

**Analyse der physiologischen Rolle der 6S RNA aus
Escherichia coli und Vergleich der molekularen
Mechanismen zwischen 6S RNAs aus
E. coli und Cyanobakterien**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

René Geißen
aus Wuppertal

Düsseldorf, Mai 2011

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. M. Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Die 6S RNA aus *E. coli* ist eine nicht kodierende stabile RNA, die über den Wachstumsphasenzyklus akkumuliert. Durch ihre Struktur, ähnlich einem DNA Promotor kann sie an die DNA-abhängige RNA Polymerase binden und die Transkription inhibieren. Dabei erfolgt eine bevorzugte Bindung an die *housekeeping* RNA Polymerase ($E\sigma^{70}$) und es wird ihr eine spezifische Inhibierung von σ^{70} -abhängigen Promotoren zugeschrieben. Daher wird ihr eine wichtige Rolle beim Umschalten der Transkription in der stationären Wachstumsphase zugeschrieben. 6S RNA kodiert darüber hinaus auch für die Synthese einer dnRNA genannten ncRNA.

In vorangegangenen genomweiten Microarray Analysen zeigten sich sämtliche Promotorklassen als 6S RNA sensitiv und es wurden Aktivierungen und Inhibierungen bei fehlender 6S RNA beobachtet. Es zeigte sich dabei ebenfalls, sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase, dass gehäuft Gene des Purinmetabolismus differentiell durch 6S RNA exprimiert werden. Auch das Gen für 6S RNA (*ssrS*) ist in unterschiedlichen Bakterien häufig in Transkriptionseinheiten mit Genen des Purinstoffwechsels gekoppelt. Überraschend wurde in den Microarray Analysen der stationären Phase eine reduzierte Expression nahezu sämtlicher Gene der Ribosomensynthese beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die reduzierte Ribosomensynthese mit einer Erhöhung der basalen Konzentration des Wachstumsratenregulators ppGpp in der 6S RNA Mutante korreliert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass während eines *outgrowth* aus der stationären Phase diese verringerte Synthese ribosomaler Komponenten durch verstärkte Expression in der 6S RNA Mutante kompensiert wird.

Für die exponentielle Wachstumsphase wurden darüber hinaus Hinweise gefunden, dass die 6S RNA an der Aufrechterhaltung des Purinspiegels beteiligt ist. Durch bioinformatische Vergleiche wurden zusätzlich potentielle Zielgene im Purinstoffwechsel, für eine Regulation durch dnRNA selbst identifiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Interaktion der 6S RNA mit dem RNA Chaperon Hfq untersucht und es konnte eine Bindung von Hfq an die 6S RNA beobachtet werden. Diese Bindung führt zu einer Modulation der RNA Polymerase Inhibierung durch 6S RNA. Weiterhin wurde eine Bindung von Hfq an die 6S RNA-kodierte dnRNA entdeckt und es zeigte sich, dass in vivo die Konzentrationen der 6S RNA und auch der dnRNA durch Hfq beeinflusst sind.

Im dritten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass sich molekulare Mechanismen der 6S RNA aus *E. coli* auf die entfernt verwandten Cyanobakterien übertragen lassen. In *in vitro* Analysen zeigte sich, dass die RNA Polymerase aus *E. coli* in der Lage ist genauso an vier verschiedene cyanobakterielle 6S RNAs zu binden, wie an die *E. coli* 6S RNA. Es wurden darüber hinaus Transkriptionseinhibierungen und Synthese von dnRNA mit allen cyanobakteriellen 6S RNAs festgestellt. Dabei fiel auf, dass eine hohe Flexibilität des zentralen Strukturelements der 6S RNA für die gemeinsame Funktion von Bedeutung ist.

Summary

6S RNA from *E. coli* is a noncoding stable RNA that accumulates during the growth cycle. Due to the secondary structure, which mimicks an open DNA promoter 6S RNA is able to bind RNA polymerase and inhibit transcription. Binding occurs preferentially to the housekeeping polymerase ($E\sigma^{70}$), resulting in inhibition of σ^{70} -dependent promoters. Thus 6S RNA is assumed to have an important role in transcriptional changes during entry into stationary phase. Additionally 6S RNA itself encodes a small ncRNA called dnRNA.

Former genomwide microarray analysis had shown that all promoter classes are sensitive to 6S RNA, and both activations and inhibitions were observed in a 6S RNA mutant strain. Additionally a group of genes belonging to the purine metabolism was differentially expressed in a 6S RNA-dependent manner, both in exponential and stationary phase. Also often the gene for 6S RNA (*ssrS*) is transcriptionally coupled to genes of the purine metabolism. Surprisingly, in the microarrays from stationary phase cells a reduced expression of almost all genes for ribosome synthesis was observed. In the present study it was shown that the reduced synthesis of ribosomes correlates with an increased basal level of the growth rate regulator ppGpp.

Moreover, it was shown that in case of outgrowth from stationary phase this reduction is compensated by an enhanced expression of ribosomal genes in the 6S RNA deficient mutant.

In exponential phase the data point to a participation of 6S RNA in balancing purine levels. With a bioinformatic approach potential target genes for dnRNA in purine metabolism were identified.

In the second part of this study binding of the RNA chaperone Hfq to 6S RNA was documented. The Hfq binding to 6S RNA results in a reduced inhibition of RNA polymerase. Additionally, Hfq binding to the dnRNA was observed and it was shown that Hfq influences 6S RNA and dnRNA concentrations *in vivo*.

Finally it was shown, that cyanobacterial 6S RNAs bare fulfil similar molecular functions as the 6S RNA from *E. coli*. In vitro analysis showed that RNA polymerase from *E. coli* is able to bind to the cyanobacterial 6S RNAs in the same way as 6S RNA from *E. coli*. Moreover transcriptional inhibition and synthesis of dnRNA was observed. A common denominator of this function appears to be a high flexibility of the central 6S RNA domain.

Danke sage ich....

als aller erstes Prof. Dr. Rolf (Himbeertoni) Wagner dafür, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die letzten 5 Jahre verbringen durfte. Danke für Deine endlose Hilfsbereitschaft und Anregungen bei allen Fragen und Problemen. Ich danke auch dafür, dass Du mich immer wieder von gesunder Selbstkritik "überzeugt" hast, auch wenn's deshalb manchmal in Arbeit ausgeartet ist.

Prof. Dr. M. Feldbrügge danke ich für Übernahme der Koreferenz.

Tino danke ich für die Zusammenarbeit und dafür, dass er immer wieder neue Aspekte in dem *morass of data* entdeckt hat.

Ilka und vor allem Anne danke ich für die Blaugrün-Färbung der 6S, hat viel Spaß gemacht und ich hoffe es war nicht das letzte mal.

Den guten Geistern im Labor Reini und Barabara danke ich für all' die Sachen, die mir und den anderen Hanseln im Labor das Leben im Labor so erleichtern und zu viele aufzuzählen sind. Reini, Deine Polymerase ist die Beste!

Meinen Mitstreitern im Labor (Ümi, Zihni, Kiki, Tommy, der Hühnerhaufen: Melina, Vero, Sabine, Nina, Beate und Kalpana) und auch den ehemaligen (Tom, Philip, Inti, Sakis) danke ich für den ganzen Spaß und die geniale Arbeitsatmosphäre. Die "schmutzigen" Freitage und später auch Donnerstag und Mittwoch, ach eigentlich wars die ganze Woche, bleiben unvergessen.

Kiki gebührt darüber hinaus mein besonderer Dank fürs Korrekturlesen, das sensationelle WDR2-Musikquiz, mit unserem Gastspieler Tommy und dafür, dass ich mich immer drauf verlassen konnte, dass er das raushaut, was ich mir verkniffen hab :D.

Nina danke ich für die vielen Kurztrips ans "Meer", ausserlaborische Unternehmungen und dafür dass wir immer was leckeres am Herd zaubern. Und nicht zu vergessen dafür, dass ich nach 16 Jahren Uni-Düsseldorf mal im botanischen Garten war.

Allen Insitutsangehörigen danke ich für lustige, feuchtfrohliche Feiern und Grillereien und das ein oder andere "Glas Snaps".

Gerhard danke ich für die Tipps und Hilfe bei den Strukturmodellen.

Der Pokerrunde danke ich zwar nicht fürs "Abzocken", aber trotzdem hat's immer Spaß gemacht und wird hoffentlich auch noch öfter Spaß machen.

Bernd, Henrik und Goldie danke ich dafür, endlich mal wieder DoKo gespielt zu haben.

Dem "Pack" danke ich für alles was Euch eben ausmacht.

Meiner Familie und auch meinen zweiten "Eltern" Fritta und Jutz danke ich dafür, dass es sie gibt und sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauch.

It's done.....

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anpassung durch Genregulation	1
1.2	Die RNA Polymerase, Zentrum der Transkription	1
1.2.1	Die α -Untereinheit	2
1.2.2	Die $\beta\beta'$ -Untereinheiten	2
1.2.3	Die ω -Untereinheit	2
1.2.4	σ -Untereinheiten (σ -Faktoren)	3
1.2.4.1	Sigma ⁷⁰	3
1.3	Ablauf der Transkription	5
1.3.1	Initiation	6
1.3.2	Elongation	8
1.3.3	Termination	8
1.3.4	Funktion und Struktur von Promotoren	9
1.4	Transkriptionsregulation in <i>E. coli</i>	11
1.4.1	Der zentrale Wachstumsratenregulator ppGpp	11
1.5	Genregulation durch kleine RNAs	14
1.6	Hfq - ein Reaktionspartner vieler ncRNAs	16
1.7	6S RNA aus <i>E. coli</i>	19
1.7.1	Struktur und Funktion der 6S RNA aus <i>E. coli</i>	21
1.7.2	6S RNA in anderen Bakterien	24
1.8	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	25
2	Ergebnisse	27
2.1	Promotorspezifität und Einbindung der 6S RNA in regulatorische Netzwerke	27
2.1.1	Promotorspezifität der 6S RNA <i>in vitro</i>	27
2.1.2	Globale Rolle der 6S RNA in der Genregulation	30
2.1.3	Direkter Einfluss von 6S RNA auf die Expression des Translationsapparates <i>in vivo</i>	31
2.1.4	Führt die 6S RNA zu einer globalen Inhibierung der Transkription?	37
2.1.5	6S RNA beeinflusst den zentralen Wachstumsraten Regulator ppGpp	39
2.1.6	Einfluss der 6S RNA auf die differentielle Regulation der rRNA Operons	41
2.1.7	Ist der beobachtete Phänotyp für 6S RNA auf einen Defekt im RSH-System zurückzuführen?	42
2.1.8	Rückkoppelung der Regulation des Purinstoffwechsels auf die 6S RNA	44
2.1.9	Rolle der 6S RNA während eines <i>outgrowth</i> aus der stationären Phase	47
2.2	Hfq, ein weiterer Interaktionspartner für 6S RNA	53
2.2.1	Hfq bindet an 6S RNA	53
2.2.2	Hfq stört die Komplexbildung zwischen 6S RNA und RNA Polymerase	54
2.2.3	Einfluss von Hfq auf die <i>in vitro</i> Transkriptionshemmung durch 6S RNA	55
2.2.4	Spezifische Bindung von Hfq an die 6S RNA-kodierte dnRNA	58
2.2.5	Einfluss von Hfq auf die Synthese von 6S RNA kodierter dnRNA	60
2.2.6	Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe in Gegenwart von Hfq	61
2.2.7	Hfq bindet an 6S RNA~dnRNA Hybride	63
2.2.8	Hfq erhöht die Flexibilität der zentralen Blase der 6S RNA	65
2.2.9	Deletion von Hfq reduziert die Mengen dnRNA nach <i>nutritional upshift</i>	68
2.2.10	Existieren weitere zelluläre Interaktionspartner der 6S RNA?	69
2.3	Mechanismen der 6S RNA-abhängigen Regulation in Cyanobakterien	70
2.3.1	Cyanobakterielle 6S RNAs besitzen ähnlich dynamische Strukturen wie die 6S RNA aus <i>E. coli</i>	73

2.3.2	Interaktion der cyanobakteriellen 6S RNAs in einem heterologen System mit der RNAP aus <i>E. coli</i>	76
2.3.3	Auch cyanobakterielle 6S RNAs haben inhibitorische Wirkung auf die Transkription <i>in vitro</i>	78
2.3.4	Hohe NTP-Konzentrationen führen <i>in vitro</i> zur Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe	80
2.3.5	<i>E. coli</i> RNA Polymerase ist in der Lage cyanobakterielle 6S RNAs als <i>Template</i> für <i>de novo</i> Synthese zu nutzen	81
3	Diskussion	85
3.1	Physiologische Rolle der 6S RNA	85
3.1.1	Promotorspezifität der 6S RNA aus <i>E. coli</i>	85
3.1.2	Physiologische Rolle der 6S RNA in der stationären Wachstumsphase	88
3.1.3	Bedeutung der 6S RNA bei der Aufrechterhaltung des NTP-Spiegels in der logarithmischen Wachstumsphase	90
3.1.4	6S RNA ist sowohl in der logarithmischen als auch der stationären Phase an der Wachstumsbalance beteiligt	92
3.1.5	Einfluss der 6S RNA während des <i>outgrowth</i> aus der stationären Wachstumsphase	93
3.1.6	Einbau aller gefundenen Zusammenhänge von 6SRNA und dem Purinstoffwechsel	96
3.2	Effekte von Hfq auf 6S RNA	98
3.2.1	Bindung von Hfq an die 6S RNA	98
3.2.2	Effekt von Hfq auf die dnRNA-Synthese und Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe <i>in vitro</i>	99
3.2.3	Einfluss von Hfq auf 6S RNA und dnRNA <i>in vivo</i>	101
3.3	Mechanismen der 6S RNA in Cyanobakterien	102
3.3.1	Temperaturabhängige Dynamik der cyanobakteriellen 6S RNAs	105
3.3.2	Interaktion der cyanobakteriellen 6S RNAs mit der RNA Polymerase aus <i>E. coli</i>	107
3.4	Ausblick	110
4	Material	113
4.1	Allgemeines	113
4.2	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	113
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	113
4.2.2	Plasmide	114
4.3	Nukleinsäuren	114
4.3.1	Oligonukleotide	114
4.3.2	Nukleotide	116
4.3.3	Molekulargewichtsmarker	116
4.4	Proteine	116
4.4.1	Restriktionsendonukleasen	117
4.4.2	Polymerasen	117
4.4.3	Enzyme und sonstige Proteine	117
4.5	Puffer und Medien	117
4.5.1	Puffer	117
4.5.2	Medien	118
4.5.3	Feinchemikalien	119
4.6	Verschiedenes	120
5	Methoden	121
5.1	Mikrobiologische Methoden	121

