, den σ^{38} -abhängigen P1 Promotor, der in der stationären Phase aktiv ist und den σ^{70} -abhängigen P2 Promotor der konstitutiv über die Wachstumsphasen exprimiert wird. Mittels Bindungsstudien wurde *in vitro* der Einfluss der Nucleoid-assoziierten Proteine H-NS, StpA, LPR und FIS untersucht. Dabei wurden Bindestellen der Proteine H-NS und StpA im Bereich des P2 Promotors und für FIS am P1 Promotor gefunden. Zusätzlich konnten Bindestellen von LRP und StpA im *rsd*-Gen nachgewiesen werden. Bei *in vivo* Analysen zeigte sich allerdings eine Derepression der *rsd*-Promotoren nur für die Proteine H NS und FIS. Dafür wurden Hinweise darauf gefunden, dass die *rsd*-Expression abhängig von der Methylierung der DNA ist. Weiterhin ergaben sich Hinweise auf eine Autoregulation von Rsd. Zwar scheint Rsd nicht stringent reguliert zu werden, dennoch gibt es deutliche *in vivo* und *in vitro* Effekt von DksA auf die *rsd*-Expression.

Summary

The small *Escherichia coli* protein Rsd is an anti-sigma factor for the primary sigma factor σ^{70} . When cells enter stationary phase Rsd inhibits the formation of $E\sigma^{70}$ holoenzyme by sequestering σ^{70} . As a consequence the alternative σ -factor σ^{38} directs RNAP to σ^{38} -dependent promoters.

By gel-shift and transcription assays, the σ -factor specificity of Rsd was examined. While gel-shift experiments revealed an unspecific inhibition of both holoenzymes, a specific inhibition of the $E\sigma^{70}$ but not of the $E\sigma^{38}$ holoenzyme could be shown by *in vitro* transcription assays. Furthermore in a σ -factor competition assay σ^{38} could effectively compete σ^{70} for core binding, when Rsd was present. Using affinity-binding experiments a direct interaction of Rsd and σ^{38} could be shown, but the formation of a stable Rsd-RNAP complex was not observed. The *in vivo* affect of Rsd on σ^{70} - and σ^{38} -dependent promoters was investigated with primer extension analysis. These experiments support the hypothesis of an Rsd-mediated increase in σ^{38} -dependent transcription. In contrast, rsd-mediated decrease of selected σ^{70} -dependent transcripts was not found.

In the second part of this work the expression of the *rsd*-gene was analyzed. Transcription of the *rsd*-gene is controlled from the σ^{38} -dependent P1 and the σ^{70} dependent P2 promoter. The P1 promoter is active in stationary phase, whereas the P2 promoter is constitutively expressed. The influence of the nucleoid-associated proteins H-NS, StpA, LRP and FIS was examined *in vitro* and *in vivo*. With gel-shift experiments it was possible to identify binding sites for H-NS and StpA at the P2 promoter, whereas FIS-binding sites were found at the P1 promoter site. Additional binding of LRP and StpA was observed in the *rsd*-gene. The *in vivo* experiments showed a de-repression of the *rsd*-promoters only by H-NS and FIS. The results of *in vitro* and *in vivo* experiments indicate, that DNA-methylation modulates the *rsd*expression. Additional results from *in vivo* studies support a model in which the *rsd*expression is auto-regulated. Most likely the *rsd*-expression is not under stringent control. Interestingly, DksA causes strong effects on transcription of the *rsd*-gene, although the effects were invers when results from *in vivo* and *in vitro* studies were compared.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitu	ng	1
	1.1 Anj	bassung von Bakterien an veränderte Umweltbedingungen	1
	1.2 Abl	auf der Transkription	2
	1.3 Die	Promotorstrukturen	3
	1.3.1	Der σ^{70} -abhängige Promotor	4
	1.3.2	Der σ^{38} -abhängige Promotor	5
	1.4 Aut	fbau der RNA-Polymerase	. 6
	1.5 Die	Sigmafaktoren	. 8
	1.5.1	Die σ^{70} -Untereinheit	9
	152	Die σ^{38} -Untereinheit	10
	16 Reg	pulation der Transkription	10
1.6.1 DNA-Methylierung		DNA-Methylierung	11
	1.6.1	Nucleoid-assoziierte Transkriptionsfaktoren	12
	1.6.2	RNAP-assoziierte Transkriptionsfaktoren	14
	17 Ant	isigmafaktoren	15
	171	Rsd (Regulator of SigmaD)	17
	18 Fra	gestellung und Konzention der Arbeit	19
2	Ergebni	sse	21
-	2.1 Ana	alvse des Antisigmafaktors Rsd aus <i>E coli</i>	21
	2.1 The 2.2 Cha	arakterisierung von potentiellen Bindungspartnern	21
	2 2 1	Einfluss von Rsd auf die RNA-Polymerase-Promotorbindung	23
	2.2.2	Footprint-Analysen der Promotorbindungen	25
	2.2.3	Inhibiert Rsd auch ein obligat σ^{38} -abhängiges System?	34
	2.2.4	Interaktion von Rsd mit Bestandteilen des Transkriptionsapparates	38
	2.3 Ein	fluss von Rsd auf die Transkription	43
	2.3	Pseudo single round in vitro Transkription	43
	232	Multiple round in vitro Transkription	45
	233	<i>In vitro</i> Transkription mit Sigmakompetition	48
	2.4 Reg	rulation der <i>rsd</i> -Expression	51
	2.4.1	Klonierung	52
	2.4.2	Die verwendeten <i>rsd</i> -Fragmente	54
	2.4.3	Bindung von Nucleoid-assoziierten Proteinen am <i>rsd</i> -Promotor	55
	2.4.4	Bedeutung der Methylgruppen für die Promotoraktivität	60
	2.4.5	Einfluss der Methylierung auf die NAP-Bindung	63
	2.4.6	Einfluss der Methylierung auf die Polymerasebindung	64
	2.4.7	Quantitative Analysen der <i>rsd</i> -Transkription	67
	2.4.8	Primer-Extension der <i>rsd</i> -mRNAs	68
	2.4.9	Einfluss der Wachstumsrate auf die <i>rsd</i> -Expression	70
	2.4.10	rsd-Expression in verschiedenen Stämmen	73
	2.4.11	Rsd-abhängige Gen-Expression in vivo	82
	2.4.12	Analyse der <i>rsd</i> -Promotoren <i>in vitro</i>	84
3	Diskuss	ion	89
3.1 Untersuchungen zur Funktion und Regulation von Rsd3.2 Interaktionspartner von Rsd		ersuchungen zur Funktion und Regulation von Rsd	89
		eraktionspartner von Rsd	89
	3.2.1	Die Sigmafaktoren in <i>E. coli</i>	89
	3.2.2	Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung der RNA-Polymerase Holoenzyme	90
	3.2.3	Die Bindungspartner von Rsd	94
	3.3 Fur	ktion von Rsd	98
	3.3.1	Funktionsstudien mittels in vitro Transkriptionen	98

3.3.2	Bedeutung der Promotorstärke für den Einfluss von Rsd auf die Transkriptio	on. 99
3.3.3	Die Modulation der Rsd-Aktivität	100
3.3.4	Funktion von Rsd <i>in vivo</i>	102
3.4 Reg	gulation der <i>rsd</i> -Expression	104
3.4.1	Ist die <i>rsd</i> -Expression abhängig von der Wachstumsrate?	105
3.4.2	Einfluss der Nucleoid-assoziierten Transkriptionsfaktoren auf die	
	Expression des <i>rsd</i> -Gens <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	106
3.4.3	Einfluss der DNA-Methylierung auf die NAP-Bindung	107
3.4.4	Wie beeinflusst die DNA-Methylierung die <i>rsd</i> -Expression?	108
3.4.5	Einfluss der Polymerase-assoziierten Transkriptionsfaktoren auf die	
	Expression des <i>rsd</i> -Gens <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	108
3.4.6	Wird die Transkription von <i>rsd</i> stringent reguliert?	109
3.4.7	Einfluss von $\sigma^{3\circ}$ auf die differenzielle Nutzung der <i>rsd</i> -Promotoren	
	P1 und P2	111
3.4.8	Autoregulation von Rsd	112
3.4.9	Welche Rolle spielt die 6S RNA für die <i>rsd</i> -Expression?	112
3.4.10	Ist Rsd ein <i>back-up</i> -System für die 6S RNA?	114
3.5 Au	sblick	118
4 Materia	1	119
4.1 All	gemeines	119
4.2 Bal	cterienstämme und Vektoren	119
4.2.1	Escherichia coli Stämme	119
4.2.2	Plasmide	121
4.3 DN	A-Fragmente	123
4.4 Nu	kleinsäuren und Nukleotide	126
4.4.1	Oligonukleotide	126
4.4.2	Verschiedene Nukleinsäuren	128
4.4.3	Nukleotide	129
4.5 Pro	teine	129
4.5.1	Enzyme und sonstige Proteine	129
4.5.2	Restriktionsendonukleasen	130
4.5.3	Polymerasen und Polymeraseuntereinheiten	130
4.5.4	Transkriptionsfaktoren	131
4.6 All	gemeine Puffer und Medien	132
4.7 Fei	nchemikalien	135
4.8 Vei	rschiedenes	137
5 Method	en	139
5.1 Mil	krobiologische Methoden	139
5.1.1	Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	139
5.1.2	Anzucht auf Agarplatten	139
5.1.3	Anzucht von üN-Kulturen	140
5.1.4	Haltung und Sicherung von Zellstämmen	140
5.1.5	Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock	140
5.1.6	Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock	141
5.1.7	Blau-Weiß-Selektion	141
5.1.8	Wachstumsratenbestimmung	142
5.2 Mo	lekularbiologische Methoden	143
5.2.1	Messen von Konzentrationen	143
5.2.2	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	145
5.2.3	Präparative Isolation von Plasmid-DNA (Maxipräp)	147
5.2.4	Plasmidisolation im analytischen Maßstab (Minipräp)	148

	5.2.5	Plasmidisolation mit dem Quiagen Plasmid Midi Kit (Midipräp)	150
	5.2.6	Präparation von chromosomaler DNA	150
	5.2.7	Präparation von Gesamt-RNA	151
	5.2.8	Enzymatische Reaktionen	153
	5.2.9	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	158
	5.2.10	Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen	161
	5.2.11	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	162
	5.3 Aut	reinigung von Rsd	163
	5.3.1	Proteinfällung mit Aceton.	166
	5.3.2	Dialyse von Proteinlösungen	166
	5.3.3	Gelelektrophorese von Proteinen	166
	5.3.4	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen.	168
	5.4 Spe	zielle Methoden	169
	5.4.1	Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem µMacs TM	
		Streptavidin Kit	169
	5.4.2	Verzögerungsgelelektrophorese	172
	5.4.3	DNA-Footprints	174
	5.4.4	multiple round in vitro Transkriptionen	177
	5.4.5	Pseudo single round in vitro Transkription	179
	5.4.6	Primer-Extension Reaktion	180
	5.4.7	Primer-Extension Sequenzierung.	180
	5.4.8	Bestimmung von Transkriptionsstartstellen	181
6	Anhang		182
	6.1 Plas	smidkarten	182
	6.2 Tab	ellen	183
	6.2.1	Pseudo single round in vitro Transkriptionen	183
	6.2.2	Multiple round in vitro Transkriptionen	183
	6.2.3	Sigmakompetition	184
	6.2.4	Wachstumsratenbestimmung	185
	6.2.5	rsd-Expression in verschiedenen Stämmen	185
	6.2.6	Rsd-abhängige Gen-Expression in vivo	187
	6.2.7	in vitro Transkription der rsd-Promotoren P1 und P2	187
	6.3 Abl	kürzungsverzeichnis	188
	6.4 Lite	eraturverzeichnis	192

1 Einleitung

1.1 Anpassung von Bakterien an veränderte Umweltbedingungen

Bakterien besiedeln die unterschiedlichsten Biosphären. Dort sind sie sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt, dazu zählen die Temperatur, die Feuchtigkeit, der Salzgehalt der Umgebung aber auch die Verfügbarkeit an Nährstoffen, die Interaktion mit anderen Mikroorganismen und eventuell die Immunabwehr eines Wirtsorganismus. Um zu Überleben müssen die Bakterien sich schnell und effizient anpassen. Das erfolgt durch eine veränderte Genexpression. Diese kann auf mehreren Ebenen reguliert werden. Dazu zählen die Replikation, die Transkription und die Translation mit anschließender Protein-Modifikation. Die Hauptebene der Regulation ist jedoch die Transkription, diese wird von der, aus mehreren Untereinheiten bestehenden, RNA-Polymerase durchgeführt. Eine dieser Untereinheiten, der Sigmafaktor, ist entscheidend an der Regulation der Genexpression beteiligt. Escheri*chia coli* besitzt sieben dieser Sigmafaktoren, die jeweils andere Regulons steuern und damit die Expression ganzer Genfamilien regulieren. Bedingt durch die einschneidende Wirkung auf das Transkriptionsmuster der Zelle, müssen diese Sigmafaktoren nachhaltig reguliert werden. Die Regulation findet auf mehreren Ebenen statt, neben dem Vorkommen in der Zelle wird auch die Aktivität gesteuert. Dabei spielen häufig Proteine eine Rolle die mit den Sigmafaktoren assoziiert sind und diese dabei inaktivieren. Durch äußere Signale wird die Bindung dieser Antisigmafaktoren aufgehoben und das Expressionsmuster der Zelle kann angepasst werden.

Die Anpassung beruht auf einer unterschiedlichen Spezifität der Sigmafaktoren für die DNA-Elemente, welche den Beginn einer Transkriptionseinheit markieren. Diese DNA-Elemente, die Promotoren, haben einen ähnlichen Aufbau. Dennoch gibt es Unterschiede in den Kernbereichen, die zu differenzierten Promotorklassen führen.

Die werden von verschiedenen Sigmafaktoren erkannt. Damit sind die Bindung der RNA-Polymerase und die Transkription dieser Promotortypen vom Sigmafaktor abhängig. Der Änderung des Transkriptionsmusters liegt also häufig ein Wechsel des Sigmafaktors zu Grunde.

1.2 Ablauf der Transkription



Abbildung 1.1 Ablauf der Transkriptionsinitiation: Dargestellt sind die vier Phasen (I-IV) der Initiation. (I): Bindung der RNA-Polymerase (R) an den Promotor (P) unter Bildung des geschlossenen Komplexes (RP_c). (II): Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_o). (III): Mit Einbau der ersten NTPs wird der ternäre Komplex (RP_{init}) gebildet. Bei der Rückreaktion kommt es zur Freisetzung kurzer abortiver Produkte. (IV): Freisetzung des Sigmafaktors (σ) und Bildung des Elongationskomplexes (EC) beim Verlassen der Promotorstruktur (P) (Record *et al.*, 1996).

Die Transkription kann in drei Abschnitte unterteilt werden, die Initiation, die Elongation und die Termination, in jedem dieser Abschnitte kann Regulation erfolgen. Die Initiation der Transkription besteht aus mehreren Schritten die zum Teil reversibel sind. In der Abbildung 1.1 ist der Ablauf der Initiation gezeigt. Die Transkription beginnt mit der Bindung des RNAP Holoenzyms (R) an den Promotor (P) und der Bildung des geschlossenen Komplexes (RP_c). Durch Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix im Bereich der -10 Region entsteht der offene Komplex (RP_o). Dabei entsteht eine 10-14 Nukleotid große Transkriptionsblase im aktiven Zentrum der Polymerase. Durch den Einbau der ersten Substrat-NTPs, verbunden mit der Bildung der ersten Phosphodiesterbindungen zwischen den NTPs, isomerisiert der offene Komplex zum ternären Initiationskomplex (RP_{init}). Dieser ähnelt strukturell dem binären Komplex (RP₀) (Newlands *et al.*, 1991). Dabei können abortive Produkte (2-12 Nt) entstehen (abortive Initiation) oder die Polymerase verlässt unter Freisetzung des Sigmafaktors (σ) den Promotor. Nachdem Übergang zum Elongationskomplex (EC) bei einer Transkriptlänge von 7-12 Nukleotiden erfolgt die Elongation durch das Coreenzym der RNA-Polymerase (Record et al., 1996).

Bei der Elongation bewegt sich das Coreenzym in 5'-Richtung entlang des template-Strangs und bedeckt dabei einen Bereich von 25-50 bp. Im aktiven Zentrum hat sich eine 14-18 Nt große Transkriptionsblase gebildet (Uptain *et al.,* 1997). Dort wird durch basenspezifische Anlagerung der NTPs an den template-Strang die entstehende RNA in 3'-Richtung verlängert. Dazu bildet das 3'-Ende des Transkripts mit dem komplementären template-Strang ein 8-9 Basenpaarungen langes RNA:DNA-Hybrid (Polyakov *et al.*, 1995; Nudler *et al.*, 1997). Das 5'-Ende der RNA verlässt die Polymerase durch den *exit channel* und beginnt sofort sich zu falten. Dabei können Strukturen entstehen, die alleine oder in Kombination mit anderen Proteinen eine Pausierung der Transkription erzwingen (Krohn & Wagner, 1996; Artsimovitch & Landick, 2000).

Die Termination umfasst die Fertigstellung sowie die Freisetzung des Transkripts und die Dissoziation des Coreenzyms von der DNA. Es kann dabei zwischen einer faktorunabhängigen (intrinsischen) und einer faktorabhängigen Termination unterschieden werden (Richardson, 1993). Bei der intrinsischen Termination bildet sich sequenzabhängig am 3'-Ende der RNA ein stabiler *Hairpin* aus, gefolgt von mehreren Uracilresten. Der *Hairpin* zwingt den Elongationskomplex zu einer Pause, während der Uracilschwanz das RNA:DNA-Hybrid destabilisiert. Bei der faktorabhängigen Termination bindet das Protein Rho als Hexamer an die *rut-site* (*Rho utilization site*) der wachsenden RNA und bewegt sich in 3'-Richtung auf den Elongationskomplex zu. Beim Pausieren der Transkription entwinden Rho unter ATP-Spaltung das RNA:DNA-Hybrid und terminiert damit die Transkription (Platt, 1994).

1.3 Die Promotorstrukturen

Promotoren sind bestimmte Bereiche der DNA, die eine konservierte Struktur besitzen und *upstream* von Genen liegen. Diese Strukturen werden von den RNA-Polymerase Holoenzymen erkannt. Weiterhin bilden sie die Startpunkte der Transkription, da an ihnen die Initiation erfolgt. Durch Abweichungen innerhalb der Promotorstruktur kommt es zu verschiedenen Promotorklassen. Diese werden von den Sigmafaktoren unterschiedlich genutzt. Unterschiedliche Promotorklassen in Kombination mit verschiedenen Sigmafaktoren sind ein wesentlicher Garant für eine differenzielle Genregulation. Allerdings können σ^{70} - und σ^{38} -abhängige Promotoren *in vitro* sowohl von $E\sigma^{70}$ als auch von $E\sigma^{38}$ Holoenzymen erkannt werden (Hengge-Aronis, 2003). *In vivo* nehmen dagegen noch zusätzliche Faktoren, wie der Salzgehalt, die Superhelikalität der DNA und Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Promotornutzung (Hengge-Aronis, 2002; Ishihama, 1999).



Abbildung 1.2 Promotorstruktur von *E. coli.* **(A)** Allgemeiner Aufbau eines *E. coli* Promotors. Gezeigt sind der Kernpromotor mit den drei Strukturelementen: -10 Region, -35 Region und den 17 ± 1 bp langen Spacer. Der Kernpromotor wird von DNA-Bereichen flankiert, welche die Promotorstärke beeinflussen und Bindestellen für Transkriptionsfaktoren enthalten (UAS *upstream activating sequence*; DSR *downstream sequence region*). Das UP-Element interagiert mit der α -Untereinheit der RNAP. **(B)** Zusammenstellung der Konsensuspromotoren für σ^{70} und σ^{38} sowie die in dieser Arbeit verwendeten Promotoren. Die bekannten Sequenzen der -35 und -10 Regionen sowie die Position des +1 Transkriptionsstarts sind durch Fettdruck hervorgehoben. Bei σ^{38} -spezifischen Promotoren ist die -35 Region oftmals degeneriert, dafür enthalten sie eine verlängerte -10 Region. Der *fic*-Promotor besitzt keine konservierte -35 Region. K steht für G oder T, W für A oder T (verändert nach Wagner, 2000).

1.3.1 Der σ⁷⁰-abhängige Promotor

Der Aufbau eines typischen σ^{70} -abhängigen Promotors ist in der Abbildung 1.2 (A) gezeigt. Die klassische Promotorstruktur besteht aus einem Kernpromotor sowie *upstream* und *downstream* gelegenen Sequenzen, welche die Stärke des Kernpromotors modifizieren können (Abbildung 1.2). Der Kernpromotor setzt sich zusammen aus einer -10 Region die auch Pribnow-Box genannt wird und einer unterschiedlich stark ausgeprägten -35 Region. Während die -10 und die -35 Region eine bestimmte Sequenzabfolge besitzen, ist die Sequenz des Abstands zwischen diesen Regionen

nicht konserviert, im Gegensatz zur Länge die 15-18 bp beträgt und des Verhältnisses von Purinen zu Pyrimidinen (Lisser & Margalit, 1993; Beutel & Record, 1990).

Die hexameren Strukturen der -10 und -35 Region sind aufgrund ihrer Position zum +1 Transkriptionsstart so benannt. Promotoren mit großen Übereinstimmungen zum Konsensuspromotor werden vom σ^{70} -Holoenzym bevorzugt gebunden und gelten deshalb als starke Promotoren.

Die Sequenzen des *tac*-Promotors entsprechen dem σ^{70} -abhängigen Konsensuspromotor. Allerdings handelt es sich beim *tac* nicht um einen nativen sondern um einen synthetischen Promotor. Bestehend aus der -10 Region des *lac*-Promotors und der -35 Region des *trp*-Promotors. Der untersuchte Promotor des ribosomalen B Operons (*rrnB* P1) ist ebenfalls ein starker Promotor. Wird allerdings stärker reguliert als der *tac*-Promotor, da er flankierend noch die regulativen *upstream* und *downstream* Elemente enthält.

1.3.2 Der σ^{38} -abhängige Promotor

Die σ^{38} -abhängigen Promotoren zeigen einen ähnlichen Aufbau, wie σ^{70} -abhängige Promotoren. Allerdings ist die -35 Region oft degeneriert (Lee & Gralla, 2001). Dafür besitzen diese Promotoren häufig eine erweiterte -10 Region. Dabei wird die -10 Region durch zwei Nukleotide in *upstream* Richtung verlängert. Ein Cytidin an der Position -13 ist dabei besonders hoch konserviert und findet sich in 85% aller σ^{38} abhängigen Promotoren (Becker & Hengge-Aronis, 2001). Manche Promotoren enthalten zwischen der -10 Region und dem +1 Transkriptionsstart ein Cluster bestehend aus Adenin und Tymin. Dies soll die Bildung des offenen Komplexes unterstützen, andere werden durch verkürzte UP-Sequenzen aktiviert (Ojangu *et al.*, 2000; Germer *et al.*, 2001). Viele σ^{38} -spezifische Promotoren sind *gearbox* Promotoren, diese werden invers zur Wachstumsrate transkribiert (Bohannon, D. E., N. Connell, *et al.*, 1991).

Der *bolA1* ist ein klassischer σ^{38} -Promotor, mit einem C an der Position -13 und einem A und T-Cluster vor dem Transkriptionsstart sowie einer -35 Region. Da der Aufbau noch sehr einem σ^{70} -spezifischen Promotor ähnelt, kann der *bolA1* auch *in vitro* vom E σ^{70} Holoenzym erkannt werden. Das BolA-Protein beeinflusst die Morphologie stationärer Phase Zellen und ist bei der Bildung des Penicillin-Bindungsproteins PBP6 involviert. Dieses ist unter schlechten Wachstumsbedingungen am Aufbau der Zell-

wand beteiligt (Lange & Hengge-Aronis, 1991). Der *fic*-Promotor gilt als obligat σ^{38} abhängig, die -35 Region ist stark degeneriert und wurde bisher nicht beschrieben. Die -10 Region weist die klassischen Nukleotide G und C an den Positionen -14, -13 auf. Das Fic-Protein (*filamentation induced by cAMP*) ist an der Synthese von p-Aminobenzoat und Folat beteiligt (Hiratsu *et al.*, 1995; Komano *et al.*, 1991).

1.4 Aufbau der RNA-Polymerase



Abbildung 1.3 Struktur der RNA-Polymerase aus Thermus thermophilus. Die Untereinheiten sind mit den folgenden Farben markiert: β : beige; β ': weiß (β ' 163-452: cyan; β ' Zn²⁺-Finger: grün); α I: lila; α II: orange; σ : magenta; ω : rot. Die zwei Mg²⁺-Ionen im katalytischen Zentrum sind als zwei rote Kugeln eingezeichnet (Vassylyev *et al.*, 2002).

In Prokaryoten gibt es im Gegensatz zu den Eukaryoten nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche die Transkription aller RNA-Spezies gewährleistet. Dabei wird zwischen einem Coreenzym und einem Holoenzym unterschieden. Das Coreenzym setzt sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) und führt als Elongationskomplex sowohl die Transkriptverlängerung als auch die Termination durch. Für die Bindung an die Promotorstrukturen und die Initiation der Transkription ist jedoch der Sigmafaktor (σ) notwendig. Dieser bildet zusammen mit dem Coreenzym das Holoenzym ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) (Burgess *et al.*, 1969).

Die Bildung des Coreenzyms beginnt mit der Anlagerung der beiden α -Untereinheiten (Ishihama, 1981). Diese lassen sich in zwei Regionen unterteilen, die aminoterminale Domäne (NTD) und die carboxyterminale Domäne (CTD), die über einen flexiblen Linker verbunden sind (Zhang & Darst, 1998). Die α -NTDs binden an die β , β' -Untereinheiten, während die α -CTD mit Transkriptionsfaktoren und ATreichen DNA-Sequenzen upstream des Promotors (UP-Element) interagiert (Igarashi *et al.*, 1991; Estrem *et al.*, 1999). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine durch Transkriptionsfaktoren vermittelte Bindung der α -CTD an die σ -Untereinheit, einhergehend mit einer verbesserten Transkriptionsinitiation (Ross *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003).

Die β , β' -Untereinheiten bilden das aktive Zentrum der Polymerase. Dort werden Substrat-NTPs sequenzspezifisch an den template-Strang angelagert und die RNA durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den NTPs synthetisiert (Gross *et al.*, 1996). Das aktive Zentrum ist an der Schnittstelle zwischen der β , β' -Untereinheiten lokalisiert und enthält zwei Mg²⁺-Ionen. Diese sind für die Funktionalität des katalytischen Zentrums unerlässlich (Vassylyev *et al.*, 2002).

Die ω -Untereinheit bindet an die β , β' -Untereinheiten und hilft bei der Bildung des Coreenzyms in dem es die Anlagerung der β , β' -Untereinheiten unterstützt. Zusätzlich verleiht die ω -Untereinheit der Polymerase Stabilität (Mukherjee *et al.*, 1999; Minakhin *et al.*, 2001). Seit einiger Zeit wird die Funktion von ω bei der Stringenten Kontrolle verstärkt diskutiert (Vrentas *et al.*, 2005). ppGpp ist ein globaler Regulator, der im Rahmen der Stringenten Kontrolle das Transkriptionsmuster der Zelle umfassend ändert. Dabei spielt die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase eine zentrale Rolle (Cashel and Rudd, 1987).

Durch die Anlagerung der σ-Untereinheit entsteht das Holoenzym. Die Struktur des *E. coli* RNA-Polymerase Holoenzyms konnte bisher nicht aufgeklärt werden. 2002 wurde allerdings die Struktur des *Thermus thermophilus* RNA-Polymerase Holoenzyms aufgeklärt (Vassylyev *et al.,* 2002). Aufgrund der großen Homologien der beiden Enzyme können Rückschlüsse auf die Struktur der *E. coli* RNAP geschlossen werden. In der Abbildung 1.3 ist die Struktur der *Thermus Thermophilus* RNAP gezeigt.

1.5 Die Sigmafaktoren

In E. coli gibt es sieben verschiedene Sigmafaktoren, die spezielle Promotorstrukturen erkennen. Dadurch verleihen die Sigmafaktoren der RNAP Spezifität und steuern damit die Transkription von ganzen Gengruppen. Der o-Faktor ist an der Bindung der RNAP an den Promotor sowie an der Bildung der Transkriptionsblase beteiligt (Polyakov et al., 1995). Nach der Initiation verlässt der o-Faktor jedoch die RNAP, die als Elongationskomplex die Transkription durchführt. Neben dem Hauptsigmafaktor $\sigma^{_{70}}$ der die Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase initiiert, gibt es noch sechs weitere σ-Faktoren. Diese gewährleisten die Transkription von Genen für das Überleben in der stationären Phase (σ^{38}), der Anpassung an Hitzeschock und extracytoplasmatischen Stress (σ^{32} & σ^{24}), der Flagellensynthese (σ^{28}), der Aufnahme eisenhaltiger Verbindungen (σ^{19}) und der Regulation des Stickstoffhaushalts (σ^{54}) (Ishihama, 1999). Bis auf σ^{54} gehören die aufgeführten σ -Faktoren der σ^{70} -Familie an. Damit zeichnen sie sich durch eine homologe Struktur und Ähnlichkeiten in der Promotorbindung aus (Abbildung 1.4). σ^{54} bildet eine eigene Gruppe und zeigt starke Abweichungen sowohl in der Struktur als auch in der Initiation der Transkription (Gruber & Gross, 2003). Die Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} werden im Folgenden näher beschrieben.





1.5.1 Die σ^{70} -Untereinheit

Abbildung 1.4 Strukturelle und funktionelle Charakteristik der σ^{70} -Untereinheit aus *E. coli.* (a) Die vier Regionen des Sigmafaktors sind schematisch dargestellt. Die Pfeile zeigen die Interaktionen der Subdomänen mit den Bestandteilen des Kernpromotors. Die Region 2.3 ist an der Bildung des offenen Komplexes beteiligt und bindet an einzelsträngige DNA. (b) Die Position der σ -Untereinheit (dunklegrau) im Holoenzym ist dargestellt. Nicht gezeigt ist die Region 1.1, deren Struktur bisher nicht aufgeklärt wurde. Der Pfeil gibt die Richtung der Transkription an. Die Position der DNA im Komplex ist schematisch dargestellt (Paget & Helmann, 2003).

 $σ^{70}$ ist der Hauptsigmafaktor in *E. coli*. In der exponentiellen Wachstumsphase steuert er die Transkription von $σ^{70}$ -abhängigen Promotoren. Diese befinden sich häufig vor Genen, die bei optimalen Wachstumsbedingungen exprimiert werden (*housekeeping*-Gene). Durch zahlreiche Untersuchungen konnte die Struktur und die Funktion der einzelnen Domänen, bis auf die Region 1.1, des Sigmafaktors aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass $σ^{70}$ aus vier Regionen besteht die über flexible Linker miteinander verbunden sind. Besonders die Regionen 2 und 4 sind innerhalb der $σ^{70}$ -Familie hoch konserviert (Vassylyev *et al.*, 2002; Severinova *et al.*, 1996). Spezifische Unterschiede in der Sequenz führen nicht nur zu einer differenziellen Promotornutzung durch die alternativen Sigmafaktoren sondern auch zu einer veränderten Affinität zum Coreenzym der RNAP. So hat σ^{70} eine fünfmal höhere Affinität zum Coreenzym als σ^{38} (Colland *et al.*, 2002).

Für die Bindung an die β , β' -Untereinheiten des Coreenzyms sind die Sigma-Regionen 2.1 und 3.2 zuständig. Dagegen binden die Regionen 2.4 und 2.5 an die -10 bzw. extended -10 Region, während die Region 4.2 an die -35 Region bindet. Die Region 2.3 ist an der Aufwindung der DNA-Helix zwischen der -10 Region und dem +1 Transkriptionsstart beteiligt (Abbildung 1.4). Die negativ geladene Region 1.1 verhindert dagegen die Bindung des freien Sigmafaktors an die DNA (Owens *et al.*, 1998; Barne *et al.*, 1997; Severinova *et al.*, 1996). Erst durch die Assemblierung des RNAP Holoenzyms kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Sigmafaktors, die eine Bindung an den Promotor ermöglicht (Dombroski *et al.*, 1993).

1.5.2 Die σ^{38} -Untereinheit

 $σ^{38}$ ist der Sigmafaktor für die generelle Stressantwort, da er nicht nur in der stationären Phase sondern auch in der exponentiellen Phase durch plötzlich auftretenden Stress exprimiert wird. Dazu zählen Veränderungen der Temperatur, des Salzgehalts oder die Stringente Kontrolle. Das $σ^{38}$ -haltige RNAP Holoenzym übernimmt dann die Transkription und steuert die Expression von Genen die für die Stressantwort unerlässlich sind (Hengge-Aronis, 1996). $σ^{38}$ gehört zur $σ^{70}$ -Familie und hat die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu $σ^{70}$. Wie $σ^{70}$ kann auch $σ^{38}$ in vier Regionen unterteilt werden, die nicht nur hinsichtlich der Struktur sondern auch der Funktion große Homologien aufweisen (Checroun *et al.*, 2004). Allerdings sind die Region 1.1 und der Linker zwischen den Regionen 1.2 und 2.1 bei $σ^{38}$ stark verkürzt. Dies führt zu einer veränderten Konformation des E $σ^{38}$ Holoenzyms (Colland *et al.*, 2002).

1.6 Regulation der Transkription

Die Regulation der Transkription kann auf mehreren Ebenen erfolgen. Neben den Sigmafaktoren und Promotorstrukturen spielen auch die Konformation der DNA, die Osmolarität, die Temperatur und weitere chemische und physikalische Gegebenheiten eine Rolle. Es gibt jedoch auch Effektoren die durch eine Interaktion mit der DNA oder der Polymerase die Genexpression modulieren (Kusano *et al.,* 1996; Ishihama, 1997).

1.6.1 DNA-Methylierung

Durch die post-replikative DNA-Methylierung werden zusätzliche Informationen auf die primäre DNA-Sequenz aufgesetzt. Diese Informationen haben großen Einfluss auf DNA-Transaktionen wie die Transkription, Transposition, Initiation der Replikation und DNA-Reparatur (Løbner-Olesen et al., 2005; Oshima et al., 2002). In Escherichia coli wird die DNA-Methylierung von den Enzymen Dam (DNA adenine methyltransferase) und Dcm (DNA cytosine methyltransferase) durchgeführt, die ähnliche Erkennungssequenzen besitzen. Dam überträgt dabei eine Methylgruppe auf die N6-Gruppe des Adenins in der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' (Low & Casadesús, 2008). Bei der Replikation ist der Austausch von falsch eingebauten Nukleotiden an die Dam-Methylierung gekoppelt. Der neu synthetisierte Strang ist noch nicht methyliert. Dadurch ist die DNA hinter der Replikationsgabel transient hemimethyliert. Die Reparaturenzyme, die falsch eingebaute Nukleotide entfernen sind nur an hemi-methylierter DNA aktiv und tauschen das Nukleotid im nicht methylierten DNA-Strang aus. Nachdem der neue Strang von Dam methyliert worden ist, können falsch eingebaute Nukleotide nicht mehr repariert werden (Iyer *et al.,* 2006). Durch die Methylierung können sich die thermodynamische Stabilität und die Krümmung der DNA ändern. Die Methylierung einer kritischen GATC-Site kann die

Interaktion eines Proteins mit der DNA beeinflussen (Wion & Casadeús, 2006; Messer & Noyer-Weidner, 1988). Zusätzlich können Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen zwischen methylierter und hemi-methylierter DNA unterscheiden. Diese Unterscheidung kann die Expression von Genen an den Zellzyklus koppeln (Wion & Casadeús, 2006).

Weiterhin kann auch die Methylierung einiger GATC-Sites reguliert werden, dadurch gibt es DNA-Bereiche die unabhängig vom Zellzyklus hemi-methyliert oder gar nicht methyliert vorliegen (Casadesús & Low, 2006). Einige dieser Methylierungsmuster können, ähnlich wie in Eukaryoten, vererbt werden. Damit kann Genregulation über den Zellzyklus hinaus erfolgen.

1.6.2 Nucleoid-assoziierte Transkriptionsfaktoren

Das meist ringförmige Genom von Bakterien wird als Nucleoid bezeichnet. Durch Superspiralisierung, makromolekulares *crowding* und Nucleoid-assoziierte Proteine (NAPs) wird das Nucleoid stark kompaktiert, bis es schließlich nur noch ein Viertel des Volumens einer Bakterienzelle einnimmt (Pul & Wagner, 2007). NAPs sind DNA-bindende Proteine, die ein niedriges Molekulargewicht und eine hohe Kopienzahl aufweisen. Diese korreliert in der Regel mit der Wachstumsrate. Alle NAPs sind strukturell oder regulatorisch an DNA-Transaktionen wie Replikation, Rekombination oder Reparatur beteiligt. Darüber hinaus modulieren NAPs die Zugänglichkeit der DNA und können damit direkt oder indirekt die Transkription beeinflussen (Dame, 2005). Dies kann über die Änderung der DNA-Konformation durch induzierte Krümmungen der DNA, durch Blockieren von Promotoren aber auch durch Interaktionen mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase erfolgen. In *Escherichia coli* sind zwischen 10 und 20 NAPs bekannt, vier davon werden hier kurz vorgestellt.

H-NS (*histon-like nucleoid structuring protein*) ist als Dimer aktiv und bindet besonders an A/T-reiche DNA-Abschnitte, die häufig in der Nähe von Promotoren lokalisiert sind (Schröder & Wagner, 2002). H-NS besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne ist für die Protein-Protein-Interaktion zuständig, während die C-terminale Domäne an die DNA bindet (Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003). Als Dimer hat H-NS zwei C-terminale Domänen und kann dadurch zwei DNA-Strängen miteinander verbrücken (Luijsterburg *et al.*, 2006). Weiterhin bindet H-NS hoch kooperativ und kann damit ganze DNA-Bereiche ummanteln und so die Transkription von Promotoren unterbinden (*silencing*). Durch diese Eigenschaft schützt H-NS die Zelle durch aufgenommene Fremd-DNA, die sich durch einen anderen G/C-Gehalt auszeichnet (Lucchini *et al.*, 2006).

StpA (*suppressor of the td-phage phenotype*) besitzt 58% identische Aminosäuren zu H-NS, weshalb eine homologe Struktur vermutet wird. Ähnlich wie H-NS bildet StpA Dimere und bindet bevorzugt an gekrümmte DNA-Bereiche. Auch die Bildung von H-NS-StpA-Dimeren ist beschrieben, allerdings ist die Funktion dieser Heteromere unklar (Williams & Rimsky, 1997). Weiterhin besitzt StpA eine RNA-Chaperone Aktivität und kann falsch gefaltete RNA in die aktive Struktur umfalten (Rajkowitsch *et al.*, 2005).

LRP (*leucine-responsive regulatory protein*) existiert als Dimer, kann jedoch auch zu Tetra-, Okta- und Hexadekameren assoziieren. Die Konzentration von LRP wird ab-

hängig von verfügbaren Nährstoffen reguliert und korreliert umgekehrt mit der Wachstumsrate. Dabei wird die Affinität der DNA-Bindung von LRP durch die Aminosäure Leucin reguliert (Chen & Calvo, 2002). Bindestellen von LRP überlappen häufig mit den Bindestellen anderer NAPs. Dies lässt auf eine Interaktion der unterschiedlichen NAPs schließen. Die DNA-Bindung von LRP erfolgt zumeist kooperativ über ein *helix-turn-helix-motif* am N-Terminus (Pul *et al.*, 2005; Pul *et al.*, 2007). Der C-Terminus ist dagegen an der Bildung von Oligomeren beteiligt.

FIS (*factor for inversion stimulation*) bildet die Protein-Hauptkomponente des bakteriellen Chromatins in der logarithmischen Wachstumsphase. Mit dem Übergang in die stationäre Phase geht die FIS-Konzentration bis auf wenige Moleküle zurück. Damit koppelt FIS die DNA-Topologie an die Wachstumsphase. Weiterhin kann FIS über eine Interaktion mit der α-Untereinheit der RNAP die Transkription direkt regulieren (Bokal *et al.*, 1997). Häufig finden sich mehrere FIS-Bindestellen hintereinander, dies ermöglicht eine direkte Veränderung der DNA-Konformation. Weiterhin kann FIS die DNA-Topologie auch durch die Inhibierung der *DNA-Gyrase*-Gene beeinflussen (Keane & Dorman, 2003).

Die Interaktion einiger NAPs mit der DNA ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



Abbildung 1.5 Mögliche NAPs-induzierte Konformationsänderungen der DNA. Zusammenstellung von schematischen Einflüssen der NAPs H-NS, LRP, FIS, IHF und HU auf die DNA-Topologie sowie AFM-Aufnahmen der entsprechenden NAPs (Pul & Wagner, 2007).

1.6.3 RNAP-assoziierte Transkriptionsfaktoren

Neben den Transkriptionsfaktoren, die über eine DNA-Bindung die Genexpression regulieren, gibt es auch Faktoren die mit der RNAP interagieren. Dazu zählen Antisigmafaktoren die weit verbreitet in Bakterien und in der Regel Sigmafaktor spezifisch sind (Hughes & Mathee, 1998). Die Regulatoren der Stringenten Kontrolle, ppGpp und DksA, steuern die Expression von Genen über die Assoziation zum RNAP Holoenzym (Haugen *et al.*, 2008). Das Enzym SpoT hält das basale ppGpp-Level aufrecht. Bei vielen Arten von Stress, besonders beim Fehlen einer Aminosäure wird die Stringente Kontrolle ausgelöst. Dann steigt die ppGpp-Konzentration in der Zelle stark an. Dies geschieht durch die Aktivierung des Ribosomen-assoziierten Proteins RelA, welches ppGpp synthetisiert. Dadurch kann die ppGpp-Menge in der Zelle innerhalb weniger Minuten von μ M auf mM Konzentrationen ansteigen (Haseltine & Bock, 1973; Lund & Kjeldgaard, 1972). Neben ppGpp ist auch das Protein DksA an der Stringenten Kontrolle beteiligt. DksA bindet im sekundären Kanal der RNA-Polymerase, während ppGpp wahrscheinlich direkt im aktiven Zentrum sitzt (Paul *et al.*, 2004; Perederina *et al.*, 2004; Artsimovitch *et al.*, 2004). Zusammen modulieren sie die Aktivität der RNAP, in deren Folge die Transkription der ribosomalen Operons und vieler tRNA-Gene inhibiert wird. Gleichzeitig wird die Transkription von Genen aktiviert, die an der Aminosäure Aufnahme bzw. Synthese beteiligt sind. Zudem können ppGpp und DksA auch die Transkription von Eo⁵⁴ und Eo³⁸ Holoenzymen aktivieren (Laurie *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2005).

Ein weiterer RNAP-assoziierter Transkriptionsfaktor ist die kleine regulatorische 6S RNA. Diese nicht kodierende RNA akkumuliert beim Übergang in die stationäre Phase. Die 6S RNA enthält eine große zentrale Blase, die der Transkriptionsblase eines offenen Komplexes ähnelt (Wassarman & Storz, 2000; Gildehaus *et al.*, 2007). Durch diese Promotor-Mimikry kann die 6S RNA an die RNA-Polymerase binden dabei werden bevorzugt Eo^{70} Holoenzyme komplexiert.

1.7 Antisigmafaktoren

In Bakterien sind Sigmafaktoren für die Promotorspeziftät der RNAP verantwortlich. Da Sigmafaktoren die Expression von Regulons (Gengruppen) regulieren, muss ihre Aktivität kontrolliert werden. Eine Möglichkeit einer direkten Steuerung bieten Antisigmafaktoren. Der erste entdeckte Antisigmafaktor ist das T4-Phagen Protein AsiA. Durch die Bindung von AsiA an die *E. coli* RNAP wird die Transkription von Wirtsgenen inhibiert. Gleichzeitig wird die Transkription von T4 Genen aktiviert. Dabei interagiert AsiA mit der σ^{70} Region 4.2 und dem T4 DNA-Bindungsprotein MotA (Hinton, 1991). Die σ^{70} Region 4.2 erkennt über ein *helix-turn-helix*-Motiv die -35 Promotorregion (Adelmann *et al.*, 1997). Durch die Bindung von AsiA wird dieses Struk-

turelement verändert und die Transkription von -35-abhängigen Promotoren unterbunden (Abbildung 1.6) (Lambert *et al.,* 2004; Hinton *et al.,* 2005).

Nicht nur Phagen nutzen Antisigmafaktoren um die Genexpression von Wirtszellen zu modulieren. Auch viele Bakterien besitzen Antisigmafaktoren, um die Aktivität ihrer Masterregulatoren zu steuern. Einige Sigmafaktoren liegen bereits dann in der Zelle vor, wenn sie noch nicht benötigt werden. Durch die Bindung an einen spezifischen Antisigmafaktor sind sie jedoch inaktiv und können nicht in die Genexpression der Zelle eingreifen. Durch veränderte Bedingungen, verbunden mit inneren und äußeren Signalen, werden die Sigmafaktoren freigesetzt und können das Genexpressionsmuster der Zelle den Bedingungen entsprechend anpassen.

In *E. coli* gibt es vier bekannte Antisigmafaktoren, dazu gehören: RseA (σ^{24}), FlgM (σ^{28}), FecR (σ^{19}) und Rsd (σ^{70}).

<u>RseA</u>: Der Sigmafaktor σ^{24} wird bei extracytoplasmatischen Stress aktiviert und regelt die Antwort der Zelle auf falsch gefaltete Proteine. Im inaktiven Zustand ist σ^{24} an das innere Membran-assoziierte Protein RseA gebunden. Der σ^{24} -RseA-Komplex wird durch den Ko-Antisigmafaktor RseB, der im Periplasma lokalisiert ist, stabilisiert. Durch die Präsenz von falsch gefalteten Proteinen im Periplasma wird σ^{24} aktiviert und RseA abgebaut (De Las Penas *et al.*, 1997; Missiakes *et al.*, 1997).

<u>FlgM</u>: Die Flagellensynthese unterliegt einer strikten zeitlichen Abfolge der Genexpression. Dabei ist das Flagellar-Regulon in frühe, mittlere und späte Gene eingeteilt. Durch entsprechende Signale aktivieren die frühen Gene die Transkription der mittleren Gene. Diese kodieren die Komponente für den Basalkörper der Flagellen sowie die Proteine σ^{28} und FlgM. Durch die Bindung an FlgM wird σ^{28} inaktiviert bis der Basalkörper fertig gestellt ist. Danach wird FlgM aus der Zelle transportiert und σ^{28} nimmt die Transkription der späten Flagellen-Gene auf (Campbell *et al.*, 2008; Chilcott & Hughes, 2000).

<u>FecR</u>: Der Sigmafaktor σ^{19} ist verantwortlich für die Expression von Genen für das Eisencitrat-Transportsystem. Die Aktivität von σ^{19} wird durch das Protein FecR reguliert. Dieses steht am Ende einer Signalkaskade und hat nicht nur eine inhibierende sondern auch eine aktivierende Wirkung auf σ^{19} (Hughes & Mathee, 1998).

Mittlerweile wurde auch ein *E. coli* eigener Antisigmafaktor für σ^{70} entdeckt, das Protein Rsd (Jishage & Ishihama, 1998).



Abbildung 1.6 Vergleich der Region 4 von σ^{70} **im Komplex mit AsiA bzw. Rsd. (a)** Native Form der σ^{70} Domäne 4 (σ^{70}_{4}) von *Thermus aquaticus*. **(b)** *E. coli* σ^{70}_{4} im Komplex mit AsiA. Durch die Bindung an AsiA (blauer Wurm) wird die Struktur der Region 4.2 verändert. **(c)** *E. coli* σ^{70}_{4} gebunden an Rsd (grüner Wurm). Die Konformation der Region 4.2 entspricht der nativen Struktur gezeigt in **(a)** (Campbell *et al.*, 2008).

1.7.1 Rsd (Regulator of SigmaD)

Rsd ist ein kleines (18,2 kDa) Protein das bevorzugt in der stationären Phase an σ^{70} (σ^{D}) bindet. Es wird vermutet, dass durch die Bindung an σ^{70} der Hauptsigmafaktor inhibiert wird und stattdessen der alternative Sigmafaktor σ^{38} an das Coreenzym der RNA-Polymerase binden kann (Mitchell et al., 2007; Jishage & Ishihama, 1998). Unterstützt wird diese Annahme von der Homologie von Rsd zum Antisigmafaktor AlgQ (Jishage & Ishihama, 1999; Dove & Hochschild, 2001). In Pseudomonas aeruginosa inaktiviert AlgQ den Hauptsigmafaktor und aktiviert damit die Synthese von Alginat, ppGpp und anorganischen Polyphosphaten. Alginat spielt bei der Virulenz des opportunistischen Pathogens eine entscheidende Rolle, denn es induziert die Bildung einer schützenden Schleimhülle (Ambrosi et al., 2005). Ähnlich wie AlgQ und AsiA bindet Rsd an die Region 4 von σ^{70} (Patikoglou *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2004; Jishage et al., 2001). Aber im Gegensatz zu AsiA kommt es bei der Bindung durch Rsd nicht zu einer Veränderung des helix-turn-helix-Motivs (Abbildung 1.6), welches für die Bindung der -35 Promotorregion wichtig ist. Weiterhin interagiert Rsd auch mit der Region 2 von σ^{70} (Yuan *et al.*, 2008). Diese ist nicht nur an der Erkennung der -10 Region sondern auch an der Corebindung beteiligt. Damit blockiert Rsd nicht nur die Interaktionsflächen von σ^{70} für die Promotorbindung sondern auch für die Polymerasebindung. Aber im Gegensatz zu AsiA kann Rsd wahrscheinlich keine stabilen RNAP-Komplexe bilden (Sharma & Chatterji, 2008). Allerdings konnte eine Bindung von Rsd an das Coreenzym der RNAP und die Bildung von Rsd-Dimeren gezeigt werden (Ilag *et al.*, 2004). Diese Interaktionen liefern Hinweise auf eine komplexere Funktion von Rsd als nur die Inhibierung des Sigmafaktors σ^{70} .

Um die Aktivität der RNAP nicht während der exponentiellen Wachstumsphase zu inhibieren muss die Zelle die Expression von Rsd den Wachstumsverhältnissen anpassen. Die Expression von Rsd wird durch die beiden *rsd*-Promotoren P1 und P2 reguliert. Der P1 Promotor liegt weiter *upstream* vom Translationsstart entfernt und ist σ^{38} -abhängig. Der P2 Promotor liegt näher am Translationsstart und ist σ^{70} -abhängig. Während in früheren Untersuchungen die Regulation des *rsd* P2 Promotors als invers zur Wachstumsrate beschrieben wurde (Jishage & Ishihama, 1999), zeigten neuere Untersuchungen, dass der P2 Promotor in allen Wachstumsphasen aktiv ist. Dagegen konnten Transkripte des P1 Promotors erst in der stationären Phase nachgewiesen werden. Weiterhin konnte Rsd bereits in der logarithmischen Phase in der Zelle detektiert werden, allerdings verdoppelt sich die Rsd-Konzentration beim Übergang in der stationären Phase. Zusätzlich nimmt die Menge an Rsd- σ^{70} -Komplexen in der stationären Phase zu (Piper *et al.*, 2009).

1.8 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Das Protein Rsd ist ein Antisigmafaktor für den Hauptsigmafaktor σ^{70} in *E. coli*. Es wird angenommen, dass Rsd beim Wechsel vom $E\sigma^{70}$ zum $E\sigma^{38}$ Holoenzym eine entscheidende Rolle spielt. Da σ^{70} und σ^{38} sich in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, sollte die Sigmafaktorspezifität von Rsd *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Dazu sollten neben Bindungsstudien auch Funktionsstudien durchgeführt werden. Der Einfluss von Rsd auf die σ^{70} - und σ^{38} -abhängige Transkription sollte mittels *in vitro* Transkriptionssystemen und *in vivo* durch Bestimmung des mRNA-Spiegels untersucht werden. Für diese Analysen waren Primer-Extension Reaktionen vorgesehen. Zusätzlich sollte nach weiteren Bindungspartnern von Rsd gesucht werden. Beson-

ders eine mögliche Bindung von Rsd an σ^{38} war von Interesse.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Expression von Rsd untersucht werden. Da zu Beginn dieser Arbeit die Expression von Rsd als invers zur Wachstumsrate beschrieben worden war, sollte der Einfluss von Transkriptionsfaktoren, die als Wachstumsregulatoren bekannt sind, untersucht werden. Zunächst sollten Transkriptionsfaktoren betrachtet werden, die über eine Interaktion mit der DNA die Genexpression beeinflussen. Darüber hinaus sollten Transkriptionsfaktoren untersucht werden, die einen modifizierenden Einfluss durch die Interaktion mit der RNA-Polymerase ausüben. Auf Grund der Tatsache, dass die regulatorische Region des *rsd*-Gens ungewöhnlich viele Dam-Methylierungssignale besitzt, sollte die Bedeutung von Methylierungsstellen in der *rsd*-Promotorregion für die Genexpression analysiert werden.

Damit die Regulation der *rsd* Promotoren P1 und P2 untersucht werden konnte, sollte zunächst die *rsd*-Promotorregion aus chromosomaler DNA isoliert werden um Vektoren zu konstruieren, die eine Analyse der *rsd*-Promotoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ermöglichen.

Es war vorgesehen die Einflüsse der Transkriptionsfaktoren *in vitro* mittels Bindungs- und Transkriptionsstudien zu untersuchen. Die *in vivo* Analysen sollten mit Primer-Extension durchgeführt werden, um die Produktmengen der *rsd*-Promotoren in verschiedenen Stämmen und Wachstumsphasen bestimmen zu können. Dabei sollten Stammpaare miteinander verglichen werden, die bis auf einen deletierten Regulator isogen sind.

2 Ergebnisse

2.1 Analyse des Antisigmafaktors Rsd aus E. coli

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Rsd (Regulator of SigmaD) auf die Aktivität des logarithmische Phase spezifischen Holoenzyms $E\sigma^{70}$ untersucht werden. Da Rsd ein Antisigmafaktor für σ^{70} ist, wurde dass stationäre Phase spezifische Holoenzym $E\sigma^{38}$ als Kontrolle verwendet. Es ist bereits bekannt, dass Rsd *in vivo* an σ^{70} bindet und dadurch die Transkription von σ^{70} -abhängigen Promotoren reduziert, während gleichzeitig die Transkription vor allem von σ^{38} -abhängigen Promotoren gefördert wird (Mitchell *et al.* (2007); Jishage & Ishihama, 1998). Darüber hinausgehend sollte hier überprüft werden, ob Rsd ausschließlich mit σ^{70} oder auch mit anderen Bestandteilen des Transkriptionsapparates von *E. coli* interagiert.

Neben der Funktion von Rsd sollte auch die Regulation der *rsd*-Expression *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Denn die zelluläre Rsd-Konzentration erhöht sich beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase (Piper *et al.*, 2009; Jishage & Ishihama, 1998), deshalb wurde der Einfluss von Transkriptionsfaktoren untersucht. Da die *rsd*-Expression von einem σ^{38} -abhängigen (P1) und einem σ^{70} -abhängigen (P2) Promotor gesteuert wird, wurde auch der Einfluss der entsprechenden Holoenzyme berücksichtigt. Diese Untersuchungen umfassten auch die Wirkung von Transkriptionsfaktoren und der DNA-Konformation auf die Aktivität der Polymerasen. Für die Analyse der *rsd*-Expression mussten zunächst, für die geplanten *in vitro* und *in vivo* Experimente, geeignete Vektoren konstruiert werden.

2.2 Charakterisierung von potentiellen Bindungspartnern

In einem ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Rsd auf die Aktivität von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen untersucht. Das Holoenzym der RNA-Polymerase von *Escherichia coli* besteht aus einem Coreenzym, welches sich aus vier verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) und einem Sigmafaktor. Erst durch die Assoziation eines Sigmafaktors (σ) an das Coreenzym der RNA-Polymerase (E) ist dieses in der Lage an Promotoren zu binden und die Transkription durch die Bildung des offenen Komplexes (RP_o) zu initiieren. Nach der Bildung des Initiationskomplexes (RP_{init}) durch den Einbau der ersten Substrat-NTPs und schließlich beim Übergang zum Elongationskomplex (EC) verlässt der σ -Faktor das Holoenzym (E σ) und die Transkription wird vom Coreenzym durchgeführt.