5.1.1	Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	121
5.1.2	Anzucht auf Agarplatten	121
5.1.3	Anzucht von $\bar{u}N$ -Kulturen	121
5.1.4	Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerinstocks)	122
5.1.5	Herstellung kompetenter Zellen	122
5.1.6	Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA	122
5.2	Molekularbiologische Methoden	123
5.2.1	Messen von Konzentrationen	123
5.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	123
5.2.1.2	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	123
5.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	124
5.2.1.4	Messung von Radioaktivität	124
5.2.2	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	124
5.2.2.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab ("Minipräp")	124
5.2.2.2	Isolation von Gesamt-RNA	125
5.2.2.3	Glaswolleelution aus Agarosegelen	126
5.2.2.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	126
5.2.2.5	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	126
5.2.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	127
5.2.3.1	Agarosegelelektrophorese	127
5.2.3.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)	127
5.2.3.3	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE)	128
5.2.4	Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen	130
5.2.4.1	Silberfärbung von Nukleinsäuren	130
5.2.4.2	Autoradiographie	130
5.2.4.3	Densitometrie	130
5.2.5	Reinigung und Konzentrierung von Proteinen	131
5.2.5.1	Gesamt Protein Extraktion im analytischen Maßstab	131
5.2.5.2	Aufreinigung von Hfq im präparativen Maßstab	132
5.2.5.3	FPLC von Hfq	133
5.2.5.4	Dialyse von Proteinlösungen	133
5.2.6	Gelelektrophorese von Proteinen	134
5.2.6.1	Diskontinuierliche SDS-PAGE	134
5.2.6.2	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Coomassie	135
5.2.7	Enzymatische Reaktionen	135
5.2.7.1	DNase-Hydrolyse von Gesamt-RNA Extraktionen	135
5.2.7.2	Präparative Gewinnung von 6S RNA mittels <i>in vitro</i> Transkription (RiboMAX)	136
5.2.7.3	Primer Extension (PE) von gesamt RNA (gRNA)	136
5.2.7.4	Primer Extension von 6S RNA	137
5.2.7.5	Phosphorylierung von Oligonukleotiden (5'-Markierung mit $[\gamma^{32}P]$ -ATP)	137
5.2.7.6	3'-Endmarkierung von RNA (pCp-Markierung)	138
5.2.7.7	<i>Multiple round in vitro</i> Transkription mit superhelikalem <i>Template</i> (IVT)	139
5.2.7.8	<i>In vitro</i> Transkriptionen zur Synthese von dnRNA	139
5.2.7.9	RNA-Footprint Analysen	140
5.2.7.10	Biotinylierung von 6S RNA	140
5.3	Spezielle Methoden	141
5.3.1	SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)	141
5.3.2	Analyse des Nukleotidpools von <i>E. coli</i>	141

5.3.2.1	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie zur quantitativen ppGpp Bestimmung	142
5.3.2.2	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	142
5.3.3	Verzögerungsgelelektrophorese (Retardierung)	143
5.3.4	Northern Blot Analysen	144
5.3.5	Unterschied im Nachweis der 6S RNA mit dem 6S Oligo 1 in Northern Blot und Primer Extension nach <i>nutritional upshift</i>	145
5.3.6	<i>Affinity Binding</i> Experimente	145
5.3.7	Transkriptomanalysen	146
5.3.7.1	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	147
5.3.7.2	Hybridisierungsexperimente mit <i>E. coli</i> DNA-Chips und fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	147
5.3.7.3	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz hybridisierter DNA-Chips	148
5.3.7.4	Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Speicherung der Chip-Daten	149
6	Abkürzungsverzeichnis	149
7	Anhang	154
7.1	Abbildungen	154
7.2	Tabellen	155
8	Literaturverzeichnis	162
9	Veröffentlichungen	176

1 Einleitung

1.1 Anpassung durch Genregulation

Bakterien sind mit Abstand die anpassungsfähigsten Organismen und besiedeln alle nur denkbaren Biotope. Angefangen von Darmbakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, über Tiefsee-Vertreter (Cyanobakterien) und Bodenbakterien (*Agrobacterium tumefaciens*), bis hin zu Archaeen, die unwirtliche Lebensräume, wie heiße Quellen mit Temperaturen nahe des Siedepunktes, besiedeln (*Pyrococcus furiosus*). Sie sind in der Lage verschiedenste Nährstoffquellen zu benutzen und können sich schnell auf neue Umweltbedingungen, wie z.B. Änderungen der Temperatur, Kohlenstoffquelle, pH-Wert, einstellen. Erreicht wird diese Adaptation durch effiziente und rasche Regulation der Genexpression. Die Anpassung kann dabei auf allen drei Ebenen der Genexpression (Replikation, Transkription und Translation) erfolgen. Darüber hinaus erfolgt auch eine Regulation der Produkte dieser drei Synthesestufen. So kann die Lebensdauer von mRNA und Proteinen gezielt durch Abbau und Prozessierung reguliert werden und auch temporäres Stilllegen (*silencing*) von Genen, mRNAs und Proteinen erfüllt regulatorische Funktion. Da Prokaryoten im Gegensatz zu Eukaryoten keine Kompartimentierung aufweisen, können sich alle diese Schritte auch gegenseitig beeinflussen (z.B. Attenuation). Die Hauptregulation findet bei Bakterien auf der Ebene der Transkription, also der Synthese von RNA, statt. Aus diesem Grund wird zunächst die Transkription und beteiligte Faktoren detaillierter beschrieben.

1.2 Die RNA Polymerase, Zentrum der Transkription

Im Gegensatz zu Eukaryoten besitzen Bakterien nur eine RNA Polymerase (RNAP), die für die Synthese von sämtlichen RNA-Spezies zuständig ist. Man kann zwei Formen von RNAP unterscheiden, Core- und Holoenzym. Das Coreenzym, mit einem Molekulargewicht von 389 kDa (*E. coli*) besteht aus den Untereinheiten $\alpha_2\beta\beta'\omega$, besitzt volle Transkriptionsaktivität. Es ist jedoch nicht in der Lage die Transkription zu initiieren, dazu ist ein Spezifitätsfaktor (σ -Faktor) nötig. Nach der Assoziation des σ -Faktors an das Coreenzym spricht man vom Holoenzym ($E\sigma$). Das Holoenzym ist in der Lage Transkriptionsstartstellen, sogenannte Promotoren, zu erkennen und die Transkription zu initiieren.

1.2.1 Die α -Untereinheit

Kodiert durch das Gen *rpoA* besteht diese Untereinheit aus 389 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 36,5 kDa. In der RNAP liegt sie als Dimer vor. Die N-terminale Domäne (α -NTD) ist an der Assemblierung des Corenzyms beteiligt und bindet an den β und β' -Untereinheiten, die C-terminale Domäne (α -CTD) ist über einen flexiblen Linker mit der α -NTD verbunden und interagiert mit Promotor Elementen *upstream* des *core* Promotors (Negishi *et al.* 1995; Jeon, Yamazaki *et al.* 1997). Darüber hinaus binden diverse Transkriptionsfaktoren, z.B. das Catabolit Regulator Protein (CRP) an die α -CTD und interagieren so mit der RNAP und dem Promotor (Ebright and Busby 1995).

1.2.2 Die $\beta\beta'$ -Untereinheiten

Mit 150 und 155 kDa stellen diese beiden Untereinheiten, kodiert durch *rpoB* und *rpoC*, die größten Untereinheiten der RNAP dar. Durch Bildung der sogenannten *Crab Claw*, mit einem zentral koordinierten Mg^{2+} -Ion, stellen diese beiden Untereinheiten das aktive Zentrum (AZ) der RNAP dar. Im Aktiven Zentrum sind β und β' an der DNA-Bindung und Einbau der NTP-Substrate beteiligt (Gross, Chan *et al.* 1996). In Kontakt stehen beide Untereinheiten durch die hochkonservierte *Bridge Helix*. Diese sorgt, zusammen mit $\beta\beta'$, für die Bildung des Hauptkanals innerhalb der RNAP, in dem die Promotor DNA liegt und dem sekundären Kanal, durch den die NTP-Zufuhr zum AZ gewährleistet wird. (Landick 2005). Des weiteren existiert noch ein *Exit Channel*, durch den das naszierende Transkript das aktive Zentrum verlässt.

1.2.3 Die ω -Untereinheit

Die Funktion der ω -Untereinheit ist bislang nicht restlos geklärt. Es wird vermutet, dass sie bei der Assemblierung und Stabilität des Corenzyms eine Rolle spielt (Minakhin, Bhagat *et al.* 2001). Ausserdem wird ihr eine Rolle als Mediator der DksA-vermittelten Regulation bei der Stringenten Kontrolle zugeschrieben (Vrentas, Gaal *et al.* 2005). Bei *in vitro* Untersuchungen zeigte sich, dass die RNAP sowohl mit als auch ohne ω in der Lage war Transkription zu initiieren und vollständig zu transkribieren (Platis 2010).

1.2.4 σ -Untereinheiten (σ -Faktoren)

Bei den σ -Untereinheiten handelt es sich um die Spezifitätsfaktoren der RNAP, die eine Transkriptionsinitiation ermöglichen. Nur in Verbindung mit einem σ -Faktor ist die RNAP in der Lage, Promotoren zu erkennen. Durch Verwendung unterschiedlicher Promotorklassen und spezifischer Sigma-Faktoren können gezielt ganze Gengruppen (Regulons) angesteuert werden. Als Regulons bezeichnet man Gengruppen, die gemeinsame Aufgaben haben und in gleiche Stoffwechselwege eingreifen. In *E. coli* existieren sieben verschiedene σ -Faktoren. Der prominenteste σ^{70} oder auch σ^D kontrolliert die sogenannten *Housekeeping* Gene, das sind Gene für optimales Wachstum, die vorwiegend in der logarithmischen Wachstumsphase exprimiert werden. Darüber hinaus gibt es Sigma-Faktoren für Regulons der stationären Phase (σ^{38} bzw. σ^S), Hitzeschockgene (σ^{32} und σ^{24}), Flagellensynthese (σ^{28}), des Eisenstoffwechsels (σ^{19}) und des Stickstoffmetabolismus (σ^{54}) (Ishihama 1997). Aufgrund der umfassenden Regulation durch Sigma Faktoren nennt man diese auch Masterregulatoren. Sigma-Faktoren lassen sich in zwei Familien unterteilen, die Sigma⁷⁰ und Sigma⁵⁴ Familie (Gruber, Young *et al.* 2001). Bis auf σ^{54} gehören in *E. coli* alle Sigma-Faktoren der Sigma⁷⁰-Familie an, da dies auch der Haupt σ -Faktor in *E. coli* ist wird dessen Aufbau näher beschrieben.

1.2.4.1 Sigma⁷⁰

Kodiert durch das Gen *rpoD* stellt σ^{70} mit 70 kDa den grössten Sigma-Faktor in *E. coli* dar. Assoziiert mit dem *core*-Enzym der RNAP spricht man auch von $E\sigma^{70}$ oder $E\sigma^D$. Allen Mitgliedern der Sigma⁷⁰-Familie gemein ist der strukturelle Aufbau aus vier funktionellen Domänen σ^1 – σ^4 . Diese lassen sich noch in Subdomänen unterteilen und sind teilweise durch flexible Linker verbunden. In Abbildung 1.1 ist schematisch und als Kristallstruktur der Aufbau gezeigt. Durch Interaktion der Subdomänen 2.1 und 3.2 mit $\beta\beta'$ des Coreenzyms erfolgt die Assemblierung zum Holoenzym. Die Regionen 2.3, 2.4 und 4.2 sind für die Erkennung der *core* Promotor Elemente zuständig. Dabei bindet die Domäne 4.2 an das -35-Element und die Domänen 2.3 und 2.4 an die -10-Region. Die Domäne 1.2 interagiert mit einer regulatorischen Region, der sogenannten Diskriminatorsequenz, die zwischen dem -10-Element und dem Transkriptionsstart lokalisiert ist (Abbildung 1.5).