In *E. coli* gibt es sieben verschiedene Sigmafaktoren, die unterschiedliche Promotoren erkennen und somit verschiedene Regulons steuern (1.5). σ^{70} ist der Hauptsigmafaktor und steuert in der exponentiellen Phase die Promotorerkennung von Genen, die für das Wachstum wichtig sind. Ändern sich die Lebensbedingungen der Bakterien durch ein verschlechtertes Nahrungsangebot oder durch plötzlich auftretenden Stress, so muss die Zelle darauf reagieren. Dies erfolgt durch eine Änderung des Expressionsmusters, einhergehend mit einem Wechsel des Sigmafaktors. σ^{70} wird durch σ^{38} ersetzt, der für die Expression von Genen verantwortlich ist, die das Überleben in der stationären Phase gewährleisten.

Da σ^{70} eine höhere Affinität zum Coreenzym hat als σ^{38} und zudem die σ^{70} -Konzentration in der Zelle wesentlich größer ist als die von σ^{38} , müssen weitere Faktoren bei dem Wechsel der Sigmafaktoren eine Rolle spielen. Einer dieser Faktoren ist das Protein Rsd ein Antisigmafaktor für σ^{70} . Durch die Bindung an σ^{70} soll die Bildung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms verhindert und stattdessen die Bildung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms ermöglicht werden. Um dies *in vitro* zu überprüfen wurde der Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung und die Transkription des $E\sigma^{70}$ und des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms untersucht. Dazu wurden σ^{70} -abhängige Promotoren (*rrnB* P1 und tac) sowie σ^{38} abhängige Promotoren (*bolA*1 und *fic*P) verwendet. Für die Bindungsstudien wurden DNA-Fragmente eingesetzt welche die analysierten Promotoren enthielten. Für die *in vitro* Transkriptionen wurden superhelikale (ccc) Plasmide benutzt, welche sowohl die Promotoren als auch dazugehörige Terminatoren enthielten. Dadurch entstanden Transkriptionsprodukte einer definierten Länge, die den Promotoren zugeordnet werden konnten.

2.2.1 Einfluss von Rsd auf die RNA-Polymerase-Promotorbindung

In einem ersten Experiment wurde der Einfluss von Rsd auf die Bindung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms an den rrnB P1 Promotor untersucht. Als Kontrolle dienten dabei das Eo³⁸ Holoenzym und der *bolA*1-Promotor. Die Holoenzyme wurden vor der Komplexbildung rekonstituiert. Dabei wurden Coreenzym zu Sigma Verhältnisse von 1:3 bzw. 1:10 gewählt. Die Bindungen wurden durch Gelretardierungen (5.4.2) analysiert, die Abbildung 2.1 zeigt eine solche Analyse. In (A) ist die Bindung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms an den rrnB P1 Promotor gezeigt. Bereits bei einem Coreenzym zu σ -Faktor Verhältnis von 1:3 waren zwei deutliche Komplexbanden erkennbar (E σ^{70} I & $\mathrm{E}\sigma^{70}\mathrm{II}$). Diese beiden Komplexbanden wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben. Bei der oberen deutlich stärkeren Bande $E\sigma^{70}I$ handelte es sich um den Initiationskomplex (RP_{init}) während der untere Komplex Eo⁷⁰II als Elongationskomplex identifiziert worden war (Jöres, 2001; Reckendrees, 2004). Eine Erhöhung der σ-Faktor Konzentration auf 1:10 führte zu keiner bedeutenden Zunahme der Komplexbandenintensitäten. Die Spuren 1 und 5 enthielten kein Rsd in den Ansätzen. Die Anwesenheit von 1 μ M Rsd (Spuren 2 & 6) führte zu keiner deutlichen Inhibierung der Komplexbildung. Erst bei einer Rsd Konzentration von 3 μ M (Spuren 3 und 7) war eine starke Abnahme beider Komplexbanden erkennbar. 10 μ M Rsd führten zu einer gänzlichen Inhibierung des Eo⁷⁰II Komplexes und einer nahezu vollständigen Reduktion des $E\sigma^{70}I$ Komplexes (Spur 4 und 8).

Die Abbildung 2.1 (B) zeigt das Kontrollexperiment mit dem $E\sigma^{38}$ Holoenzym und dem *bolA*1-Promotor. Auch das $E\sigma^{38}$ Holoenzym bildete mit dem *bolA*1-Promotor zwei Komplexe aus ($E\sigma^{38}$ I & $E\sigma^{38}$ II), die jedoch etwa gleiche Bandenintensitäten hatten. Im Gegensatz zum *rrnB* P1 Promotor ist beim *bolA*1-Promotor für eine stabile Polymerasebindung keine NTP Zugabe nötig. Um jedoch möglichst gleiche Bedingungen in den Ansätzen zu gewährleisten, wurden auch den Proben mit dem *bolA*1-Promotor Start-NTPs mit in den Ansatz gegeben. Deshalb handelte es sich beim $E\sigma^{38}$ I Komplex wahrscheinlich um den offenen Komplex (RP_o) der keine NTPs benötigte, während $E\sigma^{38}$ II den Initiationskomplex darstellte. Bei einem Coreenzym zu σ -Faktor Verhältnis von 1:10 waren deutlich stärkere Komplexbanden erkennbar als bei einem Verhältnis von 1:3. Zudem gab es einen weiteren Komplex ($E\sigma^{38}$ III), der unterhalb von $E\sigma^{38}$ II positioniert war. Bei diesem sehr schwachen Komplex handelte es sich wahrscheinlich um den Elongationskomplex.

Durch die Zugabe von Rsd kam es jedoch auch bei den $E\sigma^{38}$ Komplexen zu einer deutlichen Abnahme der Bandenintensitäten. Bereits die Zugabe von 1 μ M Rsd (Spu-

ren 2 & 5) führte zu verringerten Komplexstärken. Bei 3 μ M Rsd (Spuren 3 & 6) waren ca. 50% der Komplexe zerstört und bei 10 μ M Rsd (Spuren 4 & 8) waren keine Komplexbanden mehr sichtbar.

Der Antisigmafaktor Rsd hatte also auf die Komplexbildung beider Holoenzyme eine inhibierende Wirkung. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Komplexe des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms, aufgrund der geringeren Affinität von σ^{38} zum Coreenzym, nicht die Intensitäten erreichten wie die $E\sigma^{70}$ Komplexe. Weiterhin war auffällig, dass es nicht zu einer vollständigen Komplexierung der Promotorfragmente kam, obwohl beide Polymerasen im Überschuss eingesetzt wurden.



Abbildung 2.1: Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung von RNA-Polymerasen. Gezeigt ist das Autoradiogramm eines 5% igen nativen PAA-Gels. Für die Komplexbildung wurden $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ Holoenzyme, sowie 2 nM des σ^{70} -spezifischen Promotors *rrnB* P1 bzw. des σ^{38} -spezifischen Promotors *bolA*1, verwendet. 100 nM Coreenzym wurden mit 300 nM (1:3) bzw. 1 μ M (1:10) σ -Faktor rekonstituiert. Die Komplexbildung fand in Anwesenheit steigender Rsd Konzentration statt (1 μ M Spuren 2 & 6; 3 μ M Spuren 3 & 7 und 10 μ M Spuren 4 & 8). (A) Bindung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms an den *rrnB* P1 Promotor. (B) Bindung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms an den *bolA*1-Promotor. Die $E\sigma^{70}$ - und $E\sigma^{38}$ -Komplexbanden sowie die freie DNA sind markiert.

2.2.2 Footprint-Analysen der Promotorbindungen

2.2.2.1 DNaseI-Footprints

Um zu überprüfen, ob Rsd Bestandteil der Polymerase-Promotor-Komplexe ist, wurden DNaseI- und KMnO₄-Footprints der Promotorkomplexe durchgeführt (5.4.3). Dadurch konnte unterschieden werden, ob Rsd Bestandteil des Komplexes ist oder ob Rsd vor der Komplexbildung interveniert. Dazu wurden Komplexe zwischen dem σ^{70} -haltigen Holoenzym und dem *rrnB* P1 Promotor gebildet. Bei den verwendeten DNA-Fragmenten war der codierende Strang radioaktiv markiert (5.2.8.4). Die Komplexe wurden dann limitierend mit DNaseI behandelt, was zu einer Hydrolyse der DNA-Kette führte. Das RNAP Holoenzym schützt den DNA-Bereich, an dem es gebunden hat, vor der DNaseI-Spaltung. Dies resultiert in dem so genannten Footprint.

Die Anwesenheit von Rsd im RNAP-Promotor-Komplex könnte ein verändertes Muster oder eine Verschiebung des Footprints bewirken. Die Abbildung 2.2 (A) zeigt ein Autoradiogramm eines DNaseI-Footprints. Das *rrnB* P1 Promotorfragment wurde mit steigenden Mengen RNAP inkubiert (Spuren 3 bis 7). Dadurch intensivierte sich der Footprint. Dies war ein Hinweis auf eine Zunahme der RNAP Bindung an den Promotor. Der Footprint erstreckte sich von dem Bereich +20 bis -40 relativ zum +1 Transkriptionsstart. Der Bereich des RNAP-Footprints, der die DNA vor der Hydrolyse durch DNaseI schützt, ist mit einem vertikalen Balken markiert. Durch verstärkte Spaltung der DNA am upstream gelegenen Rand der RNAP entstand eine intensive Abbruchbande nahe der Position -40. Dieser hyperreaktive Bereich ist mit einem Pfeil markiert. Bereits in anderen Arbeiten wurde der RNAP-*rrnB* P1-Komplex mittels DNaseI untersucht. Auch dort wurde ein geschützter Bereich am *rrnB* P1 Promotor zwischen +20 und -40 beschrieben (Ohlsen & Gralla, 1992).

Der Einfluss von Rsd auf den Footprint wurde mit 100 nM RNAP und steigenden Mengen an Rsd untersucht (Spuren 8 bis 13). Durch die Anwesenheit von Rsd in den Proben änderte sich das Muster des Footprints nicht, er wurde jedoch mit steigender Rsd-Konzentration schwächer und brach schließlich vollständig zusammen (Spuren 12 & 13). Dadurch war das Bandenmuster in den Spuren 12 & 13 identisch zum Bandenmuster der freien DNA (Spur 2). In der Spur 1 ist eine A+G Sequenzierung des codierenden Strangs gezeigt, anhand dieser konnte der Bereich des Footprints bestimmt werden.



Abbildung 2.2: DNasel-Footprint eines RNAP-*rrnB* P1 Komplexes in der Gegenwart von Rsd. (A) Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines DNasel-Footprints des codierenden DNA-Strange des *rrnB* P1 Promotors. Es wurden steigende Mengen RNAP und Rsd eingesetzt. Spur 2 enthält kein Protein; die Spuren 3 bis 7 enthalten 10, 20, 50, 100 bzw. 200 nM RNAP. Die Spuren 8 bis 13 enthalten jeweils 100 nM RNAP und 0,2; 0,5; 1; 2; 5 bzw. 10 μM Rsd. Die Spur 1 zeigt eine A+G Sequenzierung des codierenden Stranges. Geschützte Bereiche des Footprints sind mit einem vertikalen Balken markiert, hypersensitive Stellen mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Aliquots der Komplexe wurden vor der Behandlung mit DNasel auf ein 5% natives PAA-Gel aufgetragen, um die Komplexbildung der Proben zu überprüfen. Die Nummern der Spuren entsprechen den identischen Proben gezeigt in (A). (C) Gezeigt ist eine densitometrische Auswertung des Footprints. Das Profil wurde mit den Spuren 2, 8, 11 und 12 des in (A) gezeigten Footprints erstellt. Angaben zum Farbcode befinden sich unter dem Profil.

Zur Überprüfung der Komplexbildung wurden von den Proben in (A) Aliquots vor der Behandlung mit DNaseI abgenommen und auf ein Retardierungsgel aufgetragen (B). Die Nummern in (B) entsprechen dabei den identischen Proben in (A). Mit steigender RNAP-Konzentration stieg auch die Intensität der Komplexbanden bis 100 nM RNAP. Die Verwendung von 200 nM RNAP führte zu keiner gesteigerten Komplexbildung (vergleiche Spuren 6 & 7). Durch die Anwesenheit von Rsd wurde die Komplexbildung gehemmt. Mit steigender Rsd Menge nahmen die Intensitäten der Komplexbanden ab. Für eine vollständige Inhibierung der Komplexbildung waren allerdings 10 μ M Rsd notwendig (Spur 13). In (C) ist eine densitometrische Auswertung des Footprints in (A) gezeigt. Dazu wurden die Spuren 2 (freie DNA), 8 (0,2 μ M Rsd), 11 (2 μ M Rsd) und 12 (5 μ M Rsd) aus (A) ausgewertet. Die Positionen der Basen wurden anhand der Sequenzierung (Spur 1 in A) bestimmt und beziehen sich auf den +1 Transkriptionsstart des *rrnB* P1 Promotors. Sowohl in (A) als auch in (C) war erkennbar, dass durch die Präsenz steigender Mengen Rsd der Schutz der DNA durch die RNAP aufgehoben wurde. Die Profile gleichen sich mit steigenden Rsd-Konzentrationen dem Profil der freien DNA an. Eine Verschiebung des Footprints konnte weder in (A) noch in (C) beobachtet werden.

Es wurden auch DNaseI-Footprints mit dem nicht codierenden Strang des *rrnB* P1 Promotors durchgeführt, die allerdings kein anderes Ergebnis brachten. Lediglich ist der Footprint des nicht codierenden Stranges generell schwächer als der des codierenden Stranges und deshalb schlechter auswertbar (Daten nicht gezeigt).

Da Rsd auch die Bindung des Eo³⁸ Holoenzyms an den *bolA*1-Promotor inhibierte (Abbildung 2.1), wurde der E σ^{38} -bolA1-Komplex ebenfalls mittels Hydrolyse durch DNasel näher untersucht. Dabei sollte überprüft werden, ob die Inhibierung der Komplexbildung dem gleichen Mechanismus wie beim Eo⁷⁰ Holoenzym zu Grunde liegt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 gezeigt. Da es vom *bolA*1-Promotor bisher nur wenige Footprintdaten gibt (Nguyen & Burgess, 1997), wurden sowohl der codierende (A) als auch der nicht codierende Strang (B) untersucht. Das $E\sigma^{38}$ Holoenzym wurde im Verhältnis 1:3 rekonstituiert. Dabei wurden 100, 250 und 500 nM Coreenzym eingesetzt. Für die Untersuchung der Rsd vermittelten Inhibierung wurden für die *bolA*1-Promotorbindung 250 nM Eo³⁸ verwendet. Weiterhin enthielten die Proben 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M und 8 μ M Rsd. (A) Erst bei 250 nM E σ^{38} war ein Schutz der DNA durch das Holoenzym erkennbar. Der geschützt Bereich der DNA erstreckte sich von +20 bis -40, zudem gibt es eine hyperreaktive Stelle im Bereich -37 relativ zum +1 Transkriptionsstart des *bolA*1-Promotors. Der Footprint ist mit einem vertikalen Balken und die hyperreaktive Stelle mit einem Pfeil markiert. In einer früheren Arbeit wurde ein $E\sigma^{38}$ induzierter Footprint am *bolA*1-Promotor von +20 bis -56 beschrieben, allerdings war der DNA-Bereich dort genauer aufgelöst (Nguyen & Burgess, 1997). Ob der hier untersuchte Footprint sich auch bis zur Position -56 erstreckt, kann anhand der Abbildung nicht mit Sicherheit geklärt werden.



Abbildung 2.3: DNasel-Footprint Analyse des Rsd Einflusses auf die Komplexbildung des E σ^{38} Holoenzyms mit dem *bolA*-Promotorfragment. Footprints des codierenden Stranges (A) und des nicht codierenden Stranges (B) sind gezeigt. Die Positionsangaben in bp beziehen sich auf den Transkriptionsstart des *bolA*1-Promoters. Geschütze DNA-Bereiche sind mit vertikalen Linien markiert, hypersensitive Positionen mit einem Pfeil. Die gepunktete Linie in (B) markiert einen hypothetischen Footprint des *bolA*2-Promoters. Es wurden unterschiedliche E σ^{38} und Rsd Mengen eingesetzt. Das E σ^{38} Holoenzym wurde im Verhältnis 1:3 rekonstituiert. (A) + (B) Die Spur 2 enthält kein Protein, die Spuren 3 bis 5 enthalten 100, 250 und 500 nM E σ^{38} . Die Spuren 6 bis 9 enthalten jeweils 250 nM E σ^{38} und 1, 2, 4 bzw. 8 µM Rsd. Die Spur 1 in (A) zeigt eine A+G Sequenzierspur des kodierenden Stranges. (C) Densitometrisches Profil des Footprints gezeigt in (A). Die entsprechenden Spuren sind 2, 6, 7 und 9. Ein Farbcode befindet sich unter dem Profil.
Wie bereits beim *rrnB* P1 Promotor so zeigt sich auch am *bolA*1-Promotor keine Veränderung des Footprintmusters, sondern lediglich eine Abschwächung des Footprints durch die Anwesenheit von Rsd in den Proben. Bereits bei 2 μ M Rsd ist eine verringerte Protektion der DNA durch Eo³⁸ erkennbar, 4 μ M Rsd führen zu einem vollständigen Verlust des Footprints (Spur 8). In (C) ist eine densitometrische Auswertung des Footprints vom codierenden Strang gezeigt. Es wurden die Spuren 2, 4, 7 und 9 quantitativ ausgewertet und die Promotorbereiche als Profile dargestellt. Die indizierten Positionen beziehen sich auf den +1 Transkriptionsstart des *bolA*1-Promotors und wurde mit Hilfe der Sequenzierung des codierenden Stranges bestimmt.

In (B) ist eine Footprint Analyse des nicht codierenden Stranges des *bolA*-Promotors gezeigt. Es wurden dabei die gleichen Polymerase und Rsd-Konzentrationen wie in (A) eingesetzt, diese wurden mit gleichen Nummern in (A) und (B) markiert. Die Positionen der Basenpaare wurden mit Hilfe einer A+G-Sequenzierung des nicht codierenden Stranges erstellt, die allerdings in der Abbildung nicht gezeigt ist. Der geschützte Bereich erstreckt sich von +30 bis -80, relativ zum +1 Transkriptionsstart. Dies ist ein sehr langer Footprint, der weit über den Promotorbereich des bolA1 hinausragt. Die Bindung des Eo³⁸ Holoenzyms an den *bolA*1-Promotor schützt wahrscheinlich einen Bereich von +30 bis -40 (markiert mit einer durchgehenden Linie), dies entspricht ungefähr dem von Nguyen und Burgess beschriebenen Bereich (1997). Die weiter upstream gelegenen Protektion der DNA (ca. -40 bis -80; markiert mit einer unterbrochenen Linie) könnte durch eine Bindung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms an den postulierten bolA2-Promotor entstanden sein. Der bolA2 Transkriptionsstart liegt 84 Basenpaare upstream vom *bolA*1 Transkriptionsstart, allerdings handelt es sich bei dem *bolA*2-Promotor um einen σ^{70} -abhängigen Promotor (Aldea *et al.*, 1989). Eine Kreuzerkennung von σ^{38} -und σ^{70} -spezifischen Promotoren durch E σ^{70} bzw. E σ^{38} Holoenzyme, in vitro, ist bereits beschrieben worden (Hengge, 2003), so dass es sich auch hier um eine Kreuzerkennung handeln könnte. Allerdings gibt es bis jetzt keine Footprintdaten für den bolA2-Promotor. Außerdem konnte für den codierenden Strang in (A) keine Bindung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms an den *bolA*2-Promotor beobachtet werden. Falls es sich um eine Bindung von $E\sigma^{38}$ an den *bolA*2-Promotor handelt, so reicht der geschützte Bereich wahrscheinlich über die Position -80 hinaus, jedoch ist es schwierig mittels der Abbildung 2.3 den Bereich am P2 Promotor besser einzugrenzen.

Wie bereits beim codierenden Strang beobachtet, kommt es auch am nicht codierenden Strang, durch die Präsenz von Rsd, zu einer Abnahme des $E\sigma^{38}$ vermittelten Schutzes der DNA. Diese umfasst den ganzen Bereich der Protektion (+30 bis -80) und endet schließlich in einem vollständigen Zusammenbruch des Footprints (Spuren 6-9).

Durch die DNaseI-Footprints konnte kein direkter Hinweis darauf gefunden werden, dass Rsd Bestandteil des Polymerase-Promotor-Komplexes ist. Denn die Gegenwart von Rsd führte nicht zu einer Veränderung der Polymerase-Promotor-Komplex Struktur, sondern nur zu einer Inhibierung der Komplexbildung. Offenbar interagiert Rsd nur mit dem freien Enzym. Trotzdem wurden zusätzlich KMnO₄-Footprints von beiden Promotoren gemacht. Durch die KMnO₄-Footprints war es möglich die Wirkung von Rsd auf die offenen Komplexe zu analysieren.

2.2.2.2 KMnO₄-Footprints

Für die Analysen wurden DNA-Fragmente verwendet, welche den *rrnB* P1 Promotor bzw. den *bolA*1-Promotor enthielten (4.3). Die Komplexbildung erfolgte mit dem σ^{70} haltigen RNAP Holoenzym oder mit rekonstituiertem $E\sigma^{38}$ Holoenzym, am jeweiligen Promotor. Die Proben wurden nach der Komplexbildung mit KMnO₄ behandelt, welches die Reste einzelsträngiger Thymine und Cytidine modifiziert. Durch eine anschließende Behandlung mit Piperidin kommt es zum Strangbruch an den modifizierten Stellen. Dadurch eignet sich diese Methode besonders zur Analyse offener Komplexe (5.4.3).

Am *rrnB* P1 Promotor wurde die Bildung des offenen Komplexes durch die Zugabe steigender Mengen RNAP verfolgt (Abbildung 2.4). Bereits durch die Zugabe von 20 nM RNAP zeigte sich deutlich der offene Komplex, der durch eine Abbruchbande im Bereich -10T und -11T sichtbar gemacht wurde. Die Steigerung der RNAP Konzentration zeigte nur bei 40 nM RNAP eine verstärkte Abbruchbande, danach blieben die Intensitäten der Abbruchbanden bei gesteigerter RNAP Konzentration gleich. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei 40 nM RNAP die Komplexbildung bereits gesättigt war.



Abbildung 2.4: KMnO₄-Footprint des RNAP-*rrnB* P1 Komplexes in Anwesenheit von Rsd. Gezeigt ist ein Autoradiogramm des KMnO₄-Footprints. Die Komplexbildung erfolgte zwischen dem RNAP Holoenzym und dem kodierenden Strang des *rrnB* P1 Promotors. Die Spur 1 enthielt eine Sequenzierung des DNA Fragments. Die Spur 2 enthielt freie DNA, die Spuren 3 bis 6 steigende Mengen an RNAP (20, 40, 100 und 200 nM). Die Spuren 7 bis 12 enthielten 100 nM RNAP und 0, 0,5, 1, 2, 4 und 8 μ M Rsd. Die Positionen -11T und -10T waren sensitive gegenüber der Modifikation mit KMnO₄. Die Inaktivierung des offenen Komplexes durch Rsd wurde quantitative ermittelt. Dazu wurde die gemittelte Intensität des offenen Komplexes bei 100 nM RNAP (Spuren 5 & 7) 100% gesetzt und die Spuren 8 bis 12 in Relation dazu berechnet. Die Werte der Rsd vermittelten Inaktivierung sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst. In der Spur 8 führte die Zugabe von 0,5 μ M Rsd nicht zu einer Inaktivierung des offenen Komplexes, sondern zu einer leichten Aktivierung.

Die Bedeutung von Rsd für die Bildung des offenen Komplexes wurde mit steigenden Rsd-Konzentrationen untersucht, bei einer konstanten RNAP-Konzentration von 100 nM. Mit steigenden Rsd-Konzentrationen nahmen die Intensitäten der Abbruchbanden und damit der offene Komplex ab. Die Inaktivierung des offenen Komplexes [%] wurde bestimmt und in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Zur Untersuchung der offenen Komplexbildung am bolA1-Promotor wurde ein DNA-Fragment verwendet, welches nur den bolA1, nicht aber den bolA2-Promotor enthielt (4.3). Die Abbildung 2.5 (A) zeigt ein Autoradiogram eines KMnO₄-Footprints des *bolA*1-Promotors. Vor der Behandlung mit KMnO₄ wurden Aliquots der Proben abgenommen und auf ein natives PAA-Gel (5.2.9) aufgetragen, um die Komplexbildung zu überprüfen (B). Die Bildung offener Komplexe wurde in Abhängigkeit zunehmender $E\sigma^{38}$ Holoenzym Mengen untersucht. Es wurden 5, 10, 20, 50 und 100 nM $E\sigma^{38}$ eingesetzt. Hyperreaktive Stellen, die bei einem offenen Komplex entstehen, waren jedoch erst bei einer $E\sigma^{38}$ -Konzentration von 50 nM detektierbar. Durch das Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges in der Nähe des +1 Transkriptionsstarts und die anschließende Modifikation mit KMnO₄ entstanden mehrere sensitive Basen, an denen die DNA-Kette nach der Piperidin Behandlung abbrach. Besonders die Positionen -15C und -14C resultierten in starken Abbruchbanden. Etwas schwächere Abbruchbanden gab es an den Positionen -12A und -11T. Um den Einfluss von Rsd zu analysieren, wurden die Polymerase Konzentration bei 50 nM konstant gehalten und steigende Rsd-Konzentrationen eingesetzt. Ab einer Rsd-Konzentration von 2 μ M waren verminderte Intensitäten der Abbruchbanden erkennbar, bei 8 μ M Rsd war die Inhibierung des offenen Komplexes deutlich zu erkennen. Zur Bestimmung der Rsd-induzierten Inhibierung des offenen Komplexes wurden die Intensitäten der Abbruchbanden -11T bis -15C addiert, und in Relation zum offenen Komplex, bei 50 nM $E\sigma^{38}$ ohne Rsd (Spur 5), gesetzt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

Auch bei der in (B) gezeigten Retardierung war erst ab einer $E\sigma^{38}$ -Konzentration von 50 nM eine Komplexbande erkennbar. Eine Erhöhung der $E\sigma^{38}$ -Konzentration auf 100 nM führte zu einer Zunahme der Komplexintensität, d.h. die 50 nM $E\sigma^{38}$ waren nicht ausreichend um die Komplexbildung zu sättigen. Durch die Anwesenheit von Rsd wurde die Komplexbildung gestört, allerdings erst ab einer Konzentration von 2 μ M (Spur 10). Ab einer Konzentration von 4 μ M Rsd waren keine Komplexe mehr sichtbar (Spur 11).



Abbildung 2.5: KMnO₄-Footprint des E σ^{38} -bolA1 Komplexes in Anwesenheit von Rsd. (A) Komplexe wurden mit dem E σ^{38} Holoenzym, rekonstituiert im Verhältnis E: σ 1:3, und den *bolA*1-Promotor gebildet. Die Spur 1 enthielt die Promotor DNA. Die Spuren 2 bis 6 beinhalteten 5, 10, 20, 50 und 100 nM E σ^{38} . Die Spuren 7 bis 12 enthielten jeweils 50 nM E σ^{38} und 0, 0,5, 1, 2, 4 und 8 µM Rsd. In Spur 13 wurde eine Sequenzierung (A+G) des *bolA*1-Fragments aufgetragen. Die Positionen -11T, -12A, -14C und -15C waren sensitive gegenüber KMnO₄ und indizieren den offenen Komplex. Für die Bestimmung der Inaktivierung des offenen Komplexes durch Rsd wurde die Menge an offenem Komplex bei 50 nM E σ^{38} ohne Rsd (Spur 5) 100% gesetzt und die anderen Werte in Bezug dazu errechnet (Tabelle 2.1). Auffällig war eine leichte Komplexzunahme bei der Anwesenheit von 0,5 µM Rsd im Ansatz (Spur 8). (B) Vor der Modifikation mit KMnO₄ wurden Aliquots der Proben gezeigt in (A) auf ein natives PAA-Gel aufgetragen um die Komplexbildung zu überprüfen. Identische Proben sind in (A) und (B) mit den gleichen Nummern versehen.

Bei einem Vergleich der Rsd-abhängigen Inhibierung des offenen Komplexes für den *rrnB* P1 und den *bolA*1-Promotor mit dem $E\sigma^{70}$ bzw. $E\sigma^{38}$ Holoenzym (Tabelle 2.1) war auffällig, dass für beide Systeme eine Rsd-Konzentration von 0,5 μ M nicht zu einer Verminderung des offenen Komplexes, sondern zu einer Aktivierung der offenen Komplexbildung führte. Eine Rsd Konzentration von 1 μ M resultierte dagegen nur in einer leichten Inhibierung, 4,8% für *rrnB* P1 bzw. 1,1% für *bolA*1, des offenen Komplexes. Erst ab 2 μ M Rsd ist für beide Holoenzyme eine deutliche Abnahme des offenen Komplexes um ca. 1/3 detektierbar. Bereits bei 4 μ M Rsd wurden ca. 90% der offenen Komplexe inhibiert, allerdings führte auch eine Erhöhung der Rsd-Konzentration auf 8 μ M zu keiner vollständigen Inhibierung der offenen Komplexe.

μM Rsd	0	0,5	1	2	4	8
RNAP [%]	/	-8,1	4,8	34,7	94,4	95,7
Inhibierung						
Eσ ³⁸ [%]	/	-7,2	1,1	32,4	n.d.	89,1
Inhibierung						

Tabelle 2.1: Rsd abhängige Inhibierung der offenen Komplexbildung eines σ^{70} - und eines σ^{38} -spezifischen Promotor-Polymerase Systems:

Da Rsd auch die Komplexbildung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms mit dem *bolA*1-Promotor inhibierte, wurde überprüft ob diese Inhibierung promotorspezifisch war. Da der *bolA*1-Promotor nicht strikt σ^{38} -abhängig ist. Es wurde gezeigt, dass der *bolA*1-Promotor *in vitro* und *in vivo* auch vom $E\sigma^{70}$ Holoenzym transkribiert wird (Nguyen *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1999). Deshalb wurde eine weitere Promotorbindung mit einem obligat σ^{38} -abhängigen Promotor durchgeführt.

2.2.3 Inhibiert Rsd auch ein obligat σ^{38} -abhängiges System?

Der untersuchte *fic*-Promotor wurde sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Studien als ausschließlich σ^{38} -abhängig identifiziert. Das Fic-Protein wird invers zur Wachstumsphase exprimiert und ist an der Zellteilung beteiligt (Tanaka *et al.*, 1993; Utsumi *et al.*, 1993). Für die Bindestudien wurde der *fic*-Promotor mittels PCR (5.2.8; 4.3) aus MG1655 isoliert. In einem ersten Versuch wurde die Bindung verschiedener RNA-Polymerasen am *fic*P-Fragment getestet (Abbildung 2.6).

Dabei wurden neben den aus Coreenzym und Sigmafaktor rekonstituierten $\mathrm{E}\sigma^{70}$ und $\mathrm{E}\sigma^{38}$ Holoenzymen auch das als Einheit isolierte σ^{70} -haltige RNAP Holoenzym und das σ -freie Coreenzym verwendet. Da für die Bildung des offenen Komplexes an einigen Promotoren die Anwesenheit der ersten beiden Start-NTPs nötig ist, wurde die Komplexbildung mit und ohne Start-NTPs (500 μ M CTP; 50 μ M ATP) durchgeführt. Besonders bei dem $\mathrm{E}\sigma^{38}$ Holoenzym führte die Anwesenheit von Start-NTPs zu einer verstärkten Komplexbildung. Bei den anderen Holoenzymen hatte der Einsatz von Start-NTPs dagegen keinen deutlichen Effekt. Die schwachen Komplexe des Coreenzyms deuten daraufhin, dass nicht genug Heparin im Ansatz war, um unspezifische Polymerasebindungen zu verhindern. Auch die σ^{70} -haltigen Polymerasen (RNAP & $\mathrm{E}\sigma^{70}$) haben am *fic*P-Fragment gebunden, allerdings laufen diese Komplexe oberhalb der $\mathrm{E}\sigma^{38}$ -Komplexe, so dass es sich bei diesen Komplexen auch um eine Randbin-

dung der Polymerasen handeln könnte. DNA-Protein-Komplexe mit randständiger Proteinbindung migrieren langsamer in nativen PAA-Gelen als vergleichbare Komplexe mit mittiger Proteinbindung (Wu & Crothers, 1984).

Da die DNA-Protein-Komplexe mit den σ^{70} -haltigen Polymerasen abweichendes Migrationsverhalten zeigten, ferner der Einsatz von Start-NTPs zu keiner erhöhten Komplexbildung führte, wurde angenommen, dass die σ^{70} -haltigen Polymerasen nicht am *fic*-Promotor binden.



Abbildung 2.6: Gelverzögerungsanalyse des *fic*P-Fragments mit Polymerasen. Gezeigt ist das Autoradiogramm einer Retardierung. Untersucht wurde die Bindung verschiedener σ^{70} - und σ^{38} - abhängiger Polymerasen am *fic*-Promotor. Die Proben enthielten 40 ng *fic*P-Fragment, versetzt mit bzw. ohne Start-NTPs. Die Polymerasebindung wurde mit 200 nM Coreenzym (Spuren 3, 4, 13, & 14), 100 nM RNAP Holoenzym (Spuren 5, 6, 15 & 16) sowie 200 nM E σ^{70} (Spuren 7, 8, 17 & 18) bzw. 200 nM E σ^{38} (Spuren 9, 10, 19, & 20) untersucht. Das E: σ Verhältnis betrug 1:3, für beide Holoenzyme. Die Spuren 1, 2, 11 und 12 enthielten freie DNA. Der Einfluss von Rsd auf die Polymerasebindung wurde mit 2 μ M Rsd überprüft. Die freie DNA und der E σ^{38} -*fic*P-Komplex sind markiert.

Zusätzlich sollte auch der Einfluss von Rsd auf die Bindung der RNA-Polymerasen an den *fic*-Promotor untersucht werden. Deshalb wurden einige Proben mit 2 μ M Rsd versetzt. Gleichwohl war die hier beobachtete Inhibierung gering, lediglich bei den Proben mit Start-NTPs resultierte die Anwesenheit von Rsd in einer leichten Abnahme der Komplexbildung. Davon ausgenommen waren die schwachen Coreenzym-Komplexe, diese zeigten sich gegenüber Rsd insensitiv. Dies war nicht weiter überraschend, da sie keinen Sigmafaktor enthielten.

Um zu überprüfen, ob die RNAP an den *fic*-Promotor oder an einer anderen Position auf dem Fragment gebunden hatte, wurde eine *in vitro* Transkription mit dem *fic*P-Fragment als Template und dem σ^{70} -haltigen RNAP Holoenzym durchgeführt. Das dabei entstandene Transkript wurde daraufhin mittels Primer-Extension sequenziert um die Transkriptionsstartstelle zu bestimmen (5.4.7). In Abbildung 2.7 (A) ist ein Autoradiogramm der Sequenzierung gezeigt. Die Spuren 1 bis 4 enthielten je eines der Didesoxynukleotide, die beim Einbau in die cDNA zum Kettenabbruch führen. In der Spur 5 wurde die Primer-Extension Reaktion ohne Abbruchnukleotide aufgetragen. In dieser Spur waren einige cDNA-Produkte der *fic*-mRNA zu erkennen, aber keines verlief auf der Höhe des +1 Transkriptionsstarts des *fic*P. Die angegeben Sequenzpositionen in (A) wurden anhand der bekannten Sequenz des *fic*-Gens identifiziert und beziehen sich auf die *fic*-mRNA. Der σ^{38} -abhängige +1 Transkriptionsstart ist markiert (+1C).

Das RNAP Holoenzym hat die RNA-Synthese nicht am bekannten Transkriptionsstart des *fic*-Promotors, sondern mehr als 40 Nukleotide weiter *upstream* gestartet. Neben den starken Abbruchbanden im Bereich zwischen -40 und -50, relativ zum +1 Transkriptionsstart des *fic*P, gibt es noch zwei weitere Abbruchbanden. Diese Laufen weiter oberhalb der Hauptabbruchbanden. Da die Sequenzierung nicht bis zu den oberen Banden reicht konnte die Größe nicht exakt bestimmt werden. Es kann nur vermutet werden, dass ein Teil der RNA-Polymerasen am upstream gelegenen Fragmentende gebunden und von dort aus die Transkription gestartet hat.



Abbildung 2.7: Analyse des *fic*-Promotors mittels Primer-Extension und Retardierung. (A) Gezeigt ist ein Autoradiogramm der Primer-Extension Sequenzierung des *fic*-Transkripts. Die Spuren 1 bis 4 zeigen die Sequenzierung der *fic*-mRNA, die Spur 5 zeigt die Primer-Extension Produkte der *fic*mRNA. Einige Positionen der *fic*-mRNA sowie der σ^{38} -spezifische +1 Transkriptionsstart sind markiert. (B) Analyse zum Einfluss von Rsd auf die Bindung von E σ^{38} an den *fic*-Promotor. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines nativen 5%igen PAA-Gels. Die Spur 1 enthält freie DNA, die Spuren 2 bis 6 enthalten 200 nM E σ^{38} sowie 0, 1, 2, 4 und 8 µM Rsd. Der E σ^{38} -*fic*P-Komplex und die freie DNA sind markiert. (C) Die Intensitäten der verbliebenen Komplexbanden wurden ermittelt K [%].

In einem nächsten Schritt wurde dann der Einfluss von Rsd auf die Eo³⁸ Holoenzym Bindung an das *fic*P-Fragment untersucht (B). Das Eo³⁸ Holoenzym formte mit dem *fic*P-Fragment einen Komplex, dessen Bildung jedoch Rsd sensitiv war, da durch steigende Rsd-Mengen die Intensitäten der Komplexbanden abnahmen. Die Stärken der Komplexbanden wurden quantitativ ermittelt und mit den entsprechenden Rsd-Konzentrationen in (C) zusammengefasst. Bereits 1 μ M Rsd war ausreichend um die Hälfte der Komplexe zu inhibieren. Bei 2 μ M Rsd bildeten sich nur noch 25% der Komplexe aus und ab 4 μ M Rsd konnten keine Komplexe mehr detektiert werden. Die negative Beeinflussung der Promotorbindung des Eo³⁸ Holoenzyms durch Rsd, konnte somit für einen weiteren o³⁸-abhängigen Promotor gezeigt werden. Ferner war die Inhibierung der Promotorbindung am *fic*P stärker ausgeprägt als für den *bolA*1-Promotor. Allerdings ist der *fic*-Promotor ein sehr schwacher Promotor, der im Gegensatz zum *bolA*1-Promotor Start-NTPs zur Bildung von stabilen Komplexen benötigt.

2.2.4 Interaktion von Rsd mit Bestandteilen des Transkriptionsapparates

Da bei den vorangegangenen Studien Rsd sowohl die Bindung des Eo⁷⁰ Holoenzyms als auch die Bindung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms inhibierte, stellte sich die Frage nach den Interaktionspartnern von Rsd. Als Antisigmafaktor geht Rsd mit σ^{70} einen 1:1 Komplex ein, auch eine Bindung an das Coreenzym und die Bildung von Dimeren ist für Rsd bereits beschrieben (Ilag et al., 2004; Westblade et al., 2004). Deshalb sollte untersucht werden, ob Rsd auch mit σ^{38} interagiert, denn die Aminosäuresequenz von σ^{38} hat eine große Homologie zur Aminosäuresequenz des primären Sigmafaktor σ^{70} . Erste Hinweise darauf gab es schon in früheren Versuchen, mittels Glutaraldehyd konnten Rsd und σ^{38} miteinander quervernetzt werden (Hofmann, 2006). Allerdings kann es bei dieser Methode der chemischen Modifikation zu unspezifischen Reaktionen kommen. Versuche einen $\sigma^{_{38}}$ -Rsd-Komplex über ein natives PAA-Gel zu identifizieren schlugen fehl (Kamp, 2005). Da in nativen Gelen die Proteine nicht nur nach ihrer Größe, sondern auch ihrer Ladung entsprechend im elektrischen Feld wandern. Deshalb wurden zur Beantwortung dieser Frage affinity-binding Experimente durchgeführt (5.4.1). Dazu wurde das μ MacsTM Streptavidin Kit der Firma Miltenyi Biotec GmbH verwendet. Dieses Kit besteht aus kleinen Säulen, die mit Edelstahlkügelchen gefüllt sind. In einem starken Magneten führen diese Kügelchen zu einer Verstärkung des Magnetfeldes. Magnetische Partikel können dadurch in der Säule festgehalten werden, während nicht magnetische Partikel von der Säule gespült werden. Über eine Streptavidingruppe können Proteine und Nukleinsäuren an die magnetischen μ Beads gebunden werden. Dabei bindet die Straptavidingruppe an Biotinreste des Moleküls.



Abbildung 2.8: Biotinylierung von Rsd. Gezeigt ist ein 15% iges SDS-Gel, auf dem steigende Mengen biotinyliertes und natives Rsd Protein aufgetragen wurden. Die Spuren 2 bis 4 enthielten 2, 4, und 6 µg biotinyliertes Rsd. Die gestaffelten Baden weisen daraufhin, dass unterschiedlich viele Biotingruppen an Rsd gebunden haben. Die Spuren 5 & 6 enthielten 2 und 6 µg natives Rsd. In der Spur 1 wurde ein Molekularmarker (MM) aufgetragen. Die Banden des biotinylierten und freien Rsd Proteins sind markiert.

Da die Interaktion von Rsd mit mehreren Proteinen untersucht werden sollte, wurde Rsd biotinyliert (5.4.1). Dies erfolgte durch eine Bindung der Biotinester an die zugänglichen Lysinreste des Proteins. Mittels einer SDS-Gelelektrophorese (5.3.3) mit anschließender Coomassie-Färbung (5.3.4) wurde überprüft, ob Rsd biotinyliert war. Die Abbildung 2.8 zeigt ein SDS-Gel, auf dem biotinyliertes und natives Rsd Protein aufgetragen wurde. Die Bindung einer Biotingruppe an Rsd führte zu einem erhöhten Molekulargewicht des Proteins, einhergehend mit einer verringerten Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die gestaffelten Banden weisen daraufhin, dass unterschiedlich viele Biotingruppen an Rsd gebunden haben. Es ist jedoch auffällig, dass nicht alle Rsd Moleküle biotinyliert waren, ca. 1/3 des eingesetzten Proteins trug keine Biotingruppe. Die anderen 2/3 des Proteins waren mit durchschnittlich 3,5 Biotingruppen pro Molekül, versehen. Um eine möglichst optimale Bindung von Rsd an die μ Beads zu gewährleisten wurde der folgende Zusammenhang berücksichtigt:

100 μ l Streptavidin μ Beads binden bis zu X μ g biotinyliertes Protein mit durchschnittlich Y Biotingruppen.

X = Molekulargewicht (kDa)/(10•Y) Y = durchschnittliche Anzahl an Biotingruppen pro Proteinmolekül

Für Rsd ergab sich demnach mit einem Molekulargewicht von 18,2 kDa und durchschnittlich 3,5 Biotingruppen pro Molekül eine maximale Säulenhaftung von 520 ng. Da nur 2/3 des Proteins biotinyliert waren, mussten 780 ng Protein bzw. 429 nM Rsd eingesetzt werden, damit theoretisch 520 ng in der Säule festgehalten wurden. Um dies zu gewährleisten wurde die dreifache Menge an Rsd (1,29 μ M) in die Reaktionsansätze eingesetzt. Damit jedes eingesetzte Rsd Molekül an eines der untersuchten Proteine binden konnte, wurden die folgenden molaren Verhältnisse gewählt:

```
\sigma^{70}, \sigma^{38}, Rsd, BSA, Lysozym: 3:1
```

Coreenzym, RNAP:

Die Affinitätsbindung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (5.4.1). In der Abbildung 2.9 sind die Ergebnisse mehrerer Versuche zusammengefasst. Jedes Protein wurde mindestens zweimal untersucht. Zuerst wurde überprüft, wie spezifisch das System ist (A). Dazu wurde biotinyliertes Rsd mit Lysozym und mit BSA inkubiert. Dies sind beides Proteine die nicht mit Rsd interagieren und deshalb nicht in der Säule retardiert werden sollten.

1:1



Abbildung 2.9: Studien zur Wechselwirkung von Rsd mit Bestandteilen des Transkriptionsapparates. Gezeigt sind SDS-Gel Ausschnitte mehrere Experimente. (A) Biotinyliertes Rsd wurde mit Lysozym (oberes Bild) bzw. mit BSA (unteres Bild) inkubiert. Oberes Bild: Zur besseren Übersicht wurden 2 µg biotinyliertes Rsd (K₁) und 2 µg Lysozym (K₂) mit aufgetragen. Die Spuren 4 bis 9 enthielten die gesammelten Fraktionen des Durchflusses (F), der vier Waschschritte (W₁-W₄) und das Eluat (E). Die Spur 3 enthielt kein Protein, biotinyliertes Rsd und Lysozym sind markiert. Unteres Bild: Der Ausschnitt zeigt die Banden des BSA-Proteins. Die Spuren 1 bis 6 enthielten die von der Säule eluierten Fraktionen (F, W₁-W₄ & E). (B) Überprüfung der Bindung von Rsd an: das Coreenzym (links, oben) und das Holoenzym (links, unten) der RNA-Polymerase sowie der Sigmafaktoren σ^{70} (rechts, oben), σ^{38} (rechts, mittig) und natives Rsd (rechts, unten). Die α - und $\beta\beta$ '-Untereinheiten, sowie σ^{70} , σ^{38} und Rsd sind markiert. Die Reihenfolge der Proben entspricht der bei BSA. Proteine die von der Säule eluiert werden konnten (Spur 6) sind mit einem Pfeil markiert.

(A) Oberes Gel: Zur besseren Übersicht wurden neben den gesammelten Fraktionen des Durchflusses (F), der vier Waschschritte (W_1 - W_4) und dem Eluat (E) noch biotinyliertes Rsd (K_1) und Lysozym (K_2) mit aufgetragen. Ungebundenes Lysozym befand sich vor allem im Durchfluss und im ersten Waschschritt. Durch wiederholtes Waschen konnte kein weiteres Lysozym von der Säule gespült werden, auch in der Probe mit dem SDS-haltigen Puffer konnte kein Lysozym nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis brachte der Einsatz von BSA (unteres Bild). Zur Vereinfachung ist nur der Gelausschnitt mit den BSA-Banden gezeigt. BSA-Protein konnte nur in den Proben des Durchflusses (F) und den ersten beiden Waschschritten ($W_1 \& W_2$) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten, dass Proteine nicht unspezifisch in der Säule festgehalten wurden. Weiterhin reichten bereits zwei Waschschritte aus um alle Proteine von der Säule zu spülen, die nicht mit Rsd interagierten.

In einem nächsten Schritt wurde die Bindung von Rsd an die Komponenten des Transkriptionsapparates von *Escherichia coli* untersucht (B). Die abgebildeten Gelausschnitte zeigen die Untereinheiten der untersuchten Proteine, die in den gesammelten Fraktionen (F, W₁-W₄ & E) enthalten waren. An den linken Seiten der Gelbilder sind jeweils die untersuchten Proteine angegeben. Konnten Proteine durch die Zerstörung der Protein-Rsd-Bindung mittels SDS von der Säule eluiert werden, so wurden die entsprechenden Banden mit Pfeilen markiert (rechte Gelseiten). Die bereits bekannten Interaktionen von Rsd mit dem Coreenzym der RNA-Polymerase (links, oben), σ^{70} (rechts, oben) und Rsd (rechts, unten) konnten auch mit dieser Methode reproduziert werden. Weiterhin konnten die durch Quervernetzungsstudien gewonnenen Hinweise auf eine Bindung von σ^{38} an Rsd bestätigt werden (rechts, mittig).

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob Rsd an das RNAP Holoenzym bindet (links, unten). Eine solche Bindung konnte mit der hier angewendeten Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch bei den bereits durchgeführten DNaseI-Footprint Analysen ergaben sich keine Hinweise auf eine solche Bindung. Allerdings konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Rsd die σ^{70} -Untereinheit vom Holoenzym ablösen kann und dann im Komplex sowohl mit σ^{70} als auch mit dem Coreenzym vorliegt (Ilag *et al.*, 2004). Aber auch diese Wechselwirkung konnte mit dem hier verwendeten System nicht beobachtet werden. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich die Nachweisgrenze dieser Methode. Durch die geringe maximale Säulenhaftung und der sich anschließende Nachweis über ein silbergefärbtes SDS-Gel eignet sich diese Methode nicht, um sehr schwache Proteinbindungen zu untersuchen.

2.3 Einfluss von Rsd auf die Transkription

Nachdem mittels Retardierungsanalysen (2.2.1) eine negative Wirkung von Rsd auf die Promotorbindung beider Holoenzyme sowie eine Bindung von Rsd an σ^{38} durch affinity-binding (2.2.4) gefunden wurde, sollte als nächstes der Einfluss von Rsd auf die Transkriptionsaktivität der Holoenzyme an verschiedenen Promotoren untersucht werden. Zuerst wurde speziell die Transkriptionsinitiation betrachtet. Dazu wurden pseudo single round in vitro Transkriptionen (5.4.5) durchgeführt. Bei einer *pseudo single round in vitro* Transkription kann jede Transkriptionseinheit mehrfach von der Polymerase transkribiert werden. Jedoch sind nur die Transkripte der ersten Runde bei der späteren Analyse sichtbar, da nur sie die radioaktiv markierten Initiationsnukleotide inkorporiert haben (Hsu, 1996). Bei der pseudo single round in vitro Transkription wurde zur Bildung stabiler offener Komplexe das RNA-Polymerase Holoenzym in der Anwesenheit der ersten drei Start-NTPs mit der Promotor-DNA inkubiert, dabei war das dritte Start-NTP radioaktiv markiert. Zur Unterdrückung unspezifischer Polymerasebindungen wurde die Probe mit Heparin versetzt und dann die Transkription mit einem Überschuss an nicht markierten NTPs gestartet. Demzufolge wurde die spezifische Aktivität des markierten NTPs soweit erniedrigt, dass es bei den anschließend synthetisierten Transkripten nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

2.3.1 *Pseudo single round in vitro* Transkription

Zur Untersuchung der Wirkung von Rsd auf die Transkriptionsinitiation wurden ein σ^{70} - und ein σ^{38} -spezifisches Promotorsystem verwendet. Um die Regulation des *rrnB* P1 Promotors zu analysieren, wurde der Vektor pRT3H Δ P2 mit dem E σ^{70} Holoenzym inkubiert. Die Initiation des *bolA*1-Promotors durch das E σ^{38} Holoenzym wurde mittels des Vektors pbolA-T1T2 (4.2.2) untersucht. Dazu wurden beide Promotorsysteme mit steigenden Rsd-Konzentrationen getestet. In Abbildung 2.10 sind die Ergebnisse eines solchen Experiments gezeigt. Für beide Systeme war eine Abnahme der Transkriptmenge bei steigenden Rsd-Konzentrationen zu erkennen (A). Allerdings zeigte die quantitative Auswertung fünf unabhängiger Experimente ein komplexeres Bild (B). Bei einer Rsd-Konzentration von 60 nM, die einem Sigmafaktor zu Rsd Verhältnis von 1:1 entspricht, war beim E σ^{70} Holoenzym eine deutliche Zunahme des *rrnB* P1 Transkripts um ca. 40% zu erkennen, während die Menge des σ^{38} abhängigen *bolA*1-Transkripts um ca. 30% abnahm. Eine Erhöhung der Rsd-Konzentration von 0,3 μ M auf 1,2 μ M führte beim E σ^{70} Holoenzym dann jedoch zu einer stetigen Abnahme der Transkripte. Während die Transkriptmengen des E σ^{38} Holoenzyms bis zu einer Rsd-Konzentration von 1,2 μ M konstant blieb. Bei 1,2 μ M Rsd hatten beide Systeme gleiche Transkriptstärken von ca. 70%, relativ zum jeweiligen Nullwert. Eine weitere Erhöhung der Rsd-Konzentration führte bei beiden Systemen zu einer identischen Inhibierung der Transkription, einhergehend mit einer starken Abnahme der Transkriptstärken. Bei einer Rsd-Konzentration von 6 μ M waren schließlich noch ca. 20% der Transkripte sowohl für das E σ^{70} als auch für das E σ^{38} Holoenzym detektierbar.



Abbildung 2.10: Vergleich zweier pseudo single round in vitro Transkriptionen. (A) Dargestellt sind Ausschnitte eines Autoradiogramms, die das *rrnB* P1 Transkript (oben) bzw. das *bolA*1 Transkript (unten) zeigen. Die Proben enthielten steigende Rsd-Konzentrationen: 0,06 μ M; 0,3 μ M; 0,6 μ M; 1,2 μ M; 1,8 μ M; 3 μ M und 6 μ M (Spuren 2 bis 8). Die in Spur 1 aufgetragene Probe enthielt kein Rsd und wurde für die quantitative Auswertung als Referenz benutzt. (B) Quantitative Auswertung der *in vitro* Transkriptionen. Dargestellt sind die detektierbaren Transkripte der *rrnB* P1 und *bolA*1-Promotoren, in Abhängigkeit der Rsd-Konzentration. Ausgewertet wurden fünf unabhängige Experimente.

Bei einer Betrachtung der Kurvenverläufe für die *rrnB* P1 und *bolA*1-Transkripte, war auffällig, dass der jeweilige Nullwert stark abweichte (B). Für das $E\sigma^{70}$ Holoenzym waren die Transkriptstärken des Nullwertes zu niedrig, während sie für das $E\sigma^{38}$ Holoenzym zu hoch waren. Allerdings konnten diese Effekte fünfmal reproduziert werden. Die Inhibierungen der Transkriptionsraten im Bereich von 60 nM bis 6 μ M Rsd, zeigten dagegen einen einheitlichen Gang. Und entsprachen damit durchaus den den bereits publizierten Effekten von Rsd auf σ^{70} - bzw. σ^{38} -abhängige *in vitro* Transkriptionssysteme (Mitchell *et al.*, 2007; Jishage & Ishihama, 1998). Da bei einer Rsd-Konzentration von 0,06 bis 1,2 μ M unterschiedliche Auswirkungen auf die Transkriptionssysteme zu erkennen waren, liegt die physiologische Wirkung von Rsd wahrscheinlich in diesem Konzentrationsbereich. Höhere Rsd-Konzentrationen könnten demnach zu unspezifischen Inhibierungen führen. Zusätzlich kommt eine *in vitro* Transkription dem natürlichem System näher als nur eine Promotorbindung. Warum der Nullwert in beiden Systemen so stark abwich, konnte bisher jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden. Überlegungen dazu werden im Diskussionsteil ausführlicher behandelt.

2.3.2 Multiple round in vitro Transkription

Bei den *multiple round in vitro* Transkriptionen (5.4.4) wurden alle Transkripte radioaktiv markiert. Dadurch konnte nicht unterschieden werden, ob ein Effektor Einfluss auf die Transkriptionsinitiation oder die Elongation hat. Dafür konnte die RNA-Polymerase mehrfach am Promotor initiieren, dies bedarf einer erneuten Bindung des Sigmafaktors an das Coreenzym der RNAP.