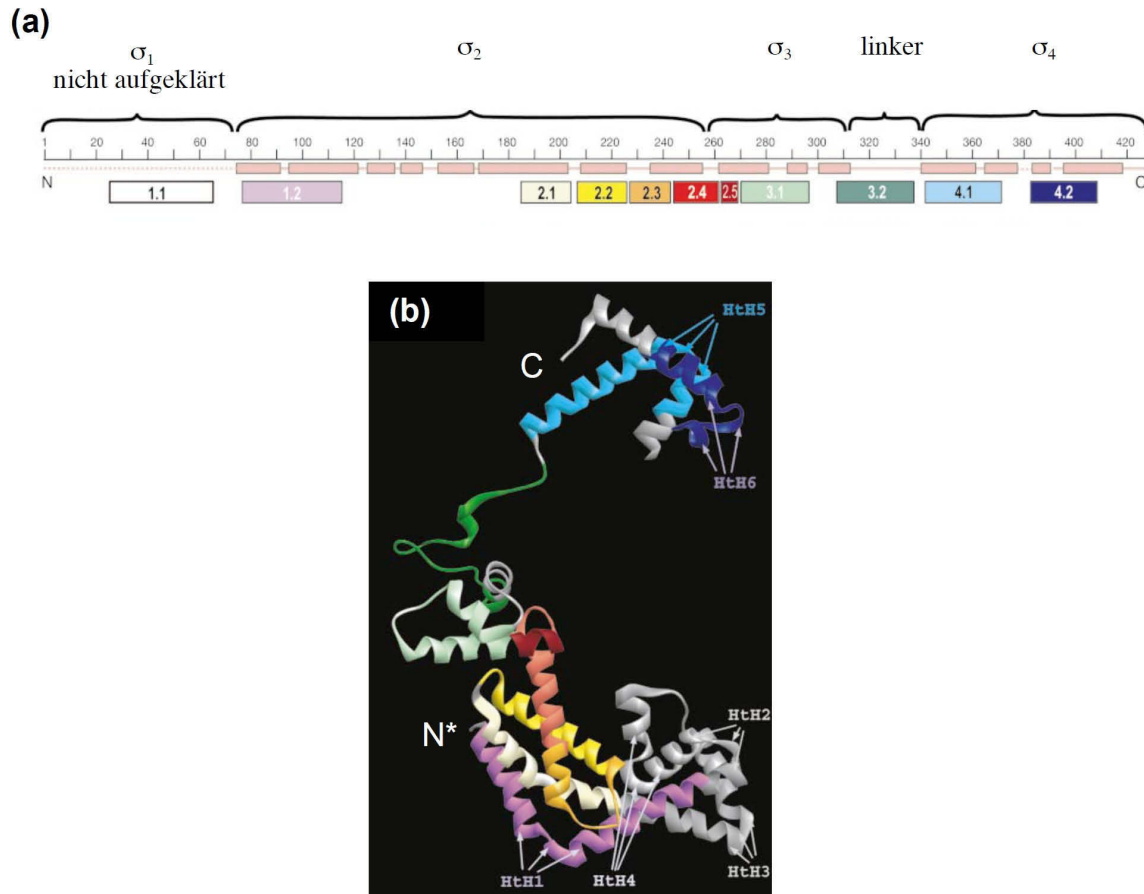


Abbildung 1.1 Röntgenkristallstruktur des $\sigma 70$ -Faktors aus *E. coli*. (a) Gezeigt ist eine schematische Übersicht der konservierten Domänen (1.1 bis 4.2) und des Linkers. Die rosa Balken deuten die Lage von α -Helices im Protein an. (b) Dreidimensionale Struktur von $\sigma 70$ ohne die Region 1.1 (AS 73-613). Die Farbkodierung entspricht der in a, wenig konservierte Bereiche sind in grau dargestellt. Der C-Terminus und der N-Terminus sind mit C bzw. N* gekennzeichnet (Vassilyev, Sekine *et al.* 2002).

Ein solcher Diskriminator (GCGC) kennzeichnet Stringent regulierte Promotoren und ist nicht Bestandteil jedes σ^{70} Promotors (Zacharias, Theissen *et al.* 1991; Feklistov, Barinova *et al.* 2006; Haugen, Berkmen *et al.* 2006). Die saure Domäne 1.1 sorgt dafür, dass Sigma⁷⁰ nicht ohne RNA Polymerase an DNA binden kann. Sie wird erst durch die Bindung an das *core*-Enzym so positioniert, dass eine Promotorbindung erfolgen kann (Dombroski, Walter *et al.* 1993). Die Domäne 2.3 ist noch an der Aufschmelzung des DNA-Doppelstrangs und damit an der Isomerisierung des geschlossenen zum offenen Initiationskomplex beteiligt (1.3.1). Die Regionen 2 und 4 sind innerhalb der *E. coli* Sigma⁷⁰ Familie hoch konserviert. Durch minimale Sequenzunterschiede bei den einzelnen Sigma-Faktoren lassen sich vermutlich die Erkennung der verschiedenen Promotorklassen realisieren und ermöglichen so gezielte Regulation. Darüber hinaus besitzen die verschiedenen Sigma-Faktoren auch unterschiedliche Affinität zum *core*-Enzym der RNAP. So besitzt σ^{70} eine etwa fünfmal höher Bindung als σ^{38} (Severinova, Severinov *et al.* 1996; Vassilyev, Sekine *et al.* 2002).

In Abbildung 1.2 ist schematisch die Interaktion der σ^{70} -assoziierten RNAP mit einem DNA Promotor zu sehen. Die β und β' -Untereinheiten (hellblau und pink) bilden, mit einem zentral koordinierten Mg^{2+} -Ion das aktive Zentrum, stabilisiert durch die *Bridge Helix*. Die Bindung erfolgt über den assoziierten σ -Faktor an die verschiedenen Regionen des Promotors (gelb/orange und grün, die Regionen 1.2, 2 und 3 in Interaktion mit der -10-Region und die Region 4.2 (rot) mit der -35-Region). Im aktiven Zentrum ist die DNA teilweise aufgeschmolzen und der *downstream* gelegene Teil befindet sich im Hauptkanal der RNAP.

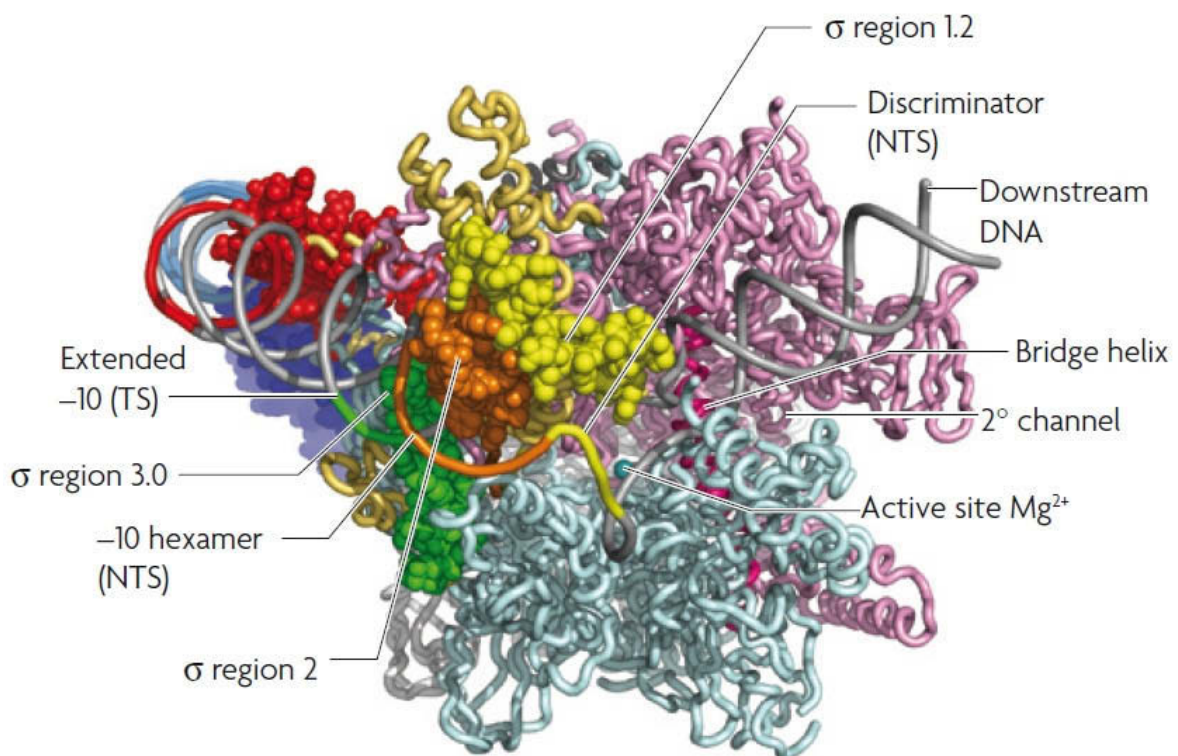


Abbildung 1.2 Modell der σ^{70} -assoziierten RNA Polymerase im Komplex mit Promotor DNA

Charakteristische Merkmale der RNAP sind markiert. (β hellblau, β' : pink, σ -Domänen 1.2: gelb, 2: orange; 3: grün und 4.2: rot, Bridge helix: magenta) Promotor Elemente und die erkennenden RNAP Regionen sind in gleichen Farben dargestellt. α und ω liegen hinter der sichtbaren Ebene und sind daher nicht zu erkennen. Aus (Haugen, Ross *et al.* 2008)

1.3 Ablauf der Transkription

Die Transkription ist die DNA-abhängige Synthese von RNA durch die RNA Polymerase. Sie kann im wesentlichen in drei Stufen (Initiation, Elongation und Termination) unterteilt werden. Diese drei Stufen werden im Folgenden detailliert beschrieben.

1.3.1 Initiation

Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Initiation. Die RNA Polymerase (R) kann unspezifisch, durch elektrostatische Wechselwirkung an die DNA binden und daran entlang gleiten, sogenanntes *Sliding* (Kabata, Kurosawa *et al.* 1993). Erst an einem Promotor (P) kommt es durch den Sigma-Faktor zu einer spezifischen Wechselwirkung mit der Promotorregion und es bildet sich der geschlossene Initiationskomplex RP_c . Die sauren Domänen des Sigma-Faktors liegen dabei im Inneren der RNAP (Helmann and deHaseth 1999; Saecker, Tsodikov *et al.* 2002). In einer starken strukturellen Änderung, der Isomerisierung (RP_i), verändern sich die Konformation der RNAP und der DNA. Dabei wird die DNA gebogen und nähert sich der Domäne 1.1 des Sigma-Faktors an, bleibt jedoch doppelsträngig (Saecker, Tsodikov *et al.* 2002; Cook and Dehaseth 2007). Die Isomerisierung führt schliesslich zum offenen Komplex (RP_o), bei dem die DNA im Bereich der -10-Region und des Transkriptionsstarts +1 aufgeschmolzen ist. Die Transkriptionsblase bildet sich. Der *downstream* DNA-Bereich liegt dabei in einem Kanal, der durch β und β' geformt wird (Korzheva, Mustaev *et al.* 2000; Murakami, Masuda *et al.* 2002). Mit Einbau der ersten Nukleotidtriphosphate entsteht ein ternärer Initiationskomplex (RP_{NTP}) und die Reaktion wird durch freiwerdende Energie des Einbaus vorwärts getrieben. Dennoch können immer wieder abortive Produkte bis zu 12 Nukleotiden Länge entstehen. Überschreitet die Transkriptlänge diese Länge, fädelt das Transkript in den *Exit Channel* ein, durch den es aus dem AZ heraus geführt wird. Gleichzeitig erfolgt eine erneute Konformationsänderung. Der Sigma-Faktor wird dabei abgespalten und es entsteht der Elongationskomplex (TEC). Dieser Vorgang wird auch als Promotor *Escape* bezeichnet (Record, Reznikoff *et al.* 1996). Alle diese Schritte sind reversibel, erst nach der Promotor *Escape* ist die Reaktionsrichtung festgelegt.

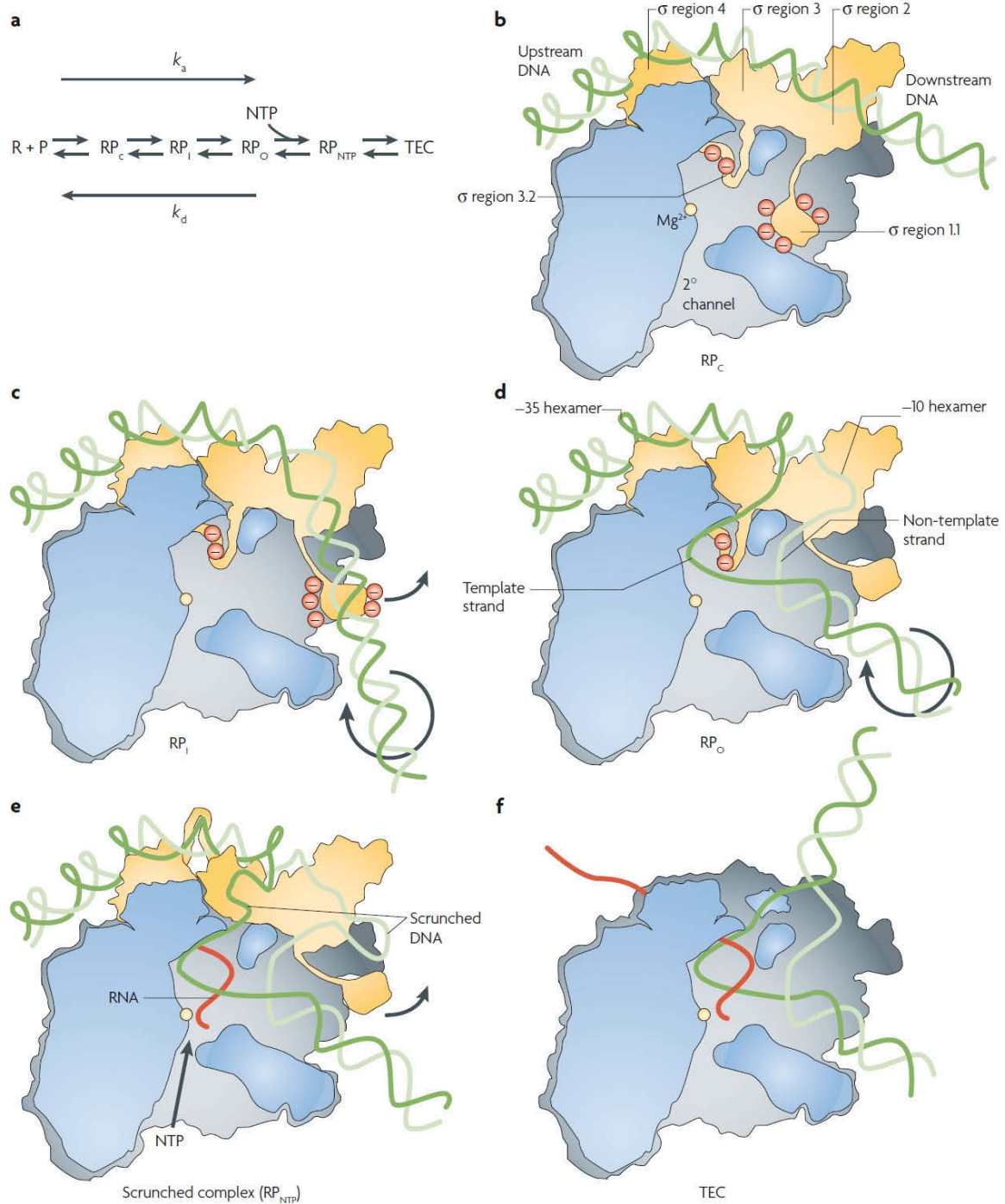


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Transkriptionsinitiation. In **a**) sind die einzelnen Schritte als Flussdiagramm dargestellt. R: RNAP, P: Promotor, RP_c : Geschlossener Komplex, RP_i : Isomerisierender Komplex, RP_o : Offener Komplex, RP_{NTP} : Ternärer Initiationskomplex, TEC: Elongationskomplex. **b**) bis **f**) zeigen die einzelnen Komplexe als Modell. *Template* DNA: dunkelgrün, *non Template* DNA: hellgrün, Transkript: rot, Aktives Zentrum: blau und grau (zentrales Magnesium als gelbe Kugel), σ^{70} : gelb, saure Regionen sind mit roten Kugeln gekennzeichnet (Haugen, Ross *et al.* 2008).

bindet der Terminationsfaktor Rho an einer sogenannten *rut site* (*rho utilization site*) auf der wachsenden RNA-Kette. Bei Rho handelt es sich um ein Homohexamer aus 47 kDa großen Untereinheiten. Es bildet eine Ringstruktur aus und bewegt sich nach der Bindung an die *rut site* auf den Elongationskomplex zu. Ist Rho dabei schneller als die elongierende RNAP, kann es nach Erreichen der RNAP das RNA-DNA Hybrid unter ATP-Hydrolyse entwinden und damit die Elongation beenden (Platt 1994).

1.3.4 Funktion und Struktur von Promotoren

Promotoren sind die Startstellen der Transkription, für die gezielte Expression von Operons und Regulons sind sie von entscheidender Bedeutung. Die RNA Polymerase erkennt und bindet einen Promotor durch den Spezifitätsfaktor σ . Da es verschiedene Sigma-Faktoren gibt existieren auch verschiedene Promotorklassen. Dabei kann es jedoch auch zu Kreuzerkennung von Promotoren kommen. So kann z.B. σ^{70} auch sehr viele σ^{38} Promotoren erkennen, allerdings deutlich weniger effizient (Becker and Hengge-Aronis 2001). Der Kernpromotor (*core* Promotor) besteht aus drei konservierten Strukturelementen, deren Positionen relativ zum Transkriptionsstart +1 angegeben werden (Beutel and Record 1990). Dabei handelt es sich um die -35-Region und die -10-Region, die durch einen Spacer variabler Länge getrennt sind. Abbildung 1.5 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Kern Promotors mitsamt der beteiligten Bindedomänen der Sigma-Untereinheit der RNAP. Je nach Promotorklasse haben die einzelnen Kernelemente unterschiedliche Konsensussequenzen und auch die Länge des Spacers variiert.

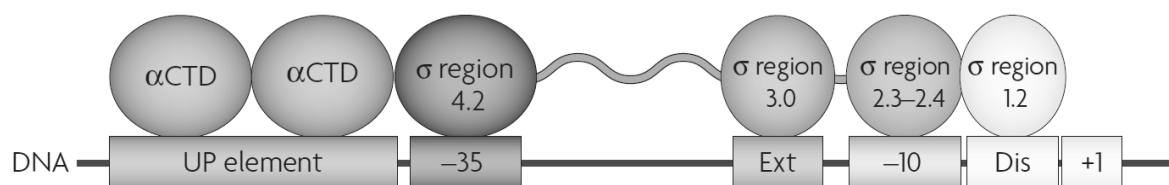


Abbildung 1.5 Promotor Konsensuselemente und Binderegionen der RNA Polymerase

Zu sehen sind die Kernelemente eines Promotors und die damit interagierenden Domänen der RNA Polymerase. Die minimalen Elemente sind die -35 und -10 Region, getrennt durch einen Spacer, der je nach Promotorklasse 4-18 Nukleotide beträgt. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert. Zusätzlich sind weitere Elemente gezeigt, die je nach Promotor auftreten können. Als UP Element werden Bereiche *upstream* der -35-Region bezeichnet, die mit der RNAP und/oder Transkriptionsfaktoren interagieren können. Ext bezeichnet eine erweiterte (extended) -10-Region. Dis beschreibt eine Diskriminatorsequenz (GCGC), welche sich oft bei stringent regulierten Promotoren findet.

Die Abbildung zeigt darüber hinaus zusätzliche Promotorelemente, die eine noch differentiellere Regulation zulassen, jedoch nicht zum Kernpromotor gehören.

Als UP-Element bezeichnet man z.B. Regionen die *upstream* des Kernpromotors liegen und mit der α -Untereinheit der RNAP (α -CTP) und/oder Transkriptionsfaktoren interagieren können. Ein extended -10 Element weisen oft solche Promotoren auf, die zwar durch σ^{70} erkannt werden, aber keine richtige -35-Region besitzen und für optimale Aktivität eine verlängerte -10-Region benötigen (Bown, Barne *et al.* 1997). Dabei wird upstream der -10-Region ein zusätzliches TG-Element für die Initiation erkannt und auch die Übereinstimmung der -35-Region mit der Konsensussequenz ist in solchen Fällen suboptimal (Mitchell, Zheng *et al.* 2003). In Tabelle 1.1 ist eine Übersicht der Konsensussequenzen der verschiedenen Promotorklassen mit den dazugehörigen Sigma-Faktoren und kontrollierten Regulons gezeigt. Die Sequenzen wurden durch Vergleiche von mehr als 300 Promotoren erhalten (Lisser and Margalit 1993). Durch diese Varianz an Konsensussequenzen und Erkennung durch spezifische Sigma-Faktoren ist die Grundlage für zielgerichtete Transkriptionsregulation und damit differentielle Genexpression geschaffen.

Tabelle 1.1 σ -Faktoren in *E. coli*, die Konsensussequenzen der spezifischen Promotoren und durch sie regulierte Gengruppen (aus (Geißel 2007) verändert nach (Wagner 2000))

σ -Faktor	-35-Region	Anzahl an Spacernukleotiden	-10-Region	Regulon
σ^{70}	TTGACA	17 +/- 1	TATAAT	<i>housekeeping</i> Gene
σ^{38}		17 +/- 1	KCTATACT	stationäre Phase Gene
σ^{32}	TNtCNCCCTTGAA	13-17	CCCCATtTA	Hitzeschock Gene
σ^{24}	GAAC TT	16	TCTGAT	extrem Hitzeschock Gene
σ^{28}	TAAA	15	GCCGATAA	Gene zur Flagellen-Synthese
σ^{54}	ttGGcaca	4	ttGCA	Gene des Stickstoffmetabolismus
σ^{19}	AAGGAAAAT	17	TCCTTT	Gene zur Eisenaufnahme

1.4 Transkriptionsregulation in *E. coli*

Die Transkriptionsregulation ist ein sehr komplexer Vorgang und bisher noch nicht vollständig verstanden. Regulation kann an vielen Schritten erfolgen, den oben beschriebenen Promotoren kommt dabei eine Hauptaufgabe zu. Je höher die Übereinstimmung eines Promotors zu seiner Konsensussequenz, desto stärker ist die Bindung des korrespondierenden Holoenzym und als Folge resultiert eine stärkere Initiation. Da die Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Initiationskomplex ein reversibler Prozess ist, kann dies allerdings das Promotor *escape* behindern. An dieser Stelle spielt auch die NTP-Konzentration eine Rolle, so sind z.B. offene Initiationskomplexe des *rrnB* P1 Promotors nur dann stabil, wenn das Startnukleotid (Adenin) in ausreichender Konzentration vorhanden ist (Gourse 1988; Langert, Meuthen *et al.* 1991). Auch der Salzgehalt und die Konformation der DNA spielen eine Rolle, da sie die Bindung der RNAP an den Promotor beeinflussen ((Kusano, Ding *et al.* 1996; Nègre, Bonod-Bidaud *et al.* 1997). Ferner existiert eine Vielzahl an Proteinen, die durch Interaktion mit dem Promotor oder der RNA Polymerase die Transkription beeinflussen. Auch können Proteine durch Kompaktierung der DNA die Transkription verändern. Solche Proteine werden als NAPs (*nucleoid associated proteins*) bezeichnet (Pul and Wagner 2007). Neben solchen Makromolekülen spielen auch niedermolekulare Verbindungen eine Rolle. Bei Glukosemangel steigt beispielsweise der intrazelluläre Spiegel von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stark an und sorgt zusammen mit dem *catabolit regulator protein* (CRP) für eine Aktivierung von Genen der sekundären Verwertung von Kohlenstoffquellen (Igarashi and A. 1991; Joung, Le *et al.* 1993). Ein weiterer, wichtiger niedermolekularer Regulator ist Guanosintetraphosphat (ppGpp). Als Bestandteil der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit, wird dieses Molekül im folgenden detaillierter beschrieben.

1.4.1 Der zentrale Wachstumsratenregulator ppGpp

Das kleine Nukleotid Guanosintetraphosphat (ppGpp) ist ein globaler Regulator der Genexpression in *E. coli*. Eine Hauptaufgabe dieses Effektormoleküls, dass sich auch als Alarmon bezeichnen lässt, ist die Mediation der Stringenten Kontrolle. Die Stringente Kontrolle beschreibt eine drastische Reduktion der Synthese von stabilen RNAs, als Antwort auf einen Aminosäuremangel in der Zelle (Cashel, Gentry *et al.* 1996). Durch die Bindung

von unbeladenen tRNAs an ein Ribosom wird die Translation arretiert. Als Folge davon wird durch das Ribosomen-assoziierte Protein RelA rasch aus GTP und ATP eine Vorstufe (Guanosinpentaphosphat, pppGpp) und durch Abspaltung eines Phosphatrests ppGpp synthetisiert. Die Konzentration an ppGpp steigt dabei schnell von μM auf mM Bereiche an. RelA dissoziiert dabei vom Ribosom und kann an weiteren blockierten Ribosomen die Reaktion wiederholen (Wendrich, Blaha *et al.* 2002). Als Resultat der Stringenten Kontrolle erfolgt eine Vielzahl an Inhibierungen und teilweise auch Aktivierungen in unterschiedlichen Bereichen des Stoffwechsels (siehe Abbildung 1.6). Am auffälligsten ist jedoch eine drastische Inhibierung der Transkription von Genen für stabile RNAs, hauptsächlich der rRNAs und tRNAs (Cashel, Gentry *et al.* 1996). Die Inhibierung erfolgt dabei zumeist an solchen Promotoren, die ein sogenanntes Diskriminatorelement besitzen (1.3.4). Dabei handelt es sich um ein konserviertes GCGC-Element *downstream* der -10-Region des Promotors (Haugen, Berkmen *et al.* 2006). Der genaue Mechanismus ist noch unklar, aber es ist bekannt dass diese Promotoren sehr instabile offene Initiationskomplexe mit der RNAP bilden und der Stabilität durch ppGpp weiter verringert wird (Barker, Gaal *et al.* 2001). Neben einer Inhibierung können auch Aktivierungen der Transkription die Folge der Stringenten Kontrolle sein. Dabei handelt es sich zumeist um Promotoren die Aminosäureoperons kontrollieren. Diese besitzen keinen GCGC Diskriminator, sondern sind in dieser Region AT-Reich (Da Costa and Artz 1997).

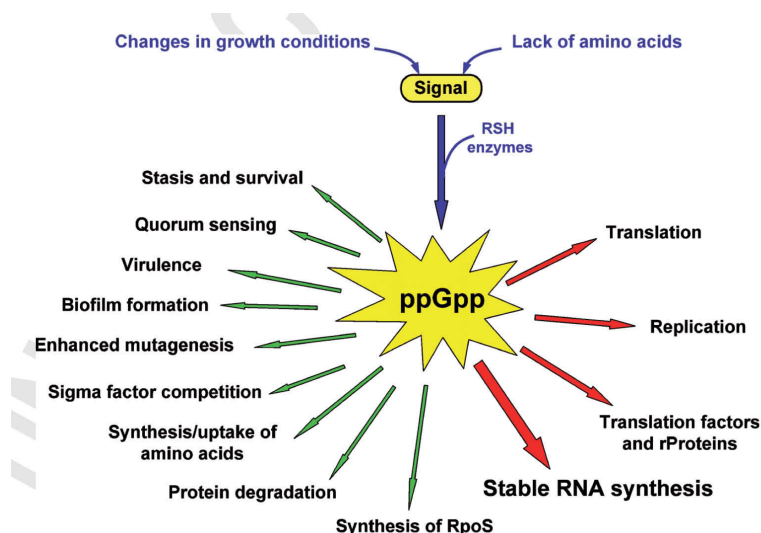


Abbildung 1.6 Globaler Einfluss von ppGpp

Gezeigt ist die vielfältige Wirkung von ppGpp auf diverse Stoffwechselwege in *E. coli*, rot gekennzeichnet Inhibierungen, grün Aktivierungen und die Stärke der Pfeile korreliert mit der Ausprägung des Effekts (Wagner 2010).