Bei den hier durchgeführten multiple round in vitro Transkriptionen wurde ein multipromotor-Vektor verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass beide Polymerasen am gleichen Template starten. Daher sind DNA-abhängige Effekte auf die Transkription, wie zum Beispiel der Salzgehalt oder die DNA-Konformation, für beide Polymerasen identisch. Weiterhin kann der Einfluss eines Effektors auf verschiedene Promotoren gleichzeitig beobachtet werden. Zudem konkurrieren die unterschiedlichen Promotortypen miteinander um die Bindung der Polymerase. Dies kommt einem natürlichen System näher als Einzelpromotorstudien, bei denen die Polymerase nicht zwischen verschiedenen Promotoren wählen kann. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pSH666-1 (4.2.2) enthält neben den bereits einzeln untersuchten Promotoren rrnB P1 und bolA auch den synthetischen tac-Promotor und die plasmidkodierte *RNA1*. Der *tac*-Promotor ist ein sehr starker σ^{70} -abhängiger Promotor der aus der -10 Region des lac-Promotors und der -35 Region des trp-Promotors besteht (de Boer et al., 1983). Im Gegensatz zum ebenfalls starken rrnB P1 Promotor gilt der tac-Promotor als unreguliert, da er kein natürlich vorkommender Promotor ist. Der bolA-Promotor enthält die Tandempromotoren P1 und P2, allerdings konnten bei den durchgeführten *in vitro* Transkriptionen stets nur Transkripte des P1 Promotor detektiert werden. Vermutlich ist der σ^{70} -abhängige P2 Promotor sehr schwach und kann sich deshalb nicht gegen die starken *tac* und *rrnB* P1 Promotoren durchsetzen. Der plasmidkodierte *RNA*1-Promotor wurde von beiden Holoenzymen erkannt und führte auch in Anwesenheit der starken Promotoren zu deutlichen Transkripten. Die Promotoren *tac, rrnB* P1 und *bolA* besitzen alle die starken, ribosomalen T1T2 Terminatoren und führen deshalb zu Transkripten einer diskreten Länge (*rrnB* P1 320 nt; *tac* 310 nt; *bolA*1 120 nt und *RNA*1 109 nt), die bei der Analyse auf einem denaturierenden PAA-Gel (5.2.9) unterschieden werden können.

Die Abbildung 2.11 (A) zeigt exemplarisch ein Autoradiogramm einer solchen in *vitro* Transkription. Der Vektor pSH666-1 wurde mit dem $E\sigma^{70}$ und dem $E\sigma^{38}$ Holoenzym transkribiert. Dabei zeigte sich, dass das $E\sigma^{70}$ Holoenzym nur von den σ^{70} abhängigen rrnB P1, tac und RNA1 Promotoren die Transkription startete, nicht aber vom σ^{38} -abhängigen *bolA*1-Promotor. Das E σ^{38} Holoenzym transkribierte dagegen neben den bolA1-Promotor auch den tac und RNA1 Promotor, auch für den rrnB P1 Promotor war ein schwaches Transkript zu erkennen. Für das $E\sigma^{70}$ Holoenzym führte die Rsd-Titration von 0,5 bis 4 μ M zu einer verringerten Transkription. Für alle drei Promotoren (*rrnB* P1, *tac* und *RNA*1) konnte eine Rsd-abhängige Verringerung der Transkriptintensitäten beobachtet werden. Die Transkriptstärken des rrnB P1 gingen bei 1 μ M Rsd auf ca. 30% Restaktivität zurück, die der RNA1 auf ca. 40% und der *tac* hatte noch ca. 60% Restaktivität (B). Eine weitere Erhöhung der Rsd Konzentration führte jedoch zu keiner weiteren Abnahme der Transkriptionsraten des Eo⁷⁰ Holoenzyms. Für das Eo³⁸ Holoenzym konnte dagegen, unabhängig vom Promotor, keine Reduktion der Transkriptionsraten beobachtet werden. Die Promotoren *bolA*1 und RNA1 zeigten sogar eine leichte Aktivierung der Transkription (ca. 10% für *bolA*1 und ca. 20% für RNA1) in Anwesenheit steigender Rsd-Konzentrationen, während die Transkriptionsrate des tac-Promotors bei ca. 100% konstant blieb. Die Verwendung des multipromotor-Vektors ermöglichte es nicht nur die Sigmafaktor abhängige Transkription verschiedener Promotoren darzustellen, sondern auch die Regulation der Transkription durch Rsd. Dabei war zu beobachten, dass abhängig vom Holoenzym Rsd unterschiedliche Wirkung auf die Transkription einzelner Promotoren hat. So wurde die Transkription des *tac*-Promotors mit dem $E\sigma^{70}$ Holoenzym durch Rsd inhibiert, während die Transkription mit dem $E\sigma^{38}$ Holoenzym durch Rsd nicht beeinflusst wurde.



Abbildung 2.11: *Multiple round in vitro* Transkriptionen mit den E σ^{70} und E σ^{38} Holoenzymen. (A) Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines 10% igen PAA-Gels. Der Vektor pSH666-1 wurde mit 15 nM E σ^{70} (Spuren 1-10) bzw. E σ^{38} (Spuren 11-20) Holoenzym und steigenden Rsd Konzentrationen inkubiert. Die Spuren 1+2 sowie 11+12 enthielten kein Rsd. Es wurden 0,5 µM; 1 µM; 1,5 µM; 2 µM; 2,5 µM; 3 µM; 3,5 µM und 4 µM Rsd (Spuren 3-10 und 13-20) eingesetzt. Die Transkripte *rrnB* P1, *tac*, *bolA*1, und *RNA*1 sowie der externe Standart Avall sind markiert. (B) Quantitative Auswertung der *multiple round in vitro* Transkriptionen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente quantifiziert. Links ist die Auswertung des E σ^{70} Holoenzyms, rechts die des E σ^{38} Holoenzyms gezeigt. Dargestellt sind die Transkriptstärken in Abhängigkeit der Rsd-Konzentration.

Da bei einer Rsd-Konzentration von 1 μ M bereits die maximale Inhibierung des E σ^{70} Holoenzyms erreicht war, wurde in einem weiteren Versuch die Inhibierung der σ^{70} abhängigen Transkription mit niedrigeren Rsd-Konzentrationen untersucht. Dazu wurde die Transkription des pSH666-1 mit 0,25 bis 1 μ M Rsd getestet. Die Abbildung 2.12 zeigt eine Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Es war ersichtlich, dass 0,25 μ M Rsd bereits ausreichten, um die Transkription deutlich zu inhibieren. Höhere Rsd-Konzentrationen führten zu keiner stärkeren Inhibierung. Weiterhin war erkennbar, dass die Inhibierung unterschiedlich stark für die einzelnen Promotoren ausfiel. So wurde der *rrnB* P1 Promotor am stärksten inhibiert, während für die *RNA*1 und den *tac*-Promotor die Rsd-induzierten Inhibierungen schwächer waren.



Abbildung 2.12: Inhibierung der $E\sigma^{70}$ -Transkription durch niedrige Rsd-Konzentrationen. Gezeigt ist die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Aufgetragen wurden die Transkriptstärken der *rrnB* P1, *tac* und *RNA*1 Promotoren gegen die Rsd-Konzentration.

2.3.3 In vitro Transkription mit Sigmakompetition

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Rsd die Transkription des E σ^{70} Holoenzyms inhibiert, nicht aber die des E σ^{38} Holoenzyms, wurde als nächstes untersucht, welche Auswirkungen Rsd auf eine Kompetition der Sigmafaktoren hat. Es wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem pSH666-1 Plasmid durchgeführt. Dabei wurden in einem Volumen von 40 µl 5 nM Plasmid-DNA in 1x 160 mM KGlu-Puffer mit 30 nM eines oder beider Sigmafaktoren und 65 µM ATP, GTP, UTP, 5 µM CTP sowie [α -³²P]-CTP inkubiert. Durch die Zugabe von 20 nM Coreenzym gleichzeitig mit steigenden Rsd-Konzentrationen wurde die Reaktion gestartet und für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von 6 µl Chase-Lösung wurden die Ansätze für weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl Stopplösung beendet und die Proben mit Ethanol gefällt. Die Pellets wurden anschließend in Formamid-Probenpuffer aufgenommen und über ein 10% iges PAA-Gel aufgetrennt. Die Abbildung 2.13 zeigt das Autoradiogramm eines solchen Versuchs. Zum Vergleich der Transkriptstärken wurden auch Proben mit nur einem Sigmafaktor aufgetragen. Die Spuren 1+2 zeigen die Transkription des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms mit (Spur 1) und ohne Rsd (Spur 2). Durch Rsd nahm die Transkriptionsrate des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms ab. Dies resultierte in schwächeren Produktintensitäten der σ^{70} -abhängigen Promotoren. Der σ^{38} -abhängige *bolA*1-Promotor wurde vom $E\sigma^{70}$ Holoenzym nicht trankribiert. Waren beide Sigmafaktoren im Ansatz vorhanden, so zeigte sich keine Änderung der Transkriptionsraten für die o⁷⁰-abhängigen Promotoren. Allerdings waren nun auch Transkripte für den σ^{38} -abhängigen *bolA*1-Promotor detektierbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein Teil des Coreenzyms an σ^{38} gebunden hatte und damit die Expression des *bolA*1-Promotors möglich wurde. Wurden dann steigende Mengen Rsd in den Ansatz gegeben, so zeigten sich für fast alle Promotoren veränderte Transkriptionsraten. Während die Transkription der rrnB P1 und tac-Promotoren inhibiert wurde, wurde gleichzeitig die Transkription des bolA1-Promotors aktiviert. Die Transkriptionsraten der RNA1 blieben dabei konstant. Die Produktstärken der Proben mit beiden Sigmafaktoren und Rsd entsprachen denen der Proben, die nur σ^{38} enthielten. Durch die Anwesenheit von Rsd in den Ansätzen war σ^{38} offenbar bei der Kompetition um die Bindung an das Coreenzym gegenüber σ^{70} im Vorteil. Dadurch wurde ein Großteil der Transkription vom E σ^{38} Holoenzym durchgeführt, dies führte zu einem veränderten Transkriptionsmuster. In der Abbildung 2.14 sind die quantitativen Auswertungen der relativen Transkriptstärken aus der Abbildung 2.13 dargestellt. Dabei konzentrierte sich die Auswertung auf die Proben, die beide Sigmafaktoren enthielten. Die Spuren 3+4 wurden als Referenz benutzt. Dazu wurden die Intensitäten gleicher Transkripte gemittelt und 100% gesetzt. Die anderen Transkriptstärken wurden in Relation dazu ermittelt. Durch die Zugabe von Rsd nahmen die Transkriptionsraten des rrnB P1 (links, oben) und des *tac*-Promotors (links, unten) um jeweils 50% ab, während die Transkriptionsrate des *bolA*1 Promotors (rechts, oben) um das vierfache zunahm. Die Transkriptionsrate der RNA1 blieb gleich (rechts unten), offenbar wird dieser Promotor unter den hier angewendeten Bedingungen von beiden Holoenzymen gleich gut genutzt.



Abbildung 2.13: Kompetition der Sigmafaktoren um die Bindung an das Coreenzym der RNA-Polymerase. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines 10%igen PAA-Gels. Die Proben enthielten entweder nur σ^{70} (Spuren 1+2), nur σ^{38} (Spuren 9+10) oder beide Sigmafaktoren (Spuren 3-8). Einige Reaktionen wurden mit Rsd supplementiert: 0,5 µM Rsd Spur 5; 1 µM Rsd Spur 6; 2 µM Rsd Spuren 1, 7 und 10 sowie 4 µM Rsd Spur 8. Die Transkripte der einzelnen Promotoren und der externe Standart (Avall) sind markiert, die Anwesenheit eines Sigmafaktors in der Probe ist mit + gekennzeichnet.



Abbildung 2.14: Quantitative Auswertung der Sigmakompetition. Gezeigt sind die Quantifizierungen der Transkriptintensitäten der Promotoren *rmB* P1 (links, oben), *tac* (links, unten), *bolA*1 (rechts, oben) und *RNA*1 (rechts, unten). Dabei wurden die Spuren 3 bis 8 der Abbildung 2.13 ausgewertet. Die Spuren 3+4, Sigmafaktoren ohne Rsd, wurden als Referenzen benutzt, dazu wurden die Bandenintensitäten gleicher Transkripte gemittelt und 100% gesetzt.

2.4 Regulation der *rsd*-Expression

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Regulation der *rsd*-Expression mittels *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht werden. Die zelluläre Konzentration von Rsd steigt zu Beginn der stationären Phase an. Dem liegt eine Expression des *rsd*-Gens invers zur Wachstumsrate zu Grunde. Dies wird in der Regel durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die abhängig von der Wachstumsphase Promotoren regulieren. Ziel war es einige dieser Regulatoren zu identifizieren.

Dazu musste zuerst die Promotorregion des *rsd*-Gens in geeignete Vektoren kloniert werden. Danach folgten Bindungsstudien mit Nucleoid-assozierten Proteinen (NAPs) und RNA-Polymerase Holoenzymen, *in vitro* Transkriptionen und Primer-Extension Analysen mit den Konstrukten der *rsd*-Promotorregion.

2.4.1 Klonierung

Auf Grund der Tatsache, dass es zu Beginn dieser Arbeit noch keine Daten zur Regulation der *rsd*-Expression gab, wurde der *rsd*-Promotor mit seiner regulatorischen Region für Transkriptionsanalysen kloniert. Dazu wurde die *rsd*-Promotorregion zusammen mit einem ca. 230 bp großem *upstream*-Bereich, mittels PCR von chromosomaler DNA aus MG1655, isoliert (5.2.8). Dieser *upstream*-Bereich wurde auf die Bindung von Nucleoid-assozierten Proteinen (NAPs) untersucht, denn diese Klasse von DNA-Bindeproteinen ist bekannt für die Anpassungsregulation an wechselnde Wachstums- und Umweltbedingungen. Weiterhin können diese Proteine durch die Wechselwirkung mit *upstream* gelegenen DNA-Sequenzen die Expression eines Promotors beeinflussen (Wagner & Pul, 2009; Dillon & Dorman, 2010; Dorman, 2009).

Das PCR-Fragment wurde mit den Primern #rsd-up-B/E und #rsd-up-S/H erstellt (4.4.1). Da die Primer Abweichungen zur nativen Sequenz aufwiesen, um Restriktionsschnittstellen einzuführen, ergab das PCR-Produkt keine diskrete Bande auf einem analytischen Agarosegel (5.2.9). Deshalb wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen BamHI und HincII (4.5.2) behandelt und als Template in eine zweistufige PCR eingesetzt (5.2.9). Das PCR-Produkt wurde dann erneut mit BamHI und HincII geschnitten und in den geöffneten pUC18-Vektor einkloniert. Aus dem Plasmid pUC18-*rsd*-up wurden dann die *rsd*-Promotor Fragmente isoliert, die für die Herstellung der Vektoren p*rsd*-up-T1T2 und p*rsd*-up-cat (4.2.2) benötigt wurden. In Abbildung 2.15 ist ein Schema der Klonierungen gezeigt. Die Sequenzen der isolierten Plasmide wurden verifiziert (*GENterprise*, Mainz), Karten der erstellten Plasmide befinden sich im Anhang (6.1).

Das Plasmid pUC18-*rsd*-up diente als Ausgangspunkt zur Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten *rsd*-Fragmente (4.3). Das Plasmid p*rsd*-up-T1T2 besitzt die *rsd*-Promotoren mit *upstream*-Region vor den Terminatoren des ribosomalen B-Operons. Diese Plasmid wurde für *in vitro* Transkriptionsanalysen verwendet. Es entsteht ein 180 Nukleotide langes Transkript des σ^{70} -abhängigen *rsd* P2 Promotors und ein 275 Nukleotide langes Transkript des σ^{38} -abhängigen *rsd* P1 Promotors. Bei dem *prsd*-upcat Plasmid liegen die *rsd*-Promotoren *upstream* des promotorlosen *Chloramphenicolacetyltransferase*-Gens (*cat*). Das *cat*-Gen kommt in den untersuchten Stämmen chromosomal kodiert nicht vor. Deshalb kann mit Hilfe dieses Reportergens die Aktivität der *rsd*-Promotoren *in vivo*, mittels Primer-Extension (5.4.6), analysiert werden. Dabei entstehen eine 160 Nukleotide lange cDNA für den *rsd* P1 und eine 255 Nukleotide lange cDNA für den *rsd* P2 Promotor.



Abbildung 2.15: Klonierung der einzelnen Vektoren. Dargestellt ist die Klonierung der Vektoren pUC18-rsd-up, prsd-up-T1T2 und prsd-up-cat. Ausgehend von einem PCR-Fragment von chromosomaler DNA aus MG1655 wurde mittels Restriktionshydrolysen das Plasmid pUC18-rsd-up erstellt. Dies war die Grundlage zur Konstruktion der Vektoren prsd-up-T1T2 und prsd-up-cat.

2.4.2 Die verwendeten rsd-Fragmente

Die Promotorregion des *rsd*-Gens besteht aus zwei Promotoren, dem σ^{38} -abhängigen *rsd* P1 und dem σ^{70} -abhängigen *rsd* P2, der als *gearbox* Promotor klassifiziert wurde (Jishage & Isjihama 1999). Die Klasse der gearbox Promotoren wird invers zur Wachstumsrate aktiviert und zeichnet sich durch eine verlängerte -10 Region aus (Aldea et al., 1990; Vincente et al., 1991). Weiterhin wird der P2 Promotor stärker transkribiert als der P1 Promotor und ist in allen Wachstumsphasen aktiv (Piper et al., 2009). Innerhalb der rsd-Promotorregion gibt es drei GATC-Sites und zwei weitere in der upstream Region. GATC-Sites sind Erkennungsstellen für die Deoxyadenosine Methyltransferase (Dam). Dieses Enzym methyliert das Adenosin in der doppelsträngigen 5'-GATC-3' Sequenz, und ist bei vielen wichtigen zellulären Prozessen involviert, wie der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur und der Transkription (Oshima et al., 2002). Eine Verteilung von fünf GATC-Sites in einem 471 bp großen DNA-Abschnitt ist eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl, da es bei einer zufälligen Verteilung nur alle 256 bp eine GATC-Site gibt. Deshalb sollte auch die Bedeutung der GATC-Sites für die Regulation des rsd-Gens untersucht werden. Dazu wurden methylierte und nicht methylierte DNA-Fragmente verwendet. Diese wurden aus Plasmid-DNA isoliert, die aus XL-1 (*dam*⁺) bzw. JM110 (*dam*⁻) gewonnen wurde. Insgesamt wurden vier verschiedene DNA-Fragmente für die Bindungsstudien benutzt, diese sind in der Abbildung 2.16 schematisch dargestellt. Das *rsd*-up-Fragment beinhaltet die rsd-Promotorregion zusammen mit der upstream-Region. Zur genaueren Analyse der Bindungsstudien wurde die rsd-Promotorregion durch eine Restrik-

tion mit BssHII (4.5.2) von der *upstream*-Region getrennt. Die resultierenden *rsd*- und up-Fragmente wurden einzeln auf die Bindung von NAPs untersucht. Das *rsd*-P1-Fragment wurde mittels PCR erstellt und ist deshalb generell nicht methyliert. Dieses

Fragment wurde verwendet um den *rsd* P1 Promotor getrennt vom P2 zu untersu-

chen, weiterhin überbrückt es die BssHII-Restriktionsschnittstelle.



Abbildung 2.16: Übersicht der verwendeten *rsd*-Fragmente. Das *rsd*-up-Fragment setzt sich aus der *rsd*-Promotorregion mit den Tandem-Promotoren P1, P2 und der *upstream*-Region zusammen. Zur Vereinfachung einiger Analysen wurden die *rsd*-Promotorregion und die *upstream*-Region durch eine Restriktion mit BssHII getrennt. Dabei entstanden das *rsd*-Fragment und das up-Fragment. Das *rsd*-P1-Fragment trug die *upstream*-Region und den *rsd* P1 Promotor. Dadurch konnte dieser getrennt vom P2 Promotor analysiert werden. Die Transkriptionsstartstellen der P1 und P2 Promotoren sind mit Pfeilen markiert, die weißen Boxen indizieren die Kernpromotoren. Die blauen Balken zeigen die Verteilung von fünf Dam-Methylierungsstellen innerhalb der Fragmente.

2.4.3 Bindung von Nucleoid-assoziierten Proteinen am rsd-Promotor

Zur Untersuchung der *rsd*-Regulation wurde zuerst der Einfluss von vier Nucleiodassozierten Proteinen untersucht. Dazu wurden Retardierungsanalysen (5.4.2) mit den vier NAPs: H-NS, StpA, LRP und FIS durchgeführt (4.5.4). Es wurden steigende NAP-Konzentrationen mit dem *rsd*-up-Fragment inkubiert (Abbildung 2.17). Es zeigte sich eine starke Bindung von H-NS an das *rsd*-up-Fragment. Bereits 2 μ M H-NS waren für eine leichte Verzögerung der *rsd*-up-Bande ausreichend, bei 3 μ M waren ca. 50% der DNA retardiert und ab 5 μ M H-NS war die DNA vollständig komplexiert. Auch für StpA konnte eine deutliche Bindung beobachtet werden, allerdings erst ab einer Konzentration von 4 μ M. Eine Erhöhung der Konzentration auf 6 μ M führte zu einer fast vollständigen Retardierung des *rsd*-up-Fragments. Für das *Leucine responsive protein* (LRP) konnte auch bei einer Konzentration von 1,5 μ M keine eindeutige Bindung beobachtet werden. Zwar zeigte sich ab einer Konzentration von 1 μ M eine schwache, lang gezogene Bande oberhalb der freien DNA, jedoch nahm die Intensität der Bande mit steigenden LRP-Konzentrationen kaum zu. Bei dem Protein FIS zeigte sich eine erste Komplexbande bei einer Konzentration von 0,5 μ M. Durch die Erhöhung der FIS-Konzentration kamen weitere Komplexbanden oberhalb der ersten Komplexbande hinzu, während die Bande der freien DNA abnahm.



Abbildung 2.17: NAP-Bindungen am *rsd*-up-Fragment. Gezeigt ist ein Autoradiogramm einer Retardierung mit NAPs. In einem Volumen von 15 µl wurden 4 nM *rsd*-up-Fragment in 1x Bindungspuffer mit steigenden Konzentrationen der NAPs: H-NS, StpA, LRP und FIS für 10 Min bei RT inkubiert. Danach wurden unspezifische Bindungen durch die Zugabe von Heparin (*f. c.* 50 ng/µl) unterbunden. Die Komplexe wurden mittels Verzögerungsgelelektrophorese getrennt. Die Spuren 1, 7, 13 und 20 enthielten freies *rsd*-up-Fragment. Es wurden 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM, bzw. 6 µM H-NS (Spuren 2-6); 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM und 6 µM StpA (Spuren 8-12); 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM, 1 µM, 1,25 µM und 1,5 µM LRP (Spuren 14-19) sowie 0,1 µM, 0,5 µM, 1,5 µM und 2,5 µM FIS (Spuren 21-24) eingesetzt.

Als Ergebnis der Bindestudie wurde eine Bindung der NAPs, H-NS, StpA und FIS, an das *rsd*-up-Fragment gefunden. Allerdings war nicht ersichtlich ob auch LRP an das *rsd*-up-Fragment bindet. Da anhand dieses Fragments nicht bestimmt werden kann, ob die NAPs in der Promotorregion oder in der *upstream*-Region binden wurden zusätzlich Retardierungen mit den *rsd*- und up-Fragmenten sowie mit dem *rsd*-P1-Fragment durchgeführt. In der Abbildung 2.18 sind die Bindungsstudien mit dem up-Fragment (A) und dem *rsd*-Fragment (B) gezeigt. Für das up-Fragment (A) konnte nur eine deutliche Bindung von FIS gezeigt werden. Weiterhin waren in den Proben mit LRP, drei gestaffelte Banden oberhalb der freien DNA erkennbar. Allerdings waren die Intensitäten dieser Banden sehr gering. Für das *rsd*-Fragment gezeigt in (B), konnten dagegen deutliche Bindungen der NAPs, H-NS, StpA und FIS beobach-

tet werden. Auch für LRP konnten drei gestaffelte Komplexbanden identifiziert werden, allerdings waren die Intensitäten dieser Banden sehr niedrig. Mit dem *rsd*-P1-Fragment wurden ebenfalls Bindungsstudien mit den NAPs durchgeführt (Daten nicht gezeigt), die beobachteten Bindungen entsprachen denen des up-Fragments. Es konnten nur eine starke FIS-Bindung und eine schwache LRP-Bindung beobachtet werden. Dadurch konnte eine Bindung von H-NS und StpA an den *rsd* P1 Promotor ausgeschlossen werden.

Zur genaueren Lokalisierung der Bindestellen der vier NAPs wurden DNasel-Footprints mit den *rsd*- und up-Fragmenten durchgeführt (Abbildung 2.19).



Abbildung 2.18: Bindung der NAPs an verschiedene *rsd*-Fragmente. Dargestellt sind zwei Ausschnitte aus einem Autoradiogramm. Der Ausschnitt in (A) zeigt die Bindung an das up-Fragment. In (B) ist die Bindung an das *rsd*-Fragment abgebildet. Die Proben in den Spuren 1-9 in (A) und (B) enthielten die gleichen Proteinkonzentrationen. Die Spur 1 enthielt die freie DNA, weiterhin wurden die folgenden Konzentrationen verwendet: 2 und 6 μ M H-NS (Spuren 2 & 3); 0,5 und 6 μ M StpA (Spuren 3 & 5); 0,5 und 1,5 μ M LRP (Spuren 6 & 7) sowie 0,5 und 2 μ M FIS (Spuren 8 & 9).



(B)



Abbildung 2.19: Lokalisation der NAP-Bindestellen am *rsd*-Promotor mittels DNasel-Footprint. (A) Gezeigt ist ein DNasel-Footprint des *rsd*-Fragments (links) und des up-Fragments (rechts). Die DNA-Fragmente wurden mit 8 μ M H-NS (Spuren 3+11), 8 μ M StpA (Spuren 4+12), 5 und 10 μ M LRP (Spuren 5-6 und 13-14) sowie mit 1, 2 und 4 μ M FIS (Spuren 7-9 und 15-17) inkubiert. Die Spuren 2 und 10 enthielten jeweils freie DNA, zusätzlich wurden eine A+G Sequenzierung des *rsd*-Fragments (Spur 1) und des up-Fragments (Spur 18) aufgetragen. Die Promotoren sind indiziert, die angegebenen Sequenzpositionen beziehen sich auf den +1 Transkriptionsstart des *rsd* P1 Promotors. Geschützte DNA-Bereiche sind durch vertikale Balken, hyperreaktive Stellen durch Pfeile markiert. Dabei wurde der folgende Farbcode verwendet: H-NS, grün; StpA, orange; LRP, rot und FIS, lila. (B) Gezeigt ist die Sequenz des *rsd*-Fragments, die Promotoren (schwarz) und die GATC-Sites (grau) sind markiert. Die Bindestellen der NAPs am codierenden Strang wurden, von der Abbildung in (A) abgeschätzt.

Bei der Betrachtung des DNaseI-Footprints ist auffällig, dass die Proteine H-NS und StpA unter anderem im Bereich des *rsd* P2 Promotors gebunden haben (A, links; und B), während die Proteine FIS und LRP im Bereich des *rsd* P1 Promotors an die DNA assoziiert waren. Die Bindestellen von H-NS und StpA erstreckten sich, ausgehend vom P2 Promotor in *upstream* Richtung zum P1, erreichten die Promotorregion jedoch nicht. Auch konnte ein teilweises Überlappen der Bindestellen von H-NS und StpA beobachtet werden. Zudem binden H-NS und StpA im Bereich der zwei GATC-Sites zwischen den Promotoren und könnten dadurch eine Methylierung dieser Stellen beeinflussen oder abhängig von der Methylierung binden. Weiterhin war StpA *downstream* des *rsd* P2 Promotors im Bereich des *rsd*-Gens an die DNA assoziiert. Auch für LRP wurden geschützte Regionen im *downstream* Bereich des P2 Promotors detektiert. Ferner bindete LRP zwischen den -10 und -35 Regionen des *rsd* P1 Promotors. Für das Nucleoid-assoziierte Protein FIS wurden Bindestellen vor allem im Bereich des +1 Transkriptionsstarts des P1 Promotors gefunden. Außerdem konnten zwei FIS-Bindestellen *downstream* des P2 Promotors, im *rsd*-Gen identifiziert werden.

In der Abbildung 2.19 (B) sind die in (A) gefundenen Bindestellen auf die Sequenz des verwendeten *rsd*-Fragments übertragen worden. Die geschützten DNA-Bereiche *downstream* des *rsd* P2 Promotors konnten nicht exakt bestimmt werden. Aufgrund der BssHII-Schnittstellen konnte beim *rsd*-Fragment nur der codierende Strang radioaktiv markiert werden, beim up-Fragment dementsprechend nur der nichtcodierende Strang. Dadurch konnten für das *rsd*-Fragment nur solche NAP-Bindungen erfasst werden, die in einen deutlichen Footprint am codierenden Strang resultierten. Infolgedessen besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Bindestellen identifiziert wurden.

Da auch für das up-Fragment nur ein Strang analysiert wurde (Abbildung 2.19 (A), links), konnten mittels des DNaseI-Footprints nur geschützte Bereiche am nichtcodierenden Strang sichtbar gemacht werden. Dennoch wurden im Bereich zwischen -200 und -230, relativ zum +1 Transkriptionsstart des P2, FIS-Bindestellen gefunden. Dagegen gab es bei der Position -250 nur einen schwachen Hinweis auf eine Bindung von LRP an das up-Fragment. Weder für H-NS noch für StpA konnte eine Bindung an den nicht-codierenden Strang des up-Fragments detektiert werden.

2.4.4 Bedeutung der Methylgruppen für die Promotoraktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die vier untersuchten Proteine in der Promotorregion des *rsd*-Gens binden, wurde als nächstes der Zusammenhang zwischen Proteinbindung und DNA-Methylierung untersucht. In der *rsd*-Promotorregion gibt es drei GATC-Sites und in der *upstream* Region zwei weitere. Die GATC-Sites sind Erkennungsstellen für das Enzym DNA Adenine Methyltransferase (Dam). Das Enzym katalysiert die Methylierung der Aminogruppe des Kohlenstoffs C₆ der Base Adenosin (N⁶-methyl-Adenin). Diese postreplikative Modifikation der DNA kann Auswirkungen haben auf die thermodynamische Stabilität der DNA, die DNA-Konformation, die Gen-Expression sowie die Bindung von Transkriptionsfaktoren und Polymerasen (Løbner-Olesen *et. al.,* 2005; Oshima *et. al.,* 2002). Weiterhin gibt es Proteine, die abhängig vom Status der Methylierung an die GATC-Sites binden und dadurch zusätzlich Einfluss auf die Replikation nehmen, wie z.B. SeqA (Waldminghaus & Skastad, 2009).

Zur Überprüfung, ob die Methylierung der DNA Einfluss auf die Bindung der Nucleoid-assoziierten Proteine hat, wurden Retardierungsanalysen mit methylierten und nicht-methylierten DNA-Fragmenten durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pUC18-rsd-up aus den Stämmen XL-1 und JM110 isoliert. Die beiden Stämme sind isogen, bis auf die DNA Adenin Methyltransferase, die dem Stamm JM110 fehlt. Die verwendeten Fragmente wurden mittels Restriktionshydrolyse aus den Plasmiden isoliert, die zuvor aus den unterschiedlichen Stämmen gewonnen worden waren. Durch eine Restriktion mit dem Dam-sensitiven Enzym MboI (4.5.2) konnte der jeweilige Status der Methylierung der DNA-Fragmente überprüft werden.



Abbildung 2.20: Überprüfung der Methylierung der *rsd***-Fragmente.** Gezeigt ist ein silbergefärbtes PAA-Gel. Mittels einer Mbol-Restriktion wurde die Methylierung der *rsd*-up-Fragmente überprüft. Je 250 ng *rsd*-up-Fragment, nicht-methyliert (GATC) bzw. methyliert (GA*TC), wurden mit (+) bzw. ohne (-) 5 U Mbol für 3,5 h bei 37°C inkubiert, durch eine anschließende Inkubation bei 65°C für 20 Min wurde das Enzym inaktiviert. Je 8 µl wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen. Die Größen der Fragmente wurden mittels einer kb-Leiter bestimmt.

Die Abbildung 2.20 zeigt das Ergebnis einer Inkubation eines methylierten (GA*TC) und eines nicht-methylierten (GATC) *rsd*-up-Fragment mit MboI. Das Restriktionsenzym schneidet innerhalb der GATC-Site, allerdings nur wenn die DNA nichtmethyliert ist. Beide DNA-Fragmente wurden mit (+) oder ohne (–) MboI im entsprechenden Puffer inkubiert und mittels eines silbergefärbten PAA-Gels analysiert. Das nicht-methylierte *rsd*-up-Fragment (471 bp) war nach der Inkubation mit MboI nicht mehr detektierbar, dafür waren mehrere kleinere DNA-Fragmente entstanden (Spur 2). Die Größen der entstandenen Fragmente wurden mittels einer kb-Leiter zugeordnet (nicht gezeigt) und entsprachen den erwarteten Längen (167 nt, 108 nt, 84 nt, 61 nt). Da MboI an jeder der GATC-Sites einmal schneiden kann, sollten bei einer vollständigen Restriktion sechs verschiedene Fragmente entstehen. Die kleinen Fragmente (30 nt und 21 nt) waren wahrscheinlich bereits aus dem Gel gelaufen und konnten deshalb nicht mehr detektiert werden. Das methylierte *rsd*-up-Fragment (Spur 4) zeigte keinerlei Abbau durch MboI, dies lässt auf eine vollständige Methylierung der DNA schließen.

Die DNA-Bindung der NAPs ist oft abhängig von der Konformation der DNA. Dabei spielt die statische Krümmung oder Flexibilität der DNA eine wichtige Rolle (Pul et al., 2008; Olivares-Zavaleta et al., 2006). Die Methylierung kann Einfluss auf die DNA-Krümmung und die thermodynamische Stabilität von DNA-Fragmenten haben (Marinus & Casadesus, 2009). Dies wurde für das *rsd*-up-Fragment, mittels einer TGGE (5.4.1.3) überprüft. Bei dem gewählten Temperaturbereich von 10°C bis 40°C können intrinsische Krümmungen eines DNA-Fragments aufgehoben werden, dies wird in einem veränderten Laufverhalten des Fragments sichtbar. Ein gekrümmtes DNA-Fragment läuft in einem nativen Gel langsamer als ein gerades DNA-Fragment der gleichen Größe. Durch die Temperaturerhöhung wird die Krümmung aufgehoben und die Migrationsgeschwindigkeit des DNA-Fragments erhöht. In Abbildung 2.21 (A) ist das Ergebnis einer TGGE gezeigt, es wurden das methylierte und das nicht-methylierte rsd-Fragment (288 bp) im Verhältnis 1:1 zusammen mit einer Referenz aufgetragen. Als Referenz wurde der Vektor pUC18 geschnitten mit MspI verwendet (4.2.2; 4.5.2). MspI hat mehrere Schnittstellen im pUC18, dadurch entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente, die alle ungekrümmt sind. Bedingt durch den Temperaturanstieg weiten sich die Poren des Gels und die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente nimmt mit steigender Temperatur zu. Die *rsd*-Fragmente laufen entsprechend ihrer Größe (288 bp) zwischen den 404 bp und 190 bp Standard und zeigen das gleiche Laufverhalten, wie die Referenzbanden. Zum Vergleich ist in Abbildung 2.21 (B) das Ergebnis einer TGGE des gekrümmten *rrnB* P1-Fragments gezeigt. Bei der niedrigen Temperatur läuft das 256 bp große Fragment auf der Höhe des 404 bp Standards. Mit steigender Temperatur wird die Krümmung aufgehoben. Das P1-Fragment schneidet die 353 bp Referenzbande. Bei 30°C läuft das *rrnB* P1 Fragment schließlich seiner Größe entsprechend, zwischen den 353 bp und den 242 bp Fragmenten.

Für die *rsd*-Fragmente wurden keine Hinweise auf eine intrinsische Krümmung gefunden. Weiterhin konnte kein Unterschied zwischen den DNA-Konformationen des methylierten und des nicht-methylierten Fragments nachgewiesen werden.



Abbildung 2.21: TGGE von *rsd***-Fragmenten.** Gezeigt sind silbergefärbte PAA-Gele. **(A)** Überprüfung der DNA-Konformationen des methylierten und des nicht-methylierten *rsd*-Fragments (288 bp). Eingesetzt wurden je 100 ng pro Fragment. Der lineare Temperaturgradient reichte von 10°C bis 40°C. **(B)** Zum Vergleich TGGE mit dem gekrümmten *rrnB* P1 Fragment. Als Referenz wurden 2 μg pUC18 geschnitten mit Mspl als DNA-Leiter verwendet, die nur aus geraden DNA-Fragmenten bestand. Einige Fragmentgrößen sind angegeben. Die Bande der *rsd*-Fragmente (rsd) und des *rrnB* P1 (P1) sind markiert.

2.4.5 Einfluss der Methylierung auf die NAP-Bindung

Da eine Beeinflussung der DNA-Krümmung durch die Methylgruppen mit den oben angewendeten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Bedeutung der Methylierung für die Bindung von NAPs und Polymerasen an die *rsd*-Promotorregion untersucht. Für die Bindung der vier NAPs, H-NS, StpA, LRP und FIS konnte kein unterschiedliches Bindeverhalten an den beiden *rsd*-Fragmenten beobachtet werden (Abbildung 2.22). Zwar waren die Intensitäten der Komplexbanden für die nicht-methylierte DNA etwas schwächer im Vergleich zu den Komplexbanden der methylierten DNA, allerdings waren auch die Bandenintensitäten der freien DNA schwächer. Die leichten Abweichungen in den Bandenintensitäten beruhen auf der radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente. Weder die Anzahl noch die Ausprägung der Komplexbanden unterschied sich zwischen den beiden verwendeten Fragmenten.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Leucin auf die Bindung von LRP an den *rsd*-Promotor untersucht. Dabei konnte, unabhängig vom Fragment, eine Inhibierung der LRP-Bindung durch Leucin gefunden werden.



Abbildung 2.22: NAP-Bindung an methylierter und nicht-methylierter DNA. Gezeigt ist ein Autoradiogramm eines Retardierungsgels. Es wurde untersucht, ob die Methylierung Einfluss auf die Bindung der NAPs hat. Zusätzlich wurde der Einfluss von 300 mM Leucin auf die LRP-Bindung untersucht. Die Spuren 1+15 enthielten freie DNA, es wurden 2, 4 und 6 μ M H-NS (Spuren 2-4 & 16-18); 0,5, 2 und 6 μ M StpA (Spuren 5-7 & 19-21); 0,25, 1 und 2 μ M LRP ohne Leucin (Spuren 8-10 & 22-24) bzw. 2 μ M LRP mit Leucin (Spuren 11+25) sowie 0,1, 0,5 und 2 μ M FIS (Spuren 12-14 & 26-28) eingesetzt. Die Proben mit methylierter DNA wurden links aufgetragen (Spuren 1-14), die Proben mit nicht-methylierter DNA rechts (Spuren 15-28).

2.4.6 Einfluss der Methylierung auf die Polymerasebindung

Es wurde gezeigt, dass die N⁶-Methylierung der Adenosin-Gruppe die Expression von Genen reguliert, die u. a. beteiligt sind an der Stress Antwort, der SOS Response, dem Aminosäure- sowie dem Nukleotid-Stoffwechsel, aerober und anaerober At-
mung, der Flagellen Synthese und Chemotaxis (Oshima *et al.*, 2002). Rsd ist als Antisigmafaktor ein Bestandteil der Stress Antwort, deshalb wurde der Einfluss der Methylierung auf die Interaktion von Polymerasen mit den *rsd*-Promotoren mittels Bindungsstudien untersucht (Abbildung 2.23). Da das *rsd*-Fragment den σ^{70} -abhängigen P2 und den σ^{38} -abhängigen P1 Promotor besitzt, wurden sowohl das RNA-Polymerase Holoenzym (RNAP) als auch das Coreenzym (Core) und rekonstituierte

Polymerasen ($\mathrm{E}\sigma^{70}$, $\mathrm{E}\sigma^{38}$, $\mathrm{E}\sigma^{70/38}$) verwendet. Zusätzlich wurde eine mögliche Autoregulation von Rsd auf die Promotorbindung der Polymerasen analysiert. Bei der Betrachtung des Autoradiogramms wurde deutlich, dass alle getesteten Po-

lymerasen besser an das methylierte *rsd*-Fragment gebunden haben als an das nichtmethylierte *rsd*-Fragment. Dies spiegelte sich auch in den unterschiedlichen Bandenintensitäten der freien DNA wieder.

Die σ^{70} -haltigen Polymerasen (RNAP und E σ^{70}) bildeten mit dem *rsd*-Fragment deutliche Komplexe. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um eine Bindung an den σ^{70} abhängigen P2 Promotor (RNAP~P2). Bei den Proben mit methylierter DNA waren die Komplexintensitäten wesentlich stärker, weiterhin hatte sich bei diesen Proben ein weiterer Komplex gebildet, der sich oberhalb der RNAP~P2 Bande befand. Vermutlich handelte es sich dabei um eine Polymerasebindung an beide Promotoren (RNAP~P1/P2). Das Eo³⁸ Holoenzym bildete wesentlich schwächere Komplexe mit dem *rsd*-Fragment, die unterhalb der RNAP~P2 Komplexe migrierten. Dabei wurde eine Bindung an den σ^{38} -spezifischen P1 Promotor vermutet (RNAP~P1). Weiterhin hatten sich schwache Komplexe auf der Höhe der RNAP-P2 Bande gebildet. Dies könnte ein Anhaltspunkt für eine Bindung von $E\sigma^{38}$ an den P2 Promotor sein. Da jedoch auch das Coreenzym ohne die Addition von Sigmafaktoren stabile Komplexe mit dem P2 Promotor gebildet hatte, könnte es sich bei diesen Banden auch um Produkte des Coreenzyms mit dem P2 Promotor handeln. Für die Versuche mit den rsd-Promotoren wurde eine neue Charge des Coreenzyms verwendet. Diese war deutlich aktiver als das alte Enzym, allerdings war es nicht vollständig frei von σ^{70} . Dadurch enthält das gebildete $\mathrm{E}\sigma^{38}$ Holoenzym auch immer einen kleinen Anteil an $\mathrm{E}\sigma^{70}$ Holoenzym (ca. 10%). Befand sich Rsd in den Proben, so bildeten sich, unabhängig von der verwendeten Polymerase, schwächere RNAP~P2 Komplexe und die RNAP~P1/P2 Komplexbande war nicht detektierbar. Die Intensitäten der RNAP~P1 Komplexbanden nahmen dagegen nicht ab, sondern eher zu. In einem zusätzlichen Versuch wurde die Kompetition der Sigmafaktoren um die Bindung an das Coreenzym untersucht. Dazu wurden die Sigmafaktoren im 1:1 Verhältnis zum Coreenzym gegeben. Es bildete sich ein starker RNAP~P2 Komplex und ein deutlich schwächerer RNAP~P1/P2 Komplex. Die RNAP~P1 Komplexbande war nur zu erahnen. Dies spricht für einen großen Anteil an $E\sigma^{70}$ Holoenzym und einem kleinen Anteil an $E\sigma^{38}$ Holoenzym. Befand sich zusätzlich Rsd mit in der Probe, so zeigte sich eine andere Verteilung der Bandenintensitäten. Die Intensität der RNAP~P2 Komplexbande war wesentlich schwächer und die RNAP~P1/P2 Komplexbande gar nicht sichtbar, dafür war die RNAP~P1 Komplexbande deutlich intensiver. Dieses Bandenmuster entspricht in etwa der Komplexbildung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms.



Abbildung 2.23: Einfluss der Methylierung auf die Polymerasebindung an die *rsd*-Promotoren P1 und P2. Gezeigt ist ein Autoradiogramm einer Retardierungsanalyse. Es wurden 100 nM Coreenzym ohne Sigmafaktoren (Spuren 3+4, 15+16) bzw. mit 300 nM σ^{70} (Spuren 7+8; 19+20), 300 nM σ^{38} (Spuren 9+10, 21+22) oder beider Sigmafaktoren (Spuren 11+12; 23+24) eingesetzt. Zusätzlich wurden 100 nM RNAP Holoenzym (Spuren 5+6; 17+18) verwendet. Weiterhin wurde die Wirkung von Rsd auf die Bindung der Polymerasen untersucht. Dazu wurden einige Proben mit 2 μ M Rsd versetzt (Spuren mit geraden Nummern). Links wurden die Proben mit dem nicht-methylierten *rsd*-Fragment, rechts die Proben mit dem methylierten *rsd*-Fragment aufgetragen. Die freie DNA und die Komplexbanden (RNAP~P1/P2) sind markiert, das RNAP bezieht sich dabei auf alle Polymerasen und nicht nur auf das RNA-Polymerase Holoenzym.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die untersuchten RNA-Polymerasen besser an das methylierte *rsd*-Fragment binden als an das nicht-methylierte. Die Ver-

teilung der gebildeten Komplexe wurde jedoch nicht beeinflusst, so dass der Effekt für beide Promotoren gleich war. Zwar konnte eine Abhängigkeit der Polymerasebindung von der N⁶-Methylierung gefunden werden, es bedurfte jedoch weiterer Untersuchungen um zu klären, ob dies auch einen Einfluss auf die Expression des *rsd*-Gens hat.

2.4.7 Quantitative Analysen der rsd-Transkription

Zur quantitativen Analyse der *rsd*-Transkription, über die Messung des intrazellulären *rsd*-mRNA Spiegels, wurden Primer-Extension Reaktionen durchgeführt. Da das chromosomal kodierte *rsd*-Gen *in vivo* nur schwach exprimiert wird, wurde ein *rsd*cat-Konstrukt verwendet. Der Vektor rsd-up-cat trägt die rsd-Promotoren P1 und P2 mit der upstream Region vor dem promotorlosen Gen der Chloramphenicolacetyltransferase. Sind die *rsd*-Promotoren aktiv, so entsteht die *cat*-mRNA. Da das *cat*-Gen in keinem der verwendeten Stämme chromosomal kodiert ist, entstammen alle cat-mRNAs dem rsd-cat-Konstrukt. Die cat-RNAs werden mittels eines DNA-Primers (#catIV) (4.4.1), der komplementär an das 3'-Ende der *cat*-mRNA hybridisiert, detektiert. Bei der anschließenden Primer-Extension (5.4.6) wird der Primer durch die virale AMV Reverse Transkriptase (4.5.1)in 5'-Richtung der mRNA verlängert. Für den *rsd* P2 Promotor entsteht dabei eine 160 nt lange complementary-DNA (cDNA) und für den *rsd* P1 Promotor einen 255 nt lange cDNA. Da das *cat*-Konstrukt plasmidär kodiert ist, muss bei einem Vergleich der Produktstärken die Plasmidkopienzahl mitberücksichtigt werden. Deshalb wurde das ebenfalls auf dem Plasmid kodierte RNA1-Gen als interner Standard verwendet. Die RNA1 ist an der Plasmid-Replikation beteiligt und der Promotor wurde als weitgehend unreguliert beschrieben (Paul et al., 2004). Für die in vivo Analysen wurden die in Tabelle 2.2 aufgelisteten E. coli Stämme mit dem Plasmid prsd-up-cat transformiert. Anschließend wurden die Stämme in YT-Medium angezogen und sowohl in der logarithmischen Phase, als auch in der stationären Phase, für die Gesamt-RNA Isolation (5.2.7) Zellen abgenommen. Für die Untersuchungen der *rsd*-Expression wurden 5 μ g Gesamt-RNA mit jeweils 0,5 pmol der radioaktiv markierten Primer #catIV und #RNA1 hybridisiert. Die bei der anschließenden Primer-Extension entstandenen Produkte wurden über ein 15% iges PAA-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

Für die quantitative Auswertung wurden die Produkte mittels Phosphoimager Screens (Fuji) detektiert und mit der Software Imagegauge (Fuji) ausgewertet.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der verwendeten Bakterienstämme. Wildtyp und Mutanten sind isogen, bis auf das untersuchte Gen. Mittels Primer-Extension Analysen wurde überprüft, ob die *rsd*-Expression von den unten aufgelisteten Genen beeinflusst wird.

Wildtyp	Mutante	Gen	Genprodukt
CP78	CP79	relA	RelA
CSH50	CSH50 fis::kan	fis	FIS
GM37	CJD1124	stpA	StpA
MC4100	DL845	Irp	LRP
MC4100	PD32	hns	H-NS
MC4100	RH90	rpoS	Sigma38
MG1655	CF9239	dksA	DksA
MG1655	MG1655 rsd::kan	rsd	Rsd
MG1655	MW∆ssrS	ssrS	6S RNA
XL-1	JM110	dam	DNA Adenine Me-
			thyltransferase

2.4.8 Primer-Extension der rsd-mRNAs

In der Abbildung 2.24 (A) sind exemplarisch die Primer-Extension Produkte der *rsd*-Promotoren und der *RNA1* gezeigt. Die cDNA des *rsd* P2 Promotors war bereits in der logarithmischen Phase deutlich zu erkennen. In der stationären Phase nahmen die Produktstärken des P2 Promotors und der *RNA1* deutlich zu, auch das cDNA-Produkt des *rsd* P1 Promotors war nun detektierbar. Allerdings entsprach die Produktstärke des P1 nur einem Bruchteil der Stärke des *rsd* P2 Promotors.

In (B) ist exemplarisch eine Wachstumskurve gezeigt. Zur Verdeutlichung sind die Zeitpunkte der Zellernte in der logarithmischen Phase (log) und der stationären Phase (stat) markiert. Die Ernte in der logarithmischen Phase erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8. Anhand des Kurvenverlaufs wurde der Zeitpunkt für die Zellabnahme in der stationären Phase bestimmt.



Abbildung 2.24: *In vivo* Analyse der *rsd*-Expression. (A) Gezeigt ist ein Autoradiogramm einer Primer-Extension Reaktion. Die Stämme GM37 (+) und CJD1124 (-) sind bis auf das Gen *stpA* isogen. Beide Stämme enthalten das Plasmid prsd-up-cat, welches die *rsd*-Promotorregion vor dem *cat*-Gen trägt. Gesamt-RNA wurde aus Zellen der logarithmischen (log) und der stationären (stat) Phase isoliert. Die cDNAs für die *rsd* P1 und P2 Promotoren sowie für die *RNA*1 und den *RNA*1 precursor (preRNA1) sind markiert. (B) Wachstumskurve des Stammes RH90, die Zeitpunkte der Zellernte in der logarithmischen und der stationären Phase sind markiert. (C) Primer-Extension Sequenzierung. Verwendet wurde Gesamt-RNA aus der stationären Phase des Stammes CF9239 (*dksA*⁻). Die Ansätze enthielten 50 µM der folgenden Abbruchnukleotide: ddTTP (Spur 1), ddGTP (Spur 2), ddCTP (Spur3), ddATP (Spur 4) bzw. kein Abbruchnukleotid (Spur 5). In der Spur 6 wurde radioaktiv markierte kb-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Der Bereich des P2 Promotors wurde vergrößert dargestellt und einige Banden wurden der Sequenz der *rsd*-RNA zugeordnet. Zusätzlich ist ein Sequenzausschnitt, von der Position +5 bis +21, der *rsd*-RNA dargestellt. Die cDNA-Produkte der *rsd* P1 und P2 Promotoren und die Markerbanden der kb-Leiter sind markiert.

Mit einer Primer-Extension Sequenzierung der cDNA-Produkte wurde überprüft, ob die in (A) markierten Abbruchbanden auch wirklich den *rsd* P1 und P2 Promotoren entsprechen (C). Die Primer-Extension Reaktion wurde in der Anwesenheit von Abbruchnukleotiden (Spuren 1-4) bzw. ohne Abbruchnukleotide (Spur 5) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine radioaktiv markierte kb-Leiter als Größenstandard aufgetragen.

Bei einem Vergleich der Spuren war erkennbar, dass die entstandenen cDNA-Produkte der P1 und P2 Promotoren den erwarteten Längen von 255 nt für den *rsd* P1 bzw. 160 nt für den *rsd* P2 Promotor entsprachen. Durch den Einsatz von Abbruchnukleotiden war es möglich, bis zur starken Abbruchbande des *rsd* P2 Promotors, die Sequenz der Primer-Extension Produkte zu überprüfen. Der Bereich unterhalb des *rsd* P2 Promotors ist vergrößert dargestellt, weiterhin sind einige Abbruchbanden den entsprechenden Positionen in der *rsd*-Sequenz zugeordnet. Links ist ein Ausschnitt aus der mRNA des *rsd-cat*-Konstruktes angegeben, der Ausschnitt entspricht der Position +5 bis +21, relativ zum P2 Transkriptionsstart. Die Angaben zu den Nukleotiden oberhalb der Spuren 1 bis 4 beziehen sich auf die RNA.

Für die meisten untersuchten Stämme konnten die Produkte des P1 Promotors nur in der stationären Phase detektiert werden. Deshalb wurden für den *rsd* P1 Promotor nur die Produktstärken zwischen Wildtyp und Mutante verglichen. Für den P2 Promotor wurde dagegen auch die Expression über die Wachstumsphase analysiert. Um die Plasmidkopienzahl mit einzubeziehen wurden die beiden Promotoren in Relation zur *RNA*1 gesetzt. Dazu wurden die *rsd*-Banden durch die Summe der RNA1I und RNA1II Banden geteilt.

2.4.9 Einfluss der Wachstumsrate auf die *rsd*-Expression

Die Rsd-Konzentration steigt beim Übergang in die stationäre Phase stark an. Dies beruht wahrscheinlich auf einer geänderten Promotoraktivität. Um die Abhängigkeit der *rsd*-Expression von der Wachstumsrate zu untersuchen, wurde der *rsd*-mRNA Spiegel bei verschiedenen Wachstumsraten bestimmt. Dazu wurden der Stamm MG1655/prsd-up-cat in YT-Medium und M9-Minimalmedien angezogen. Die M9-Minimalmedien waren entweder mit Casaminoacids und Natriumacetat (cas) oder mit Glycerin (gly) versetzt (4.6). Das Wachstum der Zellen wurde verfolgt und die optische Dichte der Kulturen gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 2.25 (A)). Die Zellen im YT-Medium zeigten eine normale Wachstumskurve, mit erkennbarer logarithmischer und stationärer Wachstumsphase. Die Zellen in den Minimalmedien wuchsen dagegen deutlich schlechter. Die Wachstumsraten (μ = Verdopplung pro Stunde) wurden bestimmt (5.1.8) und in (B) zusammengefasst. Dabei konnte aus drei unabhängigen Experimenten Wachstumsraten von 2,68 für das YT-Medium, 0,35 für das M9-Medium + cas bzw. 0,95 für das M9-Medium + gly, ermittelt werden.

Zusätzlich wurde mittels Primer-Extension der Einfluss der Wachstumsrate auf die Expression der *rsd*-Promotoren untersucht (C). Die Produktbanden der *rsd*-Promotoren und der *RNA*1 waren deutlich intensiver, wenn die Zellen in Minimalmedium angezogen wurden. In (D) sind die quantitativen Auswertungen der Primer-Extension gezeigt. Die Intensitäten der *rsd* P1 und P2 Produktbanden, angezogen im Normalmedium, wurden jeweils 1 gesetzt. Die Produktstärken der *rsd* P1 und P2 Promotoren, gewachsen in Minimalmedien, wurden relativ dazu bestimmt. Dargestellt sind die Abweichungen der Intensitäten von der Referenzprobe.

Eine Wachstumsraten abhängige Regulation des *rsd* P2 Promotors konnte nicht beobachtet werden. Dafür zeigte der *rsd* P1 Promotor deutliche Abweichungen zur Referenz. Befanden sich Casaminoacids im Minimalmedium, so hatte sich die Promotoraktivität des *rsd* P1 Promotors fast verdoppelt. War das Minimalmedium mit Glycerin supplementiert, war die Aktivität des *rsd* P1 mehr als dreimal so hoch. Allerdings korrelierten die Aktivitäten des *rsd* P1 Promotors nicht mit den bestimmten Wachstumsraten. Es ist durchaus denkbar, dass neben der Wachstumsraten-abhängigen Aktivierung des *rsd* P1 auch noch sekundäre Effekte zu einer Promotoraktivität beitragen, z. B. durch eine Glycerin-induzierte Änderung der Fettstoffbiosynthese. Diese steht in Verbindung mit dem SpoT-Protein, welches das basale ppGpp-Level der Zelle steuert. Bei Wachstumsraten Bestimmungen wurde eine Abhängigkeit des basalen ppGpp-Levels vom verwendeten Medium gefunden (Wagner, 2000).



Abbildung 2.25: Einfluss der Wachstumsrate auf die *rsd*-Expression. Der Stamm MG1655 wurde in verschiedenen Medien (YT, M9+cas, und M9+gly) angezogen. Das Wachstum der Zellen wurde durch Streumessungen verfolgt und die OD₆₀₀-Werte gegen die Zeit aufgetragen (**A**). Die Wachstumsraten von drei unabhängigen Experimenten wurden bestimmt und sind in (**B**) zusammengefasst. Von den Kulturen wurden (YT, t=120; M9+cas & M9+gly, t=180) Zellen für die Gesamt-RNA-Isolation abgenommen. Mittels Primer-Extension wurden die Expressionen des *rsd*-Gens und der *RNA*1 untersucht (**C**). Die Spuren enthielten die folgenden Gesamt-RNA Proben: Spur 1 (YT), Spur 2 (M9+cas) und Spur 3 (M9+gly). Die cDNAs der Promotoren *rsd* P1 und P2 so wie die cDNAs der *RNA*1 sind markiert. Für die quantitative Auswertung (**D**) wurden die beiden RNA1-Banden addiert und die *rsd*-Produktbanden dazu in Bezug gesetzt. Die Intensitäten der rsd-Produkte (YT) wurden 1 gesetzt und die anderen Intensitäten in Relation dazu ermittelt. Gezeigt sind die Abweichungen der Proben M9+cas und M9+gly von der YT-Probe, dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

2.4.10 rsd-Expression in verschiedenen Stämmen

In der folgenden Abbildung (Abbildung 2.26) sind die Ergebnisse quantitativer Auswertungen für den rsd P2 und den rsd P1 Promotor zusammengefasst. Da laut Literaturangaben die Rsd-Konzentration in der stationären Phase zunimmt (Piper et al., 2009; Jishage & Ishihama, 1998) wurde erwartet, dass auch die rsd-Promotoren in der stationären Phase verstärkt exprimiert werden. Deshalb wurden die Expressionsraten der *rsd* P1 und P2 Promotoren des jeweiligen Wildtyps in der stationären Phase 1 gesetzt und die anderen Expressionsraten in Relation dazu bestimmt. Da der rsd P2 Promotor auch in der logarithmischen Phase exprimiert wurde, konnten für den P2 Promotor auch phasenabhängige Unterschiede der Expression bestimmt werden. Dabei war auffällig, dass für die meisten untersuchten Stämme die Aktivität des rsd P2 Promotors im Wildtyp in der logarithmischen Phase höher war als in der stationären Phase. Davon ausgenommen waren der *stpA*⁺-Stamm GM37 und der *FIS*⁺-Stamm CSH50. Bei GM37 war die Aktivität des rsd P2 Promotors in der stationären Phase doppelt so hoch wie in der exponentiellen Phase (b). Beim CSH50-Stamm waren die Aktivitäten des rsd P2 Promotors in der logarithmischen und stationären Phase gleich (d). Die verwendeten E. coli Stämme haben verschiedene genetische Hintergründe, dies kann sich auch auf die Expression der *rsd*-Promotoren auswirken. Deshalb wurden stets Stämme miteinander verglichen, die bis auf das Regulatorgen isogen sind (Tabelle 2.2). Dadurch haben Wildtyp und Mutante den gleichen genetischen Hintergrund und Unterschiede in der rsd-Expression zwischen diesen Stämmen beruhen nur auf dem deletierten bzw. nicht deletierten Regulator. Es kann jedoch nicht festgestellt werde, ob es sich um direkte oder indirekte Effekte des Genprodukts auf die *rsd*-Expression handelt. Dazu wären weitere *in vitro* Experimente notwendig.





Abbildung 2.26: Primer-Extension Analyse der *rsd*-Expression von verschiedenen Stämmen. Gezeigt ist eine Zusammenfassung der quantitativen Auswertungen. Die entstandenen cDNA-Produkte der Promotoren *rsd* P1 und *rsd* P2 sowie der *RNA*1 wurden quantitativ ausgewertet. In (a) bis (j) sind die Auswertungen für den *rsd* P2 Promotor gezeigt. Da der P2 Promotor auch in der logarithmischen Phase aktiv war, konnten die Expressionsraten über Wachstumsphasen verfolgt werden. Die wildtypische Expressionsrate des P2 Promotors in der stationären Phase wurde 1 gesetzt und die anderen Expressionsraten in Relation dazu bestimmt. Es wurden jeweils Wildtyp und Mutanten der folgenden Gene miteinander verglichen: *hns* (a), *stpA* (b), *lrp* (c), *fis* (d), *dam* (e), *rpoS* (f), *rsd* (g), *ssrS* (h), *relA* (i) und *dksA* (j). Für den Promotor *rsd* P1 sind nur die Intensitäten in der stationären Phase bestimmt worden, da in der logarithmischen Phase oft keine *rsd* P1 cDNA detektiert werden konnte. In (k) sind die untersuchten DNA-assoziierten Effektoren zusammengefasst, und in (l) die Transkriptionsfaktoren, welche mit der RNA-Polymerase interagieren. Dargestellt sind die Abweichungen der Mutanten vom jeweiligen Wildtyp, dessen Intensitäten 1 gesetzt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

Da bei Retardierungsstudien eine Bindung der Nucleoid-assoziierten Proteine H-NS, StpA, LRP und FIS an die *rsd*-Promotoren zu beobachten war, wurde untersucht, ob diese Proteine *in vivo* an der Regulation der *rsd*-Expression beteiligt sind. Während in der logarithmischen Phase kein Einfluss von H-NS auf die Expression des *rsd* P2 Promotors gefunden wurde, zeigte sich für die *hns*-Deletionsmutante eine vierfache Aktivierung des *rsd* P2 Promotors in der stationären Phase. Dadurch war die Aktivität in der stationären Phase vergleichbar mit der Aktivität in der logarithmischen Phase vergleichbar mit der Aktivität in der logarithmischen Phase (a). Dagegen konnte weder für StpA (b) noch für LRP (c) ein Einfluss auf die Aktivität des *rsd* P2 Promotors beobachtet werden. Für beide Regulationsfaktoren waren die Promotoraktivitäten des P2 Promotors in den Deletionsstämmen sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase ähnlich den Aktivitäten des jeweiligen Wildtyps. Die Aktivität des *rsd* P2 Promotors war im *fis*-Stamm CSH50 *fis::kan* in beiden Phase höher als im Wildtyp CSH50 (d). Allerdings war dieser Effekt in der stationären Phase deutlicher, hier zeigte sich eine dreifache Erhöhung der

Aktivität des *rsd* P2 Promotors. Dadurch war die Expressionsrate des P2 Promotors in der stationären Phase höher als in der logarithmischen Phase. Ein Einfluss von FIS auf die Aktivität des P2 scheint vor allem in der stationären Phase von Bedeutung zu sein. Da in der stationären Phase nur noch wenige FIS-Moleküle in der Zelle vorhanden sind, ist dies ungewöhnlich. Eine FIS-abhängige Regulation in der stationären Phase wurde jedoch auch für den Zucker- und Nukleotid-Stoffwechsel beschrieben (González-Gil *et al.*, 1996).

Die Methylierung der DNA beeinflusste *in vitro* die Promotorbindung der Polymerase an die *rsd*-Promotoren positiv, deshalb wurde überprüft, ob auch *in vivo* ein ähnlicher Effekt gefunden werden kann. Dazu wurden die Expressionsraten des *rsd* P2 Promotors zwischen den Stämmen XL-1 (*dam*⁺) uns JM110 (*dam*⁻) miteinander verglichen (e). Dabei konnte für den *dam*⁻-Stamm eine niedrige Promotoraktivität sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase beobachtet werden. Zudem beträgt die Promotoraktivität des *dam*⁻-Stammes in der exponentiellen Phase ca. ¹/₄ der Promotoraktivität des Wildtyps und in der stationären Phase ca. die ¹/₂ des Wildtyps. Die Annäherung der Expressionsraten in der stationären Phase beruht auf eine niedrigere Aktivität des P2 Promotors im *dam*⁺-Stamm. Dagegen sind die Aktivitäten des *rsd* P2 Promotors des *dam*⁻-Stammes in der logarithmischen und der stationären Phase ähnlich.

Neben dem Einfluss von DNA-assoziierten Transkriptionsfaktoren auf die rsd-Regulation wurde auch der Einfluss von Transkriptionsfaktoren untersucht, die mit der RNA-Polymerase interagieren. Dazu zählen neben den Effektoren der Stringenten Kontrolle ppGpp und DksA auch die 6S RNA. Diese ist ähnlich wie Rsd an einem Wechsel des Transkriptionsmusters, durch die Inhibierung des σ^{70} -Holoenzyms, beteiligt. Weiterhin wurde auch überprüft, inwieweit Rsd die eigene Transkription reguliert. Da der *rsd* P1 Promotor als strikt σ^{38} -abhängig gilt (Piper *et al.*, 2009; Jishage & Ishihama, 1999), wurde auch die Beteiligung des Sigmafaktors σ^{38} an der *rsd*-Regulation untersucht (f). Es zeigte sich, dass in der logarithmischen Phase die Expressionsrate des *rsd* P2 Promotors der *rpoS*-Deletionsmutante um ca. 1/3 gegenüber dem Wildtyp verringert war. Dagegen war die Aktivität des P2 Promotors im rpoS--Stamm in der stationären Phase fünfmal höher als im Wildtyp. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der P2 Promotor auch die Transkriptmenge des σ^{38} abhängigen P1 Promotors produzieren muss. Bei einem Vergleich der Promotoraktivitäten des P2 Promotors der Stämme MG1655 und MG1655 rsd::kan offenbarte sich eine Rsd-abhängige Inhibierung des P2 Promotors in der stationären Phase (g). In der logarithmischen Phase war die Promotoraktivität der *rsd*⁻-Mutante im Vergleich

zum Wildtyp ebenfalls erhöht, allerdings nicht so stark wie in der stationären Phase. Trotzdem könnte es ein Hinweis darauf sein, dass Rsd den eigenen σ^{70} -abhängigen Promotor bereits in der logarithmischen Phase inhibiert. Es konnte dagegen kein Einfluss der 6S RNA auf die Aktivität des P2 Promotors gefunden werden. Die Expressionsraten des *ssrS*⁻-Stammes entsprachen, im Wesentlichen, denen des Wildtyps. Für die Untersuchung des ppGpp Einflusses auf die *rsd*-Regulation wurde ein

Stamm verwendet, dem das relA-Gen fehlt. Dieses Gen ist für den Anstieg der intrazellulären ppGpp Konzentration unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle verantwortlich. Allerdings wird die basale ppGpp-Produktion von dem spoT-Gen kontrolliert. Um einen vollkommen ppGpp-freien Stamm zu konstruieren, müssen beide Gene deletiert werden. Allerdings haben ppGpp⁰-Stämme deutlich veränderte Wachstumsraten und sind deshalb nur bedingt mit dem entsprechenden Wildtyp zu vergleichen. Aus diesem Grunde wurde die *relA*⁻-Mutante verwendet, um einen ppGpp-Effekt zu untersuchen. Dazu wurde in der exponentiellen Phase die Stringente Kontrolle durch die Zugabe von Serinhydroxamat (SHX) ausgelöst. Serinhydroxamat bindet irreversible an die Aminoacetyl-tRNA-Synthetase, welche die Bindung der Aminosäure Serin an die entsprechende tRNA katalysiert. Wird das Enzym inhibiert, akkumulieren in der Zelle unbeladene tRNAs, die für die Aminosäure Serin kodieren. Durch die Bindung einer unbeladenen tRNA an das Ribosomen wird die Stringente Kontrolle ausgelöst. Dies geht im Wildtyp mit einem starken Anstieg des ppGpp-Levels und einer drastischen Änderung des Transkriptionsmusters einher. In der Mutante bleibt das ppGpp-Level dagegen konstant und das Transkriptionsmuster ändert sich kaum.

Vor dem Auslösen der Stringenten Kontrolle sind die Expressionsraten des P2 Promotors in beiden Stämmen gleich. Nachdem die Stringente Kontrolle ausgelöst worden war, zeigte sich im Wildtyp eine Verdopplung der *rsd*-Expression, ausgehend vom P2 Promotor. Bei der Mutante zeigte sich dagegen keine Veränderung der Expressionsrate des P2 Promotors. Ein weiterer Effektor der Strigenten Kontrolle ist das Protein DksA, es wirkt häufig in Kombination mit ppGpp auf die Aktivität von Promotoren. Dabei wird zwischen stringent negativen und stringent positiven Promotoren unterschieden. Die Transkription stringent negativer Promotoren wird bei der Stringenten Kontrolle inhibiert, während die Transkription positiver Promotoren aktiviert wird. Zu den stringent negativ regulierten Promotoren gehören alle Promotoren, die für das Zellwachstum wichtig sind, z. B. die Promotoren der ribosomalen Operons. Dagegen spielen stringent positiv regulierte Promotoren eine Rolle u. a. bei der Synthese und Aufnahme von Aminosäuren und Nukleotiden. DksA hat jedoch nicht nur als Partner von ppGpp, im Rahmen der Stringenten Kontrolle, regulatorische Aufgaben. DksA (*DnaK suppressor A*) wurde als Repressor des *dnaK*⁻Phänotyps entdeckt und hat darüber hinaus u. a. Einfluss auf die Genexpression, Zellteilung und *Quorum Sensing* (Kang & Craig, 1990; Turner *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1999). Für den σ^{70} -abhängigen *rsd* P2 Promotor konnte eine DksA-induzierte Regulation in der stationären Phase beobachtet werden. Während die Expressionsraten des Wildtyps und der Mutante sich in der logarithmischen Phase nicht unterschieden, zeigte sich in der stationären Phase eine deutliche Erhöhung der Expressionsrate in der *dksA*⁻-Mutante. Im Vergleich zum Wildtyp war der P2 Promotor in der Mutante fünfmal aktiver. Allerdings widerspricht die Inhibierung durch DksA der Aktivierung des P2 Promotors durch ppGpp im Rahmen der Stringenten Kontrolle.

Die relativen Transkriptionsraten des P1 Promotors konnten nur für die stationäre Phase bestimmt werden. In der logarithmischen Phase konnte entweder keine *rsd* P1 cDNA-Bande detektiert werden oder sie war so schwach das eine verlässliche Auswertung nicht möglich war. In den Diagrammen (k) und (l) sind deswegen nur die Abweichungen der Expressionsraten der Mutanten von den Expressionsraten des jeweiligen Wildtyps gezeigt. Dafür wurde die wildtypische Expression des P1 Promotors 1 gesetzt und die Expressionsraten der Mutanten in Relation dazu bestimmt. Die DNA-assoziierten Regulatoren (k) und die Polymerase interagierenden Transkriptionsfaktoren (l) wurden in zwei Diagrammen zusammengefasst.

Die Abweichungen der Expressionsraten des P1 Promotors in den Deletionsstämmen entsprachen dabei weitestgehend den Abweichungen, die auch für den P2 Promotor in der stationären Phase gefunden wurden. Das bedeutet, die Einflüsse der untersuchten Effektoren sind für beide Promotoren ähnlich. Im *hns*⁻-Stamm war die P1 Aktivität deutlich erhöht, ca. 14x im Vergleich zum Wildtyp (k). Damit zeigte der P1 Promotor eine wesentlich stärkere Sensitivität gegenüber H-NS als der P2 Promotor. Da bei den Retardierungsstudien keine Bindung von H-NS im Bereich des P1 Promotors gefunden wurde, handelt es sich entweder um einen indirekten Effekt oder H-NS beeinflusst den P1 Promotor durch eine Bindung im Bereich des P2 Promotors (k). Ähnlich wie beim *rsd* P2 Promotor konnte auch für den P1 Promotor kein Einfluss der Deletion von *stpA* oder *lrp* auf die Promotoraktivität gefunden werden (k). Dagegen war im *fis*⁻-Stamm der *rsd* P1 Promotor in der stationären Phase doppelt so aktiv wie im Wildtyp (k). Dies entspricht der FIS-abhängigen Derepression des P2 Promotors in der stationären Phase (d). Die Deletion des *dam*-Gens führte zu einer fast vollständigen Inhibierung des P1 Promotors. Für den schwachen P1 Promotor schienen die Methylgruppen im Promotorbereich für die Polymerasebindung von entscheidender Bedeutung zu sein (k). In der relA--Mutante konnte die P1 Aktivität durch Auslösen der Stringenten Kontrolle nicht erhöht werden (l). Deshalb erreichte die Expressionsrate des P1 Promotors in der Mutante nur 50% der Expressionsrate des Wildtyps. Dagegen führte die Deletion des dksA-Gens, ähnlich wie für den P2 Promotor, zu einer starken Derepression des P1 Promotors. Beide Promotoren P1 und P2 waren in der Mutante fünfmal aktiver als im Wildtyp (j+l). Indessen konnten keine Unterschiede in den Expressionsraten des ssrS-Wildtyps und der ssrS-Mutante gefunden werden. Sowohl der rsd P1 als auch der rsd P2 Promotor sind gegenüber einer Inhibierung durch die 6S RNA unempfindlich (l+h). Dafür konnte eine verstärkte Expression des P1 Promotors im MG1655 rsd::kan gefunden werden. Rsd scheint *in vivo* auch auf den σ^{38} -abhängigen P1 Promotor einen inhibierenden Effekt zu haben, ähnlich zum σ^{70} -abhängigen P2 Promotor (l+g). Allein die Deletion von rpoS hatte unterschiedliche Effekte auf die Expression des P1 und des P2 Promotors. Während der Verlust von σ^{38} beim P2 Promotor zu einer starken Aktivierung der Expression führte (f), zeigte sich für den P1 Promotor eine verringerte Expressionsrate. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht ungewöhnlich, da der P1 Promotor stark σ^{38} abhängig ist. Daher wird er in der *rpoS*-Mutante kaum vom σ^{70} -Holoenzym genutzt. Stattdessen wird verstärkt der σ^{70} -abhängige P2 Promotor transkribiert um die Expression von *rsd* aufrecht zu erhalten. Weiterhin ist es denkbar, dass die Bindung eines Eo³⁸ Holoenzyms an den P1 Promotor die Transkription des P2 Promotors inhibiert.

(A) (B) log stat







(C)

log

1

2











Abbildung 2.27: Primer-Extension Analysen einiger mRNAs aus den Stämmen MG1655 (+) und MG1655 *rsd::kan* (-). Primer-Extension Analyse für die *ssrS*-mRNA (6S RNA). Es wurde Gesamt-RNA aus logarithmischen (log) und stationären (stat) Zellen isoliert. Für die Primer-Extension der *ssrS*-mRNA, wurden 1 µg Gesamt-RNA und die Primer #6S-PE-1 und #5S-2 eingesetzt. Für die Primer-Extension Analyse der ribosomalen Operons (*rrn*), der *bolA*- und der *rhoL*-mRNA wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mit den Primern #1400, bzw. #bolA2 und #rhoL2 verwendet. Die cDNA-Produkte wurden über ein 15%iges PAA-Gel getrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. In (A) sind die cDNA-Produkte für die reife 6S RNA und den Leader der 6S RNA sowie für die 5S gezeigt. (B) Quantitative Auswertung der Primer-Extension Reaktion. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die 6S RNA-Banden sind auf die 5S RNA normiert. In (C) sind die cDNA-Produkte für den ribosomalen P1 (*rrn* P1) und den ribosomalen P2 (*rrn* P2) Promotor gezeigt. (D) Zeigt die quantitative Auswertung der Primer-Extension Produkte aus (C). In (E) sind die cDNA-Produkte für die *bolA*-mRNA gezeigt. (F) Quantitative Auswertung der bolA-cDNAs. (G) Die cDNAs für die *rhoL*-mRNA. (H) Quantitative Auswertung für rhoL. Es wurden stets die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gebildet.

2.4.11 Rsd-abhängige Gen-Expression in vivo

Zusätzlich zur Regulation der *rsd*-Expression wurde auch die Rsd-abhängige Regulation der folgenden Promotoren in vivo untersucht: ribosomale Operons, ssrS, bolA1, fisP und rhoL. Daher wurden mittels Primer-Extension die Transkriptionsraten der untersuchten Promotoren im MG1655 Wildtyp mit denen in der MG1655 rsd::kan Mutante verglichen. Beide Stämme enthielten auch den prsd-up-cat Vektor. Da dieses Plasmid kein Rsd Protein produziert, wurde angenommen, dass es keinen störenden Effekt auf die Analysen hat. Auf Grund der Tatsache, dass Rsd bereits in der logarithmischen Phase in der Zelle nachgewiesen werden konnte (Piper et al., 2009), wurden die Expressionsraten in der exponentiellen und stationären Phase untersucht. Es wurden die Promotoraktivitäten der zuvor in vitro getesteten ribosomalen Promotoren (rrn) sowie der bolA Promotor verglichen. In vivo kann mittels einer Primer-Extension jedoch nicht exakt zwischen den sieben ribosomalen Operons unterschieden werden. Der Einfluss von Rsd wurde auf alle ribosomalen Promotoren untersucht. Während in vitro lediglich der P1 Promotor des rrnB Operons betrachtet wurde. Neben diesen klar σ^{70} - bzw. σ^{38} -abhängigen Promotoren (*rrn* bzw. *bolA*1) wurden auch die ssrS- und rhoL-Promotoren analysiert. Das ssrS-Gen kodiert für die 6S RNA, diese wird von zwei Promotoren P1 und P2 gesteuert. Der weiter upstream gelegene P2 Promotor kann sowohl von σ^{70} als auch von σ^{38} erkannt werden, während der P1 Promotor nur vom σ^{70} -Holoenzym transkribiert wird. Der Promotor *rhoL* kodiert für das Leaderpeptid des Transkriptionsterminators Rho, die Sigmaspezifität dieses Promotors ist bisher nicht bekannt. Allerdings wird *rhoL* konstitutiv über die Wachstumsphase exprimiert und gilt als unreguliert. Deshalb sollte *rhoL* als interner Standard verwendet werden. Da die 6S RNA eine stabile RNA ist und über die Wachstumsphasen in der Zelle akkumuliert, musste für die Detektion der 6S RNA weniger Gesamt-RNA eingesetzt werden. Zusätzlich wurde ein anderer interner Standard verwendet: die stabile 5S RNA, die während der Wachstumsphase in der Zelle akkumuliert.

In der Abbildung 2.27 (A) sind die cDNAs für die 6S RNA und die 5S RNA gezeigt. Neben dem cDNA-Produkt für die reife 6S RNA war auch der 6S RNA Leader zu erkennen. Die reife 6S RNA (184 Nukleotide) entsteht durch die Prozessierung der Primärtranskripte, dabei entstehen auch Produkte die um ein bis zwei Nukleotide verkürzt sind (Gildehaus, 2001). Der 6S RNA Leader ist ein Primärprodukt des P1 Promotors, die Transkripte des P2 Promotors werden sehr schnell prozessiert und sind deshalb nicht mittels Primer-Extension zu erfassen (Kim & Lee, 2004). Die Intensitäten der 5S Banden wurden addiert und für die Quantifizierung der 6S RNA Banden verwendet. In (B) sind die Auswertungen für den Leader und die reife 6S RNA gezeigt. Sowohl die Konzentration des Leaders als auch der reifen 6S RNA nahmen in der stationären Phase zu. Ein Unterschied in den Produktstärken zwischen den *rsd*⁺- und *rsd*⁻-Stämmen konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Expression der 6S RNA scheint nicht durch Rsd beeinflusst zu werden.

Bei der Analyse der ribosomalen Operons konnten nicht nur die cDNAs des P1 Promotors, sondern auch die des P2 Promotors detektiert werden. Der ribosomale P1 Promotor wird wesentlich stärker als der P2 Promotor transkribiert, dafür allerdings auch umfassender reguliert. Der P2 Promotor ist zwar schwächer als der P1 Promotor wird dafür jedoch konstitutiv transkribiert. In (C) sind die cDNA-Produkte beider Promotoren gezeigt. Es war auffällig, dass die Expressionsrate des P1 Promotors bei dem Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase deutlich erniedrigt wurde. Die Expressionsrate des P2 Promotors blieb bei dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase dagegen fast gleich. Es konnte kein Rsdabhängiger Unterschied in den Expressionsraten der ribosomalen Promotoren gefunden werden (D). Zwar gibt es geringe Abweichungen der Expressionsraten zwischen den Stämmen, jedoch liegen diese im Bereich der Standardabweichungen. Das Fehlen von Rsd scheint keinen positiven Einfluss auf die Transkriptionsraten der ribosomalen Promotoren zu haben. Dagegen konnte für den σ^{38} -abhängigen *bolA*1-Promotor ein deutlicher Rsd-abhängiger Effekt gefunden werden (f). Für den bolA1-Promotor konnten cDNA-Produkte erst in der stationären Phase detektiert werden. Für den *bolA*2-Promotor konnten dagegen gar keine Produkte gefunden werden (E). Die Auswertung der Produktstärken ergab eine erniedrigte Expressionsrate des bo*lA*1-Promotors in der Abwesenheit von Rsd. Der Einfluss von Rsd auf die Aktivität des *ficP* Promotors wurde ebenfalls *in vivo* untersucht. Allerdings war der *ficP* Promotor unter den Versuchsbedingungen so schwach exprimiert, dass eine verlässliche Auswertung nicht möglich war. Das cDNA-Produkt der *fic*-mRNA war nur im Wildtyp zu erahnen, im *rsd*⁻-Stamm konnte kein *ficP*-Produkt gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Eigentlich sollte die *rhoL*-mRNA als Standard zur Quantifizierung der *rrn*- und der *bolA*-cDNAs verwendet werden. Allerdings wurden bei den Auswertungen der cDNA Intensitäten Hinweise auf eine Rsd-abhängige Regulation der *rhoL*-Expression in der logarithmischen Phase gefunden (H). So war die Expressionsrate von *rhoL* im *rsd*⁻-Stamm um ca. 50% erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp. In der stationären Phase se konnte dagegen kein Unterschied in den Expressionsraten beobachtet werden.

Vorsichtshalber wurden die Produktintensitäten der *rrn* P1 und P2 sowie des *bolA1*-Promotors nicht auf *rhoL* normiert.

2.4.12Analyse der rsd-Promotoren in vitro

Nachdem die Regulation der *rsd*-Promotoren *in vivo* untersucht wurde, sollten *in* vitro die gefundenen Effekte genauer untersucht wurden, um unterschieden zu können, ob es sich um direkte oder indirekte Effekte handelt. In einem ersten Versuch wurden der Einfluss der RNA-Polymerase interagierenden Transkriptionsfaktoren mittels *in vitro* Transkriptionen analysiert (Abbildung 2.28). Dazu wurde der Vektor prsd-up-T1T2 (4.2.2) mit dem σ^{70} -haltigen RNAP Holoenzym transkribiert. Das Transkript des *rsd* P1 Promotors ist 275 Nukleotide lang, während das Transkript des *rsd* P2 Promotors nur 180 Nukleozide lang ist. Anhand der in Spur 1 aufgetragenen kb-Leiter konnten die entstandenen Banden den jeweiligen Transkripten zugeordnet werden. Die Banden der *rsd*-Transkripte, der *RNA*1 sowie die Markerbande (M) sind markiert. Die RNA1-Transkriptbanden sind deutlich stärker als die Banden der rsd-Promotoren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die rsd-Promotoren unter den untersuchten Bedingungen nur schwach exprimiert werden. Bereits bei vorherigen in vivo Analysen der chromosomalen *rsd*-Promotoren mussten 20 μ g Gesamt-RNA eingesetzt werden, um *rsd*-mRNA mittels Primer-Extension nachweisen zu können (Daten nicht gezeigt).

Während die Transkription des *rsd* P2 Promotors in allen Ansätzen zu deutlichen Transkripten führte, konnte für den *rsd* P1 Promotor nur in der Probe mit DksA (Spur 6) eine deutliche Transkriptbande detektiert werden. In den übrigen Proben konnte das P1 Transkript nur erahnt werden, deshalb wurde auf eine quantitative Auswertung der Transkriptionsrate des *rsd* P1 verzichtet.

Sowohl bei Retardierungsstudien (Abbildung 2.23) als auch bei den Primer-Extension Analysen (Abbildung 2.26) war die DNA-Methylierung maßgebend für die Aktivität der *rsd*-Promotoren. Deshalb sollte der Einfluss der GATC-Sites auf die Promotoraktivität mittels *in vitro* Transkriptionen untersucht werden. Dazu wurde neben der üblichen Transkription mit methyliertem Template (Spuren 2, 4-11) auch eine *in vitro* Transkription mit nicht-methyliertem Template durchgeführt (Spur 3). In der Probe mit dem nicht-methylierten Plasmid war ca. 50% weniger *rsd* P2-Transkript entstanden als in der methylierten Referenzprobe (Spur 2). Allerdings war auch die Menge an *RNA*1, im Vergleich zur Referenz, erniedrigt. Da es im Promotorbereich der *RNA*1 keine GATC-Sites gibt, handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen direkten methylierungsabhängigen Effekt. Zwar wurden die Plasmide parallel isoliert und stets gleichbehandelt, trotzdem können sich die Plasmide hinsichtlich ihrer Superhelikalität unterscheiden, insbesondere auch auf Grund der Methylgruppen. Da die Promotorstärke der *RNA*1 abhängig von der Superhelikalität des Templates ist und auch für die *rsd*-Promotoren eine Abhängigkeit von der Superhelikalität wahrscheinlich ist, wurde der Versuch mit linearisierten Plasmiden wiederholt (Daten nicht gezeigt). Die Transkription mit linearisierten Plasmiden resultierte in wesentlich schwächeren Transkriptionsraten im Vergleich zu superspiralisierten Plasmiden. Die Transkriptionsraten der *RNA*1 und des *rsd* P2 Promotors waren beide um ca. 60% erniedrigt, wenn das Plasmid nicht-methyliert war. D. h. ein direkter Einfluss der Methylierung auf die Transkription des *rsd* P2 Promotors konnte mit diesem Versuch nicht gezeigt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Rsd-Expression der Stringenten Kontrolle unterliegt. Deshalb wurde der Einfluss der Faktoren ppGpp und DksA sowohl einzeln als auch in Kombination auf die Transkriptionsraten der rsd-Promotoren erforscht. Weder für ppGpp noch für DksA konnte ein starker Effekt auf die Transkriptionsrate des P2 gefunden werden. Zwar konnte für ppGpp eine leichte Aktivierung und für DksA eine schwache Inhibierung der Transkription des P2 Promotors beobachtet werden (B), allerdings waren die Divergenzen zur Referenz im Bereich der Standardabweichungen. Dafür konnte ein deutlicher DksA-abhängiger Effekt auf die Transkriptionsrate des *rsd* P1 Promotors beobachtet werden. Denn nur in der Anwesenheit von DksA konnte ein Transkript des rsd P1 Promotors detektiert werden (Spur 6). Das bedeutet, DksA aktiviert die Transkription des *rsd* P1 Promotors durch die σ^{70} -abhängige Polymerase *in vitro*. Waren ppGpp und DksA zusammen im Ansatz, so konnte für den *rsd* P1 Promotor kein Transkript mehr detektiert werden (Spur 7). Dafür war die Transkriptionsrate des *rsd* P2 Promotors, im Vergleich zur Referenz um ca. 50% erhöht, allerdings war die Standardabweichung ebenfalls sehr groß. Ein eindeutiger Effekt auf den rsd P2 Promotor konnte anhand dieser Daten nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Dafür konnte eine deutliche Inhibierung der *RNA*1 durch ppGpp und DksA detektiert werden. Dabei ist die *RNA*1 in Bezug auf ppGpp und DksA als unreguliert beschrieben (Paul *et al.*, 2004), allerdings ist die RNA1 normalerweise mit starken Promotoren auf einem Plasmid kodiert. Dadurch wird die RNA1 wesentlich weniger transkribiert als in diesem Versuch, und die Effekte von ppGpp und DksA sind nicht so auffällig.

Eine deutliche Inhibierung der Transkriptionsrate des *rsd* P2 Promotors konnte für die 6S RNA und für Rsd beobachtet werden (A, Spuren 8-11). Der Einsatz von 250 nM 6S RNA führte zu einer Inhibierung von mehr als 60%, während 1 μ M Rsd zu einer ca. 40% igen Inhibierung der Transkription führte (B). Die Inhibierungsraten unterschieden sich dabei kaum für den *rsd* P2 Promotor und die *RNA*1.



Abbildung 2.28: *In vitro* **Transkription der** *rsd***-Promotoren.** (A) Gezeigt ist das Autoradiogramm einer IVT. Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren, 300 μM ppGpp, 3 μM DKsA, ppGpp+DksA, 250 nM 6S RNA, 1 μM Rsd sowie die Methylierung der GATC-Sites, auf die Transkription der *rsd*-Promotoren P1 und P2 wurde untersucht. Die Spur 1 zeigt eine kb-Leiter, die Spuren 2 und 4-11 enthielten methylierte Template-DNA, die Spur 3 nicht-methylierte DNA. Die Transkripte der *rsd* P1 und P2 Promotoren sowie die *RNA*1 sind markiert. Das *rsd* P1 Transkript ist nur in der Spur 6 deutlich zu erkennen. Das Fragment Avall (M) wurde als Standard verwendet und für die Quantifizierung, in (B) benutzt. (B) Quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind die Abweichungen der relativen Transkriptionsrate von der jeweiligen Referenzprobe.

Inwiefern die Nucleoid-assoziierten Proteine die Transkription der *rsd*-Promotoren *in vitro* beeinflussen wurde nicht näher untersucht. Dafür wurden Bindungsstudien durchgeführt, bei denen das $E\sigma^{70}$ bzw. $E\sigma^{38}$ Holoenzym mit den NAPs um die Bindung an die *rsd*-Promotoren konkurrieren. Dabei konnte jedes der getesteten NAPs, unabhängig von den Versuchsbedingungen, die Promotor-Bindung der Polymerasen inhibieren. Selbst eine Vorinkubation der Polymerasen mit dem *rsd*-Fragment schützte nicht vor einer negativen Beeinflussung der Polymerase-DNA-Komplexe durch die NAPs (Daten nicht gezeigt). Die Komplexbildung wurde jedoch auch durch LRP und StpA inhibiert, obwohl diese in den Primer-Extension Analysen keinen Einfluss auf die Aktivität der *rsd*-Promotoren hatten.

Um den Einfluss der Nucleoid-assoziierten Proteine auf die Promotoraktivität *in vitro* zu bestimmen sind weitere Versuche notwendig. *In vitro* Transkriptionen wären dafür geeignet, da durch die Interaktion der NAPs mit dem Polymerase Holoenzymen die Transkription aktiviert oder inhibiert werden kann. Dadurch könnte sich ein differenzielleres Bild als bei den Bindungsstudien ergeben.

3 Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Funktion und Regulation von Rsd

Diese Arbeit war in zwei Hauptbereiche unterteilt. Zum einen sollte die Funktion von Rsd untersucht werden, zum anderen die Regulation des *rsd*-Gens.

Insbesondere die Interaktionen von Rsd mit den RNA-Polymerase Holoenzymen waren dabei von Interesse. Dazu wurde der Einfluss von Rsd auf die Aktivität der $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ Holoenzyme *in vitro* sowie der Effekt von Rsd auf die Expression einiger ausgewählter Genen *in vivo* analysiert. Zusätzlich wurde nach weiteren Interaktionspartnern, als den bisher Beschriebenen gesucht.

Die zelluläre Rsd-Konzentration wird beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase erhöht, jedoch ist bereits in der logarithmischen Wachstumsphase Rsd in der Zelle nachgewiesen worden (Piper *et al.*, 2009). Weiterhin besteht die *rsd*-Promotorregion aus einem σ^{38} -abhängigen P1 und einem σ^{70} -abhängigen P2 Promotor (Jishage & Ishihama, 1999). Der stärkere P2 Promotor wird konstitutiv transkribiert und steuert die *rsd*-Expression auch in der exponentiellen Wachstumsphase. Durch die Komplexierung von σ^{70} unterbindet Rsd die Bildung des E σ^{70} Holoenzyms. Dies konnte mittels *immunoaffinity pulldown* Experimenten für die stationäre, nicht jedoch für die logarithmische Phase gezeigt werden (Piper *et al.*, 2009).

3.2 Interaktionspartner von Rsd

3.2.1 Die Sigmafaktoren in E. coli

Beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase ändert sich das Transkriptionsmuster der Zelle. Dies geht mit einer Veränderung des RNA-Polymerase Holoenzyms einher. Der Hauptsigmafaktor σ^{70} wird durch den alternativen σ^{38} -Faktor ausgetauscht (Hengge-Aronis, 2002). Obwohl beide σ -Faktoren Homologien in der Aminosäuresequenz und wahrscheinlich auch in der Struktur haben erkennen sie unterschiedliche Promotorstrukturen. Während σ^{70} neben einer -10 Region auch eine -35 Region für eine optimale Promotorerkennung benötigt, ist die Bedeutung der -35-Region für σ^{38} -abhängige Promotoren weniger eindeutig (Lee & Gralla, 2001). Neben der Promotorsequenz sind in der Zelle allerdings für eine effektive σ^{38} -abhängige Transkription weitere Parameter notwendig, wie die Superhelikalität des Templates, die Osmolarität, der pH-Wert, die Temperatur oder die Gegenwart spezifischer Effektoren (Hengge-Aronis, 2002; Ishihama, 1999). *In vivo* führt dies zu unterschiedlichen Promotorgruppen, deren Initiation in Abhängigkeit der Wachstumsverhältnisse Sigmafaktor abhängig ist. *In vitro* ist dagegen eine Kreuzerkennung der σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Promotoren durch die E σ^{70} und E σ^{38} Holoenzyme möglich (Hengge-Aronis, 2003).

Neben den beiden beschriebenen Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} gibt es in *E. coli* noch fünf weitere Sigmafaktoren (1.5). Davon liegen viele in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor und werden durch äußere und innere Signale aktiviert, um die Expression spezifischer Regulons zu initiieren. Damit die alternativen Sigmafaktoren die Transkription übernehmen können, müssen diese erstmal an das Coreenzym der RNA-Polymerase binden. Dazu bedarf es weiterer Effektoren, da die Konzentration der alternativen Sigmafaktoren wesentlich niedriger ist als die Konzentration des Hauptsigmafaktors σ^{70} . Zudem hat σ^{70} von allen untersuchten Sigmafaktoren die höchste Affinität zum Coreenzym (Ishihama, 2000). Ferner ist die Menge an freiem Coreenzym in der Zelle limitiert, da der Größte Teil an die DNA gebunden ist und als Elongationskomplex die Transkription durchführt (Ishihama *et al.*, 1976 & Kusano *et al.*, 1996).

Zu den Effektoren der RNA-Polymerase Aktivität gehören das Alarmon ppGpp und sein Kofaktor DksA. Beide fördern die Bildung des $E\sigma^{54}$ Holoenzyms und damit die Transkription von Genen, die für die Stickstoffaufnahme von Bedeutung sind (Szalewska-Palasz *et al.*, 2007 & Laurie *et al.*, 2003). Ein weiterer Modulator der Sigmakompetition ist Rsd, durch die Bindung an σ^{70} wird die Bildung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms verhindert. Davon profitieren die anderen Sigmafaktoren. Da Rsd erst in der stationären Phase aktiv ist, wird besonders die Bildung des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms durch Rsd gefördert.

3.2.2 Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung der RNA-Polymerase Holoenzyme

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung der Holoenzyme $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ untersucht. Bei den durchgeführten Retardierungs-

studien zeigte sich eine Inhibierung der Komplexbildung sowohl für das $E\sigma^{70}$ als auch für das $E\sigma^{38}$ Holoenzym (Abbildung 2.1).

Zusätzlich wurde deutlich, dass neben den unterschiedlichen Affinitäten der Sigmafaktoren zum Coreenzym, auch die Promotorstärken eine Rolle spielten. Für beide Holoenzyme wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt, dennoch bildete das $E\sigma^{70}$ Holoenzym deutlich stärkere Komplexe mit dem *rrnB* P1 Promotorfragment aus, als das $E\sigma^{38}$ Holoenzym mit dem *bolA*-Promotor. Wurde das Verhältnis σ^{38} zu Core auf 10:1 erhöht bildeten sich mehr $E\sigma^{38}$ -*bolA*-Komplexe. Bei dem $E\sigma^{70}$ Holoenzym führte die Erhöhung der σ^{70} -Konzentration dagegen zu keiner verstärkten Bindung an das *rrnB* P1 Fragment. Trotz des Überschusses an Polymerasen wurden die DNA-Fragmente nicht vollständig komplexiert. Das heißt, nur ein Teil der eingesetzten Proteine bildete aktive Holoenzyme, die an Promotorsequenzen binden konnten oder ein Teil der Komplexe, z.B. geschlossene Komplexe, war zu instabil, um im Retardierungsgel eine Bande zu erzeugen.

Die Inhibierung der Komplexbildung war dagegen für beide Holoenzyme ähnlich. Während für das $E\sigma^{70}$ Holoenzym eine Rsd-Konzentration von 3 μ M zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der Komplexbildung führte, unabhängig von den eingesetzten σ^{70} -Konzentrationen, zeigte sich beim $E\sigma^{38}$ Holoenzym erst ab einer Rsd-Konzentration von 10 μ M eine vollständige Inhibierung der Komplexbildung. Bei 3 μ M Rsd waren noch ca. 30% der Komplexe stabil, auch hier spielte die eingesetzte σ^{38} -Konzentration für den Effekt von Rsd keine Rolle.

Die Inhibierung der E σ^{38} -Promotorkomplexe ist ungewöhnlich, da sie nicht zur postulierten Aufgabe von Rsd passt. Als Antisigmafaktor für σ^{70} sollte zwar die E σ^{70} -Aktivität, nicht jedoch die Aktivität des E σ^{38} Holoenzyms beeinflusst werden. Allerdings gab es bis jetzt keine Studien, die eine Interaktion mit dem E σ^{38} Holoenzym *in vitro* untersucht haben. Die bisherigen *in vitro* Studien befassten sich nur mit der Interaktion von Rsd mit σ^{70} , E σ^{70} oder dem Coreenzym der RNAP.

Da die Inhibierung der E σ^{38} -Komplexe mehrfach reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt) wurden DNaseI- und KMnO₄-Footprints durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Inhibierung zu identifizieren. Bis jetzt ist nicht eindeutig geklärt, wie Rsd mit den Holoenzymen interagiert. Der Mechanismus der Rsd-abhängigen Inhibierung des E σ^{70} Holoenzyms ist noch gänzlich unklar. Es sind mehrere Wege denkbar, wobei der einfachste die Komplexierung von σ^{70} und die damit verbundene Inhibierung der E σ^{70} Komplexbildung wäre. Allerdings wurde beschrieben, dass Rsd einen bestehenden E σ^{70} -Komplex auflösen kann und dabei Rsd- σ^{70} - und Rsd-CoreKomplexe entstehen. Durch die beschriebene Bindung von Rsd an das Coreenzym sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ergeben sich neue Fragen nach der Funktion von Rsd (Ilag *et al.*, 2004 & Arifuzzaman *et al.*, 2006). Auch eine Bildung von kurzlebigen, instabilen $E\sigma^{70}$ -Rsd-Komplexen ist denkbar, allerdings konnten solche Komplexe bisher nicht beobachtet werden (Pineda *et al.*, 2004).

Wäre Rsd ein Bestandteil des Polymerase-Promotorkomplexes, so sollte sich dies in einer Veränderung des Footprintmusters bemerkbar machen. Durch die Bindung an die DNA-Doppelhelix schützt die Polymerase den bedeckten DNA-Bereich vor der hydrolytischen Spaltung durch DNaseI. Bei einer limitierten Hydrolyse resultiert dies in einem Footprint. Die Region 4 von σ^{70} ist sowohl für die Bindung an das Coreenzym als auch für die Bindung an die -35 Promotorregion wichtig, während die σ^{70} Region 2 die Erkennung der -10 Region gewährleistet (Dove *et al.,* 2003). Rsd bindet an die Regionen 2 und 4 von σ^{70} (Patikoglou *et al.,* 2007 & Yuan *et al.,* 2008). Daher sollte die Anwesenheit von Rsd im Komplex mit der DNA-Bindung interferieren. Ein solcher Komplex würde ein anderes Footprintmuster erzeugen, als ein Rsd-freier Komplex. Die beobachteten Footprints des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms am *rrnB* P1 Promotor und des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms am *bolA1* Promotor entsprachen jedoch den bereits beschriebenen Footprints (Ohlsen & Gralla, 1992 bzw. Nguyen & Burgess, 1997). Durch die Anwesenheit von Rsd änderte sich bei keinem der untersuchten Promotoren das Muster des Footprints. Dafür konnte eine deutliche Abnahme der Footprint Intensitäten mit steigender Rsd-Konzentration beobachtet werden (Abbildungen 2.2 & 2.3).

Anhand der KMnO₄-Footprints kann gezielt der offene Komplex analysiert werden, da mit dieser Methode nur einzelsträngige DNA geschnitten wird. Als Ergebnis können ungepaarte Thymin-, aber auch Cytosin-Reste in der Transkriptionsblase sichtbar gemacht werden. Bricht der offene Komplex zusammen, so schließt sich auch die Transkriptionsblase wieder und die Thymin- und Cytosin-Reste sind gegen die Modifikaton mit KMnO₄ unempfindlich.

Für den *rrnB* P1 Promotor konnten durch KMnO₄-Footprints mit dem E σ^{70} Holoenzym die ungepaarten Positionen -10T und -11T identifiziert werden. Diese Analyse ist konsistent mit Ergebnissen, die auch in einer anderen Arbeiten beschrieben wurden (Rutherford *et al.*, 2009). Die Anwesenheit von Rsd führte nicht zu einer Verschiebung der modifizierten Basen, sondern lediglich zu einer Abnahme der Bandenintensitäten. Dies geht einher mit einer Abnahme des offenen Komplexes (Abbildung 2.4).

Für die Analyse des *bolA1*-Promotors wurde ein DNA-Fragment verwendet, welches nicht den *bolA2*-Promotor enthält, um nur *bolA1*-Promotor-spezifische Signale zu

nen fast identische Inhibierungsraten gefunden.

untersuchen. Beim E σ^{38} -*bolA1*-Komplex konnten ungepaarte Basen an den Positionen -14C und -15C sowie etwas schwächere Abbruchbanden an den Positionen -12A und -11T detektiert werden. Diese reaktiven Stellen stimmen nur zum Teil (-11T) mit den von Ngyuen & Burgess (1997) publizierten Positionen überein. Diese fanden am template-Strang Abbruchbanden im Bereich des +1 Transkriptionsstarts (+1C, -2T, -3T, -8T, -10C). Es wurden jedoch unterschiedliche Temperaturen und Kaliumglutamatkonzentrationen verwendet. Beides kann Auswirkungen auf die Bildung des offenen Komplexes haben. Wie bereits beim E σ^{70} -*rrnB* P1-Komplex beobachtet, so änderten sich auch bei dem E σ^{38} -*bolA1*-Komplex zwar die Intensitäten der Abbruchbanden, aber nicht die Positionen der offenen Komplex Nukleotide (Abbildung 2.5). Das bedeutet, es konnte lediglich eine Rsd-induzierte Abnahme der offenen Komplexe für beide Systeme beobachtet werden, aber nicht etwa eine Rsd-abhängige Veränderung der Komplexstruktur. Weiterhin wurden bei gleichen Proteinkonzentratio-

Bei den durchgeführten Retardierungs- und Footprintanalysen konnten keine Hinweise auf einen Komplex bestehend aus Holoenzym, Promotor und Rsd gefunden werden. Selbst die Interaktionen von Rsd mit den verschiedenen Polymerasen waren gleich. Da für den *bolA1*-Promotor eine Kreuzerkennung durch die Eo⁷⁰ Polymerase *in vitro* beschrieben ist (Hengge-Aronis, 2003), wurde zusätzlich der obligat σ^{38} abhängige fic-Promotor untersucht. Dabei wurde bei Retardierungsanalysen eine schwache Bindung an das *fic*-Fragment durch das $E\sigma^{70}$ Holoenzym detektiert (Abbildung 2.6). Weiterhin konnte durch Transkriptionsanalysen die Entstehung eines Transkripts mit dem RNAP-Holoenzym nachgewiesen werden. Dieses Transkript wurde mittels Primer-Extension Sequenzierung untersucht und der Transkriptionsstart der RNAP konnte mehr als 40 Basenpaare upstream des +1 Transkriptionsstarts des *fic*-Promotors lokalisiert werden (Abbildung 2.7). Dabei könnte es sich um einen weiteren Promotor für das *yhfG*-Gen handeln. Dieses Gen liegt zwischen dem *fic*-Promotor und dem Translationsstart des *fic*-Gens. Allerdings liegt der bekannte Transkriptionsstart des yhfG-Gens an der Position -2, relativ zum fic-Transkriptionsstart.

Zusätzlich wurde die Abhänigkeit des *fic*-Promotors von σ^{38} *in vivo* untersucht. In einem *rpoS*⁻-Stamm konnte keine *fic*-mRNA mittels Primer-Extension detektiert werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus der stationären Phase mit einer Gesamt-RNA Probe aus dem entsprechendem Wildtyp verglichen (Daten nicht gezeigt). Die Komplexbildung des E σ^{38} Holoenzyms mit dem *fic*-Promotor wurde durch Rsd genauso inhibiert wie bereits für den *bolA1*-Promotor beschrieben. Da keine Unterschiede in der Art der Komplexinhibierung zwischen den Holoenzymen festgestellt werden konnten, stellte sich die Frage, worauf die Inhibierung beruht. Da Rsd auch mit dem Coreenzyme interagiert, könnte auch eine Bindung von Rsd an das Coreenzym der RNA-Polymerase eine Ursache für die Inhibierungen sein und nicht etwa wie bisher angenommen der Sigmafaktor.

3.2.3 Die Bindungspartner von Rsd

Dass Rsd sowohl an σ^{70} als auch an das Coreenzym bindet, ist beschrieben (Ilag *et al.*, 2004). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine mögliche Bindung von Rsd an σ^{38} . Allerdings ließen die bisher durchgeführten Versuche eine eindeutige Aussage nicht zu. Zwar konnten Rsd und σ^{38} mittels Glutaraldehyd miteinander quervernetzt werden, allerdings können durch die Methode unspezifische Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden. Bei einer zu hohen Glutaraldehyd-Konzentration werden auch nicht bindende Proteine miteinander vernetzt (Hofmann, 2006). Eine Identifizierung eines σ^{38} -Rsd-Komplexes durch ein natives PAA-Gel schlug fehl, da durch das veränderte Laufverhalten der Proteine die Banden nicht voneinander abgegrenzt werden konnten (Kamp, 2005).

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten *affinity-binding* Experimenten konnten die bereits beschrieben Interaktionen von Rsd mit σ^{70} , dem Coreenzym sowie die Bildung von Rsd-Dimeren reproduziert werden. Weiterhin war es möglich, die Bindung von Rsd an σ^{38} eindeutig zu belegen. Es ergaben sich durch diese Methode jedoch keine Hinweise auf eine Bindung von Rsd an das RNAP Holoenzym. Ein Rsd-RNAP-Komplex konnte allerdings auch in anderen Arbeiten bisher nicht beobachtet werden (Abbildung 2.9).



Abbildung 3.1: Schematischer Vergleich der σ -Untereinheiten σ^{70} und σ^{38} . Die Proteinregionen, die an den Interaktionen mit dem Coreenzym, der Promotorregion und Rsd beteiligt sind, sind markiert (verändert nach Checroun *et al.*, 2004).

Die Bindung von Rsd an σ^{38} steht zwar im Widerspruch zu der Funktion von Rsd als Antisigmafaktor für σ^{70} , allerdings ist *in vitro* eine solche Bindung durchaus denkbar. Bisher ist mit Ausnahme der Region 1.1 nur die Struktur von σ^{70} aufgeklärt. Dennoch kann auch σ^{38} , wie σ^{70} in vier Regionen unterteilt werden. Die beiden Sigmafaktoren gehören zur σ^{70} -Familie und besitzen große Homologien in ihren Aminosäuresequenzen und im allgemeinen Aufbau. In der Abbildung 3.1 ist der Aufbau der beiden Sigmafaktoren schematisch dargestellt. σ^{70} unterscheidet sich von σ^{38} vor allem durch die Region 1.1. Diese ist negativ geladen und verhindert dadurch eine Bindung des freien Sigmafaktors an die DNA. Die Struktur der Region 1.1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden, da sie vermutlich wenig strukturiert und sehr anfällig für Proteasen ist (Campbell *et al.*, 2002). Weiterhin ist der Linker zwischen den Regionen 1 und 2 bei σ^{70} sehr lang. Die Region 1 von σ^{38} ist dagegen stark verkürzt und besitzt einen wesentlich kürzeren Linker (Colland *et al.*, 2002).

Gerade die Regionen 2 und 4 sind innerhalb der σ^{70} -Familie hoch konserviert und zeigen deshalb große Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen und den Funktionen. Die Region 4.2 bindet mittels einem *helix-turn-helix* Motiv an die -35 Promotorregion. Aminosäurereste der Regionen 2 und 3 vermitteln die Bindung an die -10 Promotorregion und sind an der Aufschmelzung der DNA-Doppelhelix beteiligt. Dabei sind Aminosäuren in der Region 3.1 für die Erkennung von konservierten TG Motiven in extended -10 Promotoren verantwortlich, während die Regionen 2.3 und 2.4 mit der -10 Promotorregion interagieren. Für die Sigmafaktor Bindung an das Coreenzym sind dagegen die Regionen 2.1 und 3.2 von Bedeutung.

Für σ^{70} wurden in den letzten Jahren die Regionen bestimmt, die mit Rsd interagieren. So haben Patikoglou *et al.*, 2007 die Kristallstruktur von Rsd, gebunden an die Region 4 von σ^{70} , aufgeklärt. Weiterhin fanden Yuan *et al.*, 2008 mittels dem *twohybrid*-System *in vivo* eine gleichzeitige Bindung von Rsd an Region 2 und 4. Das bedeutet, Rsd bindet an die Regionen, die für die Interaktion des Sigmafaktors mit der DNA und dem Coreenzym der Polymerase verantwortlich sind. Dadurch, dass gebundenes Rsd mit der Bindung von σ^{70} an die β-Untereinheit des Coreenzyms sowie der -35 Region des Promotors interferiert, kann die Bildung des Holoenzyms effektiv verhindert werden (Abbildung 3.2). Gleichzeitig sind dies die Regionen mit der größten Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Deshalb ist eine Bindung von Rsd an σ^{38} , zumindest *in vitro*, möglich. Weiterhin wäre eine Bindung von Rsd an die anderen Mitglieder der σ^{70} -Familie theoretisch möglich (σ^{19} , σ^{24} , σ^{28} , σ^{32}), denn auch diese enthalten die Regionen 2 und 4. Dagegen haben σ^{70} und σ^{38} die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, dies könnte auch ein Grund für die Kreuzerkennung der Promotoren durch diese Holoenzyme sein.

In bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Ishihama, die ein Gemisch bestehend aus den Sigmafaktoren σ^{70} , σ^{54} , σ^{38} , σ^{24} , σ^{28} , σ^{32} verwendeten, wurde nur eine Bindung an σ^{70} gefunden (Jishage und Ishihama (1998). Dass nur ein Komplex von Rsd- σ^{70} isoliert wurde, ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Affinitäten der Sigmafaktoren zu Rsd zurückzuführen. Zwar haben die Sigmafaktoren homologe Regionen, dennoch gibt es Unterschiede innerhalb dieser Bereiche. Schließlich erkennen die Sigmafaktoren verschiedene Promotorregionen, weiterhin binden sie mit einer geringeren Affinität an das Coreenzym als σ^{70} . Bei einem Gemisch aus mehren Sigmafaktoren bindet Rsd an den Sigmafaktor mit der höchsten Affinität, an σ^{70} . In vivo nehmen wahrscheinlich noch weitere Faktoren auf die Sigmafaktorspezifität von Rsd Einfluss.