Die Aktivierung durch ppGpp ist teilweise eine Umverteilung der RNAP zurück zu führen. Es konnte *in vitro* jedoch bereits gezeigt werden, dass der *hisL* Promotor auch direkt durch ppGpp aktiviert wird (Schoengraf 2008). Oft ist nicht allein die hohe ppGpp-Menge für Effekte der Stringenten Kontrolle verantwortlich. Mit DksA existiert ein weiterer Faktor, der an dieser Regulation beteiligt ist. Zumeist ist die Interaktion beider Regulatoren synergistisch, in manchen Fällen jedoch auch antagonistisch (Paul, Barker *et al.* 2004; Paul, Berkmen *et al.* 2005). In Abbildung 1.7 ist schematisch der ppGpp Stoffwechsel gezeigt. Neben der raschen Synthese durch RelA, im Rahmen der Stringenten Kontrolle, wird ein basales Niveau an ppGpp durch das bivalente Enzym SpoT aufrecht erhalten. SpoT kann sowohl ppGpp aus ATP und GTP synthetisieren, als auch ppGpp zu GDP und Pyrophosphat (PP_i) hydrolysieren.

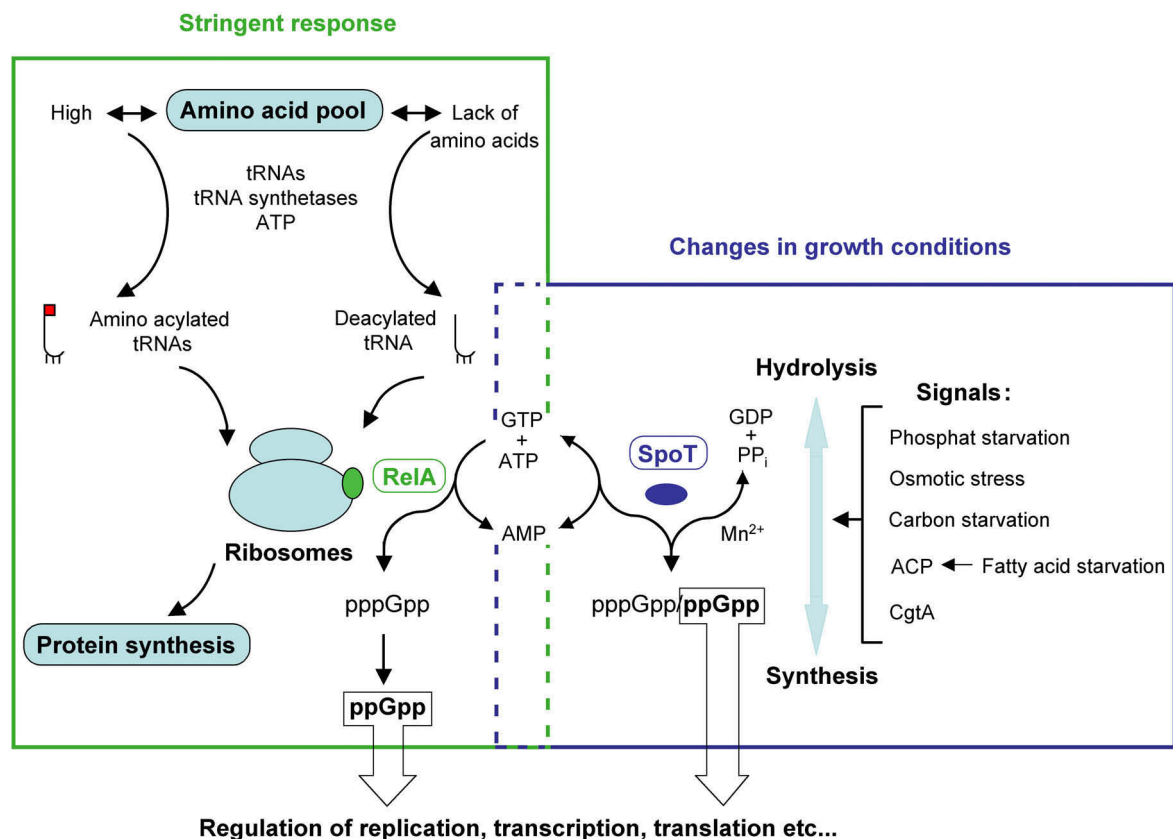


Abbildung 1.7 Schema des ppGpp-Metabolismus und der Induktion durch Aminosäuremangel in *E. coli*

In *E. coli* wird ppGpp auf zwei verschiedenen Wegen Synthetisiert. Die linke Seite zeigt die Induktion der starken, RelA-abhängigen Synthese im Rahmen der Stringenten Kontrolle. Diese wird ausgelöst durch das Binden unbeladener tRNAs in die A-site eines Ribosoms. Die rechte Seite zeigt die Aufrechterhaltung des basalen, von der Stringenten Kontrolle unabhängigen, ppGpp Niveaus durch das Enzym SpoT. SpoT ist ein bivalentes Enzym, das, gesteuert durch äussere Signale, Synthese und Hydrolyse von ppGpp betreibt (Wagner 2010).

Gesteuert wird dieses Gleichgewicht durch verschiedene äussere Faktoren, wie z.B. osmotischer Stress oder Nährstoffmangel (Battesti and Bouveret 2006).

Dieses basale ppGpp Level ist auch massgeblich an der Wachstumsratenregulation, auch der rRNA Promotoren, in *E. coli* beteiligt (Gourse, Gaal *et al.* 1996). Die Gesamtheit der Enzyme, die für ppGpp Synthese verantwortlich sind, nennt man RSHs (Rel Spo Homolog).

1.5 Genregulation durch kleine RNAs

Bis in die 90er Jahre des vorigen Jahrhunderts kannte man nur drei funktionelle Gruppen von RNAs, die allesamt bei der Translation zum tragen kommen. Messenger-RNA (mRNA) als Überträger der genetischen Information, tRNA als Transfermolekül für Aminosäuren und rRNA als Bestandteile der Ribosomen. Erst mit der Entdeckung, dass RNAs auch katalytisch wirken können, entwickelte sich die Idee einer RNA Welt, die evolutionär vor der Entwicklung der DNA stand (Cech 1993). Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass laufend neue nicht kodierende RNAs (ncRNAs), mit Funktionen abseits "simpler Botengänge" entdeckt werden (Eddy 1999; Storz 2002). Diese Beobachtung erstreckt sich sowohl auf Eukaryoten als auch auf Prokaryoten. In Abbildung 1.8 ist eine schematische Übersicht einiger Mechanismen der ncRNA-abhängigen Regulation in Eukaryoten und Prokaryoten gezeigt. Aufgrund ihrer Größe von zumeist 20-400 Nukleotiden bezeichnet man ncRNAs auch als sRNAs (*small RNA*). In *E. coli* sind derzeit mehr als 100 ncRNAs bekannt, wenn auch nicht für alle ihre Funktion geklärt ist (Storz, Altuvia *et al.* 2005; Altuvia 2007). Zumeist agieren regulatorische ncRNAs durch Interaktion mit mRNAs auf post-transkriptioneller Ebene. Durch die Bindung einer sRNA an ihre *target* mRNA kommt es zu Strukturänderungen der mRNA und möglichen Änderungen in der Zugänglichkeit der Shine Dalgarno Sequenz (SD). Dabei kann es sowohl zu Aktivierungen, als auch zu Inhibierungen kommen. Man kann ncRNAs zunächst grob in *cis*- und *trans-acting* RNAs unterteilen. Bei *cis-acting* ncRNAs handelt es sich um RNAs, die vom gleichen Genlocus transkribiert werden an dem sie auch wirken, während *trans* kodierte sRNAs unabhängig von ihrem Wirkort kodiert sind. *Cis-acting* sRNAs sind in der Regel RNAs, die als Bestandteil der mRNA in der 5'-UTR kodiert sind. Zumeist handelt es sich dabei um sogenannte *Riboswitches*, die Sekundärstrukturen ausbilden und so die SD-Region maskieren. (Nudler and Mironov 2004). Durch Bindung von meist niedermolekularen Liganden (z.B. Purine,

cAMP) an den *Riboswitch* ändert sich dessen Struktur, so dass die Blockade der SD-Region aufgehoben wird und die Translation erfolgen kann (Noeske, Richter *et al.* 2005).

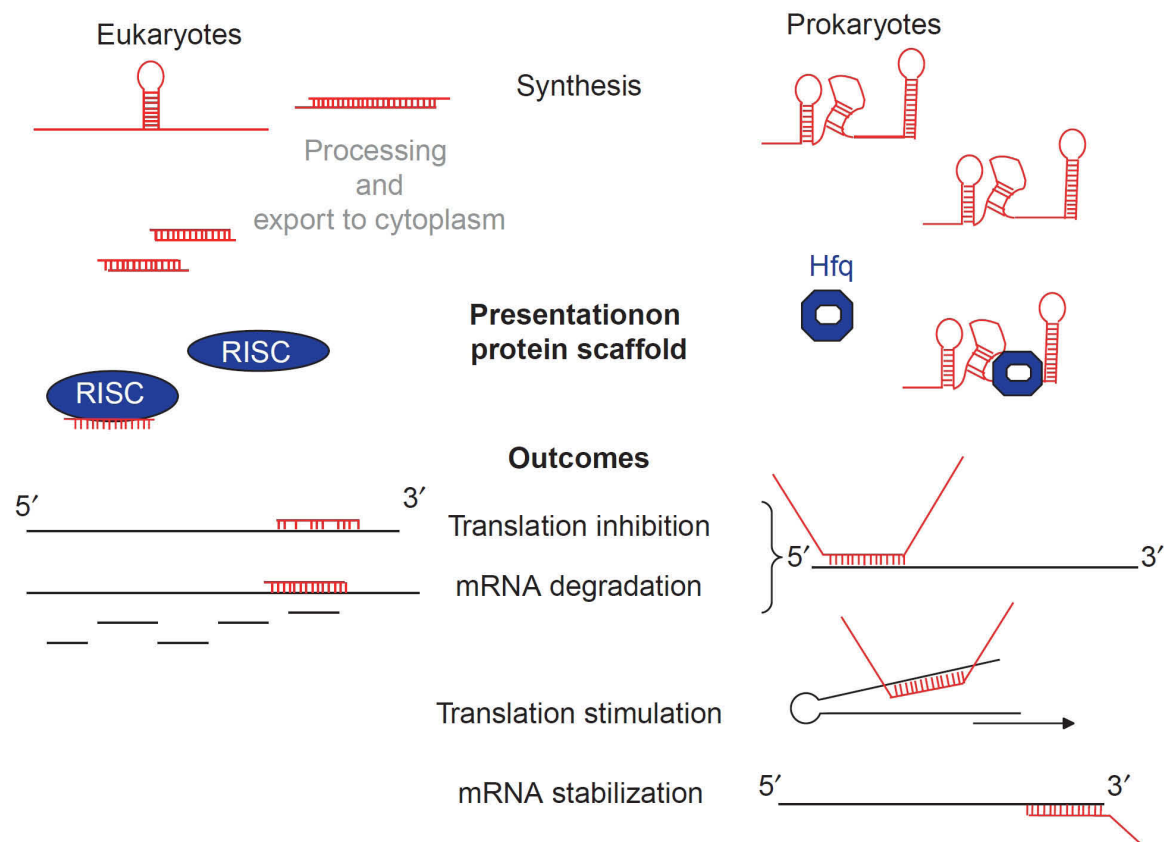


Abbildung 1.8 Schema der regulatorischen Funktion von kleinen, nicht kodierenden RNAs in Eukaryoten und Prokaryoten. Die regulatorischen RNAs sind rot und Ziel-RNAs in Schwarz dargestellt. An der Regulation beteiligte Proteine sind in Blau gezeigt (Gottesman 2005).

Unter diesen *Riboswitches* existieren auch solche, die temperaturabhängig agieren und daher RNA-Thermometer genannt werden. Zumeist werden Gene für Hitze- und Kälteschockproteine durch RNA-Thermometer reguliert (Narberhaus, Waldminghaus *et al.* 2006). Die Regulation durch *cis-acting* RNAs kann aber auch die Transkription betreffen. Während der Transkription können sich Terminatorstrukturen ausbilden und so zur vorzeitigen Beendigung der Transkription führen. Im Zuge eines als Attenuation bezeichneten Vorgangs kann dabei auch die Translation Auswirkungen auf die Bildung eines solchen Terminators haben.

Während *cis-acting* sRNAs generell mit der mRNA ihres Genlocus interagieren, können *trans-acting* sRNAs unabhängig davon wirken. Zumeist wirken jedoch auch sie auf mRNAs und inhibieren Genexpression. In Eukaryoten nennt man solche RNAs auch siRNAs, für *small interfering* RNAs und bezeichnet das Stilllegen von Genen als *gene silencing*. In vielen

Fällen führen ncRNAs aber auch zu Aktivierungen von Genen. So bindet zum Beispiel die sRNA DsrA an die 5'-UTR der *rpoS* mRNA (Gen für den stationäre Phase Sigma Faktor RpoS, Sigma³⁸) und erhöht deren Lebensdauer sowie die Translationsrate (Lease and Belfort 2001). Es existieren unter den *trans-acting* RNAs jedoch auch Vertreter die mit Proteinen interagieren.

So ist zum Beispiel die 4,5S RNA als Bestandteil des SRP (*signal recognition particle*) an der Proteinsekretion beteiligt (Luirink, High *et al.* 1992). Die 369 NT grosse CsrB RNA weist mehrere Bindestellen für das Protein CsrA (ein Regulator im C-Stoffwechsel) auf, bindet dies mit hoher Affinität. und inhibiert CsrA dadurch (Liu, Gui *et al.* 1997).