Abbildung 3.2: Rsd verhindert sterisch die Bindung des Coreenzym und der -35 Region an die Region 4 von σ^{70} . Gezeigt ist der σ^{70}_{4} -Rsd-Komplex als *backbone*-Modell (Rsd in grün, σ^{70}_{4} in orange). Die Position der β -flap-tip (*T. aquaticus* RNAP β -Untereinheit Bereich 759-588, entsprechen dem *E. coli* RNAP β -Untereinheit Bereich 887-916; cyan) im RNAP Holoenzym ist überlagert. Ebenfalls überlagert wurde die Position der -35 Region, die mit σ^{70} Region 4.2 interagiert. Rsd kollidiert sterisch sowohl mit der β -flap als auch mit der -35 Region (Patikoglou *et al.*, 2007).

3.3 Funktion von Rsd

3.3.1 Funktionsstudien mittels in vitro Transkriptionen

Nachdem der Einfluss von Rsd auf die Bindung der Polymerase Holoenzyme an Promotoren untersucht wurde, folgten *in vitro* Transkriptionsstudien. Bei dieser Methode wird nicht nur die Promotorbindung, sondern auch die Transkription der Holoenzyme analysiert. Damit kommt diese Methode den natürlichen Gegebenheiten in der Zelle näher als die reinen Bindungsstudien.

Bei den zuerst durchgeführten *pseudo single round in vitro* Transkriptionen, werden nur die Transkripte des Initiationskomplexes sichtbar (Hsu, 1996). Damit steht die Methode mit ihrer Aussagekraft zwischen den Bindungsstudien und den *multiple round in vitro* Transkriptionen. Dabei konnte für die Rsd-Wirkung ein erster Unterschied zwischen den Holoenzymen festgestellt werden (Abbildung 2.10). Für das $E\sigma^{70}$ Holoenzym zeigte sich eine Inhibierung der Transkription bereits bei niedrigen Rsd-Konzentrationen. Die Transkription des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms blieb dabei bis zu einer Rsd-Konzentration von 1,2 μ M konstant und nahm erst bei einer weiteren Erhöhung der Rsd-Konzentration ab. Im Rsd-Bereich von 0,06 bis 1,2 μ M konnten also Unterschiede zwischen den Holoenzymen beobachtet werden, danach zeigte sich für beide Holoenzyme eine identische Inhibierungsrate. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der physiologische Bereich von Rsd wahrscheinlich bei 0,06 bis 1,2 μ M liegt. Die höheren Rsd-Konzentrationen könnten zu unspezifischen Inhibierungen führen.

Auffällig waren die Unterschiede in den Transkriptionsraten zwischen den Nullwerten und den Proben mit Rsd. Beim $E\sigma^{70}$ Holoenzym war die Transkriptionsrate der Nullprobe zu niedrig, während beim $E\sigma^{38}$ Holoenzym die Transkriptionsrate zu hoch war. Da dieses Phänomen bei vier von fünf Transkriptionen zu beobachten war scheint es sich um ein systematisches Problem zu handeln. Die Nullprobe enthält den Rsd-Puffer ohne Proteine, also ohne Rsd aber auch ohne die Protease-Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin A. Ob sie einen Einfluss auf die Aktivität der Holoenzyme haben ist unklar. Eine weitere Möglichkeit ist, dass mit Rsd ein weiteres Protein in geringer Konzentration aufgereinigt wurde, welches eine differenzielle Wirkung auf die Polymerasen hat. Allerdings konnte dieses Phänomen nur bei den *pseudo single round in vitro* Transkriptionen beobachtet werden. Weder bei den Retardierungsanalysen noch bei den *multiple round in vitro* Transkriptionen trat dieses Problem auf.

3.3.2 Bedeutung der Promotorstärke für den Einfluss von Rsd auf die Transkription

Bei den sich anschließenden *multiple round in vitro* Transkriptionen wurde ein Multipromotor-Vektor verwendet. Dieser enthält die σ^{70} -abhängigen Promotoren *tac, rrnB* P1 und den schwachen *bolA2* sowie den σ^{38} -abhängigen *bolA1*-Promotor und den Promotor der RNA1, der unter den getesteten Bedingungen von beiden Holoenzymen genutzt wurde. Dieser Vektor bietet einige Vorteile gegenüber den sonst üblichen Einzelpromotorstudien. Erstens können beide Holoenzyme dieses Plasmid nutzen, dadurch werden Fehlerquellen wie unterschiedliche DNA-Konformationen und Salzgehalt der DNA ausgeschlossenen. Zweitens kommt es zu einem Wettbewerb der Promotoren um die Bindung der Polymerasen. Dies kommt einem natürlichen System näher und ermöglicht es Promotorstärken in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Generell zeigte sich, je näher die Versuche den natürlichen Bedingungen kamen, desto deutlicher wurden die Unterschiede zwischen den Holoenzymen, weiterhin nahm die Spezifität von Rsd zu (Abbildung 2.11).

Das E σ^{70} Holoenzym transkribierte nur die σ^{70} -abhängigen Promotoren, nicht jedoch den σ^{38} -abhängigen *bolA1*- bzw. den schwachen *bolA2*-Promotor. Dabei spiegelten die Transkriptmengen die Promotorstärken wieder. Bemerkenswert war, dass die Transkription des E σ^{70} Holoenzyms nicht vollständig inhibiert werden konnte. Bereits bei 250 nM Rsd war die maximale Inhibierung erreicht. Dabei hatte der *tac*-Promotor noch 60% Restaktivität, die RNA1 noch 40% und der *rrnB* P1 noch 30%. Die Restaktivität entspricht ungefähr den Promotorstärken. Der synthetische *tac* ist der stärkste Promotor. Der *rrnB* P1 ist ebenfalls ein starker Promotor, allerdings wird er im Gegensatz zur RNA1 stark reguliert.

Das $E\sigma^{38}$ Holoenzym wurde unter den getesteten Bedingungen gar nicht durch Rsd inhibiert. Neben dem σ^{38} -abhängigen *bolA1*-Promotor erkannte das $E\sigma^{38}$ Holoenzym auch den *tac*-Promotor, den *rrnB* P1 und den Promotor der *RNA*1. Allerdings war die Transkription des *rrnB* P1-Promotors am schwächsten, doch selbst diese wurde durch Rsd nicht beeinflusst.

Bei der Sigmakompetition konnte erstmalig *in vitro* gezeigt werden, dass Rsd die Transkription des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms inhibiert und gleichzeitig die Transkription des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms gefördert wird (Abbildungen 2.13 & 2.14).

3.3.3 Die Modulation der Rsd-Aktivität

Bei einem Vergleich der Polymerase-Bindungsstudien und der *in vitro* Transkriptionen ergeben sich die Fragen, warum bei den Retardierungsstudien die Promotorbindung beider Holoenzyme durch Rsd inhibiert wurde, bei den *multiple round in vitro* Transkriptionen jedoch nur die Transkription des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms? Weiterhin unterschieden sich die Stärken der Inhibierungen deutlich. Bei den Bindungsstudien wurden die Polymerase-Promotor-Komplexe vollständig inhibiert, während bei den *in vitro* Transkriptionen das $E\sigma^{70}$ Holoenzyms noch Restaktivität besaß.

Die Abweichungen lassen sich zum Teil mit den Unterschieden der Systeme erklären. Bei den Bindungsstudien wurde nur der Einfluss von Rsd auf die Promotorbindung betrachtet, dazu wurden die ersten beiden Start-NTPs mit in den Ansatz gegeben, um die Bildung des offenen Komplexes zu fördern. Gleichzeitig wurde der geschlossene Komplex durch die Zugabe von Heparin destabilisiert. Da der Weg vom geschlossenen Komplex zum offenen Komplex reversible ist, hat Heparin auch indirekt Einfluss auf die Stabilität des offenen Komplexes. Bei den *multiple round in vitro* Transkriptionen wurde Heparin erst zum Beenden der Transkription zugegeben. Dadurch konnte der Übergang vom geschlossenen zum offenen Komplex und schließlich zum Elongationskomplex ungestört erfolgen. Weiterhin befanden sich alle vier NTPs im Ansatz, auch dies hat eine stabilisierende Wirkung auf die Isomerisation zum Elongationskomplex. Bei den Bindungsstudien und den pseudo single round in vitro Transkriptionen sind dagegen nur die ersten zwei bis drei Start-NTPs im Ansatz. Dabei kann es zur Bildung abortiver Produkte kommen. Die Polymerase startet die Transkription durch den Einbau der ersten NTPs, kommt jedoch nicht weiter, da das dritte und vierte NTP fehlen. Dies resultiert in einer wiederholten Initiation unter Freisetzung abortiver Produkte. Auch dies kann eine destabilisierende Wirkung auf den Polymerase-Promotor-Komplex haben. Zusätzlich wurden die Bindungsstudien mit DNA-Fragmenten durchgeführt und die in vitro Transkriptionen mit superhelikalen Plasmiden. Komplexe mit superhelikaler DNA sind jedoch stabiler, da durch die Drehung der DNA die -10 und -35 Promotorregionen in einem anderen Winkel zueinander liegen und dadurch besser von der Polymerase gebunden werden können. Zudem erleichtert die superhelikale Spannung das Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges. Die oben aufgeführten Punkte tragen zu einer Destabilisierung der Polymerase-Promotor-Komplexe bei und können dadurch die Wirkung von Rsd verstärken.
Dass bei der Sigmakompetition das $E\sigma^{70}$ Holoenzym inhibiert wird und nicht das $E\sigma^{38}$ Holoenzym, lässt sich durch die unterschiedlichen Affinitäten von Rsd zu den Sigmafaktoren erklären. Die Affinität von Rsd zu σ^{70} ist höher als die Affinität zu σ^{38} . Dadurch wird die Bindung von σ^{38} zum Coreenzym begünstigt.

Die Affinität von Rsd zu σ^{70} kann jedoch moduliert werden, so bindet Rsd in der exponentiellen Phase schlechter an σ^{70} als in der stationären Phase (Piper *et al.*, 2009).

Worin diese Unterschiede begründet sind, ist noch unklar. Vielleicht braucht Rsd einen weiteren Faktor der entweder in der stationären Phase aktivierend oder in der exponentiellen Phase inhibierend wirkt.

Hinweise auf eine mögliche Modulation der Rsd-Aktivität lassen sich in der 3D-Struktur des Proteins finden. Bei der Strukturaufklärung wurde eine kleine Höhle gefunden, die ins innere des Rsd-Moleküls ragt und in der Nähe der Aminosäuren liegt, die mit der Region 4 von σ^{70} interagieren (Abbildung 3.3). Es wird vermutet, dass diese Höhle Zielpunkt eines kleinen Effektors ist, welcher die Aktivität von Rsd regulieren kann (Patikoglou et al., 2007). Da es starke Unterschiede in der Rsd-Wirkung zwischen den Retardierungsstudien und den in vitro Transkriptionen gibt, könnte vielleicht der Nukleotid-Spiegel entscheidend für die Aktivität von Rsd sein. In der exponentiellen Phase ist die Nukleotid-Konzentration in der Zelle hoch und die Aktivität von Rsd niedrig, in der stationären Phase ist es umgekehrt. Die Regulation eines Transkriptionsfaktors durch den Nukleotid-Spiegel ist nicht ungewöhnlich und wurde bereits für die 6S RNA beschrieben (Wassarman & Saecker, 2006). Eine weitere Möglichkeit wäre die Bildung von inaktiven Rsd-Dimeren bei einer hohen Rsd-Konzentration. Für diese Überlegung spricht, dass in vitro die Bildung von Dimeren beobachtet werden konnte. In vivo konnten dagegen bisher noch keine Rsd-Dimere nachgewiesen werden (Ilag et al., 2004; Piper et al., 2009).



Abbildung 3.3: Netzwerk konservierter Aminosäuren in Rsd. Gezeigt sind zwei Ansichten des σ^{70}_4 -Rsd-Komplexes. Die σ^{70} Region 4 ist orange, Rsd in grau dargestellt. Die Seitenketten von 13 hoch konservierten Aminosäuren in Rsd sind gezeigt (Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Kohlenstoffe magenta). Die Aminosäuren, die direkt mit σ^{70}_4 interagieren (Asp63, Ser66 und Phe70) sind rot markiert. Links sind die Oberflächen der van der Waals Bereiche der konservierten Aminosäuren dargestellt. Rechts ist der Querschnitt durch Rsd gezeigt, entsprechend der gestrichelten Linie in der linken Ansicht. Die Oberfläche des Rsd-Moleküls ist in grau angedeutet. Die drei Einbuchtungen im Rsd-Molekül sind markiert (I, II und III). Die Höhle III reicht tief ins Rsd-Molekül bis in das Netzwerk der konservierten Aminosäuren hinein und liegt nahe an den Aminosäuren, die mit σ^{70}_4 interagieren. H1 bis H5 bezeichnen die fünf α -Helices, welche die Rsd-Struktur bilden (verändert nach Patikoglou *et al.*, 2007).

3.3.4 Funktion von Rsd in vivo

Nachdem der Einfluss von Rsd auf σ^{70} - und σ^{38} -abhängige Systeme *in vitro* untersucht wurde, wurde die Wirkung von Rsd auf entsprechende Promotoren *in vivo* betrachtet (Abbildung 2.27). Dazu wurden mittels Primer-Extension die mRNA-Spiegel exemplarischer Promotoren analysiert. Dabei wurden die Expressionsraten eines *rsd*⁻-Stammes mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen. In der Rsd⁻-Mutante zeigten sich in der stationären Phase deutlich erniedrigte Expressionsraten der σ^{38} abhängigen Promotoren *bolA1* und *fic*P. In der exponentiellen Phase waren diese Promotoren nicht aktiv. Die Expressionsraten der ribosomalen Promotoren zeigten keine Veränderung zwischen den Stämmen, d. h. *in vivo* hat Rsd keinen Einfluss auf die Expression der starken ribosomalen Promotoren. Zusätzlich wurden die Promotoraktivitäten des *ssrS*-Gens untersucht. Das *ssrS*-Gen kodiert für die 6S RNA, einem Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeiten in der Expression und Funktion zu Rsd. Auch für diese Promotoren konnte kein Einfluss von Rsd auf die Expressionsraten gefunden werden.

Nur für den *rho*L-Promotor konnte eine veränderte Transkriptionsrate in der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Eigentlich wird das *Leaderpeptid* des Terminationsfaktors Rho konstitutiv exprimiert und sollte deshalb als interner Standard verwendet werden. Doch in der logarithmischen Phase zeigte sich eine erniedrigte Aktivität des *rho*L-Promotors in der Rsd⁻-Mutante. Ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt von Rsd handelt, ist nicht bekannt. Bisher gibt es keine Daten zur Funktion von Rsd in der logarithmischen Phase. Deshalb ist es schwierig diesen Befund zu interpretieren.

Der Rho-Faktor verbindet Transkription und Translation miteinander. Die Transkription effizient translatierter mRNA kann nicht durch Rho terminiert werden, da die *rut-sites* (*Rho utilization sites*) auf der mRNA von Polysomen besetzt sind. Erst wenn sich die Bedingungen ändern und die Translationsraten geringer werden, kann Rho an freie Erkennungsstellen binden und die Transkription terminieren (Wagner, 2000).

Inwiefern die Aktivierung der Synthese des Rho-*Leaderpeptids* durch Rsd dabei eine Rolle spielt, ist unklar. Allerdings wurde bei *in vivo* Experimenten eine Bindung von Rsd an das ribosomale Protein S20 gefunden (Arifuzzaman *et al.*, 2006). S20 gehört zur Gruppe der primär bindenden ribosomalen Proteine. Diese Proteine sind für die Assemblierung der 30S Untereinheit essentiell. Sie lagern sich als erstes an die ribosomale 16S RNA an und generieren dadurch Bindungsmotive, die von den sekundären ribosomalen Proteinen erkannt werden. Diese sind wiederum wichtig für die Anlagerung der tertiären ribosomalen Proteine (Hamacher *et al.*, 2006; Holmes & Culver, 2005).

Es gibt bis jetzt jedoch noch keine Hinweise, ob und in welcher Art Rsd die Aktivität von S20 beeinflusst. Da in Bakterien Transkription und Translation eng miteinander verknüpft sind, ist eine Einflussnahme von Rsd auf die Translation nicht abwegig. Auch andere Transkriptionsfaktoren, wie ppGpp, DksA und die 6S RNA stehen in Beziehung zur Translation oder es gibt zumindest Hinweise darauf (Rutherford *et al.*, 2009; Neußer *et al.*, 2010).

Für Rsd konnten weiterhin Bindungen zu Proteinen detektiert werden, die im Zell-Metabolismus involviert sind. Wie z.B. das NrdI-Protein und das hypothetische Protein YraR, beide sind am Nukleotidstoffwechsel beteiligt. Zusätzlich wurden Interaktionen mit einer Komponente des Schwefelmetabolismus (UcpA), dem Membran assoziierten HemG und dem Chaperon Hsp31 gefunden (Arifuzzaman *et al.,* 2006). Ob es sich dabei stets um spezifische Bindungen handelt, müssen zukünftige Untersuchungen klären.

Die Primäre Funktion von Rsd ist sicherlich die indirekte Aktivierung von σ^{38} abhängigen Promotoren in der stationären Phase. Für eine Inhibierung von σ^{70} abhängigen Promotoren gibt es dagegen keine direkten Hinweise (Mitchell *et al.*, 2007; diese Arbeit). Bis jetzt kann nur darüber spekuliert werden, welche weiteren Aufgaben Rsd in der Zelle erfüllt. Die Hinweise auf eine Verbindung zur Translation und die mögliche Rolle des Nukleotidstoffwechsels sprechen jedoch für potentielle weitere Funktionen.

3.4 Regulation der *rsd*-Expression

Neben der Funktion von Rsd, war besonders die Regulation des rsd-Expression von Interesse, die bisher nur in Ansätzen untersucht worden war. Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, dass Rsd erst mit dem Eintritt in die stationäre Phase oder durch plötzlich auftretenden Stress synthetisiert wird (Jishage & Ishihama, 1999). Jedoch konnten Piper, et al., (2009) zeigen, dass der rsd P2 Promotor bereits in der logarithmischen Phase aktiv und darüber hinaus Rsd-Protein in den Zellen nachweisbar ist. Dabei erreichte die Rsd-Konzentration in der logarithmischen Phase ca. 5,5 μ M und stieg in der stationären Phase auf ca. 10,4 μ M an. Im Vergleich dazu hat σ^{70} eine Konzentration von ca. 12 μ M, konstant über die Phasen verteilt. Der alternative Sigmafaktor σ^{38} konnte in exponentiellen Zellen nicht detektiert werden, erreicht allerdings in der stationären Phase eine Konzentration von ca. 2,7 µM. Die Konzentration des Coreenzyms ist in der Zelle konstant bei ca. 4,3 μ M, unabhängig von der Wachstumsphase. Allerdings liegt das meiste Coreenzym als Elongationskomplex an die DNA gebunden vor und steht deshalb für eine Sigmabindung nicht zur Verfügung (Zhang et al., 2002). Dadurch konkurrieren die Sigmafaktoren um die Bindung an das freie Coreenzym.

3.4.1 Ist die rsd-Expression abhängig von der Wachstumsrate?

In früheren Experimenten gab es Hinweise auf eine Abhängigkeit der Rsd-Synthese von der Wachstumsrate (Jishage & Ishihama, 1999). In späteren Analysen wurde dieser Befund jedoch zunehmend revidiert (Piper *et al.*, 2009). Neuste Untersuchungen zeigten, dass Rsd bereits in der exponentiellen Phase in signifikanter Konzentration in der Zelle zu finden ist. Unbestritten ist jedoch die Zunahme der Rsd-Menge in der Zelle über die Wachstumsphase. Dies kann sowohl über eine vermehrte Synthese durch Aktivierung des *rsd* Promotors in der stationären Phase als auch durch eine Akkumulation von Rsd bei konstanter Transkription in der Zelle erfolgen. Vorausgesetzt das Rsd-Protein ist metabolisch stabil.

Die *rsd*-Promotorregion besteht aus einem starken σ^{70} -abhängigen (P2) und einem schwächeren σ^{38} -abhängigen Promotor (P1). Der σ^{70} -abhängige P2 Promotor ist bereits in der exponentiellen Phase aktiv, während der P2 Promotor erst in der stationären Phase die Transkription aufnimmt.

Um die Bedeutung der Wachstumsrate für die Promotoraktivitäten zu erfassen, wurde die Wachstumsrate der Zellen durch die Qualität der Wachstumsmedien modifiziert (Abbildung 2.25). Dabei zeigte sich eine konstitutive Expression des *rsd* P2 Promotors, die von der Wachstumsrate nicht beeinflusst wurde. Dagegen zeigte der *rsd* P1 Promotor eine verstärkte Aktivität bei verringerter Wachstumsrate. Neben der Wachstumsrate zeigte auch der Gebrauch von Glycerin, als alternative Kohlenstoffquelle, eine aktivierende Wirkung auf den *rsd* P1 Promotor. Es ist möglich, dass Glycerin einen Einfluss auf den Fettsäurestoffwechsel der Zelle hat. Dieser steht wiederum in Verbindung mit dem globalen Regulator ppGpp.

Da bei einer niedrigen Wachstumsrate die Expression von σ^{38} zunimmt ist eine Aktivierung des *rsd* P1 Promotors, dessen Aktivität an die σ^{38} -Konzentration gekoppelt ist, bei einer niedrigen Wachstumsrate nicht ungewöhnlich (Jishage & Ishihama, 1999; Piper *et al.*, 2009).

3.4.2 Einfluss der Nucleoid-assoziierten Transkriptionsfaktoren auf die Expression des *rsd*-Gens *in vivo* und *in vitro*

Mit Hilfe von Retardierungsanalysen und DNaseI-Footprints wurde die Bindung der NAPs: H-NS, StpA, LRP und FIS an die rsd-Promotorregion untersucht (Abbildungen 2.17-2.19). Dabei wurde eine Bindung von H-NS und StpA verstärkt im Bereich des P2 Promotors gefunden. Dagegen bindet FIS im Bereich des P1 Promotors. Weiterhin binden LRP und StpA downstream des P2 Promotors im rsd-Gen. Im upstream-Bereich des rsd-Promotors, wo eine potentielle UAS lokalisiert wäre, konnte dagegen nur eine sehr schwache Bindung von LRP bei hohen Konzentrationen, sowie eine Bindung von FIS gefunden werden. Allerdings bindet FIS ab einer Konzentration von 2 μ M unspezifisch alle 50 bp an die DNA (Skoko *et al.*, 2006). Generell binden die untersuchten NAPs bei hohen Konzentrationen unspezifisch an die DNA. Deshalb wurden zur Kontrolle auch Bindungsstudien mit dem Avall-Fragment durchgeführt. Dieses Fragment ist ungekrümmt, enthält keinen Promotor und wurde bereits vorher als Kontrolle verwendet (Neußer, 2008). Bei den hier durchgeführten Studien wurden die gleichen Proteinkonzentrationen wie bei den rsd-Fragmenten verwendet. Dabei konnte nur eine Bindung von FIS (2 μ M) an das Fragment gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Da beim rsd-Fragment bereits eine FIS-Bindung bei einer Konzentration von $0.5 \,\mu$ M beobachtet werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich um eine spezifische Bindung.

Die Bindung des *Leucine-responsive regulatory protein* (LRP) wurde zusätzlich noch auf den Einfluss der Aminosäure Leucin hin untersucht. Die Aktivität von LRP hinsichtlich der DNA Affinität wird durch Leucin moduliert (Chen *et al.*, 2002; Pul & Wagner, 2007). Am *rsd*-Fragment konnte eine Inhibierung der LRP-Bindung durch Leucin detektiert werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine vom Nährstoffangebot abhängige Bindung von LRP an das *rsd*-Gen sein. Bei einem verschlechterten Angebot an Nährstoffen und damit weniger Leucin, bindet LRP. Sobald das Nährstoffangebot besser wird, steigt die Leucin-Konzentration in der Zelle und die Bindung von LRP wird aufgehoben. Dies würde bedeuten, dass LRP bevorzugt in der stationären Wachstumsphase an das *rsd*-Gen assoziiert wäre. Allerdings konnte bei den *in vivo* Analysen, weder in der logarithmischen noch in der stationären Wachstumsphase, eine LRP-abhängige Modulation der *rsd*-Expression beobachtet werden. Die zusätzlich durchgeführten Retardierungsstudien, bei denen die Bindung der Polymerasen an die *rsd*-Promotoren in der Gegenwart der NAPs untersucht wurden, brachten keine weiteren Erkenntnisse (Daten nicht gezeigt). Sowohl die gleichzeitige Zugabe der der NAPs und der Polymerase zur DNA als auch die Vorinkubation der DNA mit Polymerase und die spätere Zugebe der NAPs führte bei allen getesteten Bedingungen zu einer verringerten Bindung der Polymerasen an die *rsd*-Promotoren. Ob dies spezifische Inhibierungen der Polymerasebindungen sind, oder Effekte wie *molecular crowding* eine Rolle spielen ist unklar (Zimmerman & Minton, 1993).

3.4.3 Einfluss der DNA-Methylierung auf die NAP-Bindung

Wie in Abbildung 2.22 gezeigt, spielt der Methylierungszustand der GATC-Sites innerhalb der *rsd*-Promotorregion für die NAP-Bindungen keine Rolle. Allerdings könnte die Bindung der NAPs die Methylierung der GATC-Sites inhibieren. Durch die Blockierung von Methylierungsstellen ist LRP z. B. an der Synthese der Pap-Pili bei uropathogenen Bakterien beteiligt (Hernday et al., 2004). Zwar überlappen die gefundenen LRP-Bindestellen nicht mit den Methylierungsstellen, dafür aber die von H-NS und StpA. Ahnlich wie für LRP konnte auch für StpA unter den getesteten Bedingungen kein Einfluss auf die Aktivität der *rsd*-Promotoren gefunden werden. Im Gegensatz dazu haben sowohl H-NS als auch FIS, in der stationären Phase, eine inhibierende Wirkung auf die Expression der *rsd*-Promotoren. Für H-NS wurde eine ungewöhnliche De-repression des *finP*-Gens durch die DNA-Methylierung entdeckt. Das Produkt des *finP*-Gens, eine antisense RNA, ist an der Regulation des konjugativen Transfers von Virulenz-Plasmiden bei Salmonella beteiligt. Die Methylierung der GATC-Sites verhindert die Inhibierung des *finP*-Gens durch H-NS, dabei wird die Bindung von H-NS an die DNA nicht durch den Zustand der Methylierung moduliert. Der Einfluss der Methylierung auf die Expression des *finP*-Gens ist also nicht lokal, sondern resultiert eher in einer Umorganisation des Nucleoids in einem Dam⁻-Stamm (Low & Casadesús, 2008). Ahnlich wie für das *finP*-Gen wird auch die Expression von Rsd durch die Methylierung der DNA gefördert. Ob für das *rsd*-Gen ein ähnlicher Mechanismus existiert, müssen jedoch zukünftige Untersuchungen klären.

3.4.4 Wie beeinflusst die DNA-Methylierung die rsd-Expression?

Da die RNAP-Holoenzyme besser an die *rsd*-Promotoren binden, wenn die DNA methyliert ist, könnte eine Regulation der Transkription durchaus abhängig von den Methylgruppen sein. Die Tatsache, dass auch *in vivo* eine stärkere Promotoraktivität bei methylierter DNA gefunden wurde, unterstreicht diese Theorie (Abbildungen 2.23 & 2.26).

Einen Einfluss der Methylgruppen auf die Konformation der DNA konnte dagegen nicht gefunden werden (Abbildung 2.21). Da die GATC-Sites zwischen den Promotoren und damit in dem DNA-Bereich liegen, der von den Polymerasen gebunden wird, könnte auch ein direkter Kontakt der Methylgruppen mit der RNAP für eine stabile Promotor-Bindung von Bedeutung sein.

Darüber hinaus sind die GATC-Sites Erkennungsstellen für weitere Proteine wie SeqA, DpnI, DpnII und MutH. Zusätzlich ist die GATC-Site Bestandteil der Erkennungssequenzen von zwei globalen Regulatoren, Fnr (*fumarate nitrate reduction*) und CRP (*catabolite regulator protein*). Diese können die Dam-Methylierung von GATC-Sites verhindern (Marinus & Casadesus, 2009; Oshima *et al.*, 2002). Für die *rsd*-Promotorregion konnten bei einem Sequenzvergleich jedoch keine putativen Bindestellen für Fnr und CRP gefunden werden. Inwieweit die anderen Effektoren die Transkription des *rsd*-Gens modulieren, wurde bisher nicht untersucht. Die Dam-Methylierung erfolgt nach der Replikation am neu synthetisierten Strang. Direkt nach der Replikation liegt die DNA kurzzeitig in einer hemi-methylierten Form vor. Dadurch ist die Transkription von methylierungssensitiven Promotoren mit dem Zellzyklus verknüpft. Die Transkriptionsrate des *rsd*-Gens bei hemi-methylierter DNA wurde bisher nicht untersucht. Denkbar ist, dass die *rsd*-Expression direkt nach der Replikation erniedrigt ist und Rsd erst verstärkt exprimiert wird, wenn die DNA in der späten logarithmischen Phase vollständig methyliert ist.

3.4.5 Einfluss der Polymerase-assoziierten Transkriptionsfaktoren auf die Expression des *rsd*-Gens *in vivo* und *in vitro*

Neben den NAPs wurde auch der Einfluss von Transkriptionsfaktoren untersucht, die nicht mit der DNA, sondern direkt mit der RNA-Polymerase interagieren. Dazu zählen ppGpp und DksA, die Vermittler der Stringenten Kontrolle, sowie die 6S RNA. Diese regulatorische RNA inhibiert ähnlich wie Rsd die Transkription des Eo⁷⁰ Holoenzyms *in vivo* und *in vitro* (Wassarman & Storz, 2000; Gildehaus *et al.*, 2007). Allerdings unterliegt die 6S RNA-vermittelte Inhibierung einem anderen Mechanismus als die Inhibierung durch Rsd (Wurm *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde der Bedeutung des Sigmafaktors σ^{38} auf die Rsd-Expression *in vivo* untersucht.

3.4.6 Wird die Transkription von *rsd* stringent reguliert?

Die Stringente Kontrolle ist eines der schnellsten und wichtigsten Netzwerke in Bakterien. Vermittelt wird sie durch das Effektor Nukleotid Guanosin 3',5'bis(diphosphat), abgekürzt ppGpp (Cashel and Rudd, 1987; Wagner, 2010). Dieses ungewöhnliche Nukleotid ist in Bakterien weit verbreitet und existiert auch in Chloroplasten, die von Bakterien abstammen (Takahashi et al., 2004). Zusammen mit seinem Kofaktor DksA, der nicht ganz so weit verbreitet ist, greift ppGpp in die Genexpression ein und führt zu einer umfassenden Anderung des Transkriptionsmusters. Vor allem ribosomale Promotoren sowie fast alle tRNA-Promotoren werden dabei inhibiert, während Regulons welche die Aminosäuresynthese kontrollieren, aktiviert werden. Auch die Synthese von σ^{38} , die einem sehr komplizierten Mechanismus unterliegt, wird durch ppGpp aktiviert (Murray *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2005; Lange et al., 1995). Da Rsd als Antisigmafaktor an der Stressantwort beteiligt ist, könnte die *rsd*-Expression auch positiv stringent reguliert werden. Ein Hinweis darauf ist, dass Rsd invers zur Wachstumsphase exprimiert wird. Gene die invers zur Wachstumsphase exprimiert werden sind häufig unter positiver Kontrolle von ppGpp (Jishage & Ishihama, 1999). Andererseits ist Rsd nicht an der Aminosäuresynthese beteiligt.

Bei den *in vivo* Untersuchungen wurde ein Einfluss des ansteigenden ppGpp-Levels im Rahmen der stringenten Kontrolle auf die Expression der *rsd*-Promotoren gefunden (Abbildung 2.26). Während im Wildtyp die Expression beider *rsd*-Promotoren nach dem Auslösen der Stringenten Kontrolle verdoppelt wurde, blieben die Transkriptionsraten im *relA*⁻-Stamm gleich. Die *rsd*-Expression wird also durch den Effektor ppGpp aktiviert. Bei den durchgeführten *in vitro* Transkriptionen hatte ppGpp alleine jedoch keinen Einfluss auf die Transkription des *rsd* P2 Promotors (Abbildung 2.28). Allerdings sind Unterschiede der ppGpp-Wirkung auf die Transkription von Promotoren *in vivo* und *in vitro* bereits vorher beschrieben worden. Erst durch die Entdeckung des Koaktivators DksA konnten diese Unterschiede für die ribosomalen Promotoren in Einklang gebracht werden (Murray et al., 2003). Im Gegensatz zum relA⁻-Stamm sind die rsd-Promotoren in der stationären Phase in einem *dksA*⁻-Stamm dereprimiert. Offenbar hat DksA alleine einen differenzierten Effekt auf die *rsd*-Expression. Bei den durchgeführten *in vitro* Studien wurde dagegen eine deutliche Aktivierung des rsd P1 Promotors beobachtet, während die Transkription des *rsd* P2 Promotors nicht tangiert wurde (Abbildungen 2.26 & 2.28). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der in vivo und in vitro Studien für DksA gegensätzlich sind, jedoch waren beide Effekte stark ausgeprägt. Eine Regulation der *rsd*-Expression durch DksA ist daher wahrscheinlich. Ob DksA alleine oder nur in Kombination mit ppGpp wirkt, bleibt jedoch unklar. Wurden beide Effektoren in vitro auf die rsd-Transkription getestet, zeigte sich keine differenzielle Regulation der rsd-Promotoren. In vitro gibt es also keinen Hinweis auf eine Stringente Kontrolle der rsd-Expression. Die in vivo gefundene Aktivierung der rsd-Expression kann auch indirekt sein. Viele Promotoren, die positiv Stringent reguliert werden, sind schwache Promotoren, die von einer Umverteilung der Polymerase profitieren. Gerade durch die Inhibierung der ribosomalen Promotoren werden viele Polymerasen freigesetzt, die dann für die Transkription anderer Promotoren zur Verfügung stehen (Barker et al., 2001).



Abbildung 3.4: Zusammenfassung der Primer-Extension Ergebnisse. Gezeigt sind die positiven bzw. negativen Einflüsse der untersuchten Effektoren auf die Regulation des *rsd*-Gens in der stationären Phase. Keine Einflussnahme wurden für StpA, LRP und die 6S RNA gefunden. Nicht alle gezeigten Trends konnten *in vitro* bestätigt werden (ppGpp & DksA), weiterhin ist ungeklärt, ob es sich um direkte oder indirekte Effekte handelt.

3.4.7 Einfluss von σ³⁸ auf die differenzielle Nutzung der *rsd*-Promotoren P1 und P2

Die bei den Primer-Extension Analysen gefundenen Auswirkungen der untersuchten Transkriptionsfaktoren unterschieden sich nicht nur in ihrer Stärke, sondern auch in der Art (Zusammengefasst in Abbildung 3.4). Es wurden aktivierende und inhibierende Effektoren gefunden. Hingegen war die Wirkung auf beide *rsd*-Promotoren stets gleich.

 $σ^{38}$ zeigte als einziger untersuchter Faktor *in vivo* eine differenzielle Regulation der *rsd*-Promotoren. Da $σ^{38}$ nur in der stationären Phase akkumuliert, wurden nur die Ergebnisse aus der stationären Phase berücksichtigt. Während die Transkription des $σ^{38}$ -abhängigen P1 Promotors in der *rpoS*⁻-Mutante verringert war, zeigte der P2-Promotor eine deutliche Aktivierung der Transkription (Abbildung 2.26). In *rpoS*⁻-Stämmen ist in der stationären Phase die Transkription von $σ^{38}$ -abhängigen Promotorren erniedrigt, während die Transkription von $σ^{70}$ -abhängigen Promotorren erniedrigt, während die Transkription von $σ^{70}$ -abhängigen Promotorstattfindet. Weil $σ^{38}$ fehlt und die Konzentration an $σ^{70}$ über die Wachstumsphase konstant bleibt, kann $σ^{70}$ bevorzugt an das Coreenzym binden. Dadurch sind die $σ^{70}$ abhängigen Promotoren im Vorteil. Der *rsd* P1 Promotor wird *in vitro* auch vom E $σ^{70}$ Holoenzym erkannt (Jishage & Ishihama, 1999) und ist vielleicht deshalb *in vivo* nicht vollständig inhibiert. Aufgrund der Tatsache, dass der *rsd* P2 Promotor ein $σ^{70}$ spezifischer Promotor ist, wurde dieser jedoch bevorzugt genutzt.

Für die verstärkte Nutzung des *rsd* P2 Promotors gibt es mehrere Gründe: einmal die Aufrechterhaltung der Rsd-Synthese in der stationären Phase und zum anderen der allgemeine Vorteil der σ^{70} -abhängigen Promotoren, wenn σ^{38} fehlt. Allerdings wird der P2 Promotor in der *rpoS*⁻-Mutante wesentlich stärker transkribiert, als die P1 und P2 Promotoren zusammen im Wildtyp. Der Grund dafür könnte eine σ^{38} -abhängige Inhibierung der Transkription des P2 Promotors sein. Denkbar wäre, dass durch die wiederholte Initiation der Transkription des E σ^{38} Holoenzyms am P1 Promotor der P2 Promotor von Elongationskomplexen besetzt ist und damit für eine Initiation durch das E σ^{70} Holoenzym nicht zur Verfügung steht. Es besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Bindung des E σ^{38} Holoenzyms die DNA-Topologie so verändert wird, dass das E σ^{70} Holoenzym nicht mehr am P2 Promotor initiiert. Startet das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, ändert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkription am P1 Promotor, andert sich bedingt durch das E σ^{38} Holoenzym die Transkriptierende RNA Polymerase nicht frei um die DNA rotieren kann, schiebt sie positive superhelikale DNA vor sich her und zieht negative su

perhelikale DNA hinter sich her (Wagner, 2000). Wenn sich das $E\sigma^{38}$ Holoenzym auf den P2 Promotor zu bewegt, befindet sich dieser in einem positiv superhelikalen DNA-Bereich. Die $E\sigma^{70}$ Polymerase bevorzugt für die P2-Promotorbindung jedoch negativ superspiralisierte DNA (Hengge-Aronis, 2002).

3.4.8 Autoregulation von Rsd

Ein weiterer Punkt, der untersucht wurde, war die Frage, ob die Expression von Rsd autoreguliert wird. Da Rsd als Antisigmafaktor die Transkription von Eo⁷⁰ Holoenzymen negativ beeinflusst, kann dies auch Auswirkungen auf den eigenen σ^{70} abhängigen P2 Promotor haben. Es wurde tatsächlich eine Derepression des P2 Promotors im *rsd*-Stamm gefunden. Bereits in der logarithmischen Phase zeigte sich eine schwache Aktivierung des Promotors. Dieser Effekt verstärkte sich beim Übergang in die stationäre Phase. Interessanterweise konnte auch für den σ^{38} -abhängigen P1 Promotor eine Aktivierung in der *rsd*⁻-Mutante gefunden werden (Abbildung 2.26). Bei den durchgeführten Retardierungsstudien wurde dagegen keine Inhibierung der Eo³⁸ Bindung an den P1 Promotor beobachtete, während für den P2 Promotor eine Rsd-abhängige Inhibierung sowohl der Polymerase Bindung als auch der Transkription durch das $E\sigma^{70}$ Holoenzym erfasst werden konnte (Abbildungen 2.23 & 2.28). Damit bestätigen die in vitro Studien zumindest für den P2 Promotor die gefundenen in vivo Daten. Rsd kann also die Expression seines eigenen Promotors regulieren und bei einem zu hohen Expressionsniveau die eigene Neusynthese inhibieren.

3.4.9 Welche Rolle spielt die 6S RNA für die *rsd*-Expression?

Die 6S RNA aus *E. coli* gehört zu den stabilen RNAs und akkumuliert über die Wachstumsphase. Die Struktur der 6S RNA ähnelt einem offenen Promotor, durch diese Promotor-Mimikry bindet die 6S RNA bevorzugt an $E\sigma^{70}$ Holoenzyme (Wassarman & Storz, 2000; Gildehaus *et al.*, 2007; Barrick *et al.*, 2005). Diese werden dadurch inaktiviert. Erst durch die Freisetzung der Polymerase bei einem verbesserten Nahrungsangebot kann diese wieder aktiv transkribieren. In einer früheren Studie wurde eine negative Regulation des *rsd* P2 Promotors durch die 6S RNA beschrieben. Dagegen wurde der P1 Promotor als unreguliert dargestellt (Trotochaud & Wassarman, 2004). Bei diesen Untersuchungen wurde mittels β-Galaktosidase-Assays der Einfluss der 6S RNA auf die Transkription mehrere Promotoren nach 18 h Wachstum untersucht. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Primer-Extension Reaktionen konnte dagegen kein Effekt der 6S RNA auf die Aktivität der *rsd*-Promotoren beobachtet werden (Abbildung 2.26). Allerdings wurden die Transkriptmengen in der frühen stationären Phase, nach ca. 3 h Wachstum, bestimmt. Deshalb sind die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar. Bei *in vitro* Transkriptionen konnte eine Inhibierung des isolierten σ^{70} -abhängigen P2 Promotors durch die 6S RNA detektiert werden (Trotochaud & Wassarman, 2004; diese Arbeit). Da die 6S RNA das $E\sigma^{70}$ Holoenzym durch seine Bindung inaktiviert, ist dies jedoch nicht überraschend. Die Inhibierung des *rsd* P2 Promotors ist etwas stärker als für die RNA1, allerdings ist der Promotor der RNA1 stärker als der *rsd* P2 Promotor (Abbildung 2.28). Damit gewinnt die RNA1 bei einer Kompetition um die verbleibenden Polymerasen.

Da durch die Inaktivierung des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms besonders schwache σ^{70} -abhängige Promotoren im Nachteil sind, kann die Inhibierung des *rsd* P2 Promotors in der spätstationären Phase nicht ausgeschlossen werden.



Abbildung 3.5: Vergleich der Promotorregionen der Rsd und 6S RNA Gene, *rsd* und *ssrS*. (A) Die Promotorregionen sind schematisch dargestellt. Die relativen Abstände der einzelnen Komponenten entsprechen den tatsächlichen Gegebenheiten. Die Transkriptionsstartstellen sind mit Pfeilen markiert. Die weißen Boxen entsprechen den Kernpromotoren. Das *rsd*-Gen ist verkürzt, das *ssrS*-Gen in voller Länge gezeigt. Das *ygfA*-Gen, das mit der 6S RNA ko-transkribiert wird ist nicht gezeigt. Die blauen Balken indizieren GATC-Sites innerhalb der Sequenzen. (B) Vergleich der Sequenzen der Kernpromotorelemente.

3.4.10 Ist Rsd ein *back-up*-System für die 6S RNA?

Zwar handelt es sich bei Rsd um ein Protein und bei der 6S RNA um eine stabile RNA, trotzdem gibt es viele Gemeinsamkeiten. Beide Moleküle sind Regulatoren der $E\sigma^{70}$ -abhängigen Transkription in *E. coli* und haben viele Homologe in anderen Bakterien. Darüber hinaus sind beide Moleküle stabil und akkumulieren über die Wachstumsphase. Die Konzentrationen beider Regulatoren steigen in der exponentiellen Phase deutlich an: Rsd von 3.000-4.000 auf 6.000-7.000 und 6S RNA von etwa 1.000 auf etwa 10.000 Moleküle (Piper *et al.*, 2009; Wassarman & Storz, 2000). Ob und welche Funktionen die beiden Regulatoren in der exponentiellen Phase ausüben, ist noch gänzlich unklar. In der stationären Phase inhibieren sie die $E\sigma^{70}$ -abhängige Transkription und gelten damit als Regulatoren, die den Übergang zur stationären Phase-Expression erleichtern. Dabei bindet die 6S RNA das $E\sigma^{70}$ Holoenzym und komplexiert dadurch nicht nur σ^{70} , sondern auch Coreenzym. Dieses steht dadurch nicht mehr für die Transkription mit alternativen Sigmafaktoren zur Verfügung. Für Rsd wird angenommen, dass es nur σ^{70} komplexiert und damit Coreenzym für die anderen Sigmafaktoren frei wird. Allerdings konnte eine Bindung von Rsd an das Coreenzym sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Die Frage nach der Bedeutung dieser Interaktion konnte jedoch noch nicht beantwortet werden.

Neben dem Vorkommen und der Funktion gibt es noch weitere Gemeinsamkeiten dieser Regulatoren. So haben beide einen ähnlichen Aufbau der Promotorstruktur (Abbildung 3.5). Beide besitzen einen proximalen σ^{70} -abhängigen Promotor, der konstitutiv transkribiert wird und den größten Teil der Produkte synthetisiert. Die weiter *upstream* gelegenen Promotoren werden *in vitro* sowohl vom $E\sigma^{38}$ als auch vom $E\sigma^{70}$ Holoenzym erkannt. *In vivo* liefern diese Promotoren, allerdings nur schwache Produkte. Die 6S RNA Primärtranskripte unterliegen jedoch vielen Prozessierungsschritten zur Herstellung der reifen 6S RNA. Da diese zum Teil sehr schnell erfolgen, kann dies ein Grund für das Fehlen des *upstream* gelegenen Primärtranskripts in Primer-Extension Reaktionen sein. Ein weiterer Unterschied ist, dass das *E. coli ssrS*-Gen in einem dicistronischen Leserahmen zusammen mit dem *downstream* gelegenem *ygfA*-Gen kodiert ist. Bei dem *ygfA*-Genprodukt handelt es sich um ein putatives Protein, welches in der Zelle exprimiert wird und dessen Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten mit eukaryotischen Methenyltetrahydrofolat-Synthetasen hat (Hsu *et al.*, 1985).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass beide Moleküle ähnlich reguliert werden. So unterliegen weder die 6S RNA noch Rsd der stringenten Kontrolle. Beide Transkriptionsfaktoren können ihr Expressionsniveau durch Autoregulation steuern und weiterhin spielen die Nucleoid-assoziierten Proteine eine Rolle bei der Expression (Neußer *et al.*, 2008; diese Arbeit). In der frühen stationären Phase konnte weder ein Einfluss von Rsd auf die Expression der 6S RNA gefunden werden, noch eine Wirkung der 6S RNA auf die Rsd-Expression (Geißen unpublished; diese Arbeit). Dagegen war in der spät-stationären Phase die Rsd-Expression im *ssrS*⁻-Stamm signifikant erhöht (Trotochaud & Wassarman, 2004). Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung der Regulatoren Rsd und 6S RNA für die spät-stationäre Phase sein.

Die 6S RNA wurde lange vor Rsd entdeckt und besser untersucht. So ist nicht nur der Mechanismus der Komplexbildung mit der RNA Polymerase aufgeklärt, sondern auch die Aufhebung der Inhibierung bei einem verbessertem Nahrungsangebot (Abbildung 3.6) (Wasssarman and Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010). Durch die Bindung an die Polymerase ist die 6S RNA vor dem Abbau durch RNasen geschützt.

Verbessert sich das Angebot an Nährstoffen, so steigt auch der Nukleotidspiegel in der Zelle an. Dadurch kann die 6S RNA als Template für die Synthese kleiner RNAs (*de novo* RNAs) dienen, wodurch der 6S RNA-Polymerase Komplex destabilisiert wird und schließlich zerfällt. Die freigesetzte Polymerase steht anschließend für die Aufnahme der Transkription zur Verfügung, während die 6S RNA abgebaut wird (Wassarman & Saecker, 2006; Wurm *et al.*, 2010).

Grundsätzlich sollten auch Mechanismen existieren, um eine Rsd-abhängige Inhibierung von σ^{70} bei veränderten Wachstumsbedingungen wieder aufzuheben. Allerdings gibt es bisher darüber noch keine Erkenntnisse. Auch die Stabilität des Rsd-Proteins während unterschiedlicher Wachstumsphasen wurde noch nicht ausreichend untersucht. Die Frage, was mit Rsd bei verbesserten Umweltbedingungen passiert, ist somit noch völlig offen.

Falls Rsd ein *back-up*-System für die 6S RNA ist, wäre ein ähnlicher Mechanismus, wie bei der 6S RNA denkbar. Demnach würde der σ^{70} -Rsd-Komplex durch den Konzentrationsanstieg eines, in der stationären Phase limitierten, Faktors destabilisiert. Dieser Faktor könnte auch der Grund für die geringe Affinität von Rsd zu σ^{70} in der logarithmischen Phase sein. Dort sind 7% der Rsd-Moleküle mit σ^{70} assoziiert, während in der stationären Phase 25% der Rsd-Moleküle mit σ^{70} im Komplex vorliegen (Piper *et al.*, 2009).

Für die 6S RNA ist dieser Faktor der NTP-Spiegel. Ob dies auch für Rsd der Fall ist, müssen weitere Untersuchungen klären.



Abbildung 3.6: Modell der 6S RNA Aktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen. Beim Wechsel von der exponentiellen zur stationären Phase steigt der 6S RNA Spiegel in der Zelle an. Durch die Bindung an $E\sigma^{70}$ Holoenzyme inhibiert die 6S RNA die Transkription. Bedingt durch einen Anstieg der Nukleotidkonzentration kommt es zur Bildung von *de novo* RNAs. Dabei wird der 6S- $E\sigma^{70}$ -Komplex destabilisiert. Der Komplex zerfällt, die 6S RNA wird abgebaut, Coreenzym und σ^{70} werden freigesetzt. Diese können nach einer erneuten Re-assemblierung des Holoenzyms die Transkription wieder aufnehmen (Wurm *et al.*, 2010).

3.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rsd *in vitro* auch mit dem E σ^{38} Holoenzym interagieren kann. Weiterhin sind sowohl die Sigmaspezifität als auch die Aktivität von Rsd modulierbar. Mittlerweile gibt es auch Hinweise auf eine Interaktion von Rsd mit Molekülen, die nicht Bestandteil des Transkriptionsapparates sind. Besonders die Bindung an das ribosomale S20-Protein ist interessant, da es eine Verbindung zwischen Rsd und der Translation bedeuten würde. Auch eine Verbindung von Rsd zum Nukleotidstoffwechsel sollte näher untersucht werden, da der NTP-Spiegel ein Faktor sein könnte, der die Rsd-Aktivität reguliert. Da dies ein Hinweis auf eine differenzielle Funktion von Rsd in der exponentiellen Phase ist, bedarf die unterschiedliche Affinität von Rsd zu σ^{70} in der exponentiellen und der stationären Phase weiterer Analysen.

Die Frage, warum Rsd an das Coreenzym bindet ist immer noch offen. Da diese Bindung mittlerweile auch *in vivo* nachgewiesen wurde, scheint es sich nicht nur um eine unspezifische Interaktion zu handeln.

In vivo konnten bisher keine Rsd-Dimere nachgewiesen werden, daher ist die Bedeutung der Rsd-Dimere noch völlig offen. Handelt es sich dabei nur um ein *in vitro* Artefakt oder hat die Dimerisierung von Rsd eine Funktion?

Mittels Bindungsstudien und Primer-Extension Analysen konnte die Regulation der Rsd-Expression grundlegend untersucht werden. Dennoch gibt es viele offene Fragen und Widersprüche und damit Bedarf für weitere Untersuchungen.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der in dieser Arbeit nicht experimentell bearbeitet wurde, ist die Stabilität des Rsd-Proteins und die Aufhebung der σ^{70} -Inhibierung bei einem verbesserten Angebot an Nährstoffen. Besonders die Möglichkeit das Rsd ein *backup*-System für die 6S RNA sein könnte, sollte näher betrachtet werden. Dazu könnten Funktionsanalysen mit einer 6S RNA/Rsd-Doppelmutante einen wichtigen Beitrag leisten.

4 Material

4.1 Allgemeines

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, besaßen, sofern nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis'.

Sämtliche Medien und Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nach geschaltetem 'water purification system EPA Est. 41237-MA-1', Millipors GmbH, Neu Isenburg) angesetzt, dieses wird als *Aqua dest*. bezeichnet wird.

4.2 Bakterienstämme und Vektoren

4.2.1 Escherichia coli Stämme

Tabelle 4.1 Übersicht über die	e verwendeten Escherichia coli Stämme.	. In der	Tabelle sin	d die	Geno-
typen und die Referenzen der j	eweiligen Stämme zusammengefasst.				

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21DE3 pLysS	F^{-} , ompT, hsd S_{B} (r_{B}^{-}	1. Studier & Mof-
	m _B ⁻), dcm, gal,	fat, 1986
	(DE3), pLysS, Cm ^r	2. Davanloo <i>et al.,</i>
		1983
CF9239	MG1655 (F ⁻)	Kang & Craig,
	∆dksA:: kan ^r (De-	1990
	letion allel from M.	
	Cashel; original	
	called PK201 from	
	E. A. Craig)	
CJD1124	stpA ⁻ , tet ^r ,; aus	Free <i>et al.</i> , 1998
	GM37 (wt)	
	∆stpA::Tcr (Tn10)	

$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	CP78	F^+ , thi ⁻ , leu ⁻ , thr ⁻ ,	Fiil & Friesen, 1968
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		his ⁻ , arg ⁻ , mal ⁻ , xyl ⁻ ,	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		ara ⁻ , gal ⁻ , str ^s , rel	
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		A^+	
rel A'rel A'CSH50F; ara, Δ (lacpro), str A, thiMiller, 1972CSH50fis::kanisogen zu CSH50; fis' (Kanamycin- Insertion)Koch et al., 1988DL845MC4100 Derivat mbf7 (methylation blocking factor = Irp), Tet'Braaten et al., 1991GM37wt für CJD 1124Free et al., 1998HB 101F, pro A2, recA13, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str')Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac F', gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, A(lac-pro AB)Yanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976	CP79	wie CP78 (wt) aber	Fiil & Friesen, 1968
$\begin{array}{c c} \mathrm{CSH50} & \mathrm{F}; \mathrm{ara}, \Delta(\mathrm{lacpro}), & \mathrm{Miller, 1972} \\ \mathrm{str} \mathrm{A}, \mathrm{thi} & & & \\ \mathrm{CSH50fis::kan} & \mathrm{isogen} \mathrm{zu} \mathrm{CSH50}; & \mathrm{Koch} \mathrm{et} \mathrm{al., 1988} \\ \mathrm{fis}^{\circ} (\mathrm{Kanamycin-} \\ \mathrm{Insertion}) & & & \\ \mathrm{DL845} & \mathrm{MC4100} \mathrm{Derivat} \\ \mathrm{mbf7} (\mathrm{methylation} \\ \mathrm{blocking} \mathrm{factor} = \\ \mathrm{lrp}), \mathrm{Tet}^{\circ} & & \\ \mathrm{GM37} & \mathrm{wt} \mathrm{für} \mathrm{CJD} 1124 & \mathrm{Free} \ et \ al., 1998} \\ \mathrm{HB} 101 & \mathrm{F}, \ pro \ A2, \ recA13, \\ \mathrm{ara-14}, \ lacY1, \\ \mathrm{galK2}, \ xyl-5, \ mtl-1, \\ \mathrm{rps} \mathrm{L20} \ (\mathrm{Str}^{\circ}) & \\ \\ \mathrm{JM110} & \mathrm{F}', \ \mathrm{tra} \mathrm{D36}, \mathrm{lac} \ \mathrm{F}', \\ \mathrm{tra} \mathrm{D36}, \mathrm{lac} \ \mathrm{F}', \\ \mathrm{gal} \mathrm{K}, \mathrm{gal} \mathrm{T}, \mathrm{ara}, \\ \mathrm{flu}, \mathrm{A}, \mathrm{tsx}, \mathrm{dam,} \\ \mathrm{dcm, \ sup} \ \mathrm{E44}, \\ \Delta(\mathrm{lac-pro} \ AB) & \\ \\ \mathrm{MC4100} & \mathrm{F}', \ \mathrm{araD39}, \Delta \\ (\mathrm{argF-lac}) \mathrm{U169}, \\ \mathrm{deoC1}, \ \mathrm{flb} \mathrm{S01}, \mathrm{re-} \\ \mathrm{IA1}, \ \mathrm{rpsL150}, \\ \mathrm{ptsF25}, \ \mathrm{rbsR} & \\ \end{array}$		rel A ⁻	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	CSH50	F^- ; ara, Δ(lacpro),	Miller, 1972
CSH50fis::kanisogen zu CSH50; fis (Kanamycin- Insertion)Koch et al., 1988DL845MC4100 Derivat mbf7 (methylation blocking factor = lrp), Tet'Braaten et al., 1991GM37wt für CJD 1124Free et al., 1998HB 101F', pro A2, recA13, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str')Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac I*, lac ZΔM15, pro AB/rps L (Str'), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB)Yanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976		str A, thi	
fis (Kanamycin- Insertion)DL845MC4100 Derivat mbf7 (methylation blocking factor = lrp), Tet'Braaten et al., 1991GM37wt für CJD 1124Free et al., 1998HB 101F', pro A2, recA13, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str')Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac I', uYanisch-Perron et al., 1985JM110F', tra D36, lac I', uYanisch-Perron et al., 1985JM10F', tra D36, lac I', uYanisch-Perron et al., 1985JM110F', tra D36, lac I', uYanisch-Perron et al., 1985MC4100F', ara D36, lac I', uYanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (arg F-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976	CSH50fis::kan	isogen zu CSH50;	Koch et al., 1988
$\begin{tabular}{ c c c c c c } \hline Insertion) & Insertion & Insertion) & Insertion & Insertion) & Insertion & Insert &$		fis (Kanamycin-	
DL845MC4100 Derivat mbf7 (methylation blocking factor = lrp), Tet'Braaten et al., 1991GM37wt für CJD 1124Free et al., 1998HB 101F, pro A2, recA13, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str')Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac I%, lac ZAM15, pro AB/rps L (Str'), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ (lac-pro AB)Yanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, fb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976		Insertion)	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	DL845	MC4100 Derivat	Braaten <i>et al.,</i> 1991
		mbf7 (methylation	
Irp), Tet ^r Free et al., 1998 GM37 wt für CJD 1124 Free et al., 1998 HB 101 F', pro A2, recA13, ara-14, laCY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str ¹) Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969 JM110 F', tra D36, lac I ⁴ , lac ZΔM15, pro Yanisch-Perron et al., 1985 AB / rps L (Str ¹), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) Casadaban, 1976 MC4100 F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR Casadaban, 1976		blocking factor =	
GM37wt für CJD 1124Free et al., 1998HB 101F, pro A2, recA13, ara-14, laCY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str')Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac I ⁹ , lac Z\DeltaM15, pro AB/rps L (Str'), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ (lac-pro AB)Yanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976		lrp), Tet ^r	
HB 101F, pro A2, recA13, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str ¹)Boyer, & Roulland- Dussoix, 1969JM110F', tra D36, lac I ^q , lac ZΔM15, pro AB/rps L (Str ¹), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ (lac-pro AB)Yanisch-Perron et al., 1985MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsRCasadaban, 1976	GM37	wt für CJD 1124	Free <i>et al.,</i> 1998
$\begin{array}{ c c c c c c c } & ara-14, laCY1, & Dussoix, 1969 \\ & galK2, xyl-5, mtl-1, \\ rps L20 (Str') & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & $	HB 101	F ⁻ , pro A2, recA13,	Boyer, & Roulland-
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		ara-14, lacY1,	Dussoix, 1969
rps L20 (Str') rps L20 (Str')JM110F', tra D36, lac Iq, (al., 1985)JM110F', tra D36, lac Iq, (al., 1985)AB/rps L (Str'), (thr, leu, thi, lac Y, (gal K, gal T, ara, (fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, A(lac-pro AB)MC4100F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		galK2, xyl-5, mtl-1,	
JM110F', tra D36, lac IYanisch-Perron etlac Z Δ M15, proal., 1985AB/rps L (Str'),thr, leu, thi, lac Y,gal K, gal T, ara,fhu A, tsx, dam,dcm, sup E44, Δ (lac-pro AB)MC4100F', araD139, Δ Casadaban, 1976(argF-lac) U169,deoC1, flb5301, re-IA1, rpsL150,ptsF25, rbsR		<i>rps</i> L20 (Str ^r)	
JM110 F', tra D36, lac I ^q , Yanisch-Perron et lac ZΔM15, pro al., 1985 AB/rps L (Str'), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR			
lac ZΔM15, pro al., 1985 AB/rps L (Str [*]), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsR	JM110	F', tra D36, lac Iª,	Yanisch-Perron et
AB/rps L (Str ^r), thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		lac Z∆M15, pro	al., 1985
thr, leu, thi, lac Y, gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		AB/rps L (Str ^r),	
gal K, gal T, ara, fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		thr, leu, thi, lac Y,	
fhu A, tsx, dam, dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		gal K, gal T, ara,	
dcm, sup E44, Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		fhu A, tsx, dam,	
Δ(lac-pro AB) MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, (argF-lac) U169, (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- IA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		dcm, sup E44,	
MC4100 F', araD139, Δ Casadaban, 1976 (argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		Δ(lac-pro AB)	
(argF-lac) U169, deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsR	MC4100	F', araD139, Δ	Casadaban, 1976
deoC1, flb5301, re- lA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		(argF-lac) U169,	
lA1, rpsL150, ptsF25, rbsR		deoC1, flb5301, re-	
ptsF25, rbsR		lA1, rpsL150,	
		ptsF25, rbsR	

MG1655	E. coli K12 Wildtyp	Blattner et al., 1997
MG1655rsd::kan	E. coli K12 Derivat	Mitchell et al., 2007
	mit Kanamycin-	
	Insertion in rsd.	
	Kan ^r ; isogen zu	
	MG1655 (wt)	
MW∆ssrS	Mg1655 Derivat	Labor R. Hart-
	(wt); kan ^r , Kana-	mann, Marburg;
	mycin-Insertion im	nicht publiziert
	Gen der 6S RNA	
	(ssrS)	
PD32	MC4100 Derivat	Dersch <i>et al.,</i> 1993
	(wt), hns-206::Ap ^r	
RH90	MC4100 Derivat	Lange & Hengge-
	(wt), rpoS359::	Aronis, 1991
	Tn10; starvation &	
	multiple stress-	
	sensitive, glyco-	
	gen-negative, cata-	
	lase negative; Tet ^r	
XL-1	recA1, lac ⁻ , end A1	Stratagene
	gyr A96, thi, hsd	
	R17, sup E44, rel	
	A1, [F ⁻ : pro AB, la-	
	c^{iq} , lacZ Δ M15, Tn	
	10]	

4.2.2 Plasmide

pUC18

pBR322/M13mp18-Derivat mit '*multi cloning site*' (MCS) Polylinker (Yanisch-Peron *et al.,* 1985).

рКК232-8	Derivat aus pBR322 (Amp und cat-Gen) und pKK3535; Promo- tortestvektor durch promotorloses Choramphenicolacetyltrans- ferasegen (<i>cat</i>) zwischen der MCS und der Terminatorregion des <i>rrnB</i> -Operons (Brosius, 1984).
pCP1	Derivat des pUC18, trägt die Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK232-8 in der KpnI-Site des pUC18 (Pohl, 2005).
pUC18-1	Derivat des pUC18, trägt P1-Fragment des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK3535 (SspI/DdeI, 235 bp) in der SmaI-Schnittstelle des pUC18 (Zacharias & Wagner, 1990).
pUC18-bolA	Derivat des pUC18, trägt <i>bolA</i> -Promotor mit upstream-Region (via PCR mit #bola1-up und #bola1-down von chromosomaler DNA aus MG1655 und Restriktion mit SspI erhalten) in der Ecl136II-Schnittstelle des pUC18 (Reckendrees, 2004).
pRT3HAP2	Derivat des pBR322, trägt <i>rrnB</i> P1, einen Teil des 16S RNA- und des 5S-RNA-Gens vor den Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> P1 Operons (auch pRT4) (Bradaczek, 1991).
pbolA-T1T2	Derivat des pCP1, trägt <i>bolA</i> -Promotor mit upstream-Region aus pUC18-bolA (EcoRI/BsaAI; 290 bp) zwischen EcoRI- und Ecl136II-Schnittstelle des pCP1 (Reckendrees, 2004).
pUC18-bolA1	Derivat des pUC18, trägt <i>bolA</i> -Promotor ohne upstream-Region (via PCR mit #bola1-up und #bola1-down von chromosomaler DNA aus MG1655 und Restriktion mit SspI erhalten) in der Ecl136II-Schnittstelle des pUC18 (Reckendrees, 2004).
pSH666-1	Derivat von pKK223-3, trägt <i>rrnB</i> P1-T1T2 und <i>bolA</i> -T1T2 Pro- motorfragmente in der MCS (Schoengraf, 2008).

pUC18-Rsd	pUC18-T7-Derivat mit dem E. coli rsd-Gen und der ribosomalen
	Bindestelle des MS2-Phagen-Polymerasegens aus Plasmid pPlc-
	Rsd. Das Fragment wurde hinter den T7-Promotor in die Stul-
	Site kloniert (Kohl, 2002).
pUC18-rsd-up	Derivat des pUC18, trägt rsd-Promotor mit upstream-Region (via
	PCR mit #rsd-up-B/E und #rsd-up-S/H von chromosomaler
	DNA aus MG1655 und Restriktion mit BamHI und HincII erhal-
	ten; 480 bp) zwischen der BamHI- und HincII-Schnittstelle des
	pUC18 (diese Arbeit).
prsd-up-cat	Derivat des pKK232-8, trägt rsd-promotor mit upstream-Region
	aus pUC18-rsd-up (SmaI/HindIII; 499 bp) zwischen HindIII-
	und SmaI-Schnittstelle des pKK232-8 (diese Arbeit).
prsd-up-T1T2	Derivat des pCP1, trägt rsd-Promotor mit upstream-Region
	aus pUC18-rsd-up (SacI/EcoRI; 464 bp) zwischen SacI- und
	EcoRI-Schnittstelle des pCP1 (diese Arbeit).

4.3 DNA-Fragmente

P1-Fragment	Gewonnen durch EcoRI und HincII Restriktion aus pUC18-1,
	Länge des oberen Stranges 261 bp, rrnB-P1-Sequenz von
	-193 bis + 68 relativ zum P1-Start. Das Fragment wurde für
	Retardierungen und DNase1 und KMnO ₄ Footprints
	verwendet.

P1-Fragment Gewonnen durch BamHI und SacI Restriktion aus pUC18-1, Länge des unteren Stranges 249 bp, *rrnB*-P1-Sequenz von -186 bis + 63 relativ zum P1-Start. Das Fragment wurde für Retardierungen und DNase1 und KMnO₄ Footprints verwendet.

bolA-Fragment	Gewonnen durch XbaI und HincII Restriktion aus pUC18-bolA, Länge 276 bp, <i>bolA</i> -Sequenz von - 160 bis + 116 relativ zum <i>bolA1</i> -Start. Das Fragment wurde für Retardierungen und DNase1 und KMnO4 Footprints verwendet.
bolA-Fragment	Gewonnen durch EcoRI und BsaAI Restriktion aus pUC18-bolA, Länge 276 bp, <i>bolA</i> -Sequenz von - 160 bis + 116 relativ zum <i>bolA1</i> -Start. Das Fragment wurde für Retardier- ungen und DNase1 und KMnO4 Footprints verwendet.
bolA1-Fragment	Gewonnen durch EcoRI und BamHI Restriktion aus pUC18- bolA1, Länge 168 bp, <i>bolA</i> -Sequenz von - 58 bis + 109 relativ zum <i>bolA1</i> -Start. Das Fragment wurde für Retardierungen verwendet.
bolA1-Fragment	Gewonnen durch EcoRI und BsaAI Restriktion aus pUC18- bolA1, Länge 107 bp, <i>bolA</i> -Sequenz von - 58 bis + 48 relativ zum <i>bolA1</i> -Start. Das Fragment wurde für KMnO4-Footprints verwendet.
ficP-Fragment	Erstellt mittels PCR, mit den Primern #fic2 und #fic-up, von chromosomaler DNA aus MG1655 und anschließender Restrik- tion mit BanI. Die Länge ist 256 bp, <i>fic</i> -Sequenz von -157 bis +98, relativ zum <i>fic</i> -Transkriptionsstart. Das Fragment wurde für Retardierungen verwendet.
rsd-up-Fragment	Gewonnen durch Restriktion von pUC18-rsd-up mit EcoRI und HincII. Das Fragment ist 471 bp lang und enthält die <i>rsd</i> -Pro- motoren und die upstream-Region. <i>rsd</i> -Sequenz von -258 bis +212, relative zum <i>rsd</i> P1-Start. Das Fragment wurde für Retar- dierungen und DNase1 Footprints verwendet.

rsd-up-Fragment	Gewonnen durch Restriktion von pUC18-rsd-up mit SmaI und HindIII. Das Fragment ist 471 bp lang und enthält die <i>rsd</i> -Pro- motoren und die upstream-Region. <i>rsd</i> -Sequenz von -258 bis +212, relative zum <i>rsd</i> P1-Start. Das Fragment wurde für Retar- dierungen und DNase1 Footprints verwendet.
rsd-Fragment	Erstellt durch Restriktion von pUC18-rsd-up mit BssHII und HincII. Das Fragment ist 288 bp lang und enthält die <i>rsd</i> -Pro- motoren ohne die upstream-Region. <i>rsd</i> -Sequenz von -75 bis +212, relative zum <i>rsd</i> P1-Start. Das Fragment wurde für Retar- dierungen und DNase1 und KMnO ₄ Footprints verwendet.
rsd-P1-Fragment	Erstellt durch PCR, mit den Primern #rsd-P1-up und #rsd-P1- down, von pUC18-rsd-up und anschließender Restriktion mit EcoRI. Das Fragment ist 315 bp, <i>rsd</i> -Sequenz von -258 bis +56, relative zum <i>rsd</i> P1-Start. Das Fragment wurde für Retardie- rungen verwendet.
up-Fragment	Erstellt durch Restriktion von pUC18-rsd-up mit Smal und BssHII. Das Fragment ist 195 bp lang und enthält die upstream- Region ohne die <i>rsd</i> -Promotoren. Das Fragment wurde für Re- tardierungen und DNase1 Footprints verwendet.
avaII-Fragmnet	Erstellt durch Restriktion von pUC18-bolA1 mit AvalI. Das 222 bp lange DNA Fragment enthält Vektorsequenz ohne Pro- motoren. Das Fragment wurde als externer Standard bei <i>in</i> <i>vitro</i> Transkriptionen und als Negativ-Kontrolle bei Retardie- rungen verwendet.

4.4 Nukleinsäuren und Nukleotide

4.4.1 Oligonukleotide

#catIV:	5'-GCT CGG CGG ATT TGT CCT-3' bindet an den nicht-codierenden Strang des prsd-up-cat Plas- mids von der Position +255 bis +237, dies entspricht der Posi- tion 160 bis 142 der <i>rsd</i> -mRNA, und liest auf die Transkrip- tionsstarts der <i>rsd</i> -Promotoren P1, P2 zu. Eine Primer-Extension Reaktion ergibt cDNA-Produkte von 255 Basen für <i>rsd</i> P1 und 160 Basen für <i>rsd</i> P2.
#RNA1:	5'-TCA GCA GAG CGC AGA TAC CA-3' bindet an die RNA1 von Position 28 bis 9 und ergibt in der Primer Extension Reaktion ein cDNA-Produkt von 28 Basen.
#6S-Oligo-1	5'-GTG GTA TGA AAT ATG GGC-3' bindet an die Nukleotidposition 56 bis 38 der reifen 6S RNA und ergibt in einer Primer-Extension Reaktion cDNA-Produkte einer Länge von 54, 55 bzw. 56 Basen für die reife 6S RNA je nach Prozessierung.
#PE-5S-Oligo	5'-ACC ACC GCG CTA CTG CCG-3' bindet an die Position 25 bis 8 der 5S rRNA, wurde für Primer- Extension Reaktion benutzt.
#fic	5'-CGG GAC TTT TGC TTA TCG GT-3' bindet an die Position 59 bis 40, an die <i>fic</i> -mRNA, wurde für die Primer-Extension Reaktion benutzt.
#fic2	5#-CTG GCC TGA AAA TTA CGA T-3' bindet an die Position +98 bis +80, <i>downstream</i> des Transkriptionsstart des <i>fic</i> P an den codierenden Strang, wurde für die Amplifizierung des <i>fic</i> -Promotors, mittels PCR aus chromosomaler MG1655 DNA, verwendet.

#fic-up	5'-GTT GCC GAT AAG ATT TCC-3'
	bindet an die Position -178 bis -161 <i>upstream</i> des <i>fic</i> P an den
	nicht-codierenden Strang, wurde für die Amplifizierung des
	fic-Promotors, mittels PCR aus chromosomaler MG1655 DNA,
	verwendet.
#1400	5'-GAT TGT CTG ATA AAT TGT T-3'
	bindet in die Leaderregion aller ribosomalen Operons, an die
	Positionen 56 bis 38 der ribosomalen RNAs, wurde für die
	Primer-Extension Reaktion benutzt.
#bolA2	5'-GGA ATA CGG GTT GGA ACG GC-3'
	bindet an die Position 95 bis 76 der <i>bolA</i> -mRNA, wurde für die
	Primer-Extension Reaktion verwendet.
#rhoL2	5'-GGA AAT TAC AAG ATT CAA ACT TAA TAA GG-3'
	bindet an die Position 47 bis 18 an die <i>rho</i> Leader-RNA, wurde
	für die Primer-Extension Reaktion verwendet.
#rsd-up-B/E	5#'-GCT C <mark>GG AT<u>C</u> C</mark> AT T <mark>GA</mark> ATT CCC GCA G-3'
_	bindet an die Position -272 bis -248 <i>upstream</i> vom P1
	Transkriptionsstart des <i>rsd</i> -Gens an den nicht-codierenden
	Strang, wurde für die Amplifizierung des <i>rsd</i> -Promoters, via
	PCR aus chromosomaler MG1655 DNA, verwendet.
	Der Primer weist vier Abweichungen (unterstrichen) zur nati-
	ven Sequenz auf, um eine BamHI (gelb) und eine EcoRI (rot)
	Schnittstelle einzuführen.
#rsd-up-S/H	5'-ACA T <mark>GT <u>C</u>GA C</mark> AG C <mark>GA <u>CCT</u> C</mark> CC AG-3'
	bindet an die Position +124 bis +101 <i>downstream</i> vom P2
	Transkriptionsstart des <i>rsd</i> -gens an den codierenden Strang,
	wurde für die Amplifizierung des <i>rsd</i> -Promoters, via PCR aus
	chromosomaler MG1655 DNA, verwendet. Der Primer weist
	fünf Abweichungen zur nativen Sequenz auf, um eine HincII
	(gelb) und eine SacI (rot) Schnittstelle einzuführen.

#rsd-P1-up	5'-GGA TCC ATT GAA TTC CCG C-3'
	bindet von Position -268 bis -250 upstream des rsd P1 Trans-
	kriptionsstarts an den nicht-codierenden Strang, wurde für die
	Amplifizierung des <i>rsd</i> P1-Promoters, via PCR von chromoso-
	maler MG1655 DNA, verwendet.
#rsd-P1-down	5'-GAG CTA TGG ATC GTA TAA TTG AAA AAT TAG-3'
	bindet an die Position +56 bis +27 <i>downstream</i> des <i>rsd</i> P1
	Transkriptionsstarts an den codierenden Strang, wurde für die
	Amplifizierung des <i>rsd</i> P1-Promoters, via PCR von chromoso
	maler MG1655 DNA, verwendet.
#5020	5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA C-3'
	bindet <i>upstream</i> der MCS von pUC18, an den codierenden
	Strang; wurde für die Sequenzierungen von pUC18-rsd-up
	und prsd-up-T1T2 verwendet.
#3'-core-cat	5#-GGC GGG CAA GAA TGT GAA TAA AGG-3'
	bindet im cat-gen und liest auf den Transkriptionsstart zurück,
	wurde für die Sequenzierung von prsd-up-cat verwendet.

4.4.2 Verschiedene Nukleinsäuren

Kb-Leiter

Invitrogen, Kalifornien, USA

pUC18/MspI

Diese Arbeit

4.4.3 Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat Adenosin-5'- $[\alpha^{32}P]$ triphosphat Adenosin-5'-[γ³²P]triphosphat Adenosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure" Cytidin-5'- $[\alpha^{32}P]$ triphosphat Cytidin-5'-triphosphat Cytidin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure" Guanosin-5'-triphosphat Guanosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure" Uridin-5'-triphosphat Uridin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure" Uridin-5'-[α^{32} P]triphosphat 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat 2'-Desoxyadenosin-5- $[\alpha^{32}P]$ triphosphat $2'\text{-}Desoxycytidin-5'-[\alpha^{32}P] triphosphat$ 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat 2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat 2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat 2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat 2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat

Boehringer, Mannheim Hartmann, Braunschweig Hartmann, Braunschweig Pharmacia, München Hartmann, Braunschweig Boehringer, Mannheim Pharmacia, München Boehringer, Mannheim Pharmacia, München Boehringer, Mannheim Pharmacia, München Hartmann, Braunschweig Boehringer, Mannheim Hartmann, Braunschweig Hartmann, Braunschweig Boehringer, Mannheim Boehringer, Mannheim Boehringer, Mannheim Roche, Mannheim Roche, Mannheim Roche, Mannheim Roche, Mannheim

4.5 Proteine

4.5.1 Enzyme und sonstige Proteine

DNase I (RNase-frei) Lysozymchlorid Peq Gold Protein Marker Roche, Mannheim Sigma, St. Louis, USA PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Proteinase K	Roche, Mannheim
Ribonuklease A (RNase A)	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	New England Biolabs, USA
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, USA

4.5.2 Restriktionsendonukleasen

ApoI
AvaII
BamHI
BanI
BsaAI
BssHII
Ecl136II
EcoRI
HpaII
HincII
HindIII
KpnI
MboI
MspI
SacI
SmaI
XbaI

New England Biolabs, USA New England Biolabs, USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, USA New England Biolabs, USA New England Biolabs, USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, USA New England Biolabs, USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.5.3 Polymerasen und Polymeraseuntereinheiten

AMV-Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

RNA-Polymerase aus Escherichia coli	
Holoenzym	nach Burgess & Jendrisak,
	1975; verändert nach Gonza-
	les et al., 1977; charkterisiert
	nach Chamberlin et al., 1979;
	freundliche Gabe von R. Wurm
Coreenzym	nach Burgess & Jendrisak,
	1975; Lowe et al., 1979;
	freundliche Gabe von R. Wurm
σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase	präpariert von R. Wurm nach
	Igarashi & Ishihama, 1991;
	verändert nach Borokov &
	Goldfarb, 1993
$\sigma^{_{38}}$ -Untereinheit der RNA-Polymerase	nach Tanakara <i>et al.,</i> 1993 zur Verfügung gestellt von R. Wurm

4.5.4 Transkriptionsfaktoren

DksA	nach Delic, 2006
	freundliche Gabe von D. Delic
Guanosin-3'-5'-bis(diphosphat) (ppGpp)	nach Krohn & Wagner, 1995
6S RNA	nach Gildehaus <i>et al.,</i> 2007
$\mathbf{D}_{\mathbf{r}}$	Treutiunche Gabe von K. Geisen
Regulator of Sigma D (RSd)	dert nach Hofmann, 2006;
	alese Arbeit

4.5.4.1 Nucleoid Associated Proteins (NAPs)

H-NS:	nach Tippner <i>et al.,</i> 1994
	freundliche Gabe von R. Wurm
T'-	h K. h & K. h
F1S:	nach Koch & Kanmann, 1986
	freundliche Gabe von R. Wurm
Lrp	nach Roesch & Blomfield 1988
21p.	
	freundliche Gabe von R. Wurm
Stp 4 ·	nach Zhang et al 1995
StpA.	flach Zhang et ut., 1995
	freundliche Gabe von R. Wurm

4.6 Allgemeine Puffer und Medien

AB-Diluent:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM MgCl_2
	10 mM β-Mercaptoethanol
	50 mM NaCl
	100 μ g/ml BSA, acetyliert
	0,1 mM EDTA, pH 8,0
	5% (v/v) Glycerin
30% Acrylamid/0,8% Bis-	290 g/l Acrylamid
acrylamidlösung (30:1):	10 g/l Bisacrylamid
	ad 1 l mit <i>Aqua dest.</i> ,
	mit Amberlite üN deionisiert & filtriert
40% Acrylamid/Bis-	380 g/l Acrylamid
acrylamidlösung (20:1)	20 g/l Bisacrylamid
	ad 1 l mit <i>Aqua dest.</i> ,
	mit Amberlite üN deionisiert & filtriert

40% Acrylamid/Bis-	391,31 g/l Acrylamid
acrylamidlösung (46:1)	8,69 g/l Bisacrylamid
	ad 1 l mit <i>Aqua dest.,</i>
	mit Amberlite üN deionisiert & filtriert
Formamid-Probenpuffer:	0,1% (w/v) Bromphenolblau
	0,1% (w/v) Xylencyanol
	95% (v/v) deionisiertes Formamid
	25 mM EDTA, pH 8,0
2 x Harnstoff-Probenpuffer:	7 M Harnstoff
	50 mM Tris-Borat, pH 8,3
	1 mM EDTA
	0,025% (w/v) Bromphenolblau
	0,025% (w/v) Xylencyanol
10 x KGlu80-Puffer:	0,5 M Tris-Acetat, pH 8,0
	0,1 M Mg-Acetat
	10 mM Dithiothreitol (DTT)
	1 mM EDTA, pH 8,0
	100 μ g/ml BSA, acetyliert
	0,8 M Kaliumglutamat
10 x KGlu160-Puffer:	0,5 M Tris-Acetat, pH 8,0
	0,1 M Mg-Acetat
	10 mM Dithiothreitol (DTT)
	1 mM EDTA, pH 8,0
	100 μ g/ml BSA, acetyliert
	1,6 M Kaliumglutamat
50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat, pH 7,5
	50 mM EDTA, pH 8,0

2 x TAE-Probenpuffer:	0,025% (w/v) Bromphenolblau
	0,025% (w/v) Xylencyanol
	30% (v/v) Glycerin
	in 2 x TAE-Puffer
10 x TBE-Puffer:	0,89 M Tris-Borat, pH 8,3
	25 mM EDTA, pH 8,0
2 x TBE-Probenpuffer:	0,025% (w/v) Bromphenolblau
	0,025% (w/v) Xylencyanol
	30% (v/v) Glycerin
	in 2 x TBE
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TGED-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	5% (v/v) Glycerin
	0,1 mM EDTA, pH 8,0
	0,1 mM DTT
Top-Agar:	10 g/l Trypton
	8 g/l NaCl
	6 g/l Agar
	in Aqua dest. auf pH 7,0 einstellen
	und autoklavieren
5 x SDS-Laufpuffer:	150 g Tris
	720 g Glycin
	25 g SDS
	ad 51 mit <i>Aqua dest</i> .
2 x SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl, pH 6,8
	2% SDS (v/v)
	20% Glycerin (v/v)
	0,025% (w/v) Bromphenolblau

4 x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% SDS (v/v) 35% Glycerin (v/v) 0,025% (w/v) Bromphenolblau
YT-Medium:	8 g/l Trypton
	5 g/l Hefe-Extrakt
	5 g/l NaCl
	in Aqua dest. auf pH 7,4 einstellen
	und autoklaviert
M9-Minimalmedium:	6 g/l Na ₂ HPO ₄
	3 g/l KH ₂ PO4
	0,5 g/l NaCl
	1 g/l NH ₄ Cl
	direkt vor der Verwendung dazugegeben:
	Thiamin (f. c. 1 mg/l)
	MgSO4 (<i>f. c.</i> 1 mM)
	CaCl2 (<i>f. c.</i> 0,1 mM)
	Uridine (f. c. 20 μ g/ml)
M9-Medium mit:	0,1% (v/v) Casaminoacids
	0,1% (v/v) Natriumacetat
M9-Medium mit:	0,2% (v/v) Glycerin

4.7 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Agarose, 'ultra pure' SeaKem	Cambrex Bio Science, USA
Ameisensäure	Merck, Darmstadt

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Ammoniumperoxidisulfat (APS) Ammoniumsulfat Ampicillin **Biotin-NHSE** Borsäure Bradford-Reagenz 5-bromo-4-chloro-3-indolylß-D-Galaktoside (X-Gal) Bromphenolblau Chloramphenicol Chloroform Coomassie Brillant Blue R250 Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) Dithiothreitol (DTT) DNA-Cellulose Essigsäure Ethidiumbromid (EtBr) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Formaldehyd Formamid Glycerin Glycin Harnstoff Hefe-Extrakt Heparin HEPES Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG)

Kaliumglutamat

Kaliumpermanganat (KMnO₄) Leupeptin, Hemisulfate Magnesiumdichlorid (MgCl₂) β-Mercaptoethanol N,N'-Methylenbisacrylamid VWR International, Leuven Roth, Karlsruhe Grüssing, Filsum Sigma, St. Louis, USA Sigma, St. Louis, USA Grüssing, Filsum **Bio-Rad** Boehringer, Mannheim Merck, Darmstadt Boehringer, Mannheim Fisher Scientific, UK Serva, Heidelberg Sigma, St. Louis, USA Jansen, Beerse, Belgien Sigma, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe Boehringer, Mannheim AppliChem, Darmstadt Riedel-de-Haen, Seelze J. T. Baker, Groß-Gerau Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Difco, Detroit, USA Sigma, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe Roche, Mannheim

Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Merck, Darmstadt Calbiochem, Nottingham, UK Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg
Natriumacetat Natriumcarbonat (Na₂CO₃) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumdeoxycholat Natriumhydroxid (NaOH) Natriumthiosulfat Paraffin Pepstatin A Phenol Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF) Piperidin Polyethylenglykol (PEG₆₀₀₀) P11-Phospho-Cellulose Saccharose Salzsäure (HCl) Sephadex DEAE A25 Silbernitrat N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Trypton Xylencyanol

Riedel-de-Haen, Seelze Merck, Darmstadt **VWR** International, Leuven Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe J. T. Baker, Groß-Gerau Merck, Darmstadt Riedel-de-Haen, Seelze Calbiochem, Nottingham, UK Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Pharmacia, München Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt **VWR** International, Leuven Difco, Detroit, USA Serva, Heidelberg

Verschiedenes 4.8

Amberlite Mischbettionenaustauscher	Roth, Karlsruhe
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
Centriprep Centrifugal Filter	Millipore, Neu Isenburg
DE 52-Papier	Whatman, England
Dialyseschlauch (Porengröße 6000-8000)	Spectrum Laboratories,
	Broadwick St., USA

Faltenfilter Gel-Fix[®] for PAG, Gelbondfolie µMacsTM Streptavidin Kit

Mascherey-Nagel, Düren Serva, Heidelberg Miltenyi Biotec GmbH,

PhosphoImager Screen BAS 2340 Polyethylenfolie

Qiagen Plasmid Midi Kit Röntgenfilme Blaufilm CEA RP New

Entwickler Euromed[®] E1000

Fixierer Euromed[®] F1000

Sterilfilter Chromafil CA-20/25 S

Verstärkerfolie DuPont Cronex, Lightning Plus Screen VS Filtermembran (Porengröße 0,025 µm, ø 2,5 cm) Bergisch Gladbach FUJI, Japan Wentus Kunststoff GmbH, Höxter Qiagen, Hilden Ernst Christiansen GmbH, Planegg Ernst Christiansen GmbH, Planegg Ernst Christiansen GmbH, Planegg Mascherey-Nagel, Düren

Millipore, Neu Isenburg

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

Bei der Handhabung von Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Vorschriften des Gentechnikgesetztes für das Arbeiten mit Gentechnisch veränderten Organismen (GvO's) (S1) wurden dabei eingehalten. Anfallender mikrobiologischer Abfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert.

5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Mittels Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2-3 bar) wurden alle temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen wurden steril filtriert (4.8). Verwendete Glasgeräte wurden hitzesterilisiert für 4 h bei 210°C.

5.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Alle Bakterienstämme wurden als Sicherheitsstocks bei -70°C gelagert und zur Anzucht auf YT-Platten (4.6) ausgestrichen. Die YT-Platten waren gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versetzt. Die Stämme wurden stets mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Anschließend konnten Einzelkolonien auf eine neue Platte (Masterplatte) umgesetzt oder in Flüssigkultur übernommen werden.

5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen

Die Anzucht von üN-Kulturen erfolgte bei 37°C auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm). Dazu wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte gepickt und in 3 ml bzw. 25 ml YT-Medium (4.6) überführt. Je nach E. coli Stamm wurde das YT-Medium mit einem selektiven Antibiotikum versetzt.

5.1.4 Haltung und Sicherung von Zellstämmen

Die temporäre Sicherung von Zellen erfolgte auf Agarplatten, versetzt mit einem entsprechendem Antibiotikum (4.7), bei 4°C. Zur langfristigen Sicherung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 0,8 ml einer üN-Kultur (3.1.3.) des gewünschten Stammes in einem sterilen Stockgläschen mit 0,2 g 100% Glycerin versetzt und 30 min bei Raumtemperatur, unter schütteln inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur kurz mit flüssigem Stickstoff behandelt und anschließend bei -70°C gelagert.

5.1.5 Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock

Für die Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock wurde nach einer von Dagert & Ehrlicher, (1979) veröffentlichten Methode verfahren. Dazu wurden 100 ml YT-Medium 1/100 mit einer üN-Kultur des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 37°C auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm) und wurde mittels Streumessung (5.2.1.2) verfolgt. Nachdem die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht hatten wurden je 25 ml Kultur in Corex Zentrifugengläser überführt und bei 5000 rpm, 4°C für 5 Minuten pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in 12,5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben sedimentiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in je 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung versetzt mit 15% (v/v) Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden zu 200 μ l Aliquots in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und üN bei 4°C gelagert. Durch die Lagerung bei 4°C soll sich die Transformationskompetenz der Zellen erhöhen. Zum Schluss wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff behandelt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

5.1.6 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock

Die Transformation von kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch einen Hitzeschock. Dabei wurde eine von Hanahan (1985) publizierte Methode benutzt. 200 μ l kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 μ l Ligation-sansatz (5.2.8.3) oder 50 ng Plasmid-DNA versetzt und 1h auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen dreiminütigen Hitzeschock bei 42°C induziert. Danach wurden die Zellen sofort für max. 2 Minuten auf Eis inkubiert, durch diese Behandlung soll sich die Transformationseffizienz erhöhen, und dann mit 800 μ l 37°C warmen YT-Medium versetzt. Die Zellen wurden dann 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Haep Labor Consultant, HTM 130 L), damit sich die Antibiotikaresistenz ausbilden konnte. Im Anschluss daran wurden 100 – 200 μ l Zellen auf selektiven Agarplatten (4.6) ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien auf der Platte sichtbar wurden.

5.1.7 Blau-Weiß-Selektion

Mi Hilfe der Blau-Weiß-Selektion können positive Klone, Zellen die ein Plasmid mit gewünschten Insert enthalten, leicht von Klonen unterschieden werden, die nur ein Religationsprodukt des Vektors enthalten. Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf der sogenannten α -Komplementation (Maniatis *et.al.*, 1982). Dabei wird das Gen für die β -Galaktosidase in zwei Fragmente zerlegt. Der N-terminale Teil des Gens, das α -Fragment ist dabei auf einem Plasmid kodiert. Der andere Teil des Gens, das ω -Fragment ist dagegen auf dem Bakterienchromosom als lacZ Δ M15 kodiert. In dieser Arbeit wurden der Vektor pUC18 (4.2.2) und der *E. coli* Stamm *XL-1* (4.2.1) verwendet. Bei pUC18 steht das α -Fragment steht unter der Kontrolle des lac-Repressors deshalb muss die Expression durch die Zugabe von IPTG induziert werden. Durch eine gleichzeitige Expression beider Fragmente kann *in vivo* β-Galaktosidase rekonstituiert werden. Zellen, welche die β-Galaktosidase besitzen sind in der Lage X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid) als Substrat zu nutzen. Durch die Spaltung von X-Gal entsteht das blaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo und die entsprechenden Zellen verfärben sich blau. Befindet sich die MCS (*multi cloning site*) innerhalb des plasmidär kodierten α-Fragments, so kann durch die Insertion eines DNA-Fragments der Leserahmen des Gens unterbrochen werden, und kein funktionelles α-Fragment mehr exprimiert werden. Zellen denen der N-terminale Teil der β-Galaktosidase fehlt sind nicht mehr in der Lage X-Gal als Substrat zu nutzen und bleiben deshalb weiß.

Um positive Klone mittels der Blau-Weiß-Selektion identifizieren zu können mussten die verwendeten Agarplatten speziell behandelt werden. Agarplatten (4.6), versetzt mit Ampicillin (50 μ g/ml) wurden zusätzlich mit 100 μ l YT-Medium, 8 μ l X-Gal (100 mg/ml) und 4 μ l IPTG (200 mg/ml) bestrichen und für 3-4 h bei 37°C getrocknet und danach sofort verwendet.

Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden, danach wurden die Platten für 4-8 h bei 4°C gelagert, damit sich die Farbe des 5-Brom-4-Chlor-Indigo verstärkt und besser zwischen blauen und weißen Kolonien unterschieden werden konnte. Weiße Kolonien wurden mittels eines sterilen Zahnstochers gepickt und 3 ml üN-Kulturen angesetzt, um die Plasmid-DNA mittels "Mini-präp' (5.2.4) zu isolieren und durch Restriktionshydrolysen (5.2.8.1) weiter zu charakterisierten.

5.1.8 Wachstumsratenbestimmung

Zur Bestimmung von Wachstumsraten wurde der Bakterienstamm MG1655/rsd-upcat in YT-Medium und in M9-Minimalmedien angezogen. Die Minimalmedien wurden entweder mit 0,1% (v/v) Casaminoacids und 0,1% (v/v) Natriumacetat oder mit 0,2% (v/v) Glycerin supplementiert (4.6). Zusätzlich wurden die Medien mit 50 μ g/ml Ampicillin versetzt (4.7). 100 ml Vorkultur wurden 1:100 mit einer üN-Kultur angeimpft und das Wachstum mittels Streumessung verfolgt (5.2.1.2). Bei einer OD600 von 0,6 wurden die Medien für die Wachstumsratenbestimmung in den folgenden Verhältnissen mit der Vorkultur angeimpft: YT-Medium 1:50, M9Minimalmedien 1:25. Das Wachstum der Zellen wurde spektralphotometrisch verfolgt.

Die Wachstumsraten (μ = Verdopplung pro Stunde) wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$\begin{split} \mu &= lg(M_2) - lg(M_1)/lg2(t_2\text{-}t_1)\\ M_1 &= OD_{600} \text{ zu Beginn des exponentiellen Wachstums}\\ M_2 &= OD_{600} \text{ zum Ende des exponentiellen Wachstums}\\ t_1 &= Zeitpunkt \text{ zu } M_1\\ t_2 &= Zeitpunkt \text{ zu } t_2 \end{split}$$

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Messen von Konzentrationen

5.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ein UV/VIS-Spektralphotometer der Firma Beckman (Typ DU 64) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge λ von 260 nm. Damit in einem linearen Bereich gemessen werden konnte (OD260 = 0,1 bis 0,9) mussten die Nukleinsäure-Proben in der Regel mit *Aqua dest*. verdünnt werden. Das Spektralphotometer wurde zuvor mit *Aqua dest*. kalibriert. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet sich die Konzentration der Probe aus der Absorption bei 260 nm mittels des folgenden, vereinfachten Zusammenhangs:

 $1A_{260} = 50 \ \mu g/ml$ doppelsträngige Nukleinsäure $1A_{260} = 37 \ \mu g/ml$ einzelsträngige Nukleinsäure

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurde zusätzlich mit einem UV-Spektrum von 220 nm bis 320 nm überprüft. Mittels des Quotienten E_{260}/E_{280} konnte die Reinheit einer Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Für eine reine Probe sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die Konzentration von angesetzten Nukleotidlösungen wurde ebenfalls spektralphotometrisch bestimmt. Allerdings wurde dabei der Substanzspezifische Extinktionskoeffizienz ε mitberücksichtigt. Nach dem Labert Beerschen Gesetzt gilt dabei:

$$\mathbf{E} = \mathbf{\epsilon} \cdot \mathbf{c} \cdot \mathbf{d}$$

- E = gemessene Extinktion bei angegebener Wellenlänge λ (nm)
- ϵ = substanzspezifischer molarer Extinktionskoeffizienz bei angegebener Wellenlänge λ
- c = molare Konzentration der absorbierenden Substanz
- d = Schichtdicke der Küvette (hier 1 cm)

Für die Konzentration gilt danach: $c = E \cdot e^{-1} \cdot d^{-1}$

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Nukleotide sind die folgenden:

Adenosin-5'-triphosphat	(ATP) ε ₂₅₉	$15.400 \left[M^{-1} \cdot cm^{-1} \right]$
Cytidin-5'-triphosphat	(CTP) ε ₂₇₁	9.000 [M ⁻¹ · cm ⁻¹]
Guanosin-5'-triphosphat	(GTP)ε ₂₅₃	13.700 [M ⁻¹ · cm ⁻¹]
Uridin-5'-triphosphat	(UTP) ε ₂₆₂	$10.000 \left[M^{-1} \cdot cm^{-1} \right]$
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	(dATP) ε ₂₅₉	$15.200 \left[M^{-1} \cdot cm^{-1} \right]$
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	(dCTP) ε ₂₇₁	9.300 [M ⁻¹ · cm ⁻¹]
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	(dGTP) ε ₂₅₃	$13.700 \left[M^{-1} \cdot cm^{-1} \right]$
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	(dTTP) ε ₂₆₇	9.600 [M ⁻¹ · cm ⁻¹]

5.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde im Spektralphotometer (Beckman, Typ DU 64) mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm beobachtet. Um im linearen Bereich (OD_{600} -Werte zwischen 0,1 und 0,9) zu messen wurden die Proben gegebenenfalls mit sterilem YT-Medium (4.6) verdünnt. Das Photometer wurde vor jeder Messung gegen steriles YT-Medium kalibriert.

5.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mittels des "Bradford-Microassays" der Firma Bio Rad. Es wurden 5 – 20 μ l Proteinlösung mit 780 - 795 μ l *Aqua dest.* und 200 μ l Bradford-Reagenz (4.7) gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Probe wurde in einem Beckman Spektralphotometer (Typ DU 64) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Das Photometer wurde zuvor gegen 780 – 795 μ l *Aqua dest.*, 5 - 20 μ l des sich in der Proteinlösung befindlichen Puffers und 200 μ l Bradford-Reagenz kalibriert. Mittels einer Eichgeraden mit bekannten Proteinkonzentrationen (1 – 15 μ g BSA (4.5)) wurde die Konzentration der untersuchten Probe bestimmt.

5.2.1.4 Messung von Radioaktivität

Die Radioaktivitätsmessung von ³²P-Proben wurde im Beckman LS 6500 Szintillationszähler durchgeführt. Dabei wurde die Cerenkov-Strahlung der Probe im Tritium-Kanal gemessen. Dazu wurden 1 μ l Probe oder das getrocknete Pellet einer Probe, ohne Szintillationsflüssigkeit verwendet.

5.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Bei dieser Proteindenaturierenden Methode wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und für eine Minute gemischt, zur Trennung der Phasen wurde anschließend fünf Minuten zentrifugiert. Bei kleinen Volumina (Eppendorfgefäß) wurde bei 12000 rpm (Hettich Mikro 22), bei größeren Volumina (Greinerröhrchen) bei 6000 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, wohingegen die Interphase und die organische Phase verworfen wurden. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Zur Entfernung der Phenolreste aus der wässrigen Lösung wurde anschließend eine Extraktion mit einem Volumen Chloroform durchgeführt.

Bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Zellaufschlüssen wurde vor der Behandlung mit Phenol/Chloroform eine Extraktion mit einem Volumen reinem Phenol durchgeführt.

5.2.2.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Für die Fällung von Nukleinsäuren wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit Natriumacetat als Fällungshilfe versetzt. Dabei wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5 für DNA-Lösungen und 1/20 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,3 für RNA-Lösungen verwendet. Daraufhin wurden die Proben mit dem zwei- bis dreifachem Volumen absolutem Ethanol (-20°C) supplementiert und durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt. Für die Fällung von besonders kleinen Nukleinsäuren, z.B. Oligonukleotiden (5.2.8.5) oder Sequenzierreaktionen (5.4.3.1), wurden 1/5 Volumen Glykogen (20 μ g/ml) und 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat, pH 5,7 als Fällungshilfen benutzt. Weiterhin wurden diese Proben mit dem fünffachen Volumen absolutem Ethanol (-20°C) versetzt.

Die Fällung erfolgte bei -20°C für 30-45 Minuten, manchmal auch üN oder mittels Inkubation in flüssigen Stickstoff für 3 Minuten. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren durch Zentrifugation für 30 bis 45 Minuten, bei 12.000 rpm (kleine Volumina, Eppendorfgefäß, Hettich Mikro 22) oder bei 6.000 rpm (große Volumina, Greinerröhrchen, Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets mit einem Volumen 80%igen Ethanol (-20°C) versetzt, und durch eine erneute 10minütige Zentrifugation von Salzresten befreit, RNA-Proben und markierte Oligonukleotide wurden zweimal mit 80%igen Ethanol behandelt. Anschließend wurden die Pellets im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophylisiert oder an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurden die Nukleinsäure Pellets in einem geeigneten Volumen *Aqua dest*. oder TE-Puffer (4.6) aufgenommen.

5.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-Lösungen wurden mit Hilfe der Mikrotropfendialyse entsalzt. Diese Methode eignet sich für die Dialyse von Nukleinsäure-Lösungen mit einem Volumen von bis zu 100 μ l. Dazu wurden 30-40 ml TE-Puffer (4.6) in eine sterile Petrischale gegeben und ein VS Millipore Membranfilter (Durchmesser 2,5 cm, Porengröße 0,025 μ m) auf die Oberfläche der Flüssigkeit aufgesetzt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die glänzende Seite des Filters nach oben zeigte. Danach wurde die Nukleinsäure-Probe auf den Membranfilter gegeben und die Petrischale abgedeckt. Die Dialyse erfolgte für 2 Stunden bei RT, im Anschluss daran wurde die Probe vorsichtig vom Filter abgenommen. Der Membranfilter wurde zum Schluss bei größeren Volumina (>50 μ l) 2 x mit 10 μ l TE-Puffer, bei kleineren Volumina (<50 μ l) nur 1 x mit 10 μ l TE-Puffer, gespült. Dadurch wurden auf dem Filter verbliebene Nukleinsäure-Reste aufgenommen.

5.2.3 Präparative Isolation von Plasmid-DNA (Maxipräp)

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen & Wells (1981) beschriebenen Methode. Dazu wurden 800 ml YT-Medium (4.6) mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit 8 ml Vorkultur angeimpft und üN auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific, Model G25) bei 37°C inkubiert. Die Zellkultur wurde auf zwei JA-10 Becher verteilt und für 10 Minuten bei 8000 rpm, 4°C (Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in insgesamt 16 ml Saccharoselösung resuspendiert. Danach wurden je 8 ml in ein Ti55.2-Polycarbonatröhrchen überführt und mit je 3 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 sowie mit 3 ml Lysozymlösung versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden je 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzu gegeben und weiteren 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend 45 Minuten bei 44000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der klare Überstand wurde mit RNase A versetzt (Endkonzentration 50 μ g/ml) und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde Proteinase K (Endkonzentration 50 μ g/ml) hinzu gegeben und weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde in Greinerrörchen überführt mit einem halben Volumen PEG-Lösung versetzt und für 30 Minuten auf Eis gefällt. Durch die darauf folgende Zentrifugation für 45 Minuten, 4.000 rpm,

4°C (Beckman Zentrifuge J2 21; JS-7.5 Ausschwingrotor) wurde die Plasmid-DNA pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml TE-Puffer (4.6) aufgenommen und anschließend Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.2.1). Nach der Ethanolfällung (5.2.2.2) wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch bestimmt (5.2.1.1).

Saccharose-Lösung:	25% (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10% (w/v) Brij 35 1 Volumen 10% (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest</i> . pH 8,0
RNase A:	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (nach Maniatis <i>et al.,</i> 1982) von DNase-Aktivität befreit
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest</i> .
PEG-Lösung:	30% (w/v) PEG ₆₀₀₀ in 1,5 M NaCl

5.2.4 Plasmidisolation im analytischen Maßstab (Minipräp)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde nach erfolgreicher Transformation (5.1.6) von *E. coli* Stämmen mit Plasmid-DNA angewendet. Ziel war es zu überprüfen, ob der isolierte Klon das richtige Plasmid enthielt und nicht etwa ein Religationsprodukt des Ausgangsvektors. Die angewendete Arbeitsweise geht auf eine von Birnboim und Doyle beschriebene Methode zurück, die hier allerdings in veränderter Form eingesetzt wurde (Birnboim & Doyle, 1979).

Für die Isolation des Vektors wurden 3 ml einer üN-Kultur des entsprechenden Stammes verwendet. Dazu wurden nacheinander zweimal 1,5 ml der Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und mittels Zentrifugation, jeweils 5 Minuten bei 12.000 rpm und RT, übereinander pelletiert (Hettich Mikro 22). Das Zellpellet wurde dann in 100 µl Lyselösung I resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l Lyselösung II zugegeben, die Probe durch mehrfaches Invertieren gut gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit 150 µl 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 versetzt, gemischt und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation (5 Minuten, 12.000 rpm, RT; Hettich Mikro 22) wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA pelletiert und so von der Plasmid-DNA abgetrennt. Der Überstand, welcher u. a. die Plasmid-DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.2.1). Durch eine anschließende Ethanolfällung wurde die Plasmid-DNA aufkonzentriert und von überschüssigen Salzen befreit (5.2.2.2). Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 25 µl TE-Puffer aufgenommen und gegebenenfalls die Konzentration mittels Messung der UV-Absorption ermittelt (5.2.1.1). Für die Überprüfung der Plasmid-DNA wurde diese mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.5) behandelt, um durch ein charakteristisches Hydrolyseergebnis die Identität des Vektors feststellen zu können (5.2.8.1). Bei der Restriktion von Minipräp-DNA wurden stets 2 μ l RNase A (200 μ g/ml) zugegeben um noch enthaltene RNA hydrolytisch abzubauen.

Lyselösung I:

50 mM Glukose 25 mM Tris-HCL, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 0,4 mg/ml Lysozymchlorid; frisch zugegeben

200 mM NaOH 1% (v/v) SDS (nach dem Autoklavieren zugegeben)

Lyselösung II:

5.2.5 Plasmidisolation mit dem Quiagen Plasmid Midi Kit (Midipräp)

Die Midi-Präparation von Plasmid DNA wurde angewendet, wenn ein erfolgreich kloniertes Plasmid durch Restriktionshydrolysen (5.2.8.1) bereits identifiziert wurde und im Anschluss daran die Sequenz des Plasmids überprüft werden sollte.

Die Midi-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kit (4.8). Die Präparation folgte dabei weitgehend den Anweisungen des Kits. 50 ml einer üN-Kultur wurden in Corex Glasgefäße überführt und die Zellen mittels Zentrifugation (6.000 rpm, 15 min, 4°C; Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 (4°C) resuspendiert und nach der Zugabe von 4 ml Puffer P2 durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Danach wurde die Probe bei RT für 5 Minuten inkubiert. Durch die Anwesenheit von LyseBlue im Puffer P2 färbt sich die Probe blau. Anschließend wurden 4 ml eiskaltem Puffer P3 zugegeben, die Probe mehrfach invertiert und für 15 Minuten auf Eis gelagert. Durch die Zugabe von Puffer P3 verschwindet die Blaufärbung wieder, und die Lösung erscheint milchig. Mittels der folgenden Zentrifugation (6.000 rpm, 30 Minuten 4°C; Heraeus Megafuge 1.0 R) wurden Zelltrümmer und Proteine weitestgehend entfernt. Während der Zentrifugation wurde die Quiagen-tip 100 Säule mit 4 ml Puffer QBT equilibriert. Der klare Überstand wurde auf die vorbereitete Säule aufgetragen und gewartet bis die Flüssigkeit durchgelaufen ist. Danach wurde die Säule zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen, die Durchflüsse wurden verworfen. Die Plasmid DNA wurde mittels 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert und in einem sterilen Greiner aufgefangen. Die DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol (RT) vermischt und bei 6.000 rpm, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 2 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet und in 40 μ l TE-Puffer (4.6) aufgenommen.

5.2.6 Präparation von chromosomaler DNA

Die folgende Vorgehensweise wurde nach einer von Liebig beschriebenen Methode adaptiert (Liebig, 1996). Für die Präparation von chromosomaler DNA aus *E. coli* wurde ein 25 ml YT-Medium (4.6) 1/100 mit einer üN-Kultur des entsprechenden Stammes angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter schütteln inkubiert (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm), und das Wachstum mittels Streu-

messung (5.2.1.2) verfolgt. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8 bis 0,9 erreicht hatte wurden 2 ml abgenommen und die Zellen mittels Zentrifugation (3 Minuten bei 13.000 rpm, RT; Hettich Mikro 22) pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden dann in 200 μ l Lösung I resuspendiert und mit 22 μ l Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei RT wurden 200 μ l 1% ige (v/v) SDS-Lösung zugegeben, die Proben gemischt und weitere 10 Minuten bei RT inkubiert.

Zur Entfernung von Zellresten und Proteinen wurde die Probe anschließend viermal mit Phenol/Chloroform und abschließend einmal mit Chloroform extrahiert (5.2.2.1). Aufgrund der hohen Viskosität der Probe wurden Pipettenspitzen mit einer erweiterten Öffnung verwendet. Weiterhin wurde die Probe zur Phasentrennung 30 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, anstatt wie Üblich fünf Minuten.

Im Anschluss daran wurden die Proben mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,5 und dem dreifachem Volumen absolutem Ethanol versetzt und üN bei -20°C gelagert. Für die Fällung der Nukleinsäuren wurde die Probe dann für 45 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80% igem Ethanol gewaschen und lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator). Nach der Aufnahme des Pellets in 50 μ l TE-Puffer (4.6) wurde die Probe mit 2,5 μ l RNase A (200 μ g/ml) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der RNase A aus dem Ansatz wurde die Probe erneut mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend für zwei Stunden bei RT gegen TE dialysiert (5.2.2.3).

Lösung I:

50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0

5.2.7 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *Escherichia coli* Stämmen wurde nach der folgenden Methode verfahren, dabei handelt es sich um eine abgewandelte Vorgehensweise des von Liebig und Wagner beschriebenen Wegs zur Isolation von Gesamt-RNA (Liebig & Wagner, 1995).

100 ml YT-Medium, gegebenenfalls versetzt mit Ampicillin (50 μ g/ml), wurde mit einer üN-Kultur 1/100 angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Das Wachstum der Kultur wurde spektralphotometrisch überprüft (5.2.1.2) und eine Wachstumskurve erstellt. Die Zellernte erfolgte sowohl in der logarithmischen (OD₆₀₀ 0,6 bis 0,8) als auch in der früh stationären Wachstumsphase. Es wurden 10 ml logarithmische Zellen bzw. 6 ml stationäre Zellen abgenommen und in Greinerröhrchen überführt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation 6.000 rpm; 4°C für 10 Minuten pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen und die feuchten Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Je 0,5 ml Phenol, gesättigt mit 20 mM Natriumacetat, wurde in Eppendorfgefäße vorgelegt und bei 60°C im Wasserbad (julabo C) vorinkubiert. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in je 0,5 ml Puffer I resuspendiert und sofort zum vorinkubiertem Phenol gegeben. Die Phenol/Zellmischungen wurden daraufhin mittels des Vortexes gut gemischt und für fünf Minuten bei 60°C inkubiert, zwischendurch wurden die Proben nochmals gut gemischt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm zur Phasen Trennung zentrifugiert (Hettich Mikro 22). Die wässrigen Phasen wurden abgehoben und nochmals mit heißem Phenol für fünf Minuten bei 60°C inkubiert und mehrfach gründlich gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen abgenommen und mit 0,5 ml Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und bei 60°C inkubiert. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen einmal mit Chloroform bei RT extrahiert. Nach der Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen in neue Eppendorfgefäße überführt und jeweils mit 40 μ l 0,1 M MgCl₂, 13 μ l 3M NaOAc, pH 5,3 und 2,5 μ l DNase I (10U/ μ l; RNase frei) versetzt und für 2 h bei RT inkubiert.