Eine relativ neu entdeckte Funktion von ncRNAs liegt in einer Art Immunabwehr gegenüber fremden Nukleinsäuren wie z.B. Phagen, Transposons oder Plasmiden. Bei diesem CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) genannten System werden nach einer überstandenen Invasion durch Fremd-DNA Sequenzabschnitte der eingedrungenen DNA ins Genom übernommen (Bolotin, Quinquis *et al.* 2005). Nach einer, noch nicht detailliert geklärten, Induktion des CRISPR Systems werden diese kurzen RNA-Sequenzen exprimiert und führen, ähnlich eukaryotischer miRNAs, zu einer Stilllegung oder Degradation von fremd-DNA (Marraffini and Sontheimer 2009; Mojica, Diez-Villasenor *et al.* 2009). Bei der Induktion des CRISPR-Systems spielen ein abweichender AT-Gehalt der DNA und H-NS-abhängiges *Silencing* eine Rolle (Pul, Wurm *et al.* 2010). Für die Erkennung der fremd-DNA reichen kurze Sequenz-Komplementaritäten von 8-12 NT (Mojica, Diez-Villasenor *et al.* 2009). Allen regulatorisch wirkenden sRNAs gemein ist die Tatsache, dass sie post-transkriptionell wirken und zumeist die Translation beeinflussen (Majdalani, Cuning *et al.* 1998; Arluison, Hohng *et al.* 2007). Die bislang einzige bekannte Ausnahme bei Bakterien stellt die 6S RNA dar. Indem sie mit der RNA Polymerase interagiert liegt ihre Wirkung direkt auf Transkriptionsebene. Als zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit wird ihr ein eigenes Kapitel gewidmet (siehe 1.7). Viele Interaktionen von ncRNAs werden durch das Protein Hfq vermittelt, als Bestandteil der vorliegenden Arbeit wird Hfq daher im folgenden Kapitel behandelt.

1.6 Hfq - ein Reaktionspartner vieler ncRNAs

Ursprünglich entdeckt wurde Hfq (*host factor required for phage Q β RNA replication*) in *Escherichia. coli* als essentieller Faktor bei der Replikation des Bakteriophagen Q β (Franze

de Fernandez, Eoyang *et al.* 1968). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass Hfq über eine Interaktion mit dem ribosomalen Protein S1 an Ribosomen assoziiert ist (Miranda, Schuppli *et al.* 1997). Aufgrund einer Sequenzhomologie zu eukaryotischen Sm-Proteinen wird Hfq auch als *Sm-Like* Protein (Lsm) bezeichnet. Sm-Proteine formen heptamere Ringstrukturen und sind in Eukaryoten Bestandteil des Splicosomes. Sie sind daher am RNA-Splicing und RNA-Prozessierungen beteiligt (Hermann, Fabrizio *et al.* 1995; Seraphin 1995; Will and Luhrmann 2001). Phylogenetische-Vergleiche haben gezeigt, dass in mehr als der Hälfte aller Bakterien Hfq Homologe existieren, während bei Archaeen bislang nur für *Methanococcus jannaschii* ein Hfq-Vertreter identifiziert werden konnte (Sun, Zhulin *et al.* 2002; Valentin-Hansen, Eriksen *et al.* 2004). Proteine der Hfq Familie sind thermostabil, aus 70-110 Aminosäuren bestehend und formen Homohexamere. In *E. coli* besteht Hfq aus 102 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 11,2 kDa und ist mit 50-60000 Molekülen pro Zelle (~10000 Hexamere) hoch exprimiert (Kajitani and Ishihama 1991; Kajitani, Kato *et al.* 1994; Vassilieva Iu and Garber 2002). Erst 1996 wurden erste funktionelle Aspekte über Hfq in der Genregulation in *E. coli* bekannt. Muffler *et al.* stellten fest, dass Hfq essentiell für die Translation der *rpoS* mRNA dem Gen für den stationäre Phase Sigma-Faktor $\sigma^{s/38}$ ist (Muffler, Fischer *et al.* 1996).

Eine direkte Hfq-RNA Interaktion wurde erstmals Ende der 90er Jahre beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Hfq die 5'-UTR von *ompA*, einem Membranprotein bindet und dadurch die Stabilität der mRNA reduziert. Durch die Bindung von Hfq wird eine Interaktion der 30S Ribosomenuntereinheit und gleichzeitig die Translation der mRNA verhindert, was mit einem Verlust des Schutzes vor RNaseE-Abbau einhergeht (Vytvytska, Jakobsen *et al.* 1998; Vytvytska, Moll *et al.* 2000). Auch der beschriebene Effekt für die Translation der *rpoS* mRNA ist auf eine Interaktion mit der 5'-UTR zurück zu führen. In diesem Fall ist Hfq der Vermittler für die Interaktion der ncRNA DsrA mit der *rpoS* mRNA. Hfq ist dabei in der Lage beide RNAs simultan zu binden und eine Hybridisierung von DsrA mit der *rpoS* mRNA zu erleichtern, dadurch wird die RBS zugänglich und die Translation kann erfolgen (siehe auch Kapitel 1.5) (Sledjeski, Whitman *et al.* 2001; Mikulecky, Kaw *et al.* 2004; Papenfort, Bouvier *et al.* 2010). Dieser Aktivierung wirkt die OxyS RNA entgegen. OxyS bindet an Hfq und verhindert die Interaktion von Hfq mit DsrA (Zhang, Altuvia *et al.* 1998; Zhang, Wassarman *et al.* 2002). Es wirken also zwei ncRNAs antagonistisch auf ein Zielgen. Aufgrund der Fähigkeit von Hfq Strukturveränderungen in RNAs herbei zu führen wird es auch als RNA Chaperon bezeichnet. Darüber hinaus ist für Hfq eine Interaktion mit der Poly (A) Polymerase I (PAP I) bei der Poly-Adenylierung von mRNAs gezeigt. In Abwesenheit

von Hfq traten vermehrt kürzere Poly (A)-Enden auf (Hajnsdorf and Regnier 2000; Le Derout, Folichon *et al.* 2003). Diese Poly (A)-Enden sind Erkennungssequenzen für exonukleolytischen Abbau durch RNaseE und Hfq erhöht durch Bindung an diese Sequenzen ebenfalls die Lebensdauer der RNA (Folichon, Arluison *et al.* 2003).

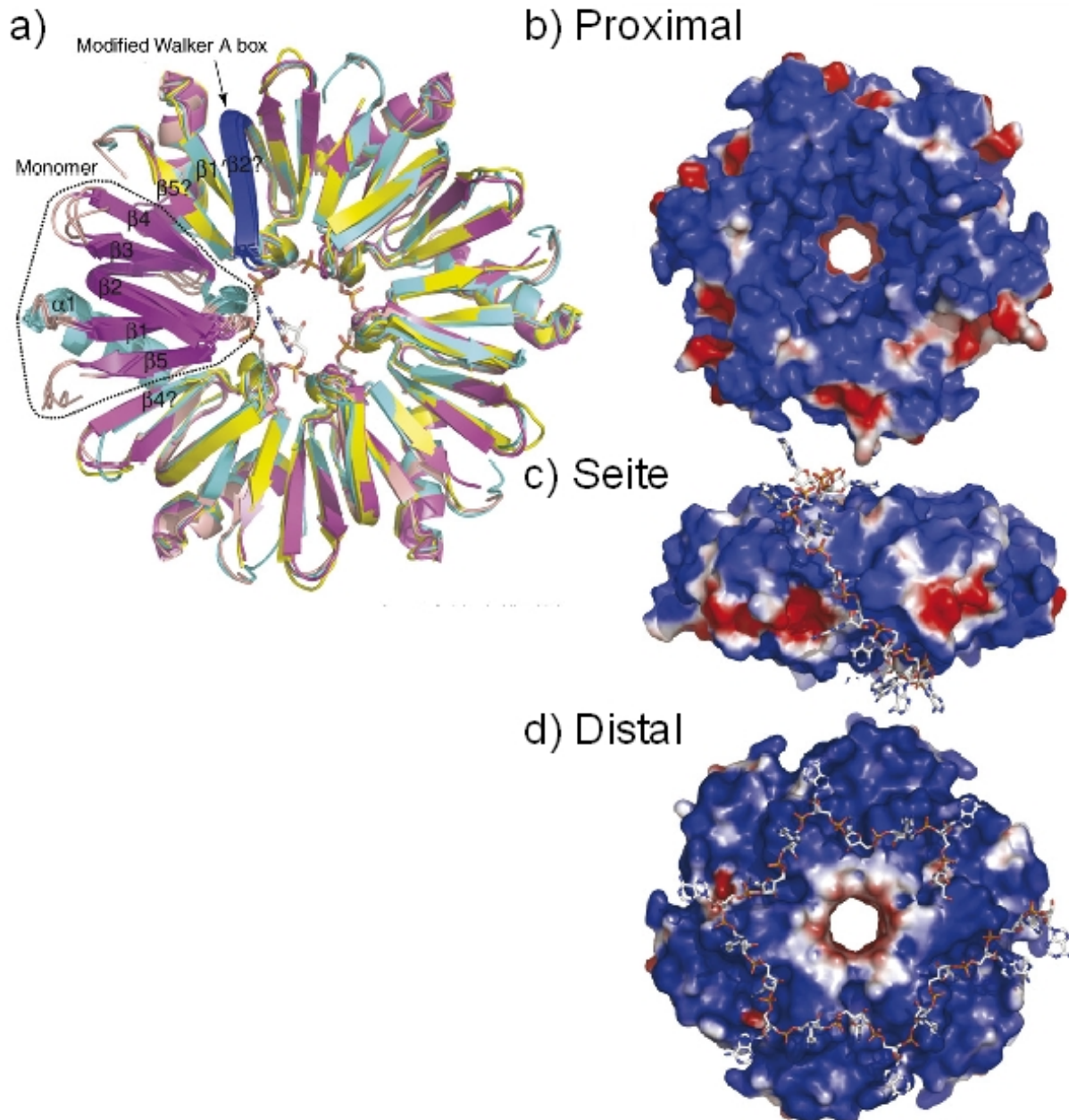


Abbildung 1.9 Struktur und potentielle Oberflächenladung von Hfq

Abbildung a zeigt eine Überlagerung von 4 verschiedenen Hfq-Strukturen. *P. aeruginosa*: cyan, *E. coli*: Lachsfarben *S. aureus* mit gebundener RNA: gelb, *S. aureus* ohne gebundene RNA magenta. Der Blick ist in die Proximal Höhlung, mit einer Gebundenen RNA (AU_5G). In gestrichelter Linie ist ein Monomer des Heamers markiert, einzelne Domänen sind angegeben. b) bis d) zeigt die potentielle elektrostatische Ladung der Oberflächen von Hfq aus *E. coli* der proximalen, seitlichen und distalen Ansicht. In blau elektropositiv und in rot elektronegativ dargestellt. Die seitliche Ansicht zeigt einen möglichen Bindekanal eines A_{27} -mers an die proximale und distale Seite, während die distale Ansicht eine mögliche Bindepotion für ein A_{18} -mer an die distale Oberfläche zeigt (verändert nach (Brennan and Link 2007))

Auch eine Bindung von Hfq an 5'-gelegene RNaseE Erkennungssequenzen, resultierend in erhöhtem Schutz vor Abbau bei der *ompA* mRNA und DrsA ist bereits beobachtet (Moll, Afonyushkin *et al.* 2003).

Die Bindung von Hfq erfolgt bevorzugt an einzelsträngige A/U-reiche Regionen, die in Nachbarschaft zu Stammregionen liegen (Brescia, Mikulecky *et al.* 2003; Sun and Wartell 2006). Inzwischen ist für eine Vielzahl von ncRNAs eine Interaktion mit Hfq bekannt und Hfq ist für viele ncRNAs ein essentieller Mediator der Funktion. Die Wirkung von Hfq erstreckt sich dabei von Strukturumwandlung der RNAs, über RNA-RNA Interaktionen auch auf die Stabilität von ncRNAs und mRNAs, dabei sowohl fördernd als auch reduzierend. Und auch für die 6S RNA aus *E. coli* wurde unlängst eine Bindung an Hfq gezeigt (Windbichler, von Pelchrzim *et al.* 2008). In Abbildung 1.9 ist schematisch eine Strukturüberlagerung von Hfq mehrerer Spezies und eine Verteilung der Oberflächenladung für das *E. coli* Hfq gezeigt. In a) ist deutlich zu erkennen, dass Hfq aus verschiedenen Spezies sehr homologe Strukturen aufweisen und sich diese Struktur durch Bindung eines kleinen RNA-Aptamers (AU₅G) nicht wesentlich ändert. In b) bis d) sind die Oberflächenladungen und zwei mögliche Bindestellen für RNAs an das Hfq aus *E. coli* gezeigt. Es wird deutlich, dass einzelsträngige RNA-Moleküle in der Lage sind die Pore (ca. 8-12 Å) zu durchdringen und dadurch sowohl proximal, als auch distal zu binden und/oder in einer eher ringförmigen Anordnung nur distal zu binden. Durch die zwei Bindepositionen ist eine Interaktion von verschiedenen gebundenen RNA-Molekülen möglich.

1.7 6S RNA aus *E. coli*

Die 184 Nukleotide lange 6S RNA aus *E. coli* wurde bereits 1967 entdeckt und war eine der ersten RNAs die sequenziert wurde (Hindley 1967; Brownlee 1971). Zwar wurden früh Hinweise darauf gefunden, dass sie Bestandteil eines Ribonukleoprotein-Partikels ist. Durch das Fehlen eines Phänotyps blieb Ihre Funktion dennoch lange unklar (Lee, Bailey *et al.* 1978; Hsu, Zagorski *et al.* 1985; Lee, Fournier *et al.* 1985). Erst mehr als 30 Jahre nach ihrer Entdeckung wurde nachgewiesen, dass 6S RNA die σ^{70} -assoziierte RNA Polymerase bindet und dadurch deren Funktion beeinflusst (Wassarman and Storz 2000).

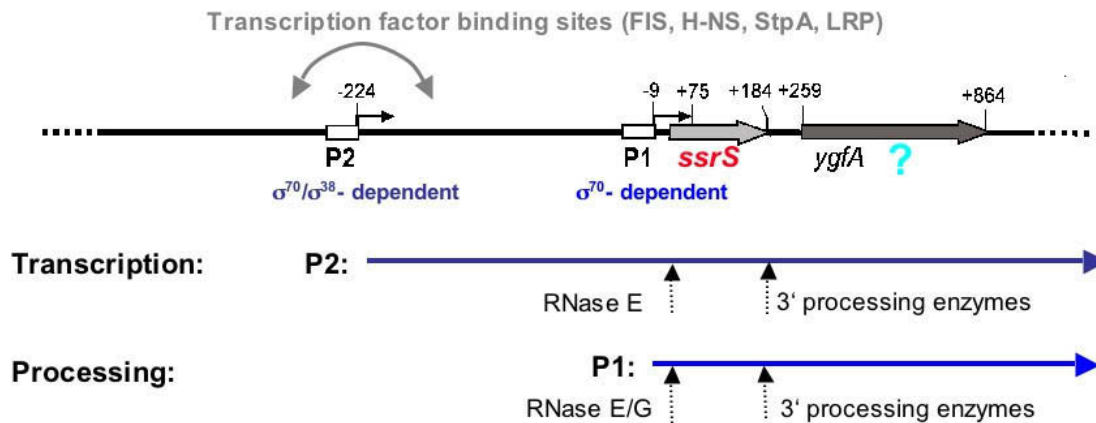


Abbildung 1.10 Schematische Darstellung der *ssrS*-Promotorregion.

Oben: Gezeigt ist Lage der Promotoren P1 und P2 innerhalb der Transkriptionseinheit, ihre σ -Abhängigkeit, sowie die relative Lage der codierenden Region zu den Promotoren. Ausserdem der putative ORF für das unbekannte Gen *ygfA*. Unten: Sind die Vorläufertranskripte der beiden Promotoren, die Prozessierungsstellen und beteiligten Enzyme (soweit bekannt) gezeigt (Wagner 2007).

Kodiert wird die 6S RNA in einem dicistronischen Leserahmen durch das Gen *ssrS* (*small stable RNA*) (Hsu, Zagorski *et al.* 1985). Abbildung 1.10 zeigt schematisch das *ssrS*-*ygfA* Operon. Dem Operon vorgeschaltet sind zwei Promotoren P1/P2, von denen der proximale P1 obligat σ^{70} -abhängig ist und der P2 sowohl von σ^{70} , als auch von σ^{38} erkannt wird. Die Promotorregion beinhaltet diverse Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die Inhibition der *ssrS* Transkription durch die NAPs H-NS, StpA und LRP wurde bereits gezeigt (Neußer, Gildehaus *et al.* 2008). Eine Regulation der *ssrS* Transkription durch das Effektormolekül ppGpp im Rahmen der Stringenten Kontrolle scheint dagegen ausgeschlossen (Neußer, Gildehaus *et al.* 2008). Der lange P2 dirigierte Precursor wird am 5'-Ende durch RNaseE und der kurze P1-abhängige durch RNaseE und RNaseG prozessiert. Über die 3'-Prozessierung ist bislang nichts näheres bekannt (Kim and Lee 2004). Bereits in der logarithmischen Wachstumsphase existieren in der Zelle ca. 1000 6S RNA Moleküle. Bedingt durch eine relativ hohe Stabilität und konstitutiver Expression akkumuliert die 6S RNA in der stationären Phase auf das Fünf- bis Zehnfache (Lee, Bailey *et al.* 1978). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich *downstream* der 6S RNA mehrere Bindestellen für den Transkriptions-Terminationsfaktor Rho befinden und die 3'-Prozessierung vermutlich exonukleolytisch erfolgt. Die Rho-abhängige Termination beeinflusst vermutlich auch die Expression des downstream gelegenen Gens *ygfA* (Chae, Han *et al.*). Über die Funktion von *ygfA* ist bislang wenig bekannt. Neuere Arbeiten weisen auf eine Funktion als Cycloligase hin. Die Funktion liegt in einem Abbau von 5-Formyltetrahydrofolat, das Inhibierung auf andere Enzyme des Folatstoffwechsels wirkt. (Jeanguenin, Lara-Nunez *et al.* 2010). Des weiteren existieren

Hinweise auf eine Beteiligung von *ygfA* bei der Entstehung von Biofilmen und Bildung von Multi-Antibiotika resistente Zellen, sogenannten Persister Zellen (Hansen, Lewis *et al.* 2008).

1.7.1 Struktur und Funktion der 6S RNA aus *E. coli*

Charakteristisch für 6S RNA ist eine ausgeprägte Sekundärstruktur, die einem offenen DNA Promotor ähnelt. Durch *in silico* Sequenz- und Strukturvergleiche wurden bisher über 100 6S RNA Homologe in diversen γ -Proteobakterien entdeckt. Auch in anderen Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis*, dem Humanpathogen *Helicobacter pylori* und diversen Cyanobakterien sind bereits 6S RNA Vertreter identifiziert worden (Barrick, Sudarsan *et al.* 2005; Willkomm, Minnerup *et al.* 2005; Axmann, Holtzendorff *et al.* 2007; Sharma, Hoffmann *et al.* 2010). Abbildung 1.11 zeigt die Sekundärstruktur der 6S RNA aus *E. coli*.

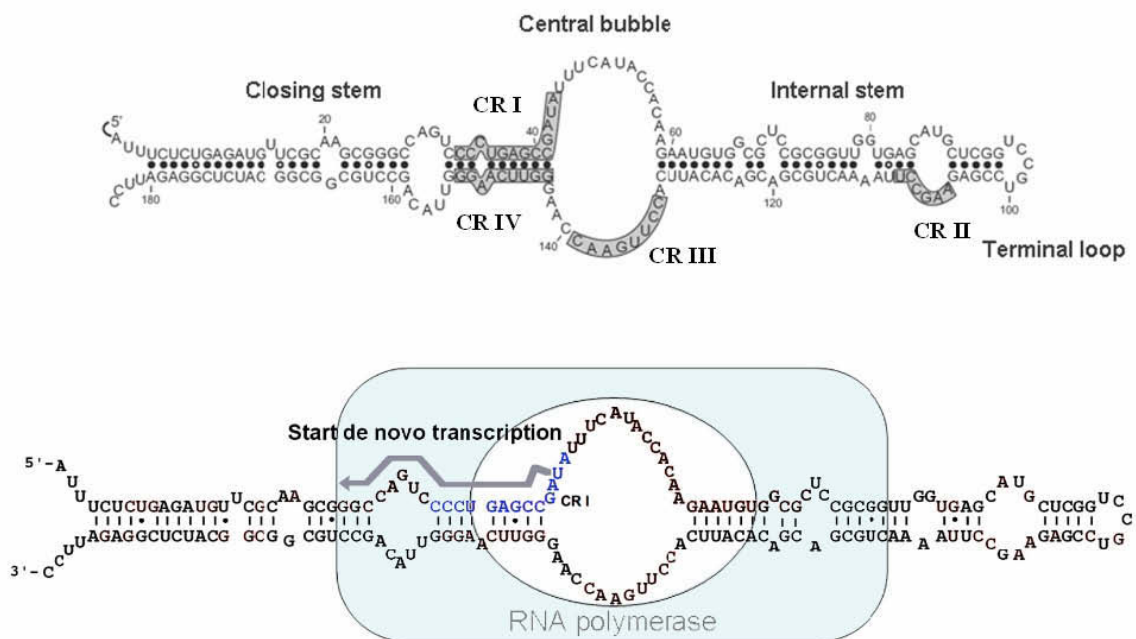


Abbildung 1.11 Sekundärstruktur der 6S RNA aus *E. coli*

Der obere Teil zeigt die konservierte Sekundärstruktur der 6S RNA, ermittelt durch *in silico* Strukturvergleiche (Brown and Ellis 2005). Dabei sind die hochkonservierten Sequenzen (CR I-CR IV) grau hinterlegt. Der *closing stem*, der *internal stem*, die zentrale Blase sowie der terminale *loop* sind eingezeichnet. Im unteren Teil ist das Promotormimikry-Modell schematisch dargestellt. Dabei liegt die 6S RNA im aktiven Zentrum der RNA-Polymerase. Mit einem grauen Pfeil ist der Bereich markiert der als *Template* für die *de novo* Synthese dient (Neußer 2008).

Hauptsächlich ist die Sekundärstruktur der 6S RNA konserviert, es existieren jedoch auch auf Sequenzebene konservierte Elemente (CR I bis CR IV). Diese betreffen im wesentlichen Teile der zentralen Blase und einen Teil des *Closing Stem* in direkter Nachbarschaft. Aufgrund dieser Struktur ist 6S RNA in der Lage an die RNA Polymerase zu binden und dadurch die Transkription zu inhibieren (Barrick, Sudarsan *et al.* 2005; Trotochaud and Wassarman 2005). Diese Bindung geschieht bevorzugt mit der σ^{70} -assoziierten RNAP, resultierend in einer Inhibierung der σ^{70} -abhängigen Transkription. Als besonders sensitiv werden sogenannte extended -10 Promotoren beschrieben. Diese haben schwächere -35-Erkennungsregionen und dadurch geringere Affinitäten zur RNAP. Die Bindung der 6S RNA an die RNAP erfolgt über Sigma⁷⁰, dabei sind die betroffenen Bindedomänen überlappend mit denen die eine Promotorbindung eingehen, aber sie weisen auch distinkte Unterschiede auf (Cavanagh, Klocko *et al.* 2008; Klocko and Wassarman 2009). Aufgrund der Akkumulation der 6S RNA in der stationären Phase und bevorzugten Bindung an das $E\sigma^{70}$ Holoenzym wird der 6S RNA eine wichtige Rolle beim Umschalten der Transkription beim Eintritt in die stationäre Phase zugeschrieben. Damit einhergehend soll es zu einer indirekten Aktivierung der σ^{38} -abhängigen Transkription kommen (Wassarman and Storz 2000; Trotochaud and Wassarman 2004). Jedoch finden sich viele Hinweise, dass die Funktion der 6S RNA weit über ein simples Umschalten der Transkription hinaus gehen. So ist, wenn auch schwächer, eine Interaktion mit der σ^{38} -assoziierte RNAP bereits gezeigt und sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* wurden auch σ^{38} -abhängige Promotoren als 6S RNA sensitiv identifiziert (Geißen 2007) (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). Genomweite Transkriptomanalysen haben darüber hinaus gezeigt, dass es in der logarithmischen und stationären Wachstumsphase durch 6S RNA zu Inhibierungen sämtlicher Promotorklassen kommt. Des weiteren wurden für viele Gene sogar erniedrigte mRNA Level beobachtet, wenn 6S RNA fehlte. Darunter waren in der stationären Phase auffällig viele Gene zu finden, die für die Synthese von Ribosomen und Translationskomponenten wichtig sind (Neußer 2008; Neußer, Polen *et al.* 2010). Dennoch ist für 6S RNA lange kein ausgeprägter Phänotyp bekannt gewesen. Lediglich eine minimal verbesserte Fitness in langzeitstationärem Wachstum und leichte Wachstumsnachteile bei hohem pH-Wert wurden beobachtet (Trotochaud and Wassarman 2004; Trotochaud and Wassarman 2006). Aufgrund der beschriebenen Promotormimikry (Abbildung 1.11) kann die 6S RNA selbst, in einer sehr ungewöhnlichen Reaktion, als *Template* für eine *de novo* Synthese von RNA (dnRNA) dienen (Wassarman and Saecker 2006; Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). Diese dnRNA, manchmal auch als pRNA (*product* RNA) bezeichnet, wird *in vitro*

unter erhöhten NTP-Konzentrationen, in Abwesenheit jeglicher DNA synthetisiert (Wassarman and Saecker 2006; Gildehaus, Neusser *et al.* 2007).

Als Resultat dieser Synthese zerfallen die 6S RNA~RNAP Komplexe. Auch *in vivo* lässt sich durch einen *nutritional upshift* die dnRNA-Synthese in der stationären Phase Synthese induzieren. Als Folge wird die 6S RNA zunächst abgebaut und akkumuliert erst wieder von neuem über den Zellzyklus (Wurm, Neußer *et al.* 2010). Man vermutet darin einen Mechanismus der Zelle bei verbesserten Wachstumsbedingungen die Transkriptionsinhibierung durch 6S RNA zu überwinden, um die Ressourcen optimal zu nutzen. In Abbildung 1.12 ist schematisch die Rolle der 6S RNA in einem Wachstumsphasenzyklus gezeigt.