Im Anschluss daran erfolgte eine Extraktion mit je 0,5 ml Phenol/Chloroform (5.2.2.1) um die DNase I aus den Ansätzen zu entfernen. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 10 μ l 3M Natriumacetat, pH 5,3 und 1 ml absolutem Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation bei 13.000 rpm, bei RT für 30 Minuten (Hettich Mikro 22) wurde die RNA pelletiert. Die RNA-Pellets wurden dann zweimal mit 400 μ l 80% igem Ethanol gewaschen (10 Minuten bei 13.000 rpm). Die RNA-Pellets wurden an der Luft getrocknet und in 40 μ l TE-Puffer (4.6) aufgenommen. Dazu wurden die Proben für 20-30 Minuten bei 37°C geschüttelt (Haep Labor Consultant, HTM 130 L). Die RNA-Lösungen wurden dann in neue Eppendorfgefäße überführt und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (5.2.1.1), die Qualität der RNA-Proben wurde mittels einem 1% igem Agarosegel überprüft (5.2.9.1). Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA 1:500 verdünnt, für die Überprüfung der RNA-Qualität wurde die Stocklösung 1:20 verdünnt.

Puffer I:

20 mM NaOAc, pH 5,3 1mM EDTA, pH 8,0 0,5% (v/v) SDS (nach dem Autoklavieren zugegeben)

5.2.8 Enzymatische Reaktionen

5.2.8.1 Restriktionshydrolysen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme gehören zum Typ II der Endonukleasen (Zabeau & Roberts, 1979). Dies bedeutet, dass die Enzyme innerhalb ihrer Erkennungssequenz auch schneiden. Abhängig vom verwendeten Enzym entstehen, bei der hydrolytischen Spaltung doppelsträngiger DNA, 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends). Die Restriktionshydrolasen wurden entsprechend den Herstellerangaben gehandhabt. Mittels Agarose- (5.2.9.1) oder Polyacrylamidgelen (5.2.9.2) wurde die Hydrolyse von DNA-Proben überprüft.

Bei der Restriktion von "Minipräp"-DNA (5.2.4) wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Restriktionsenzyme auch bei hohen Salzkonzentrationen aktiv sind, da diese DNA-Proben sehr salzhaltig sind. Weiterhin wurden bei diesen DNA-Proben noch 2 μ l RNase A (200 μ g/ml) mit in den Restriktionsansatz gegeben, um RNA-Verunreinigungen zu entfernen.

5.2.8.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur sequenzgenauen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten wurde die Methode der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) verwendet. Dieses von Mullis, 1987 erfundene System ermöglicht die präparative DNA Gewinnung aus kleinsten Probenmengen, *in vitro* (Mullis & Faloona, 1987). Die Vervielfältigung (*Amplifizierung*) erfolgt dabei mit Hilfe von zwei kurzen Oligonukleotiden (*Primern*) die sequenzspezifisch an die Ziel-DNA binden und damit einen Startpunkt für die DNA-Polymerase bilden. Durch die Wahl der Primersequenzen wird die Länge des zu kopierenden DNA-Bereichs bestimmt. Die *Amplifikation* resultiert aus einer Wiederholung (20 bis 40 Zyklen) der drei Schritte: Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges (*Melting*), Anlagerung der Primer an die Ziel-DNA (*Annealing*), Verlängerung der Primer durch eine DNA-Polymerase (*Elongation*).

Aufgrund der Tatsache, dass der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen werden muss, in der Regel bei 94°C, ergibt sich die Notwendigkeit einer hitzestabilen DNA-Polymerase. In dem Organismus *Thermus aquaticus* der in 100°C heißen Quellen lebt, wurde ein solches Enzym gefunden. Die Taq-Polymerase ist hitzestabil und übersteht dadurch die hohen Temperaturen, die zum Denaturieren des DNA-Stranges nötig sind. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt über 70°C, weshalb die *Elongation* bei 72°C stattfindet. Während die Annealingtemperatur durch die Schmelztemperatur (Tm) der Primer bestimmt wird und ca. 10°C unterhalb des Tm-Wertes liegen sollte. Die Tm-Werte, der Primer, können mit der unten aufgeführten Formel berechnet werden (Maniatis *et.al.*, 1982).

> Tm = 69,3 + 0,41 (G+C)% - 650/LL = Länge des Primers (bp)

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 100 μ l und enthielt in 1x Taq-Puffer die weiteren Komponenten: 50 ng chromosomale DNA (MG1655) oder 10 ng Fragment-DNA, je 10 pM der verwendeten Primer, 0,2 mM je dNTP (A,C,G,T) und 5U Taq-Polymerase. Für präparative PCRs wurden zehn 100 μ l Ansätze angesetzt. Die Reaktion fand im ThermoCycler Varius V (Landgraf) statt, da dieser Cycler noch keinen temperierbaren Deckel besaß mussten die PCR-Ansätze mit Paraffin überschichtet werden. Bei der Verwendung von Fragment-DNA als Template wurde eine zweistufige PCR durchgeführt, da das Fragment mit Restriktionsenzymen behandelt worden war (5.2.8.1), und dadurch die Primer am Ende überstanden. Deshalb wurde für die ersten Zyklen mit einem niedrigern Tm-Wert gerechnet:

	Chrom. DNA			Fragment-DNA	
A:	94°C	60 sec	A:	94°C	60 sec
B:	94°C	60 sec	B:	94°C	60sec
	53°C	60 sec		47°C	60 sec
	72°C	60 sec		72°C	60 sec
	B wird 35 mal	wiederholt		B wird 15 mal	wiederholt
D:	72°C	600 sec	C:	94°C	60 sec
	38°C	600 sec		53°C	60 sec
	4°C	∞		72°C	60 sec

	C wird 20 mal	wiederholt
D:	72°C	600 sec
	38°C	600 sec
	4°C	∞

Spätere PCR-Reaktionen wurden im Mastercycler epgradient S (Eppendorf) durchgeführt, zudem wurde die Phusion *high-fidelity* DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt, im Gegensatz zur Taq-Polymerase, auch eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität (*proof reading correction*) und dadurch eine niedrige Fehlerrate beim Nukleotideinbau (4,4 x 10^{-7} , Finnzymes) (4.5). Die Berechnung der Annealingtemperatur für die Primer wurde nach der *nearest neighbour* Methode durchgeführt (<u>www.finnzymes.com</u>). Der Reaktionsansatz wurde etwas abgewandelt; in einem Volumen von 20 µl wurden 50 ng chrom. DNA je 0,5 µM Primer, 0,2 mM je dNTP und 0,02U Phusion-Polymerase in 1 x Phusion-Puffer 518 eingesetzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte für 30 sec bei 98°C, die Amplifikation wurde 30 mal wiederholt und setzte sich aus den folgenden drei Schritten zusammen: Denaturieren 98°C, 10 sec; Annealing 55°C-65°C, 20 sec und Elongation 72°C, 30 sec. Die *Final-Extension* fand für 5 min bei 72°C statt, danach wurde der Cycler bis zur Entnahme der Proben bei 4°C gehalten.

Auf einem analytischem Agarosegel (5.2.9.1) wurden die PCR-Reaktionen überprüft und die Ansätze mit dem gewünschten Produkt vereinigt. Anschließend wurde das PCR-Produkt über ein präparatives Agarosegel isoliert und mittels Phenol/Chloroform-Extration aufgereinigt (5.2.2.1).

5.2.8.3 Ligation

Für die kovalente Verknüpfung von DNA-Enden wurde die T4 DNA-Ligase verwendet (4.5). Für eine gerichtete Klonierung wurden DNA-Fragmente eingesetzt, die sowohl überhängende als auch glatte Enden aufwiesen. Es wurden je 50 ng linearisierte Vektor DNA verwendet und unterschiedliche Mengen Insert DNA. Dadurch ergaben sich Vektor zu Insert Verhältnisse von 1:2 bis 1:50 je nach eingesetzten Vektor bzw. Insert. Das DNA-Gemisch wurde für 5 Minuten bei 60°C inkubiert und danach auf RT abgekühlt. Dann wurde die Probe mit 1 μ l 10xLigationspuffer und 1U T4 DNA-Ligase versetzt und mit *Aqua dest.* auf 10 μ l Volumen aufgefüllt. Die Ligation erfolgte erst für 3-4 h bei 4°C und anschließend bei RT üN. Schließlich wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert und der Ligationsansatz in eine Transformationsreaktion eingesetzt (5.1.6).

10x Ligationspuffer:

660 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM MgCl₂ 50 mM DTT 10 mM ATP

5.2.8.4 Klenow-Reaktion zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA-Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragments können, aufgrund der fehlenden 5'-3'-Exonukleaseaktivität, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden mit den entsprechenden komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden.

Reaktionsansatz:	x μ l DNA (max. 1 μ g)
	2,5 μ l 10 x Klenow-Puffer
	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	1 μ l Klenow Enzym (8 U/ μ l)
	ad 25 μ l mit <i>Aqua dest</i> .
10 x Klenow-Puffer:	500 mM Tris-HCl, pH 7,2
	100 mM MgSO ₄
	1 mM DTT
	500 μ g/ml BSA, acetyliert

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT wurde der Ansatz mit TE-Puffer (4.6) auf 50 μ l aufgefüllt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2.1) sowie eine E-thanolfällung (5.2.2.2) durchgeführt. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in einem geeignetem Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Die oben beschriebene Klenow-Reaktion kann auch zur radioaktiven Endmarkierung von DNA-Fragmenten genutzt werden. Dazu wurde im Reaktionsansatz das dNTP durch die Zugabe von 20 μ Ci des entsprechenden [α^{32} P]-Nukleotids (3000 Ci/mmol) ersetzt, welches als erstes zum Auffüllen des überhängenden Stranges eingebaut

wird. Für die Verwendung eines radioaktiv markierten Größenstandards wurden 10 μ l kb-Leiter (Invitrogen) mit 20 μ Ci [α^{32} P]-dATP (3000 Ci/mmol) endmarkiert. Radioaktiv endmarkierte Fragmente, welche für Retardierungsanalysen verwendet wurden, wurden in der Regel in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen. Radioaktiv markierte Fragmente, die als externe Standards für Quantifizierungen oder als Größenmarker (kb-Leiter) dienten, wurden in einem Volumen von 200 μ l TE-Puffer resuspendiert.

5.2.8.5 Oligo-Markierung

Synthetisch erstellte Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende keine Phosphatgruppe und können deshalb mittels des Enzyms T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert werden. Dabei wird die endständige γ -Phosphatgruppe vom Substrat γ -³²P-ATP kovalent auf die 5'-OH-Gruppe des Oligonukleotids übertragen.

In einem Reaktionsvolumen von 20 μ l wurden 10 pmol Oligonukleotid (4.4.1) mit 50 μ Ci γ -³²P-ATP (5000 Ci/mmol) (4.4.3) in 1x Kinasepuffer gemischt. Durch die Zugabe von 10U T4 Polynukleotidkinase (4.5) wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Polynukleotidkinase durch eine Inkubation bei 68°C für 10 Minuten inaktiviert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz mittels einer Ethanolfällung aufkonzentriert (5.2.2.2). Dazu wurde die Probe mit 1 μ l Glykogen (20 μ g/ml) sowie 2 μ l 7,5 M Ammoniumacetat pH 5,7 versetzt und gründlich gemischt. Danach wurden 100 μ l absolutem Ethanol (-20°C) zugegeben, die Probe nochmals gut gemischt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Durch eine 30minütige Zentrifugation (Hettich EBA 12R) bei 4°C, 13.000 rpm wurden die Oligonukleotide pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Nukleinsäurepellet zweimal mit 50 μ l 80% igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet bei 30°C inkubiert, bis es trocken war, um dann in 20 μ l TE-Puffer (4.6) gelöst zu werden. Dazu wurde die Probe für 1-2 h bei RT geschüttelt (Eppendorf Mixer 5432) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

5.2.9.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von chromosomaler DNA, Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden 0,5 bis 0,8% ige (w/v) Agarosegele verwendet (Maniatis *et al.*, 1982), zur Analyse von RNA-Proben wurden 1% ige Agarosegele benutzt. Dazu wurden 100 ml 1 x TAE-Puffer (4.6) mit der entsprechenden Menge Agarose aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf unter 60°C abgekühlt war, wurde sie mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und als ein Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Als die Gelmatrix vollständig verfestigt war, wurde das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TAE-Laufpuffer (4.6), der ebenfalls 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid enthielt, überschichtet.

Die Nukleinsäure-Proben wurden mit einem Volumen 2 x TAE-Probenpuffer versetzt und bei 80 bis 120 V für 1-2 Stunden aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, welches sich in die DNA einlagert, konnten die Nukleinsäuren auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) bei 302 nm visualisiert werden. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer SW-Kamera (Sanyo B/W CCD, Modell VC 25-12), mit einem UV-Filter, aufgenommen und mittels eines Videoprinters ausgedruckt. Für präparative Gele wurde 'ultrapure' Agarose verwendet und die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte bei 320 nm. Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte nur in RNase freien Elektrophoresekammern, die zuvor mit DEPC (4.7) behandelt worden waren.

5.2.9.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele sind ein Polymerisationsprodukt bestehend aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Bisacrylamid dient als Quervernetzer, für die nur zweidimensionale Kettenbildung durch Acrylamid. Die Porengröße und damit der Auftrennungsbereich des Polyacrylamidgels werden durch die Acrylamidkonzentration sowie durch den Vernetzungsgrad bestimmt. Die Polymerisation ist eine Radikalkettenreaktion, diese wird durch die Zugabe von N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. TEMED dient dabei als Polymerisationskatalysator und APS als Radikalbildner.

Die native PAGE wurde zur Analyse kurzer DNA-Fragmente mittels TGGE (5.4.1.3) und für die Verzögerungsgelelektrophorese (5.4.2) verwendet.

Für Retardierungsanalysen wurde eine 5% ige Gellösung mit einer Vernetzung von 46:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) angesetzt und die Polymerisation durch die Zugabe von 60 μ l TEMED und 600 μ l 10% APS gestartet. Die Gellösung wurde zwischen zwei gereinigten Glasplatten gegossen, dadurch hatten die Gele eine Größe von 330 mm x 250 mm x 1 mm (B x H x T). Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer (4.6) verwendet. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen 1,5 x TBE-Probenpuffer (4.6) versetzt und für ca. 3 Stunden bei 30 mA elektrophoretisch aufgetrennt, dabei wurde das Gel mittels eines Ventilators auf RT gekühlt. Die Visualisierung der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgte mittels Autoradiographie (5.2.10.2).

 Gellösung (5%):
 12,5 ml 40% Acrylamid-/

 Bisacrylamid-Lösung (46:1)
 5 ml 10 x TBE-Puffer

 ad 100 ml mit Aqua dest.
 60 μl TEMED

 600 μl 10% APS
 600 μl 10% APS

Für die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) (5.4.1.3) wurden spezielle Glasplatten verwendet, bei denen die Abstandshalter für die Gelbegrenzung und für die Geltaschen aufgeklebt waren. Dadurch ergab sich eine Geldimension von 180 mm x 170 mmx 1 mm (B x H x T). Für die Gelmatrix wurde eine 7,5% ige PAA-Lösung mit einer Quervernetzung von 30:1 verwendet, als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE (4.6) benutzt. Der verwendete Probenpuffer enthielt kein Glycerin, da die TGGE auf einer horizontalen Platte erfolgt.

Gellösung (7,5%):

15 ml 30% Acrylamid-/
Bisacrylamid-Lösung (30:1)
3 ml 10 x TBE-Puffer
ad 60 ml mit *Aqua dest*.
30 μl TEMED
300 μl 10% APS

5.2.9.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende PAGE wurde verwendet, um DNA-Fragmente, cDNAs und RNAs ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Dazu wurde das denaturierende Agens Harnstoff der Gellösung zugesetzt, um Nukleinsäuren als Einzelstränge, frei von Sekundärstrukturen, im Gel auftrennen zu können. Die PAGE wurde deshalb zur Produktanalyse von *in vitro* Transkriptionen (5.4.4), Footprint-Analysen und Primer-Extension Reaktionen (5.4.6) verwendet.

Es wurden 10% ige oder 15% ige Polyacrylamidgele mit einer Vernetzung von 20:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) hergestellt, die 7 M Harnstoff und 1 x TBE-Puffer (4.6) enthielten. Nachdem sich der Harnstoff vollständig gelöst hatte wurde die Gellösung für ca. 3 Minuten entgast und die Polymerisation durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Die Gellösung wurde zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Die Dimension des Gels betrug 310 mm x 395 mm x 0,4 mm (B x H x T).

Nach dem die Gelmatrix fest war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1 x TBE-Laufpuffer (4.6) befüllt. Das Gel wurde vor dem Auftragen der Proben vorgeheizt (10 min 25 W, 10 min 50 W, 10 min 75 W). Die zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden mit einem Volumen 2 x Formamid-Probenpuffer (4.6) versetzt, 3 Minuten bei 96°C denaturiert und danach sofort auf Eis überführt. Anschließend wurden die Proben auf das vorbereitete Gel aufgetragen und für 2 bis 4 Stunden bei 75 bis 90 W aufgetrennt. Die Proben wurden anschließend mittels Autoradiographie (5.2.10.2) sichtbar gemacht.

Gellösung:

42 g Harnstoff 10 ml 10 x TBE-Puffer 25 ml 40% Acrylamid-/ Bisacrylamid-Lösung (20:1) ad 100 ml mit *Aqua dest*. 60 μl TEMED 600 μl 10% APS

Neben der oben beschriebenen Verwendung der PAGE wurde diese Methode auch für nicht radioaktiv markierte Nukleinsäuren benutzt. Allerdings wurden dafür Gele verwendet, die kleiner und dicker sind (190 mm x 170 mm x 1 mm). Deswegen wurde die Gellösung (50 ml) nicht entgast, jedoch musste das Gel mit einer Metallplatte isoliert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Metallplatte unten nicht in den Elektrophoresepuffer ragte. Vor der Auftragung der Proben wurde das Gel vorgeheizt (10 min 10 W, 20 min 30 W), danach lief die Elektrophorese für 10 Minuten bei 60 W und anschließend für ca. 40 Minuten bei 40 W. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Silber gefärbt (5.2.10.1).

5.2.10 Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen

5.2.10.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Die Detektion nicht radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels der Silberfärbung nach Beidler *et al.*, (1982). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für fünf Minuten in Fixierlösung I geschwenkt und dann für 10 Minuten in der Silbernitratlösung. Anschließend wurde das Gel dreimal für je eine Minute mit Aqua dest. gewaschen und dann so lange in frisch angesetzter Entwicklerlösung inkubiert, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Durch 10minütiges schwenken in Fixierlösung II wurde die Entwicklung gestoppt.

Fixierlösung I:	10% (v/v) Ethanol
	0,5% (v/v) Essigsäure
Silberlösung:	$2 \text{ g AgNO}_3/1 \text{ in } Aqua \ dest.$
Entwicklerlösung:	15 g NaOH 0,08 g Na ₂ BH ₄ 4 ml Formaldehyd (37%ig) ad 11 mit <i>Aqua dest</i> .
Fixierlösung II:	0,75% (v/v) Na ₂ CO ₃

5.2.10.2 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen erfolgte durch die Exposition von Röntgenfilmen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einen alten Röntgenfilm oder auf Whatman 3 MM Papier aufgezogen, mit Polyethylenfolie bedeckt und in eine Expositionskassette (Siemens) gelegt. Unter Rotlicht wurde ein Röntgenfilm (Blaufilm CEA RP New) auf das Gel gelegt, und dieser üN oder bis zu 14 Tage bei -20°C auf dem Gel gelagert. Falls nötig wurde zusätzlich noch eine Verstärkerfolie (DuPont Cronex) aufgelegt. Für die Entwicklung der Röntgenfilme wurde die Entwicklermaschine AGFA Curix 60 verwendet.

5.2.10.3 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden Phosphoimager Screens (BAS 2340, FUJI) auf die Polyacrylamidgele gelegt und diese für 3 Stunden oder üN bei RT exponiert. Anschließend wurden die Screens mit einem Phosphoimager (BioImager FAS 3000) gescannt und mit Hilfe der Computersoftware *Image Reader Fla. V.1.8 E* und *Image Gauge V3.0* ausgewertet.

5.2.11 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte (5.2.8.2) oder DNA-Fragmente die bei Restriktionshydrolysen (5.2.8.1) entstanden sind wurden mittels Gelelektrophorese über ein präparatives Agarosegel (5.2.9.1) von anderen Nukleinsäuren abgetrennt. Unter UV-Licht wurde die zu eluierende Probe mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation der DNA-Probe aus dem Gel erfolgte mittels Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle (4.8). Dazu wurde ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Loch an der unteren Spitze versehen und ein Drittel des Gefäßes mit Glaswolle gefüllt und autoklaviert. Das vorbereitete 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und das Gelstück auf die Glaswolle gelegt. Die Elution der Glaswolle erfolgte durch dreimaliges zentrifugieren, zweimal bei 6000 rpm, für 5 Minuten und einmal bei 12.000 rpm für 5 Minuten. Die wässrigen Eluate die sich im größeren Reaktionsgefäß gesammelt hatten wurden vereinigt und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2.1) und Ethanolfällung (5.2.2.2) und anschließende Dialyse (5.2.2.3) aufgearbeitet.

5.3 Aufreinigung von Rsd

Für die Präparation von Rsd wurden acht 800 ml BL21DE3/plysS/pUC18-rsd (4.2) Kulturen bei 37°C auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Model G25) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Rsd Überexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Kulturen für weitere vier Stunden inkubiert. Für die Zellernte wurden die Kulturen auf JA-10 Becher aufgeteilt und die Zellen pelletiert (15 min, 5000 rpm, 4°C, Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10 Rotor). Die Zellpellets wurden in Lysepuffer (50 mM NaCl) resuspendiert (3,5 ml Lysepuffer/1 g Zellen) und vereinigt. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall (Labsonic U, Braun Biotech Int.) aufgeschlossen.

Ultraschallaufschluss der Zellen:

Sonde :	Konische Sonde 50 T
Leistung :	150 W
Repeating Duty Cycle:	0,9
Power Range Switch:	high

15 Sekunden Ultraschall1 Minute auf Eis10 Zyklen

Die aufgeschlossenen Zellen wurden auf JA10-Becher aufgeteilt und Zelltrümmer abzentrifugiert (45 min, 12.000 rpm, 4°C; Beckman Zentrifuge J2-21, JA17-Rotor). Der Proteinhaltige Überstand wurde abgenommen, auf Ti55 Carbonatröhrchen aufgeteilt und erneut zentrifugiert (üN, 40.000 rpm, 4°C; Beckman Ultrazentrifuge L8-55, Ti55.2-Rotor). Der Rsd-haltige Überstand wurde abgenommen und 1:1 mit Lysepuffer versetzt und mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde das Econo-System der Firma Bio-Rad verwendet. Der erste Reinigungsschritt erfolgte mittels der DEAE-Sephadex A25 Säule, dabei handelt es sich um einen Anionenaustauscher. Das Säulenmaterial wurde nach Herstellerangaben gepackt (Säulenvolumen 25 ml; $\emptyset = 1,50$ cm, h = 14,5 cm). und mit Lysepuffer (10 mM NaCl) üN äquilibriert. Der Proteinhaltige Überstand wurde auf die Säule gepumpt (Flussrate 0,4 ml/min) und der Durchfluss in 12 ml Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurde die Säule erst mit Lysepuffer (10 mM NaCl) (0,4 ml/min, 12 ml Fraktionen) und dann mit Lysepuffer (100 mM NaCl) gewaschen (0,3 ml/min, 12 ml Fraktionen). Mittels eines Salzgradienten wurden die auf der Säule verbliebenen Proteine eluiert. In einem Volumen von 500 ml wurde ein Gradient von 100 mM – 1000 mM NaCl (in Lysepuffer) angelegt und mit 0,4 ml/min auf die Säule gepumpt, der Durchfluss wurde in Fraktionen von je 6 ml aufgefangen. Ein Teil der gesammelten Fraktionen wurde auf einem SDS-Gel (5.3.3) analysiert. Die Fraktionen die Rsd enthielten wurden daraufhin vereinigt, vier Stunden gegen 10 mM Lysepuffer dialysiert (5.3.2) und anschließend über die P11-Phosphocellulose aufgereinigt.

Für den zweiten Reinigungsschritt wurde eine P11-Phosphocellulose Säule verwendet (h = 9 cm; \emptyset = 3 cm, Säulenvolumen ≈ 64 ml), diese wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und mit Lysepuffer (10 mM NaCl) äquilibriert. Die Protein-Lösung wurde auf die Säule aufgetragen (0,4 ml/min) und der Durchfluss in Fraktionen von je 12 ml aufgefangen. Danach wurde die Säule erst mit Lysepuffer (10 mM NaCl) und dann mit Lysepuffer (100 mM NaCl) über Nacht gewaschen (0,4 bzw. 0,3 ml/min, 12 ml Fraktionen). Anschließend wurde ein Gradient von 100 mM – 700 mM NaCl in einem Volumen von 200 ml Lysepuffer angelegt (Flussrate 0,5 ml/min, 4 ml Fraktionen).

Einige der gesammelten Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen die Rsd enthielten wurden vereinigt und gegen Lysepuffer (10 mM NaCl) dialysiert. Anschließend wurde die Protein Lösung auf DNA-Cellulose aufgetragen. Dabei sollte Rsd allerdings nicht an der DNA-Cellulose binden, sondern sich im Durchfluss befinden. 70 ml Rsd Lösung wurden auf die DNA-Cellulose aufgepumpt (0,4ml/min) und der Durchfluss in 4 ml Fraktionen aufgefangen. Danach wurde die Säule zuerst mit Lyselösung (10 mM NaCl), dann mit Lyselösung (1M NaCl) gewaschen, die Flussrate betrug 0,4 ml/min, aufgefangen wurden 4 ml Fraktionen. Die Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel analysiert und die Fraktionen, die sauberes Rsd enthielten, vereinigt. Auf eine Ammoniumsulfatfällung der Rsd-Lösung wurde verzichtet, stattdessen wurde das Protein mittels Centriprep Centrifugal Filter (4.8) aufkonzentriert. Die Centrifugal Filter wurden nach Herstellerangaben befüllt und mit Parafilm verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte in der Beckman J2-21 Fuge, Ausschwingrotor JS-7.5 bei 4.000 rpm, 4°C für mehrere Stunden. Danach wurde die Proteinprobe mit einer geeigneten Menge (v/v) 100% Glycerin und (v/v) 1M NaCl und (v/v) 2M $MgCl_2$ versetzt, bis die Konzentrationen des Rsd-Puffers erreicht waren. Zum Schluss wurde die Konzentration der Rsd-Probe mittels Bradford-Assay bestimmt, die Probe aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die verwendeten Säulen wurden nach jedem Gebrauch mit Lysepuffer (1 M NaCl) gewaschen und anschließend mit Lysepuffer (10 mM NaCl) wieder äquilibriert.

Lysepuffer (1xTGED): 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 X mM NaCl 5% Glycerin 1 mM EDTA 0,1 mM DTT 0,2mM PMSF 0,1 µM Leupeptin 0,1 µM Pepstatin A **Rsd-Puffer:** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 200 mM NaCl 10 mM MgCl_2 25% (v/v) Glycerin 1 mM EDTA, pH 8,0 0,1 mM DTT 0,2 mM PMSF 0,1 µM Leupeptin 0,1 µM Pepstatin A

5.3.1 Proteinfällung mit Aceton

Bei dieser denaturierenden Proteinfällung wurden die Proben mit dem vierfachen Volumen Aceton p.A. (4.7) versetzt und nach dem Mischen für 2 h bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro 22). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 15 μ l *Aqua dest*. aufgenommen und über ein 15% iges SDS-Gel (5.3.3) analysiert.

5.3.2 Dialyse von Proteinlösungen

Die Entsalzung von Proteinlösungen erfolgte mittels Dialyseschläuchen (Porengröße 6000-8000), bei größeren Volumina wurden breitere Schläuche ($\emptyset = 20,4$ mm) verwendet, bei kleineren Volumina entsprechend schmalere Schläuche ($\emptyset = 6,4$ mm). Vor der Verwendung mussten die Dialyseschläuche 30 Minuten in einer Na₂CO₃-Lösung gekocht, dann zweimal mit *Auqa dest*. gespült und im Anschluss daran erneut für 15 Minuten in *Aqua dest*. gekocht werden. Die vorbereiteten Schläuche wurden bis zur Benutzung in 50% (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert.

Vor dem Gebrauch wurden die Schläuche mit *Aqua dest.* gespült und dann für 30 Minuten in den Dialyse-Puffer eingelegt. Die untere Öffnung des Schlauches wurde verschlossen und die Probe in den Schlauch überführt. Nachdem der Schlauch an beiden Seiten verschlossen war erfolgte die Dialyse gegen den entsprechenden Puffer. Dazu wurde der Schlauch in 1-1,5L Puffer gehängt und für 2 h unter Rühren bei 4°C inkubiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration neu bestimmt (5.2.1.3).

Kochlösung:

5 g Na₂CO₃ 1 mM EDTA, pH 6,5 ad 500 ml *Aqua dest*.

5.3.3 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach ihrem Molekulargewicht. Dazu wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) eingesetzt. Bei dieser

Methode wird ein engporiges Trenngel (15% PAA, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS) mit einem weitporigem Sammelgel (6% PAA, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS) kombiniert. Weiterhin wird die Trennung des Proteingemisches durch unterschiedliche pH-Werte in Trenn- und Sammelgel erhöht. Natriumdodecylsulfat (SDS) befindet sich als denaturierendes Agens sowohl im Gel als auch in den Proben. SDS zerstört fast alle kovalenten Wechselwirkungen im Protein weiterhin lagern sich die hydrophoben Reste der SDS-Anionen an die Proteinketten (1,4 g SDS/g Protein) [Lottspeich & Zorbas, 1998]. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine werden ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Vor der Auftragung aufs Gel wurden die Proben mit ¼ bzw. ½ Volumen 4 x bzw. 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, und nach der Zugabe von 3 μ l β -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 96°C denaturiert. Bei großen SDS-Gelen erfolgte die Trennung der Proben bei 120 V, bei kleinen Gelen bei 50 V üN. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Puffer verwendet. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie oder mit Silber gefärbt (5.3.4).

Lösung A:	30% Acrylamid-/
	Bisacrylamid-Lösung (30:1)
Lösung B:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Lösung C:	10% (w/v) SDS
Lösung D:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Klebegel:	1/3 (v/v) 30% PAA (30:1)
	2/3 (v/v) Aqua dest.
Großes SDS-Gel:	BxHxT
70 ml Trenngel:	310 mm x 180 mm x 1 mm
20 ml Sammelgel:	310 mm x 50 mm x 1 mm
Kleines SDS-Gel:	B x H x T
40 ml Trenngel:	180 mm x 120 mm x 1 mm
10 ml Sammelgel:	180 mm x 40 mm x 1 mm

5.3.4 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

5.3.4.1 Coomassie-Färbung

Für einen quantitativen Nachweis von Proteinen in Polyacryamidgelen wurde die Coomassie-Färbung angewendet. Dazu wurden die Gele 30 bis 60 Minuten auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, Schüttelmaschine LS10) bei RT in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde das Gel solange in der Entfärbelösung geschüttelt, bis der Hintergrund hellblau und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Anschließend wurden die Gele Luftdicht in Folie verpackt, bei 4°C gelagert und mittels des Scanners U-MAX, Astra 4000U eingescannt. Wenn die Coomassie-Färbung nicht sensitiv genug war um Proteine sichtbar zumachen, es können Proteinbanden ab ca. 300 ng nachgewiesen werden, wurden die Gele mit Silber nachgefärbt (5.3.4.2).

Färbelösung:	50% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure
	0,1% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250
Entfärbelösung:	10% (v/v) Methanol
	10% (v/v) Essigsäure

5.3.4.2 Silberfärbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte durch die von Blum & Gross (1987) beschriebene Silberfärbung. Diese Methode ist sensitiver als die Coomassie-Färbung, bereits 2-5 ng Protein pro Bande können detektiert werden. Allerdings ist mit der Silberfärbung eine quantitative Analyse von Proteinen in PAA-Gelen nicht möglich.

Für die Färbung wurde das Gel zunächst für drei Stunden in Fixierlösung I geschüttelt (Gerhardt, Schüttelmaschine LS10). War das Gel zuvor mit Coomassie gefärbt worden, so wurde es üN in Fixierlösung I inkubiert bis es vollständig entfärbt war. Danach wurde das Gel zweimal mit 50% Methanol und einmal mit 30% Ethanol für jeweils 10 Minuten gewaschen. Zur Verstärkung der Signale wurde das Gel dann für eine Minute in einer Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l) inkubiert. Daraufhin wurde das Gel dreimal für jeweils 30 Sekunden mit *Aqua dest*. gewaschen und danach für 20 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel so lange in der Entwicklerlösung geschüttelt, bis die Banden deutlich zuerkennen waren. Durch schwenken in Fixierlösung II wurde die Entwicklung gestoppt.

Fixierlösung I:	50% (v/v) Methanol
	12% (v/v) Essigsäure
	0,0185% (v/v) Formaldehyd
Färbelösung:	2 g/l Silbernitrat
	0,028% (v/v) Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Natriumcarbonat
	0,04 g/l Natriumthiosulfat
	0,0185% (v/v) Formaldehyd
Fixierlösung II:	25% (v/v) Methanol
	12% (v/v) Essigsäure

5.4 Spezielle Methoden

5.4.1 Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem µMacs[™] Streptavidin Kit

5.4.1.1 Biotinylierung von Rsd

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von Rsd mit anderen Proteinen wurde ein Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Dieses Kit besteht aus Säulen die im Inneren mit Edelstahlkügelchen ausgefüllt sind. Die Säulen werden in einen starken Magneten eingesetzt, durch die Edelstahlkügelchen wird das Magnetfeld ca. dreißigfach verstärkt. Die ' μ Macs Micro Beads' sind magnetische Partikel, welche mittels Streptavidine an die Biotingruppe eines Moleküls binden. Das so markierte Molekül wird dann im Magnetfeld immobilisiert. Damit die Wechselwirkung von Rsd mit Komponenten des Transkriptionsapparates untersucht werden konnte musste das Protein biotinyliert werden. Bei der Biotinylierung bindet die Biotingruppe an die Lysinreste des Proteins, da Tris-HCl diese Reaktion stört wurde Rsd zuvor gegen HEPES-Puffer I dialysiert. Für eine vollständige Biotinylierung von Rsd wurde das Protein im molaren Verhältnis 1:9 mit Biotinester versetzt, da Rsd neun Lysinreste enthält. Die Reaktion erfolgte üN bei 4°C danach wurden nicht gebundene Biotinester mit einem fünffachen Überschuss an Glycin abgefangen. Zur Entfernung der Biotin-Glycin Verbindungen wurde die Probe für 2 h bei 4°C gegen HEPES-Puffer II dialysiert.

HEPES-Puffer I:	50 mM HEPES, pH 7,4
	200 mM NaCl
	5% Glycerin
	0,2 mM PMSF
HEPES-Puffer II:	50 mM HEPES, pH 7,4
	200 mM NaCl
	25% Glycerin
	0,2 mM PMSF
Biotin-NHSE-Lösung:	10 mM Biotin NHSE
	in DMSO-Lösung
Glycinlösung:	1,33 M Glycin
	in Aqua dest.

5.4.1.2 Magnetische Markierung und Isolation von spezifischen Protein-Protein-Bindungen

Die Verwendung des μ MacsTM Streptavidin Kits (4.8) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. In einem Volumen von 30 μ l wurde das biotinylierte Rsd mit dem zu untersuchenden Protein in 1x TGED-Puffer (4.6) für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde das Volumen der Probe mit TGED-Puffer auf 100 μ l erhöht und die Probe mit 100 μ l Streptavidin-'Micro Beads' versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Säule nach Herstellerangaben vorbereitet und zweimal mit 100 μ l TGED-Puffer gespült. Der Reaktionsansatz wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Danach wurde die Säule viermal mit je 100 μ l TGED-Puffer gewaschen um unspezifisch gebundene Protein von der Säule zu entfernen. Jeder Durchfluss wurde separat aufgefangen. Anschließend wurden Protein-Protein-Bindungen durch die Verwendung eines SDS-Puffers zerstört und Proteine die an Rsd gebunden waren von der Säule eluiert.

Alle aufgefangenen Durchflüsse wurden anschließend mit Aceton präzipitiert (5.3.1), auf einem SDS-Gel (5.3.3) analysiert und mittels Coomassie- und Silberfärbung (5.3.4) visualisiert.

1 x SDS-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 6,8 50 mM DTT 10% Glycerin 1% SDS

5.4.1.3 Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE)

Die von Rosenbaum und Riesner (1987) beschriebene Methode der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese eignet sich um Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Thermodynamischenstabilität zu untersuchen. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des untersuchten Nukleinsäuremoleküls treffen. Dabei wird quer zur Wanderungsstrecke der Nukleinsäuren im PAA-Gel ein linearer Temperaturgradient angelegt. Während der Elektrophorese ist jedes Nukleinsäuremolekül einer konstanten Temperatur ausgesetzt, bei der es eine der Temperatur entsprechende Sekundärstruktur ausbildet. Bei doppelsträngiger DNA kann es z.B. zur Ausbildung bzw. zum Verlust einer intrinsischen Krümmung kommen, bei entsprechend hohen Temperaturen können doppelsträngige Bereiche von Nukleinsäuren auch aufgetrennt werden. Eine Veränderte der Sekundärstruktur zeigt sich in einem veränderten Laufverhalten. Je nach Zustand der Sekundärstruktur kommt es zu einer stärkeren oder schwächeren Retardierung im Gel. Zur Stabilisierung der Sekundärstrukturen wurden die Proben in 2 x uRHM-Puffer aufgenommen und 1:1 mit TGGE-Probenpuffer verdünnt. Damit die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ihrer Struktur entsprach, wurde ein natives PAA-Gel (5.2.9.2) verwendet. Da die Elektrophorese auf einer horizontalen Platte, mit Temperaturgradient, erfolgte wurde das Gel auf eine Gelbondfolie (4.8) polymerisiert. Durch eine dünne 30%ige Glycerinschicht wurde das Gel mit der Folie Luftblasen frei auf die horizontale Platte gelegt. Nachdem die Probe ins Gel eingelaufen war (ca. 20 min, 200 V) wurde, mit Hilfe von zwei temperierbaren Wasserbädern (Haake F3 und julabo F20), der entsprechende Temperaturgradient angelegt (10 min, 200 V) und das Gel luftblasenfrei mit einer Folie bedeckt. Nur an den oberen und unteren Rändern wurde das Gel nicht bedeckt, damit es noch Kontakt mit den Schwämmen hatte, welche in den Puffer ragten und damit die Elektrophorese gewährleisteten. Die Elektrophorese wurde für ca. 2,5 h bei 300 V fortgesetzt. Danach wurde das Gel mit Silber gefärbt (5.2.10.1).

2 x uRHM-Puffer:	200 mM NaCl
	1 mM EDTA, pH 8,0
	2 mM DTT
1 x TGGE-Probenpuffer:	0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol in 1 x TBE

5.4.2 Verzögerungsgelelektrophorese

Die Verzögerungsgelelektrophorese eignet sich zur qualitativen und quantitativen Darstellung von Komplexen aus DNA und Proteinen. Die Methode beruht auf einer geringeren Mobilität von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zu freier DNA. Dieses veränderte Laufverhalten entsteht durch ein größeres Molekulargewicht des Komplexes als auch durch eine proteininduzierte Konformationsänderung der DNA. Wurde die Bindung von Nucleoid-assozierten Proteinen (NAPs) (4.5.4.1) an DNA-Fragmente (4.3) untersucht, so wurden in einem Volumen von 10-15 μ l 4 nM radioaktiv markiertes DNA-Fragment in 1 x Bindepuffer mit einer steigenden Menge an NAPs inkubiert. Die NAPs wurden stets in TGED-Puffer (4.6) mit einer für sie spezifischen Salzkonzentration (200 mM NaCl für H-NS und Lrp; 300 mM NaCl für StpA und 50 mM NaCl für Fis) verdünnt. Das Volumen, zusammengesetzt aus NAP und TGED-Puffer, wurde dabei immer gleich gehalten, um identische Salzbedingungen in vergleichbaren Ansätzen zu gewährleisten. Die Ansätze enthielten weiterhin He-
parin (f. c. 50 ng/ μ l) um unspezifische Protein-DNA-Bindungen zu unterbinden. Die Proben wurden für 5 Minuten bei RT inkubiert und dann mit 5-7,5 μ l 2 x TBE-Probenpuffer (4.6) versetzt. 14-18 μ l wurden auf ein natives 5% iges PAA-Gel (5.2.9.2) aufgetragen und für 2-3 h bei 30 mA getrennt.

10 x Bindungspuffer:

500 mM Tris-HCl, pH 7,4 700 mM KCl 150 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,0 100 mM β-Mercaptoethanol

Für die Analyse der Bindung von RNA-Polymerasen (4.5.3) an Promotorfragmenten (4.3) wurde ein etwas abweichendes Protokoll verwendet. In einem Volumen von 10 μ l wurden 2-4 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment in 1 x KGlu80-Puffer (4.6) inkubiert. Bei einigen Promotorfragmenten wurden die ersten beiden Startnukleotide mit in den Ansatz gegeben (*rrnB* P1: 500 μ M ATP + 50 μ M CTP; *bolA*1: 550 μ M GTP; *fic*P 500 μ M CTP + 50 μ M ATP). Wurde der Einfluss von Transkriptionsfaktoren (Rsd, 6S RNA, ppGpp, DksA, NAPs) auf die Promotorbindung untersucht, so wurden diese vorgelegt, falls nicht anders erwähnt. Proben ohne Transkriptionsfaktor wurden mit dem entsprechenden Puffer supplementiert, um die Salzbedingungen gleichzuhalten.

Es wurde sowohl das σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase Holoenzym (RNAP) als auch Coreenzym (E) supplementiert mit σ^{70} (E σ^{70}), σ^{38} (E σ^{38}) oder beiden Sigmafaktoren (E $\sigma^{70/38}$) verwendet. Coreenzym und Sigmafaktor wurden dabei im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Sigmafaktoren wurden in 1 x TGED-Puffer (4.6), Coreenzym und RNAP in AB-Diluent (4.6) verdünnt. In früheren Experimenten wurden E σ^{70} und E σ^{38} erst rekonstituiert und dann in den Ansatz gegeben. Die Rekonstitution von Coreenzym und Sigmafaktor erfolgte dabei für 30 Minuten auf Eis. Bei den späteren Experimenten wurde auf eine Rekonstitution verzichtet, da sie zu keiner verbesserten Enzymaktivität beitrug. Deshalb wurde der Sigmafaktor vorgelegt und die Reaktion durch die Zugabe von Coreenzym bzw. RNAP gestartet. Die Reaktion erfolgte für 10 Minuten bei 30°C, dann wurde die Bildung von unspezifischen Komplexen durch die Zugabe von Heparin (*f.c.* 50 ng/µl) unterbunden und die Ansätze für weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µl 2 x TBE-Probenpuffer (4.6) wurden 14 µl Ansatz auf ein natives PAA-Gel (5.2.9.2) aufgetragen.

5.4.3 DNA-Footprints

5.4.3.1 'Maxam-Gilbert'-Sequenzierung von DNA

Für die Footprint Analysen war es notwendig, einen Längenstandard des verwendeten DNA-Fragments als Sequenzierspur für die Gelelktrophorese zur Verfügung zustellen. Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde die Methode der basenspezifischen, chemischen Spaltung endmarkierter DNA nach Maxam und Gilbert (1977) angewendet. Bei dieser Methode werden die Purine Adenin und Guanin mit Formiat chemisch modifiziert und durch die Inkubation mit Piperidin die anschließende Abspaltung dieser Basen, sowie die Strangbrüche an den depurinierten Basenpositionen katalysiert.

Für die Sequenzierreaktion wurden in einem Volumen von 10 μ l in Aqua dest. ³²Pendmarkierte DNA (1.000.000 cpm) mit 1 μ g der entsprechenden, nicht markierten DNA versetzt. Nach der Zugabe von 25 μ l Ameisensäure (Formiat) wurde der Ansatz für 3 min und 45 sec bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 200 μ l Hydrazinpuffer wurde die Reaktion gestoppt und die DNA mittels dem dreifachem Volumen absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt (5.2.2.2). Danach wurde das DNA-Pellet zweimal mit dem einfachen Volumen 70% igem (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich im Savant, Speedvac Concentrator getrocknet. Zur vollständigen Entfernung von Hydrazin und Formiat wurde das DNA-Pellet in 200 µl Aqua dest. aufgenommen erneut mit abs. Ethanol versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die Abspaltung der modifizierten Basen und die Induktion der Strangbrüche, erfolgten durch die Inkubation der DNA in 10% (v/v) Piperidin für 30 Minuten bei 90°C. Zur Entfernung des Piperidins wurde der Ansatz (70 μ l) für mehrere Stunden lyophilisiert. Danach wurde das Pellet einmal in 30 μ l und zweimal in je 20 μ l Aqua dest. aufgenommen und wiederholt lyophilisiert, um Piperidinreste aus dem Ansatz zu entfernen. Abschließend wurde die DNA in 50 µl Aqua dest. resuspendiert, mit 2,5 µl Glycogen (20 μ g/ml) und dem dreifachem Volumen abs. Ethanol versetzt und erneut mit flüssigem Stickstoff gefällt, gewaschen und lyophilisiert. Das DNA-Pellet wurde im Szintilationszähler (Beckman LS6500) gezählt (5.2.1.4) und in 10 μ l Harnstoff-Probenpuffer (4.6) aufgenommen.

Hydrazin-Puffer:

300 mM Na-Acetat, pH 5,0 100 mM EDTA, pH 8,0 25 μg/ml Glykogen

5.4.3.2 DNA-Modifikation mit DNaseI

Die Komplexbildung zwischen den DNA-Fragmenten und den untersuchten Proteinen (RNA-Polymerasen und NAPs) erfolgte wie für die Verzögerungsgelelektrophorese (5.4.2) bereits beschrieben. Allerdings betrug das Reaktionsvolumen 20 μ l, nach der Komplexbildung bzw. der Zugabe von Heparin und der sich anschließende Inkubation bei 30°C (bei RNA-Polymerasen), wurden 4 μ l mit 2 x TBE-Probenpuffer (4.6) versetzt und auf ein natives PAA-Gel (5.2.9.2) aufgetragen. Die restlichen 16 μ l wurden mit 5 μ l DNaseI (10U/ μ l; 1:5000 verdünnt mit DNase-Diluent) versetzt, und für 30 Sekunden bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 100 μ l Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet und die Ansätze mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.2.1). Die Proben wurden mit absolutem Ethanol versetzt, in flüssigem Stickstoff gefällt (5.2.2.2) und anschließend im Speedvac Konzentrator (Savant) lyophilisiert. Die DNA-Pellets wurden im Szintilationszähler (Beckman, LS 6500) gemessen und anschließend in 10 μ l Harnstoff-Probenpuffer (4.6) aufgenommen. Die Proben wurden auf ein denaturierendes PAA-Gel (5.2.9.3) aufgetragen, dabei wurde das Probenvolumen der gemessenen Radioaktivitätsmenge entsprechend angepasst. Mittels Autoroadiographie (5.2.10.2) wurden die DNase-Footprints sichtbar gemacht. Um das Bandenmuster der DNA-Sequenz zuordnen zu können wurde eine Sequenzierspur (5.4.3.1) der entsprechenden DNA mit aufgetragen.

DNase-Diluent:	20 mM Tris-HCl, pH 7,8
	10 mM CaCl_2
	20 mM MgCl ₂
Stopp-Puffer:	330 mM Na-Acetat, pH 5,5
	5 mM EDTA, pH 8,0
	$10 \mu g/ml$ Glykogen

5.4.3.3 KMnO₄-Footprint

Die hier beschriebene Methode zur Modifizierung von Nukleinsäuren mit $KMnO_4$ wurde nach einem veränderten Protokoll von Kvaratskhelia *et al.*, (2002) durchgeführt.

Mittels der Behandlung von Nukleinsäuren mit KMnO₄ werden bevorzugt ungepaarte Thymin bzw. Uracil und auch Cytidin-Reste modifiziert. Durch die anschließende Behandlung mit Piperidin kommt es zum Strangbruch an den modifizierten Stellen. Dadurch eignet sich diese Methode besonders um offene Promotorkomplexe zu analysieren.

In einem Gesamtvolumen von 40 μ l wurden 16 ng Fragment DNA mit RNAP, in 1 x Kaliumglutamatpuffer (KGlu80) (4.6) und den ersten beiden Start-NTPs inkubiert (500 µM ATP und 50 µM CTP für rrnB P1 bzw. 550 µM GTP für bolA1). Die Komplexbildung erfolgte in Anwesenheit von verschiedenen Rsd Konzentrationen. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von Heparin (f.c. 50 ng/ μ l) wurde die Bildung unspezifischer Komplexe unterbunden und die Reaktion für weitere 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 4 μ l 160 mM KMnO₄-lösung, frisch angesetzt aus einer 0,37 M Stocklösung, zugegeben und der Ansatz für 2 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von 4,8 μ l β -Mercaptoethanol (14,3 M) wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz auf Eis überführt. Die Probe wurde mit 5,3 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 versetzt, mit 50 µl TE-Puffer (4.6) auf 100 μ l aufgefüllt und einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (5.2.2.1). Danach wurde die Probe mit Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt (5.2.2.2) und anschließend mittels Zentrifugation pelletiert, 13.000 rpm, 30 Minuten bei 4°C. Das Pellet wurde in 70 μ l 10% iger (v/v) Piperidinlösung aufgenommen und 30 Minuten bei 90°C inkubiert. Die Piperidinlösung wurde dann mittels Lyophilisation (Savant, Speedvac Concentrator) entfernt und dreimal mit je 30 µl Aqua dest. gewaschen. Das Aqua dest. wurde ebenfalls mittels Lyophilisation entfernt. Schließlich wurde das Pellet in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen und erneut mit Ethanol über Nacht gefällt. Das Pellet wurde in 20 μ l Harnstoff-Probenpuffer (4.6) aufgenommen und die Strahlungsintensität (cpm) im Szintilationszähler (5.2.1.4) bestimmt. Die Proben wurden über ein 10% iges denaturierendes Gel (5.2.9.3) aufgetrennt. Dabei wurde das Auftragsvolumen den cpm-Werten entsprechend angeglichen, um die gleichen Probenmengen aufzutragen.

Ansetzen einer 0,37 M KMnO₄-Stocklösung

3 g Kaliumpermanganat (KMnO₄) wurden mit *Aqua dest.* auf etwas mehr als 50 ml aufgefüllt und die Lösung unter rühren bis zum Kochen erhitzt. Die Lösung wurde dann so lange gekocht, bis ein Volumen von exakt 50 ml erreicht war. Daraufhin wurde die Lösung langsam abgekühlt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Lösung war ca. 2-3 Monate haltbar.

5.4.4 *multiple round in vitro* Transkriptionen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionen handelte es sich um *multiple round in vitro* Transkriptionen mit superspiralisierten Templates (ccc-Plasmide). Dabei kann die Transkriptionseinheit mehrmals von der DNAabhängigen RNA-Polymerase abgelesen werden. Die Termination der Transkription bedarf jedoch plasmidär kodierten Terminationsstrukturen. Zum Beenden der Transkription wird die Chase-Lösung verwendet. Diese enthält Heparin, welches die Neuinitiation der Transkription inhibiert, und eine hohe Konzentration an NTPs, zur Vollendung begonnener Transkripte. Damit die Transkripte eine definierte Länge besitzen endet jede Transkriptionseinheit mit einer Terminatorstruktur, wobei es sich in der Regel um die starken ribosomalen Terminatoren T1T2 handelt. Eine Ausnahme bildet dabei die RNA1. Diese hat ihren eigenen Terminator, sie wird für die Plasmid-Replikation benötigt und ist deshalb auf allen hier verwendeten Plasmiden (4.2.2) kodiert.

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation wurde sowohl das σ^{70} -abhängige RNA-Polymerase Holoenzym (RNAP) als auch das RNA-Polymerse Coreenzym (E) verwendet. Das Coreenzym wurde dabei mit den Sigmafaktoren σ^{70} bzw. σ^{38} im Verhältnis 1:3 supplementiert. Die daraus resultierenden Holoenzyme $E\sigma^{70}$ bzw. $E\sigma^{38}$ wurden mit σ^{70} - bzw. σ^{38} -spezifischen Promotoren inkubiert und ihre Aktivität unter verschiedenen Bedingungen getestet. Bei früheren Experimenten wurden die $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ Holoenzyme erst für 30 Minuten auf Eis rekonstituiert. Dazu wurde das Coreenzym in AB-Diluent (4.6) und die Sigmafaktoren in 1 x TGED-Puffer (4.6) verdünnt und dann zusammen in AB-Diluent, zur Bildung des $E\sigma^{70}$ bzw. $E\sigma^{38}$ Holoenzyms, inkubiert. Bei späteren Versuchen wurde auf die Rekonstitution verzichtet, da diese Methode nicht zu einer erhöhten Aktivität der Polymerasen beitrug. Stattdessen wurden die Sigmafaktoren mit in den Ansatz gegeben und nach der Zugabe des Coreenzyms der Ansatz für 5-10 Minuten bei RT inkubiert, bevor die Reaktion durch den NTP-Mix gestartet wurde.

Für die in vitro Transkription wurden 5-10 nM Plasmid-DNA (ccc) und 15-30 nM Holoenzym (RNAP, $E\sigma^{70}$, $E\sigma^{38}$ oder $E\sigma^{70/38}$) in 1 x KGlu80- bzw. KGlu160-Puffer eingesetzt. Wurde der Einfluss von Transkriptionsfaktoren (Rsd, 6S RNA, ppGpp, DksA) untersucht, so wurden diese, falls nicht anders angegeben, vorgelegt. Vergleichsproben ohne Transkriptionsfaktoren wurden mit den entsprechenden Puffern versetzt, um mit identischen Salzkonzentrationen zu arbeiten. Dies war wichtig, da die Salzkonzentration einen starken Einfluss auf die Transkription hat. Bei Reaktionen mit den Vektoren pSH666-1 und prsd-up-T1T2 wurde eine Rsd-Charge verwendet, die nur 80 mM NaCl enthielt. Der normale Rsd-Puffer enthält 200 mM NaCl. Durch die hohe Salzkonzentration konnte das Transkript des rrnB P1 Promotors bei der Verwendung des multipromotor-Vektors jedoch nicht detektiert werden. Die Transkription wurde durch die Zugabe des 10x NTP-Mixes gestartet und der Ansatz für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1,5 µl Chase-Lösung versetzt und für weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 μ l Formamid-Probenpuffer, versetzt mit radioaktiv markiertem DNA-Standart (4.3), gestoppt und die Proben auf Eis überführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein 10% iges denaturierendes PAA-Gel (5.2.9.3).

Bei einigen Reaktionen wurden die Proben nach der *in vitro* Transkription gefällt. Dies war notwendig, wenn der Salzgehalt der Proben die Trennung der Transkripte auf der PAGE limitierte oder wenn die untersuchten Promotoren sehr schwach waren und nur wenig Transkript gebildet wurde. In solchen Fällen wurde der Ansatz verdoppelt oder vervierfacht. Die Reaktion wurde dann nicht mit Formamid-Probenpuffer abgestoppt, sondern mit 10 μ l Stopplösung, versetzt mit Avall-Fragment als externen Standard. Das Volumen wurde falls nötig auf 50 μ l mit TE-Puffer (4.6) erhöht und die Proben mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.2.1) und anschließend mit Ethanol gefällt (5.2.2.2). Das Pellet wurde in 10 μ l Formamid-Probenpuffer aufgenommen, davon wurden 9 μ l auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Mittels Autoradiographie (5.2.10.2) wurden die Nukleinsäure-Banden sichtbar gemacht.

Chaselösung:

je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP 2 mg/ml Heparin 1 mM Tris-HCl, pH 7,0 10x NTP-Mix:

650 μM ATP, GTP, UTP
50 μM CTP
1,33 μM [α-³²P]-CTP (3000 Ci/mM)

1,33 μ M [α -³²P]-ATP (3000 Ci/mM)

10x NTP-Mix für die Analyse der Rsd-Promotoren:

Stopplösung:

250 mM EDTA, pH 8,0 in TE-Puffer

650 μM CTP, GTP, UTP

50 µM ATP

5.4.5 Pseudo single round in vitro Transkription

Bei einer *pseudo single round in vitro* Transkription kann die Transkriptionseinheit mehrfach von der RNA-Polymerase abgelesen werden. Jedoch können nur die Transkripte durch Autoradiographie (5.2.10.2) sichtbar gemacht werden, die von den Initiationskomplexen stammen. Da nur diese die radioaktiven Nukleotide eingebaut haben, die bei der Vorinkubation zur Verfügung standen (Hsu, 1996). Um dies zu gewährleisten wurde die RNAP mit den ersten drei Start-NTPs (500 μ M ATP, 50 μ M CTP und 10 μ Ci α -³²P-UTP für den *rrnB* P1 bzw. 550 μ M GTP und 10 μ Ci α -³²P-ATP für den *bolA*1) und den Templates vorinkubiert. Dadurch konnten sich an den Promotoren Heparin stabile, offene Komplexe ausbilden. Unspezifisch gebundene RNAP und geschlossene Komplexe sind Heparin sensitiv, und wurden durch die Zugabe von Heparin inhibiert. Danach wurde die Transkription mit einem Überschuss an nicht markierten dNTPs gestartet.

In einem Ansatz von 15 μ l wurden 5 nM ccc-Plasmid mit 20 nM rekonstituiertem E σ^{70} bzw. E σ^{38} Holoenzym mit den ersten drei Start-NTPs in Gegenwart von Rsd in 1 x 160KGlu-Puffer (4.6) bei 30°C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde Heparin (*f. c.* 200 ng/ μ l) zugegeben und der Ansatz für weitere 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von je 650 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurde die Transkription gestartet, nach 5 Minuten wurde 2,3 μ l Chase-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 5 Minuten is 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 15 μ l Formamid-Probenpuffer (4.6) gestoppt und die Proben auf einem 10% igem denaturierendem PAA-Gel (5.2.9.3) analysiert.

5.4.6 Primer-Extension Reaktion

Die Primer-Extension Reaktionen wurden in Anlehnung an eine von Stern et al., (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die zu analysierende RNA als Template benutzt, von dem eine virale Reverse Transkriptase (AMV) mittels eines Primers eine copy-DNA (cDNA) erstellt.

Dazu wurde ein 5'- γ -³²P-markiertes DNA-Oligonukleotid (5.2.8.5) zu einer Gesamt-RNA (5.2.7) Probe gegeben. Nach erfolgter Hybridisierung des Primers an die Ziel-RNA, wurde dieser durch den Einbau von dNTPs mittels der Reversen Transkriptase verlängert (Extension) und so die cDNA gebildet.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Primer-Extension Reaktionen wurden, falls nicht anders angegeben, 5 μ g Gesamt-RNA aus *E. coli* Stämmen (4.2.1) und jeweils 0,5 pmol pro Primer eingesetzt. In der Regel wurden zwei Primer verwendet. Die Hybridisierung fand in einem Reaktionsvolumen von 9 μ l statt. 1 μ l je eingesetztem, markiertem Primer, wurde in 1x Hybridisierungspuffer mit 5 μ g Gesamt-RNA vermischt, das benötigte Volumen wurde mit *Aqua dest*. eingestellt. Die Denaturierung der RNA erfolgte im vorgewärmten Hybridisierungsofen (Biometra OV2) bei 70°C für 3 Minuten. Danach wurden die Proben langsam auf RT abgekühlt (1°C/min) und die Primer konnten sich an ihre Zielsequenzen anlagern.

Die Primer-Extension Reaktion fand in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l statt. In 1 x AMV-Puffer wurden 4 μ l Hybridisierungsansatz mit 36 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 0,2 mM je dNTP und 0,2 U AMV Reverse Transkriptase vermischt. Die Ansätze wurden dann für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte mit 5 μ l Formamid-Probenpuffer (4.6). Die Proben wurden anschließend für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und 14 μ l je Probe auf ein 15% iges denaturierendes PAA-Gel (5.2.9.3) aufgetragen.

5 x Hybridisierungspuffer:

500 mM KCl 250 mM Tris-HCl, pH 8,0

5.4.7 Primer-Extension Sequenzierung

Bei dieser Methode werden noch 2',3'-didesoxynukleotide (ddNTPs), so genannte Abbruch-Nukleotide, mit in den Primer-Extension Ansatz gegeben. An der Stelle der

cDNA Synthese an der ein solches Abbruch-Nukleotid in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird kommt es zu einem Abbruch der Kette, da an das ddNTP kein weiteres dNTP angeknüpft werden kann. Für einem statistisch verteilten Einbau der ddNTPs, wurden diese in geringerer Konzentration eingesetzt (50 μ M) als die normalen dNTPS (250 μ M).

In einem Volumen von 10 μ l wurden 4 μ l Hybridisierungsansatz in 1 x AMV-Puffer mit 36 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 250 μ M je dNTP und 50 μ M eines ddNTPs mit 2,5 U AMV Reverse Transktiptase für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 μ l Formamid-Probenpuffer (4.6) wurden die Ansätze für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und mittels einer 15% igen PAGE (5.2.9.3) aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels Autoradiographie (5.2.10.2).

5.4.8 Bestimmung von Transkriptionsstartstellen

Bei dieser *in vitro* Transkription wurde auf den Einsatz von radioaktiven NTPs verzichtet. Stattdessen wurden die Transkripte mittels Primer-Extension sequenziert (5.4.7). Bei dieser Methode wurde das *fic*P-Fragment (4.3) mit mehreren Polymerasen transkribiert. Die Transkriptionsstartstellen der Transkripte wurden anschließend mittels Primer-Extension bestimmt. Für die in vitro Transkription wurden, in einem Volumen von 100 μ l, 5 nM *fic*P-Fragment in 1 x KGlu80 Puffer mit 10 nM RNAP und 650 μ M je NTP für 1h bei 30°C inkubiert. Danach wurden 15 μ l Chase-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 3,2 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8; 10 µl 0,1 M MgCl₂ und 2 µl DNase I versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und das Pellet in 40 μ l 2x Hybridisierungspuffer gelöst. Fünf Aliquots á 4,5 μ l wurden mit jeweils 1 μ l 5'-³²P-markiertem Oligo-fic2 vermischt und das Volumen mit Aqua dest. auf 9 µl eingestellt. Die Hybridisierung erfolgte bei 70°C. Für die Primer-Extension Sequenzierung wurden 4 μ l Hybridisierungsansatz in 1x AMV-Puffer mit 36 mM Tris-HCl, pH 7,5; 250 μ M je dNTP, 50 μ M eines ddNTPs und 2,5 U AMV-RT für 30 min bei 42°C inkubiert. Die Produkte wurden anschließend auf einem 15% igen denaturierenden PAA-Gel analysiert.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarten



Abbildung 6.1 : Gezeigt sind die Karten der konstruierten Plasmide. Aus dem Plasmid pUC18rsd-up wurde die *rsd*-Promotorregion isoliert und in die Plasmide prsd-up-T1T2 und prsd-up-cat kloniert. Die Transkriptionsstarts der *rsd*-Promotoren P1 und P2 sind mit grünen Pfeilen markiert. Die Positionen des *Ampicillinresistenz*-Gens (bla), der RNA1, des *Chloramphenicolacetyltransferase*-Gens (cat) und der Terminatoren T1 und T2 sind angegeben.

6.2 Tabellen

6.2.1 Pseudo single round in vitro Transkriptionen

Tabelle 6.1 Quantitative Auswertungen der *in vitro* Transkriptionen des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms mit den Plasmid pRT3H Δ P2. Gezeigt sind Ergebnisse von fünf unterschiedlichen Experimenten sowie die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) (Abbildung 2.10).

Rsd µM	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	М	S
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
0,06	139,60	120,86	106,32	193,83	121,27	136,38	34,22
0,3	109,34	96,11	108,51	137,09	84,90	107,19	19,49
0,6	100,37	85,56	104,63	134,65	38,30	92,70	35,25
1,2	68,35	70,92	72,38	89,22	38,35	67,84	18,42
1,8	14,48	61,50	58,73	78,71	16,88	46,06	28,79
3	18,28	25,89	36,21	31,81	8,77	24,19	10,93
6	6,58	11,66	7,86	6,44	0,53	6,62	4,00

Tabelle 6.2 Quantitative Auswertungen der *in vitro* Transkriptionen des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms mit den Plasmid pbolA-T1T2. Gezeigt sind Ergebnisse von fünf unterschiedlichen Experimenten sowie die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) (Abbildung 2.10).

Rsd µM	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Mittelwert	Standardabw.
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
0,06	65,30	93,07	64,59	63,98	57,43	68,87	13,89
0,3	55,93	72,71	47,81	116,01	71,26	72,74	26,36
0,6	58,00	92,67	76,37	77,63	55,23	71,98	15,46
1,2	55,49	80,34	41,74	85,83	64,00	65,48	18,03
1,8	45,54	67,33	40,82	44,00	53,34	50,21	10,62
3	32,61	42,73	15,35	25,56	29,75	29,20	10,00
6	8,17	18,74	1,61	9,76	8,78	9,41	6,12

6.2.2 Multiple round in vitro Transkriptionen

Tabelle 6.3 Quantitative Auswertungen der *in vitro* Transkriptionen des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms mit den Plasmid pSH666-1. Gezeigt sind die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) für die Promotoren *rrnB* P1, *tac* und *RNA1* (Abbildung 2.11).

	rrnB P1		tac		RNA1	
Rsd [µM]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
0,5	37,89	5,19	85,11	3,71	43,12	6,57
1	28,00	7,13	61,73	6,17	42,22	9,05
1,5	29,42	9,63	53,78	5,24	45,19	10,15
2	27,66	10,72	62,99	24,88	38,93	3,03
2,5	26,99	6,11	61,28	16,03	38,08	2,75
3	24,91	8,89	51,84	18,02	32,76	11,62
3,5	22,91	5,11	50,21	13,48	33,55	7,72
4	22,52	9,70	39,52	12,17	39,56	14,86

Tabelle 6.4 Quantitative Auswertungen der *in vitro* Transkriptionen des $E\sigma^{38}$ Holoenzyms mit den Plasmid pSH666-1. Gezeigt sind die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) für die Promotoren *bolA*1, *tac* und *RNA*1 (Abbildung 2.11).

	bolA	A1	tac		RNA1	
Rsd [µM]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]
0	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
0,5	113,57	5,30	106,10	12,19	109,00	0,45
1	119,27	6,54	110,79	20,01	116,71	3,72
1,5	117,62	6,39	106,80	25,67	109,77	1,49
2	98,99	20,33	97,95	10,21	99,00	14,62
2,5	108,23	14,51	102,99	11,72	118,74	15,75
3	95,95	18,67	98,04	16,87	99,48	16,88
3,5	84,68	13,83	90,87	16,95	90,29	19,13
4	80,72	16,62	90,84	19,02	83,66	24,42

Tabelle 6.5 Quantitative Auswertungen der *in vitro* Transkriptionen des $E\sigma^{70}$ Holoenzyms mit den Plasmid pSH666-1. Gezeigt sind die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) für die Promotoren *rrnB* P1, *tac* und *RNA1* (Abbildung 2.12).

	rrnE	3 P1	tao	5	RNA1		
Rsd [µM]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]	M [%]	s [%]	
0 µM Rsd	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	
0,25 µM Rsd	45,11	23,05	83,62	42,33	66,53	32,68	
0,5 µM Rsd	42,17	12,70	68,46	17,75	72,36	23,97	
0,75 µM Rsd	42,06	19,39	64,95	22,72	78,32	35,61	
1 µM Rsd	35,54	18,18	62,43	14,07	62,43	39,72	

6.2.3 Sigmakompetition

Tabelle 6.6 Quantitative Auswertungen der *in vitro* **Transkription der** Eσ^{70/38} **Holoenzyme mit den Plasmid pSH666-1.** Gezeigt sind die relativen Transkriptstärken [%] für die Promotoren *rrnB* P1, *tac, bolA*1 und *RNA1* (Abbildung 2.14).

µM Rsd	rrnB P1 [%]	tac [%]	bolA1 [%]	RNA1 [%]
0	100,00	100,00	100,00	100,00
0,5	68,41	64,65	477,21	118,17
1	53,23	48,60	392,90	98,79
2	52,41	49,23	411,06	99,96
4	50,70	44,85	390,03	95,02

6.2.4 Wachstumsratenbestimmung

Tabelle 6.7 Wachstumskurven des Stammes MG1655/prsd-up-cat. Das Wachstum des Stammes in verschiedenen Medien wurde mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt und in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen (Abbildung 2.25).

	OD600					
Zeit [min]	YT	M9+cas	M9+gly			
0	0,02	0,031	0,032			
30	0,048	0,06	0,06			
60	0,135	0,095	0,098			
90	0,385	0,125	0,135			
120	0,773	0,145	0,184			
150	1,726	0,168	0,259			
180	2,628	0,183	0,324			
210	3,488	0,21	0,412			
240	4,792	0,234	0,51			
270	5,312	0,259	0,602			
300	5,768	0,281	0,724			

Tabelle 6.8 Wachstumsraten. Die Wachstumsraten des Stammes MG1655/prsd-up-cat, angezogen in verschiedenen Medien, wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (Abbildung 2.25).

	1	2	3	Μ	S
ΥT	2,75	2,57	2,72	2,68	0,10
M9+cas	0,41	0,33	0,32	0,35	0,05
M9+glycerin	0,96	0,93	0,95	0,95	0,02

Tabelle 6.9 Transkriptmengen der rsd-Promotoren P1 und P2. Die Transkriptmengen der plasmidär kodierten *rsd*-Promotoren P1 und P2 wurden in Abhängigkeit der Wachstumsrate bestimmt. Der Stamm MG1655/prsd-up-cat wurde in verschiedenen Medien angezogen. Für die Primer-Extension Reaktion wurde Gesamt-RNA aus Zellen der logarithmischen Phase isoliert (Abbildung 2.25).

	rsd P1 M	rsd P2 M
ΥT	1,00	1,00
M9+cas	1,80	1,32
M9+glycerin	3,25	0,75

6.2.5 rsd-Expression in verschiedenen Stämmen

Bestimmt wurden die Transkriptmengen der plasmidär kodierten *rsd*-Promotoren P1 und P2. Das bedeutet, alle untersuchten Stämme enthielten das Plasmid prsd-up-cat. Die Expression des P2 Promotors wurde sowohl in der logarithmischen als auch in der stationären Phase bestimmt. Die Expression des *rsd* P1 wurde nur in der stationären Phase bestimmt.

Tabelle 6.10 Quantifizierung der *rsd* P2 cDNA-Banden der Primer-Extension Analysen von Gesamt-RNA aus verschiedenen Stämmen. Angegeben sind die Werte aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten, sowie die normierten Mittelwerte. Die Werte wurden gegen den internen Standard RNA1 normiert. Die Expression des Wildtyps in der stationären Phase wurde 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen (Abbildung 2.26; a-j).

		log Pl	nase		stat Phase			
Stamm	1	2	3	norm. M	1	2	3	norm. M
CP78	0,47	0,61	0,36	0,48	1	1	1	1
CP79	0,50	0,41	0,29	0,40	0,38	0,29	0,40	0,36
MG1655	1,23	3,06	1,63	1,97	1	1	1	1
MWdssrS	1,00	2,80	1,54	1,78	1,11	1,65	1,31	1,36
MG1655drsd	3,89	1,94	2,15	2,66	5,01	2,42	2,38	3,27
CF9239	2,20	1,50	1,60	1,77	5,13	3,70	5,17	4,67
MC4100	6,47	1,56	1,61	3,22	1	1	1	1
RH90	2,90	2,46	1,21	2,19	8,17	4,11	2,55	4,94
GM37	0,64	0,54	0,25	0,47	1,00	1	1	1
CJD1124	1,63	0,64	0,26	0,84	0,98	1,06	0,54	0,86
MC4100	6,43	3,06	1,58	3,69	1	1	1	1
PD32	4,77	2,46	3,07	3,43	9,97	1,36	2,11	4,48
DG845	7,10	3,56		5,33	0,75	0,65		0,70
CSH50	1,22	0,78		1,00	1	1		1
CSH50fis:kan	1,78	1,11		1,44	3,45	1,81		2,63
XL-1	2,37	1,49		1,93	1	1		1
JM110	0,28	0,57		0,42	0,36	0,54		0,45

Tabelle 6.11 Quantifizierung der *rsd* P1 cDNA-Banden der Primer-Extension Analysen von Gesamt-RNA aus verschiedenen Stämmen. Angegeben sind die Werte aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten, sowie die normierten Mittelwerte. Die Werte wurden gegen den internen Standard RNA1 normiert. Die Expression des Wildtyps in der stationären Phase wurde 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Die cDNA-Banden wurden nur in der stationären Phase bestimt (Abbildung 2.26; k-l).

Stamm	1	2	3	Μ
CP78	1	1	1	1
CP79	0,42	0,28	0,81	0,51
MG1655	1	1	1	1
MWdssrS	0,67	1,24	1,16	1,03
MG1655drsd	4,44	1,17	1,16	2,26
CF9239	4,52	5,37	6,01	5,30
MC4100	1	1	1	1
RH90	0,27	0,32	n.d.	0,30
GM37	1	1	1	1
CJD1124	1,00	0,95	0,90	0,95
MC4100	1	1	1	1
PD32	8,27	7,42	22,09	12,59
DG845	0,62	0,95		0,78
CSH50	1	1		1
CSH50fis:kan	1,94	1,38		1,66
XL-1	1	1		1
JM110	0,05	0,13		0,09

6.2.6 Rsd-abhängige Gen-Expression in vivo

Tabelle 6.12 Quantitative Auswertung der cDNA-Banden einiger ausgewählter Promotoren in den Stämmen MG1655 und MG1655∆rsd. Gezeigt sind die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (s) von drei unabhängigen Experimenten. Je nach untersuchtem Promotor wurde die cDNA-Bande des Wildtyps in der stationären oder in der logarithmischen Phase 1 gesetzt. Die cDNA-Banden der 6S RNA wurden auf die 5S RNA normiert (Abbildung 2.27).

		log		stat	
Transkript		MG1655	MG1655∆rsd	MG1655	MG1655∆rsd
6S RNA	М	0,42	0,42	1	0,96
	S	0,07	0,04		0,11
6S Leader	М	0,64	0,65	1	1,02
	S	0,16	0,11		0,09
rrn P1	М	1	0,75	0,06	0,06
	S		0,35	0,03	0,01
rrn P2	М	1	0,84	0,58	0,77
	S		0,13	0,14	0,19
bolA1	М	n.d.	n.d.	1	0,54
	S	n.d.	n.d.		0,14
rho Leader	М	1	0,59	1,44	1,74
	S		0,20	0,28	0,90

6.2.7 *in vitro* Transkription der *rsd*-Promotoren P1 und P2

Tabelle 6.13 Quantitative Auswertung der *in vitro* **Transkription des RNAP Holoenzyms mit dem Vektor prsd-up-T1T2.** Gezeigt sind die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (s) von drei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind die Transkriptstärken der Promotoren *rsd* P2 und *RNA1* (Abbildung 2.28).

	rsd	P2	RNA1	
	Μ	s	Μ	S
Referenz	1		1	
GATC	0,44	0,20	0,69	0,42
ррGрр	1,16	0,46	1,18	0,24
DksA	0,85	0,29	0,75	0,17
ppGpp+DksA	1,40	0,80	0,43	0,10
6S RNA	0,32	0,01	0,45	0,08
Rsd	0,62	0,14	0,78	0,23

6.3 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
А	Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
acetyl.	acetyliert
Amp.	Ampicillin
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus–Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Bis	Bisacrylamid
Вр	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytidin
ca.	circa
cat	Chloramphenicolacetyltransferase
'ccc'	superhelikale DNA
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
СТР	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppolsträngig
DTT	Dithiothreitol

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Ø	Durchmesser
Е	Coreenzym der RNAP von E. coli
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$\mathrm{E}\sigma^{_{38}}$	$\sigma^{_{38}}$ Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
$\mathrm{E}\sigma^{70}$	σ^{70} -Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
<i>f. c.</i>	final concentration
FIS	factor for inversion stimulation
G	Guanosin
G	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hyroxyethyl)-1-piperazinyl]-
	ethansulfonsäure
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
k	kilo (10 ³)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGlu	Kaliumglatamat
λ	lamda
1	Liter
LRP	leucine-responsive regulatory protein
m	milli (10 ⁻³)
М	Molar
mA	Milliamper
min	Minute
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	messenger RNA
μ	mikro (19 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm

190

μl	Mikroliter
n	Nano (10 ⁻⁹)
ng	Nanogramm
NS	Nukleinsäure
Nt	Nukleotid
ω	omega
OD	Optische Dichte
[³² P]	Phosphorisotop (Massenzahl 32)
р	pico (10 ⁻¹²)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Primer-Extension
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylflourid
%	Prozent
ppGpp	Guanosintetraphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
RP _c	geschlossener Promotorkomplex
RP _{init}	Initiationskomplex
rpm	rounds per minute
RPo	offener Promotorkomplex
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
σ	sigma
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sekunde
SS	einzelsträngig
StpA	supressor of the td ⁻ -phage phenotype
t	Zeit
Т	Thymidin
Tab.	Tabelle

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Unit
Uridin
upstream activating sequence
über Nacht
über Tag
und
Uridintriphosphat
upstream element
ultraviolett
Volt
sichtbares Licht
volume per volume
Watt
weight per volume
yeast tryptome
zum Beispiel

6.4 Literaturverzeichnis

Adelman, K., Orsini, G., Kolb, A., Graziani, L. & Brody, E. N. (1997). "The Interaction between the AsiA Protein of Bacteriophage T4 and the σ^{70} Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase." *J. Biol. Chem.* **272** (43): 27435-27443.

Aldea, M., T. Garrido, J. Pla and M. Vincente (1990). "Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters." *EMBO Journal* **9**: 3787-3794.

Aldea, M., T. Garrido, C. Hernández-Chico, M. Vicente and S. R. Kushner (1989). "Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene." *EMBO* **8**(12): 3923-3931.

Ambrosi, C., Tiburzi, F., Imperi, F., Putignani, L. & Visca, P. (2005). "Involvement of AlgQ Transcriptional Regulation of Pyoverdine Genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J. Bacteriol.* **187** (15): 5097-5107.

Arifuzzaman, M., M. Maeda, A. Itho, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. Huang, A. Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada, and H. Mori, (2006). "Large-scale identification of protein-protein ineraction of *Escherichia coli* K-12." *Genome Res.* **16**: 686-691.

Artsimovitch, I., V. Patlan, S. Sekine, M. N. Vassylyveva, T. Hosaka, K. Ochi, S. Yokoyama and D. G. Vassylyev (2004). "Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp." *Cell* **117**(3): 299-310.

Artsimovitch, I. and R. Landick (2000). "Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals." *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(13): 7090-7095.

Barker, M. M., T. Gaal and R. Gourse (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.

Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. W. Busby and S. D. Minchin (1997). "Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the extended -10 motif at promoters." *EMBO* **16**(13): 4034-4040.

Barrick, J. E., N. Sudarsan, Z. Weinberg, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker (2005). "6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter." *Rna* **11**(5): 774-784.

Becker, G. & Hengge-Aronis, R. (2001). "What makes an *Escherichia coli* promoter σ^{s} dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^{s} ." *Mol. Microbiol.* **39**: 1153-1165.

Beidler, J. L., P. R. Hillard and R. l. Rill (1982). "Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver." *Analytical. Biochem.* **126**: 374-380. Beutel, B. A. & Record, M. T., Jr. (1990). *"E. coli* promoter spacer regions contain nonrandom sequences which correlate to spacer length." *Nucleic Acids Res.* **18** (12): 3597-3603.

Birnboim, H. C. and J. Doyle (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1515-1523.

Blattner, R. F., G. Plunkett III, A. Craig, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Colllado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* **277**: 1453-1462.

Bloch, V., Y. Yang, E. Margeat, A. Chavanieu, M. T. Auge, B. Roberts, S. Arold, S. Rimsky and M. Kochoyan (2003). "The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition." *Nat Struct Biol* **10**(3): 212-218.

Blum, H. & Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels." *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Bohannon, D. E., N. Connell, J. Keener, A. Tormo, M. Espinosa-Urgel, M. M. Zambrano and R. Kolter (1991). *"*Stationary-Phase-Inducible Gearbox Promoters: Differential Effects of *katF* Mutations and Role of s70." *J of Bacteriol* **173**(14): 4482-4492.

Bokal, A. J., W. Ross, T. Gaal, R. C. Johnson and R. L. Gourse (1997). "Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli rrnB* P1 Promoter." *Embo* **16**(1): 154-162.

Borukhov, S. & Goldfarb, A. (1993). "Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly." *Protein expression and Purification* **4**: 503-511.

Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. **41**: 459-472.

Braaten, B. A., L. B. Blyn, B. S. Skinner & D. A. Low (1991). "Evidence for a Methylation-Blocking Factor (*mbf*) Locus Involved in *pap* Pilus Expression and Phase Variation in *Escherichia coli*. " *J. Bacteriol*. **173**(5): 1789-1800.

Bradaczek, C. (1991). "Untersuchung nahe am Promotor P1 des *rrnB*-Operons bindender Proteine aus *E. coli*." Dissertation am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Brosius, J. (1984). "Plasmid vectors for the selection of promoters." Gene 27: 151-160.

Brosius, J. and J. R. Lupski (1987). "Plasmids for the selection and analysis of prokaryotic promoters." *Methods Enzymol* **153**: 54-68.

Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. & Bautz, E. K. F. (1969). "Factor stimulating transcription by RNA polymerase." *Nature* **221**: 43-46.

Burgess, R. R. & Jendrisak, J. J. (1975). "A procedure fort the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography." *Biochemistry* **14**: 4636-4638.

Cashel, M. and K. E. Rudd (1987). "The stringent response." in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. (Neidhardt, Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H. e. eds.) Washington, DC, ASM Press: 1410-1438.

Chamberlin, M. J., Nieman, W. C., Wiggs, J. & Neff, N. (1979). "A quantitative assay for bacterial RNA polymerases." *J. Mol. Chem.* **254**: 10061-10069.

Campbell, E. A., L. F. Westblade and S. Darth (2008). "Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective." *Curr Opinion in Microbiol* **11**: 121-127.

Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, L. & Darst, A.S. (2002). "Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specifity σ Subunit." *Molecular Cell* **9**: 527-539.

Casadaban, M. J. (1976). "Transposition and fusion of lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.

Casadesús, J. and D. Low (2006). "Epigenetic gene regulation in the bacterial world." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 830-856.

Checroun, C., Bordes, P., Leroy, O., Kolb, A. & Gutierrez, C. (2004). "Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of sigmaS, the stress-specific sigma factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements." *Nucleic Acids Res.* **32** (1): 45-53.

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." *Molecular Cell* **11**: 1621-1633.

Chen, S. and J. M. Calvo (2002). "Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers." *J. Mol Biol* **318**(4): 1031-1042.

Chilcott, G. S. and K. T. Hughes (2000). "Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar thyphimurium and *Escherichia coli*." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.

Colland, F., Fujita, N., Ishihama, A. & Kolb, A. (2002). "The interaction between σ^s , the stationary phase σ factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Genes to Cells* **7**: 233-247.

Dagert, M. and S. D. Ehrlich (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells." *Gene* **6**(1): 23-28.

Dame, R. T. (2005). "The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compacting of bacterial chromatin." *Mol Microbiol* **56**: 858-870.

Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1983). "Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2035-2039.

de Boer, H. A., L. J. Comstock and M. Vasser (1983). "The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters." *Proc Natl Acad Sci USA* **80**(1): 21-25.

De Las Penas, A., L. Connolly and C. A. Gross (1997). "The σ^{E} -mediated response to extracytoplasmatic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB two negative regulators of σ^{E} ." *Mol Microbiol* **24**: 373-385.

Delic, D. (2006). "Untersuchungen des *E. coli*-Proteins DksA bei der Synthese ribosomaler RNAs unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle." Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Dersch, P., K. Schmidt and E. Bremer (1993). "Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation." *Mol. Microbiol.* **8**(5): 875-889.

Dillon, S. C. and C. J. Dorman (2010). "Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression." *Nature Reviews Microbiology* **8**: 949-959.

Dombroski, A. J., W. A. Walter and C. A. Gross (1993). "Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity." *Genes & Development* 7: 2446-2455.

Dorman, C. J. (2009). "Chapter 2 nucleoid-associated proteins and bacterial physiology." *Adv Appl Microbiol* **67**: 47-64.

Dove, S. L. & Hochschild, A. (2001). "Bacterial Two-Hybrid Analysis of Interactions between Region 4 of the σ^{70} Subunit of RNA Polymerase and the Transcriptional Regulators Rsd from *Escherichia coli* and AlgQ from *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Bacteriol.* **183** (21): 6413-6421.

Dove, S. L., S. A. Darth, and A. Hochschild, (2003). ,, Region 4 of σ as a target for transcription regulation." *Mol Microbiol*. **48**(4): 863-874.

Esposito, D., A. Petrovic, R. Harris, S. Ono, J. F. Eccleston, A. Mbabaali, I. Haq, C. F. Higgins, J. C. Hinton, P. C. Driscoll and J. E. Ladbury (2002). "H-NS Oligomerization Domain Structure Reveals the Mechanism for High Order Self-association of the Intact Protein." *J Mol Biol* **324**(4): 841-850

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 interaction with the carboxyterminal domain of the RNA polymerase alpha subunit." *Genes & Development* **13**: 2134-2147.

Fiil, N. and Friesen, D. (1968) J. Bacteriol. 95: 729-731.

Free, A., R. M. Williams & C. J. Dorman (1998). "The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **180**(4): 994-997.

Germer, J., Becker, G., Metzner, M. & Hengge-Aronis, R. (2001). Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated σ^{s} -dependent promoter in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* **41**: 705-716.

Gildehaus, N. (2001). "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der 6S RNA aus *E. coli* und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines Transkriptions-komplexes." Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gildehaus, N., T. Neußer, R. Wurm and R. Wagner (2007). "Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcrips." *NAR* **35**(6): 1885-1896.

González-Gil, G., P. Bringmann and R. Kahmann (1996). "FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **22**(1): 21-29.

Gonzales, N., Wiggs, J. & Chamberlin, M. J. (1977). "A simple procedure for resolution of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **182** (2): 404-408.

Gross, C. A., Chan, C, L. & Lonetto, A. M. (1996). "A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **351**: 475-482.

Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003). "Multiple sigma subunits and partitioning of bacterial transcription space." *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 441-466.

Hengge-Aronis, R. (2002). "Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promotor σ^s-selective?" *Current Opinion in Microbiol.* **5**: 591-595.

Hamacher, K., J. Trylska and J. A. McCammon (2006). "Dedendency map of proteins in the small ribosomal subunit." *PLoS Comput Biol* **2**(2): e10

Hanahan, D. (1985). "Techniques for transformation of *Escherichia coli* in DNA cloning." (*D. M. Glover, ed.*), **1**: 121-124.

Haseltine, W. and R. Bock (1973). "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor sites of ribosomes." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **70**: 1564-1568.

Haugen, S. P., W. Ross and R. L. Gourse (2008). "Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA." *Nat Rev Microbiol* **6**(7): 507-519.

Hengge-Aronis, R. (2003). "The General Stress Response Regulatory Network in *Escherichia coli*." *Horizon Scientific Press*: Chapter **26**: 174-179.

Hernday, A., B. Braaten, and D. Low, (2004). "The intricate workings of a bacterial epigenetic switch." *Adv Exp Med Biol* **547**: 83-89.

Hillen, W., Klein, R. D. & Wells, R.D. (1981). "Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments." *Biochemistry* **20** (13): 3748-3756.

Hinton, D. M. (1991). "Transcription from a bacteriophage T4 middle promoter using T4 motA protein and phage-modified RNA polymerase." *J. Biol. Chem.* **266**: 18034-18044.

Hinton, D. M., Pande, S., Wais, N., Johnson, X. B., Vuthoori, M., Makela, A. & Hook-Barnard, I. (2005). "Transcriptional takeover by σ appropriation: remodelling of the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase by the bacteriophage T4 activator MotA and co-activator AsiA." *Microbiology* **151**: 1729-1740.

Hiratsu, K., H. Shinagawa and K. Makino (1995). "Mode of promoter recognition by the *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing the sigma S subunit: identification of the recognition sequence of the *fic* promoter." *Mol Microbiol* **18**(5): 841-850.

Hofmann, N. (2006). "Funktionelle Analyse des potentiellen Antisigmafaktors Rsd aus *Escherichia coli.*" Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Holmes, K. L. and G. M. Culver (2005). "Analysis of Conformational Changes in 16 S rRNA During the Course of 30 S Subunit Assembly." *J. Mol. Biol.* **354**: 340-357.

Hsu, L. M., J. Zagorski, Z. Wang and M. J. Fournier, (1985). *"Escherichia coli* 6S RNA gen eis part of a dual-functional transcription unit." *J Bacteriol* **161**(3): 1162-1170.

Hsu, L. M. (1996). "Quantitative parameters for promoter clearance." *Methods Enzymiol.* **237**: 59-71.

Hughes, K. T. & Mathee, K. (1998). "The Anti-Sigma Factors." *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 231-286.

Igarashi, K., Fujita, N. & Ishihama, A. (1991). "Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." *J. Mol. Biol.* **218** (1): 1-6.

Igarashi, K. & Ishihama, A. (1991). "Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase α subunit: Involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP." *Cell* **65**: 1015-1022.

Ilag, L.L., Westblade, L.F., Deshayes, C., Kolb, A., Busby, S. J. W. & Robinson C. V. (2004). "Mass Spectrometry of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Interactions of the Core Enzym with σ^{70} and Rsd Protein." *Structure* **12**: 269-275.

Ishihama, A., Taketo, M., Saitoh, T. & Fukuda, R. (1976). "Control of formation of RNA polymerase in *Escherichia coli*." RNA polymerase. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York 475-502.

Ishihama, A. (1981). "Subunit assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Advanced Biophysics* **14**: 1-35.

Ishihama, A. (1997). "Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria." *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 582-588.

Ishihama, A. (1999). "Modulation of the nucleiod, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival." *Genes to Cells* **4**: 135-143.

Ishihama, A. (2000). "Functional Modulation of *Escherichia coli* RNA Polymerase." *Annu. Rev. Microbiol.* 2000 (54): 499-518.

Iyer, R. R., A. Pluciennik, V. Burdett and P.L. Modrich (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." *Chem Rev* **106**: 302-323.

Jishage, M. & Ishihama, A. (1998). "A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major σ subunit of RNA polymerase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4953-4958

Jishage, M. & Ishihama, A. (1999). "Transcriptional Organization and In Vivo Role of the *Escherichia coli rsd* Gene, Encoding the Regulator of RNA Polymerase Sigma D." *J. Bacteriol.* **181** (12): 3768-3776.

Jishage, M., Dasgupta, D. & Ishihama, A. (2001). "Mapping the Rsd Contact Site on the Sigma 70 Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase." *J. Bacteriol.* **183** (9): 2952-2956.

Jöres, L. (2001). "Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die Transkriptionsinitiation ribosomaler RNA P1-Promotoren von *Escherichia coli*." Dissertation am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kamp, C. (2005). "Untersuchung zur Expression und Funktion des *E. coli* Proteins Rsd, ein möglicher Antisigmafaktor für σ^{70} ." Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kang, P. J. and E. A. Craig (1990). "Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is dosage-dependent suppressor of a dnaK deletion mutation." *J Bacteriol* **172**(4): 2055-2064.

Keane, O. M. and C. J. Dorman (2003). "The *gyr* genes of *Salmonella enterica serovar Thyphimurium* are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis." *Mol Genet Genomics* **270**(1): 56-65.

Kim, K. S. and Y. Lee, (2004). "Regulation of 6S RNA biosynthesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases." *Nucleic Acids Res* **32**(20): 6057-6068.

Koch, C. & R. Kahmann (1986). "Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage Mu." *J. Biol. Chem.* **261**: 15673-15678.

Koch, C., J. Vandekerckhove & R. Kahmann (1988). *"Escherichia coli* host factor for site-specific DNA inversion: cloning and characterization of the *fis* gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4237-4241.

Kohl, J. (2002). "Klonierung und Expression eines Gens für den bakteriellen Antisigmafaktor Rsd." Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Komano, T., R. Utsumi and M. Kawamukai (1991). "Functional analysis of the *fic* gene involved in regulation of cell division." *Res. Microbiol* **142**: 269-277.

Krohn, M. and R. Wagner (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.

Krohn, M. und R. Wagner (1995). "A procedure for the rapid preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) from *Escherichia coli* ribosomes." *Anal. Biochem.* **225**: 188-190.

Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N. & Ishihama, A. (1996). "Promoter Selectivity of *Escherichia coli* RNA Polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$." *J. of Biol. Chem.* **271** (4): 1998-2004.

Kvaratskhelia, M., S. R. Budihas and S. F. Le Grice (2002). "Pre-existing Distortions in Nucleic Acid Structure Aid Polypurine Tract Selection By HIV-1 Reverse Transcriptase." *J Biol Chem* **277**(19): 16689-16696.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4." *Nature* **294**: 623-626.

Lambert, L. J., Wei, Y., Schirf, V., Demeler, B. & Werner, M. H. (2004). "T4 AsiA blocks DNA recognition by remodelling σ^{70} region 4." *EMBO* **23**: 2952-2962.

Lange, R. & R. Hengge-Aronis (1991). "Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol*. **5**(1): 49-59.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991). "Growth Phase-Regulated Expression of the bolA and Morphology of Stationary-Phase *Escherichia coli* Cells Are Controlled by the Novel Sigma Factor σ^{s} ." *J. Bacteriol.* **173** (14): 4474-4481.

Lange, R., D. Fischer, R. Hengge-Aronis (1995). "Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **177**: 4676-4680.

Laurie, A. D., L. M. Bernardo, C. C. Sze, E. Skärfstad, A. Szalewska-Palasz, T. Nyström, and V. Shingler (2003). "The Role of the Alarmone (p)ppGpp in σ^{N} Competition for Core RNA Polymerase." *J of Biol. Chem.* **278**(3): 1494-1503.

Lee, S. J. & Gralla, D. (2001). "Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides." *J. Biol. Chem.* **276**: 30064-30071.

Liebig, B. and R. Wagner (1995). "Effects of different growth conditions on the in vivo activity of the tandem *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters P1 and P2." *Mol. Gen. Genet.* **249**: 328-335.

Liebig, B. "Quantitative Analysen der ribosomalen RNA-Expressionsmuster des Bakteriums *Escherichia coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen." Dissertation, Düsseldorf, 1996.

Lisser, S. & Margalit, H. (1993). "Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences." *Nucleic Acids Res.* **21** (7): 1507-1516.

Løbner-Olesen, A., O. Skovgaard, and M. G. Marinus, (2005). "Dam methylation: coordinating cellular processes." *Current Opinion in Microbiology* **8**:154-160.

Lottspeich, F. & Zorbas, H., Hrsg. (1998). "Bioanalytik." Spektrum Akademischer Verlag

Lowe, P. A., Hager, D. A. & Burgess, R. R. (1979). "Purification and properties of the sigma subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase." *Biochemistry* **18** (7): 1344-1352.

Low, D. A. and J. Casadeús, (2008). "Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation." *Current Opinion in Microbiol* **11**: 106-112.

Lucchini, S., G. Rowley, M. D. Goldberg, D. Hurd, M. Harrison and J. C. Hinton (2006). "H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria." *PLoS Pathog* **2**(8): e81

Luijsterburg, M. S., M. C. Noom, G. J. Wuite and R. T. Dame (2006). "The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective." *J. Struct Biol* **156**: 262-272.

Lund, E. and N. O. Kjeldgaard (1972). "Metabolism of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli.*" *Eur J Biochem* **28**(3): 316-326.

Magnusson, L. U., A. Farewell and T. Nystrom (2005). "ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli." TRENDS in Microbiology* **13**: 236-242.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning: A laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*

Marinus, M. G. and J. Casadeus, (2009). "Roles of DNA adenine methylation in hostpathogen interactions: mismatch repair, Transcriptional regulation, and more." *FEMS Microbiol Rev* **33**(3): 488-503.

Maxam, A. L. & Gilbert, W. (1977). "A new method for sequencing DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (2): 560-564.

Messer, W. and M. Noyer-Weidner (1988). "Timing and targeting: the biological functions of Dam methylation in *E. coli*." *Cell* **54**: 735-737.

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. New York, Cold Spring Harbor Labaratory Press.

Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H. & Severinova, K. (2001). "Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural and functional homologs and promote RNA polymerase assembly." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 892-987.

Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Gregopoulos and S. Raina (1997). "Modulation of the *Escherichia coli* σ^{E} (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA RseB and RseC proteins." *Mol Microbiol* **24**: 355-371.

Mitchell, J. E., T. Oshima, S. E. Piper, C. L. Webster, L. F. Westblade, G. Karimova, D. Ladant, A. Kolb, J. L. Hobman, S. J. W. Busby & D. J. Lee (2007). "The *Escherichia coli* regulator of sigma 70 protein, Rsd, can up-regulate some stress-dependent promoters by sequestering sigma 70." *J. Bacteriol.* **189**(9): 3489-3495.

Mukherjee, K., Nagai, H., Shimamoto, N. & Chatterji, D. (1999). "GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the ω subunit in vivo." *European Journal of Biochem.* **266**: 228-235.

Mullis, K. B. and F. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Meth. Enzymol.* **155**:335-350.

Murray, H. D., D. A. Schneider and R. Gourse (2003). "Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant." *Mol. Cell* **12**: 125-134.

Neußer, T., T. Polen, R. Geißen and R. Wagner (2010). "Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in *E. coli* causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery." *BMC Genomics* **11**:165

Neußer, T., N. Gildehaus, R. Wurm and R. Wagner, (2008). "Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators impottant for stress and growth adaptation." *Biol. Chem.* **389**: 285-297.

Neußer, T. (2008) "Untersuchungen zur Expression, Stabilität und Funktion der regulatorischen 6S RNA von *E. coli.*" Dissertation am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Newlands, J. T., Ross, W., Gosink, K. K. & Gourse, R. L. (1991). "Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription II. Characterization of complexes of *rrnB* P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with *Escherichia coli* RNA polymerase." *Journal of Molecular Biology* **220**: 569-583.

Nguyen, L. H., Jessen D. B., Thompson, N. E., Gentry, D. R., and Burgess R. R. (1993). *"In vitro* functional charcterization of overproduced *Escherichia coli* KatF/rpoS gene product." *Biochemistry* **32**: 11112-11117.

Nguyen, L. H. & Burgess, R. R. (1997). "Comparative Analysis of the Interactions of the *Escherichia Coli* σ^{S} ans σ^{70} RNA Polymerase Holoenzyme with the Stationary-Phase-Specific *bolAp1* Promoter." *Biochemistry* **36**: 1748-1754.

Nudler, E., A. Mustaev, E. Lukhtanov and A. Goldfarb (1997). "The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase." *Cell* **89**: 33-41.

Ohlsen, K. L. and J. D. Gralla, (1992). "DNA Melting within Stable Closed Complexes at the *Escherichia coli rrnB* P1 Promoter." *J of Biol. Chem.* **267**(28) 19813:19818.

Ojangu, E. L., A. Tover, R. Teras and M. Kivisaar (2000). "Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(23): 6707-6713.

Olivares-Zavaleta, N., R. Jáuregui and E. Merino (2006). "Genome analysis of *Escherichia coli* promoter sequences evidences that DNA static curvature plays a more important role in gene transcription than has previously been anticipated." *Genomics* **87**(3): 329-337.

Oshima, T., C. Wada, Y. Kawagoe, T. Ara, M. Maeda, Y. Masuda, S. Hiraga and H. Mori, (2002). "Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* **45**(3): 673-695.

Owens, J.T., Miyake, R., Murakami, K., *et al.*, (1998). "Mapping the σ^{70} subunit contact sites on *E. coli* RNA polymerase with a σ^{70} -conjugated chemical protease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6021-6026.

Paget, M. SB. and J. D. Helmann (2003). "The σ^{70} family of sigma factors." *Genome Biology* **4**(I) Article 203

Paul, B. J., M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster, and R. L. Gourse (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**: 311-322.

Patikoglou, G. A., L. F. Westblade, E. Campbell, V. Lamour, W. J. Lane, and S. A. Darth, (2007). "Crystal structure of the *Escherichia coli* regulator σ^{70} , Rsd, in complex with σ^{70} domain 4." *J Mol Biol.* **372**(3): 649-659.

Perederina, A., V. Svetlov, M. N. Vassylyeva, T. H. Tahirov, S. Yokoyama, I. Artsimovitch and D. G. Vassylyev (2004). "Regulation through the secondary channel – structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription." Cell 118(3): 297-309.

Pineda, M., Gregory, B. D., Szczypinski, B., Baxter, K. R., Hochschild, A., Miller, S. E. & Hinton, D. M. (2004). "A Family of Anti- σ^{70} Proteins in T4-type Phages and Bacteria that are Similar to AsiA, a Transcription Inhibitor and Co-activator of Bacteriophage T4." *Journal of Mol. Biol.* **344**: 1183-1197.

Piper, S. E., J. E. Mitchell, D. J. Lee and S. J. W. Busby (2009). "A global view of *Escherichia coli* Rsd protein and its interactions." *Mol. BioSyst.* **5**(12): 1943-1947.

Platt, T. (1994). "Rho and RNA: models for recognition and response." *Molecular Microbiology* **11**: 983-990.

Pohl, C. (2005). "Haben die unterschiedlichen upstream gelegenen DNA-Sequenzen der sieben rRNA-Operons einen differentiellen Einfluss auf die Stringente Kontrolle?" Dissertation am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Polyakov, A., Severinova, E. & Darst, S. A. (1995). "Three-Dimensional Structure of *E. coli* Core RNA Polymerase: Promotor Binding and Elongation Conformations of the Enzyme." *Cell* **83**: 365-373.

Pul, Ü., B. Lux, R. Wurm and R. Wagner (2008). "Effect of upstream curvature and transcription factors H-NS and LRP on the efficiency of Escherichia coli rRNA promoters P1 and P2 – a phasing analysis." *Microbiology* **154**(Pt9): 2546-2558.

Pul, Ü. und R. Wagner (2007). "Nukleiod-assoziierte Proteine bei Mikroorganismen." *Biospektrum*, **05**: 495-497.

Pul, Ü., R. Wurm, B. Lux, M. Meltzer, A. Menzel and R. Wagner (2005). "LRP and H-NS – cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters." *Mol Microbiol* **58**(3): 864-876.

Rajkowitsch, L., K. Semrad, O. Mayer and R. Schröder (2005). "Assays for the RNA chaperone activity of proteins." *Biochem Soc Trans* **22**(Pt 3): 450-456.

Reckendrees, B. (2004). *"In vitro* Analysen prokaryotischer Transkriptionsmechanismen während der exponentiellen und stationären Phase der Genexpression." Dissertation am Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Record, M. T., Jr., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. & Schlax, P. J. (1996). "Escherichia coli RNA Polymerase (Eo⁷⁰), promoters and the *kinetics of the steps of transcription initiation.*" In: Neidhardt, F. C., Curtis III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umbarger, H. E. (eds.) "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology." Vol. 1. Washington, DC: ASM Pess, pp. 792-821.

Richardson, J. P. (1993). "Transcription termination." Critical Reviews in Biochemistry and –Molecular Biology 28: 1-30.

Roesch, P. L. & I. C. Blomfield (1998). "Leucine alters the interaction of the leucineresponsive regulatory protein (Lrp) with the fim switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **27**(6): 1321-1330.

Rosenbaum, V. and D. Riesner (1987). "Temperature-gradient gelelectrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts." *Biophys. Chem.* **26**: 235-246.

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 & Development* **17**: 1293-1307.

Rutherford, S. T., C. L. Villers, J.-H. Lee, W. Ross, and R. L. Gourse, (2009). "Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA." *Genes & Development* **23**: 236-248.

Santos, J. M., Freire, P., Vicente, M. & Arraiano, C. M. (1999). "The stationary-phase morphogene bolA from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth." *Molecular Microbiol.* **32** (4): 789-798.

Schoengraf, P. (2008). "Einfluss des Transkriptionsfaktors DksA auf stringent und nicht stringent regulierte bakterielle Promotoren." Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schröder, O. and R. Wagner (2002). "The bacterial regulatory protein H-NS – a versatile modulator of nucleic acid structures." *Biological Chemistry* **383**: 945-960.

Severinova, E., Severinov, K., Fenyö, D., Marr, M., Brody, E. N., Roberts, J. W., Chait, B. T. & Darst, S. A. (1996). "Domain Organization of the *Escherichia coli* RNA Polymerase σ⁷⁰ Subunit." *J. Mol. Biol.* **263**: 637-647.

Sharma, U. K. and D. Chatterji (2008). "Differential mechanisms of bindung of antisigma factors *Escherichia coli* Rsd and bacteriophage T4 AsiA to *E. coli* RNA polymerase lead to divers physiological consequences." *J Bacteriol* **190**(10): 3434-43.

Skoko, D., D. Yoo, H. Bai, B. Schnurr, J. Yan, S. M. McLeod, J. F. Marko and R. C. Johnson (2006). "Mechanism of Chromosome Compaction and Looping by the *Escherichia coli* Nucleoid Protein Fis." *J. Mol. Biol.* **364**: 777-798.

Stern, S., D. Moazed and H. F. Noller (1988). "Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension." *Methods Enzymol.* **164**: 481-489.

Studier, F. W. & Moffat, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

Szalewska-Palasz, A., L. U. M. Johansson, L. M. D. Bernardo, E. Skärfstad, K. Brännström, and V. Shingler (2007). "Properties of RNA Polymerase Bypss Mutants: Implications for the role of ppGpp and ist co-Faktor DksA in controlling transcription dependent on σ^{54} ." *J of. Biol. Chem.* **282**(25): 18046-18056.

Takahashi, K., K. Kasai and K. Ochi (2004). "Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4320-4324.

Tanakara, K., Takayanagi, Y., *et al.*, (1993). "Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*; the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 3511-3515.

Tippner, D., H- Afflerbach, C. Bradaczek and R. Wagner (1994). "Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis." *Mol. Micrbiol.* **11**(3): 589-604.

Trotochaud, A. E. & Wassarman, K. M. (2004). "6S RNA function enhances long-term cell survival." *J. Bacteriol.* **186** (15): 4978-4985.

Turner, A. K., M. A. Lovell, S. D. Hulme, L. Zhang-Barber and P. A. Barrow (1998). "Identification of *Salmonella thyphimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chickens." *Infect Immun* **66**(5): 2099-2106.

Uptain, S. M., Kane, C. M. & Chamberlin, M. J. (1997). "Basic mechanisms of transcription elongation and ist regulation." *An. Rev. Biochem.* **66**: 117-172.

Utsumi, R., Kusafuka, S., Nakayama, T., Tanaka, K., Takayanagi, Y., Takahashi, H., Noda, M. and Kawamukai, M. (1993). "Stationary phase-specific expression of the *fic* gene in *Escherichia coli* K-12 is controlled by the *rpoS* gene product (sigma 38)." *FEMS Microbiol Lett.* **113**(3): 273-278.

Vassylyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S. & Yokoyama, S. (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." *Nature* **417**: 712-719.

Vincente, M., S. R. Kushner, T. Garrido, and M. Aldea (1991). "The role of the 'gearbox' in the transcription of essential genes." *Molecular Microbiology* **5**: 2085-2091.

Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H. & Gourse, R. L. (2005). "Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA." *Genes & Development* **19** (19): 2378-2387.

Wagner, R.: ppGpp Signaling. in Bacterial Signaling Kraemer, R. and Jung, K. (Eds.), 2010, Wiley VCH, Weinheim, ISBN: 978-3-527-32365.

Wagner, R. and U. Pul (2009). "Nucleoid-associated proteins – structural properties." *Springer Press*

Wagner, R. (2000). "Transcription Regulation in Prokaryotes." Oxford, Oxford University Press.

Waldminghaus, T. and K. Skarstad, (2009). "The *Escherichia coli* SeqA protein." Plasmid **61**: 141-150.

Wassarman, K. M. & Storz, G. (2000). "6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity." *Cell* **101** (6): 613-623.

Wassarman, K. M. & R. M. Saecker (2006). "Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase." *Science* **314**(5805): 1601-1603.

Webb, C., M. M. Wilme-Riesenberg, R. Curtis and J. W. Foster (1999). "Effects of DksA and ClpP protease on sigmaS production and virulence in *Salmonella thyphimurium*." *Mol Microbiol* **34**: 112-123.

Westblade, L. F., Ilag, L. L., Powell, A. K., Kolb, A. Robinson, C. V. & Busby, S. J. W. (2004). "Studies of the *Escherichia coli* Rsd- σ^{70} Complex." *J. Mol. Biol.* **335**: 685-692.

Williams, R. M. and S. Rimsky (1997). "Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks." *FEMS Microbiol Lett* **156**(2): 175-185.

Wion, D. and J. Casasesús (2006). "N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions." *Nat Rev Microbiol* **4**: 183-192.

Wu, H. M. and D. M. Crothers (1984). "The locus of sequence-directed and proteininduced DNA bending." *Nature* **308**: 509-513.

Wurm, R., T. Neußer and R. Wagner (2010). "6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products." *Biol. Chem.* **391**: 187-196.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 mp 18 pUC19 vectors." *Gene* 33: 103-119.

Yuan, A. H., B. D. Gregory, J. S. Sharp, K. D. McCleary, S. L. Dove and A. Hochschild (2008). "Rsd family proteins make simultaneous interactions with regions 2 and 4 of the primary sigma factor." *Mol Micobiol* **70**(5): 1136-1151.

Zabeau, M. & Roberts, R., Hrsg. (1979). "The role of restriction endonucleases in molecular genetics." *Academic Press*

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 promotor region." *Nucleic Acids Res.* **18**: 6271-6275.

Zhang, A., V. Derbyshire, J. L. Salvo & M. Belfort (1995). *"Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro." RNA* **1**(8): 783-793.

Zhang, G. & Darst, S. A. (1998). "Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino terminal domain." *Science* **281**: 262-266.

Zimmermann, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**: 27-65.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Rolf Wagner für die wissenschaftliche Betreuung während dieser Arbeit. Er war stets ansprechbar und wusste bei Problemen immer Rat. Die letzten fünf Jahre waren für mich sehr lehrreich.

Dank an Prof. Dr. J. Ernst für die Übernahme der Koreferenz.

Dank allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der AG Wagner (Ümit, Tom, Tommy, Philipp, Jan, Athanasios, Zihni, Vero, Melina, Sabine, René und Benedikt) für wissenschaftliche Diskussionen, Anregungen und Hilfe bei Problemen. René und Benedikt gilt mein besonderer Dank fürs Korrekturlesen! Ich danke auch für die Freitage, der großartigen Arbeitsatmosphäre, den vielen Kalauern (Tom & Benedikt), Mensagängen und philosophischen Ausführungen zu absolut sinnfreien Themen. René danke ich für Kurzurlaube am "Meer" *aber auch* für die Unterstützung außerhalb des Labors und für die gemeinsamen Aktivitäten.

Reini danke ich für ihre Hilfe bei der Aufreinigung von Rsd, den Footprints, den vielen Ratschlägen, der steten Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art, den aufgereinigten Proteinen und den vielen Dingen, die Du unbemerkt von uns erledigt hast.

Ich danke Bernd für die stete Ansprechbarkeit bei methodischen Fragen und für die leider in letzter Zeit vernachlässigten Mensagänge. Barbara danke ich für die Arbeit im Hintergrund, die uns allen vieles erleichtert hat.

Elke und Natalie danke ich für das morgendliche Schwimmen mit anschließendem Frühstück und der steten Hilfsbereitschaft.

Ich danke Karen, Bene und Fabi für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Motivation sowie für die abwechslungsreichen Unternehmungen.

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Der Gründerstiftung zur Förderung von Forschung und wissenschaftlichem Nachwuchs an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Zuerkennung eines Stipendiums, das meine Dissertation über einen Zeitraum von zwei Jahren finanziell ermöglicht hat.
Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, im Mai 2010

Nina Hofmann