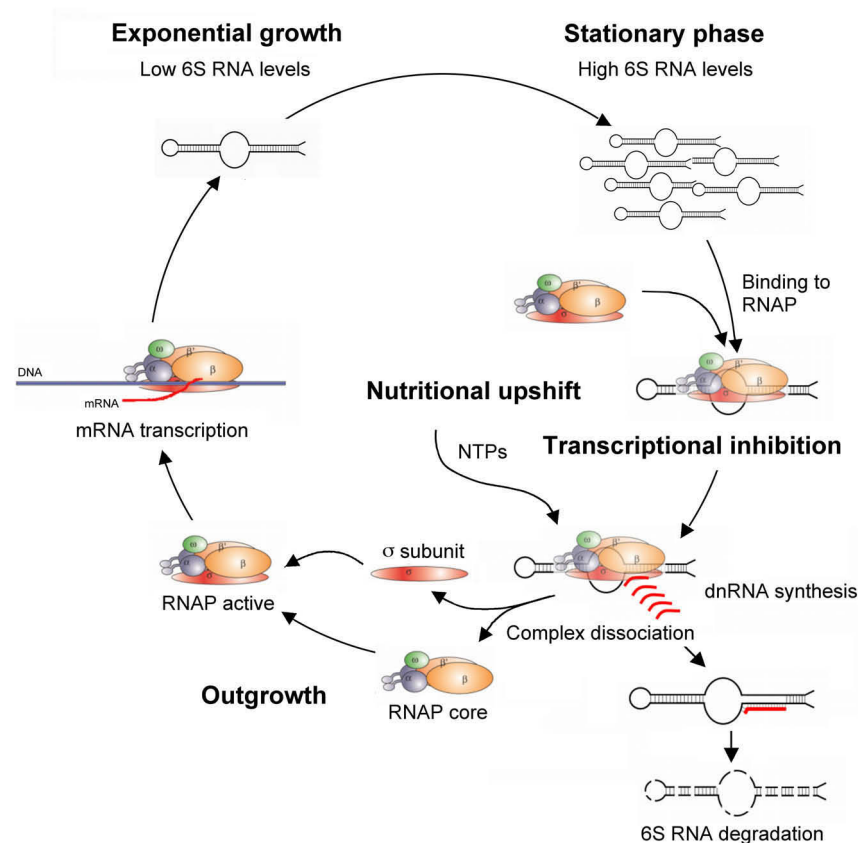


Abbildung 1.12 Schema der Beteiligung der 6S RNA an der Wachstumsphasen-abhängigen Transkriptionsregulation und eines *outgrowth* aus der stationären Wachstumsphase.

1.7.2 6S RNA in anderen Bakterien

Aus phylogenetischen Vergleichen ist bekannt, dass 6S RNAs in Enterobakterien weit verbreitet sind. Oft ist das kodierende Gen *ssrS* dabei gekoppelt an Homologe des, bei *ssrS* in *E. coli* co-transkribierten, Gens *ygfA* (Barrick, Sudarsan *et al.* 2005). Auch funktionell zeigen sich für die 6S RNAs dort Parallelen. So besitzt zum Beispiel *Bacillus subtilis* sogar zwei Gene (*bsrA/bsrB*) für 6S RNAs, die beide *in vivo* exprimiert werden. Auch dort ist eine Interaktion der 6S RNA mit der *Housekeeping*-RNAP gezeigt und für BsrA ist darüber hinaus ebenfalls eine Synthese von dnRNAs *in vivo* nachgewiesen (Barrick, Sudarsan *et al.* 2005; Beckmann, Grunweller *et al.* 2010; Irnov, Sharma *et al.* 2010). In jüngster Zeit sind auch 6S RNA Vertreter in Bakterienspezies entdeckt worden, die in der Gruppe der γ -Proteobakterien nur entfernt mit *E. coli* verwandt sind. Dabei handelt es sich um die, auch als Blaualgen bekannten, Cyanobakterien.

Bei Cyanobakterien handelt es sich um Photosynthese betreibende gram-negative Bakterien die Gewässer bevölkern. Zwar identifizierte man schon 1997 in *Synechococcus* PCC6301 und *Synechocystis* PCC6803 eine ncRNA, die als 6Sa RNA bezeichnet wurde. Es wurde jedoch erst 2005 durch Strukturvergleiche deutlich, dass es sich dabei um ein Homolog zur 6S RNA aus *E. coli* handelt. Zeitgleich wurden in diversen anderen Cyanobakterien 6S RNA Vertreter entdeckt (Axmann, Kensche *et al.* 2005; Barrick, Sudarsan *et al.* 2005). Aussergewöhnlich bei Cyanobakterien ist das Vorkommen einer sogenannten *circadian clock*. Diese ist in einem Tag-Nachtrhythmus massgeblich an der Genregulation beteiligt (Nair, Ditty *et al.* 2002; Ditty, Williams *et al.* 2003). Auch eine Korrelation der 6S RNA-Expression zu diesem Tag-Nachtrhythmus konnte bereits in dem Stamm *Prochlorococcus* *Med4* beobachtet werden (Axmann, Holtzendorff *et al.* 2007).

Abseits der Bakterien existieren auch bei Eukaryoten ncRNAs mit ähnlicher Funktion wie die 6S RNA aus *E. coli*. Zum Beispiel die humane Alu RNA. Diese bindet spezifisch die RNA Polymerase II und inhibiert dadurch die Transkription (Mariner, Walters *et al.* 2008). Eine homologe Funktion weist ebenfalls die B2 RNA aus der Maus auf, die die RNAP II bindet und zusammen mit dem Promotor und der RNAP II einen prä-Initiationskomplex bildet. Dadurch interferiert die B2 RNA mit der Transkriptionsinitiation. Nach Ablösen der B2 RNA aus diesem prä-Initiationskomplex kann die Transkription erfolgen (Allen, Von Kaenel *et al.* 2004; Espinoza, Allen *et al.* 2004; Yakovchuk, Goodrich *et al.* 2009).

1.8 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren Untersuchungen zur vorhergesagten Promotorspezifität der 6S RNA aus *E. coli*. Zum einen handelte es sich dabei um *in vivo* Einzelpromotoranalysen und die Effekte der 6S RNA auf deren Aktivität (Geißen 2007), zum anderen um eine genomweite Transkriptomanalyse der 6S RNA-abhängigen Effekte auf die Transkription *in vivo*. In beiden Analysen konnte sich jedoch keine strikte Promotorspezifität für die Wirkung der 6S RNA auf die Transkription feststellen lassen, sämtliche Promotorklassen wurden als beeinflusst durch 6S RNA beobachtet. So sollte *in vitro* eine mögliche Konkurrenz der 6S RNA mit verschiedenen Promotoren um die Bindung an die RNAP untersucht werden. Vorgesehen waren *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart von 6S RNA mit einem Multipromotor-*Template*, bei dem für alle Promotoren identische Reaktionsbedingungen herrschen. In den Transkriptomanalysen zeigte sich eine Anhäufung von Genen des Purinstoffwechsels, die sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Wachstumsphase durch 6S RNA reprimiert waren. Darüber hinaus war in der stationären Phase eine überraschende Reduktion der mRNA-Spiegel für viele Gene des Translationsapparates, in Abwesenheit der 6S RNA, zu beobachten. Dabei waren nahezu alle Operons für Gene der ribosomalen Proteine und auch einige Translationfaktoren betroffen. Es sollte untersucht werden, ob dies auf einen direkten 6S RNA-abhängigen Effekt auf Promotorebene zurückzuführen war. Weiterhin war vorgesehen zu überprüfen, ob möglicherweise ein Wachstumsregulator durch das Fehlen der 6S RNA betroffen und dadurch indirekt die Synthese ribosomaler Gene beeinflusst war. Weiterhin sollte, aufgrund der offensichtlich komplexeren Funktion der 6S RNA und der neu identifizierten Bindung von 6S RNA an das RNA-Chaperon Hfq eine mögliche funktionelle Interaktion von Hfq und 6S RNA mittels Binde- und Funktionsstudien *in vitro* untersucht werden. Zusätzlich sollte ein möglicher Effekt von Hfq auf die 6S RNA oder die 6S RNA-kodierte dnRNA *in vivo* überprüft werden. Im letzten Teil war vorgesehen der Frage nachzugehen, ob sich grundlegende mechanistische Funktionen der 6S RNA aus *E. coli* auf 6S RNAs aus weiter entfernt verwandten Bakterien, in diesem Fall Cyanobakterien, übertragen lassen. Es sollten Struktur- und Bindeanalysen, sowie Funktionsstudien mit 6S RNAs aus vier entfernt verwandten Cyanobakterien im heterologen System mit der RNA Polymerase aus *E. coli* durchgeführt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Promotorspezifität und Einbindung der 6S RNA in regulatorische Netzwerke

In einer Vorarbeit, in der verschiedene Promotortypen auf ihre 6S RNA abhängigen Effekte *in vivo* untersucht wurden, ließ sich keine strikte σ^{70} Promotorspezifität für die 6S RNA abhängige Regulation erkennen (Geißen 2007; Neußer, Polen *et al.* 2010). In der betreffenden Arbeit wurden σ^{70} abhängige Promotoren (*rrnP1/gapAP1*), σ^{38} abhängige Promotoren (*bolA/fic/osmY*) und auch σ^{32} gesteuerte Promotoren (*rpoDP3/dnaK*) untersucht. Es zeigte sich, dass die beiden σ^{70} Promotoren *in vivo* eher schwach (*gapAP1*) oder gar nicht durch 6S RNA reprimiert waren. Für die ribosomalen P1 Promotoren zeigte sich im Gegenteil sogar eine leichte Inhibierung, wenn 6S RNA fehlt. Von den untersuchten σ^{38} abhängigen Promotoren wiesen dagegen zwei (*bolA/osmY*) starke Inhibierung in Gegenwart von 6S RNA auf. Für den *osmY* Promotor war dieser Effekt besonders stark, es wurde eine Derepression bei fehlender 6S RNA um den Faktor 5-10 festgestellt. Der *fic* Promotor war dagegen nicht 6S RNA sensitiv. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die untersuchten Hitzeschock (σ^{32}) Promotoren. Während für den *dnaK* Promotor keine Wirkung durch 6S RNA zu beobachten war, konnten für den *rpoDP3* in Anwesenheit von 6S RNA überhaupt keine Produkte detektiert werden. Dazu muss jedoch bemerkt werden, dass dieser Promotor zwar als Hitzeschock abhängig klassifiziert ist, seine Konsensussequenzen jedoch deutlich besser zu einem σ^{70} abhängigen Promotor passen. Die stärksten Effekte waren eher für solche Promotoren zu beobachten, die *in vivo* vergleichsweise schwach transkribiert werden. Daraus folgte die Idee, dass 6S RNA mit den Promotoren um die Bindung an die RNAP konkurriert und bei dieser Kompetition schwache Promotoren stärker inhibiert werden.

2.1.1 Promotorspezifität der 6S RNA *in vitro*

Um über eine Inhibierung durch 6S RNA in Abhängigkeit von der Promotorstärke Aussagen treffen zu können wurden *in vitro* Transkriptionen (IVT) mit superspiralisierten *Templates* durchgeführt (5.2.7.7). Für die Promotoren *rrnBP1* und *bolA* konnte bereits gezeigt werden, dass beide Promotoren *in vitro* inhibiert werden (Gildehaus 2005). Dabei wurden jedoch isolierte *Templates* verwendet, die jeweils nur den *rrnBP1* oder *bolA* Promotor enthalten.

Zwar zeigte sich auch dort bereits, dass die Inhibierung für den *bolA* Promotor stärker ausfällt als für den *rrnBP1*, jedoch spielen auch Qualität und Superhelikalität des *Templates* eine Rolle für die *in vitro* Transkription und lassen eine Vergleichbarkeit nur bedingt zu. Um die Effekte auf unterschiedliche Promotoren besser miteinander Vergleichen zu können wurde daher ein Multipromotorvektor (pSH666-2) verwendet. Bei diesem befinden sich mehrere Promotoren auf dem selben *Template*, so dass Faktoren wie z.B. Salzgehalt und Superhelikalität für alle Promotoren identisch sind. Durch die simultane Zugabe von 6S RNA und *Template* zum Reaktionsansatz konnten die verschiedenen Promotoren zeitgleich mit der 6S RNA um die Bindung an die RNAP und Bildung der Initiationskomplexe konkurrieren. Auf dem verwendeten Vektor befinden sich insgesamt fünf Promotoren, mit jeweils eigenen Terminatoren, so dass Transkripte spezifischer Länge detektierbar sind. Als Promotor mit perfekter σ^{70} Konsensussequenz befindet sich der *tac* Promotor auf dem Vektor. Dies ist ein synthetischer Promotor mit der -35-Region des *trp* und der -10-Region des *lac* Promotors. Zwei weitere σ^{70} abhängige Promotoren sind der *rrnBP1* und der *hisL*, der darüber hinaus zur Klasse der positiv stringent regulierten Promotoren gehört. Als σ^{38} -abhängiger Vertreter befindet sich der *bolA* Promotor auf dem Vektor. Aufgrund einer möglichen Kreuzerkennung kann das σ^{70} Holoenzym, wenn auch mit geringerer Effizienz, ebenfalls von σ^{38} -abhängigen Promotoren transkribieren (1.3.4). Als fünftes befindet sich noch der Promotor für die RNAI auf dem Vektor, diese ist plasmidkodiert und an der Plasmidreplikation *in vivo* beteiligt.

Abbildung 2.1 a) zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen IVT, die Visualisierung erfolgte durch radioaktive Transkriptmarkierung (Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP) und Autoradiographie. Um auch den relativ schwachen *bolA* Promotor zu visualisieren, wurde für die Darstellung eine relativ lange Expositionszeit gewählt. Aus diesem Grund sind die Banden für den *ptac* und den *rrnBP1* Promotor teilweise nicht einzeln zu erkennen. Für die quantitative Auswertung, die in b) gezeigt ist, wurden je nach Promotor und Bandenintensität variable Expositionszeiten gewählt. Auf der linken Seite in a) ist der Effekt von steigenden Mengen 6S RNA auf die Transkriptausbau zu sehen. Es ist zu erkennen, dass bei allen Promotoren mit zunehmender Menge 6S RNA die Bandenintensitäten abnehmen. Der Vergleich mit der tRNA Kontrolle zeigt klar, dass die beobachtete Inhibierung spezifisch für 6S RNA und nicht eine unspezifische Inhibierung durch hohe Konzentrationen an RNA ist. Allerdings scheint diese Abnahme nicht für alle Promotoren gleich stark zu sein. Während für den *ptac* und *hisL* Promotor auch bei höchster 6S RNA Konzentration noch deutlich Banden zu erkennen sind, lassen sich diese bei *rrnBP1* und RNAI nur noch erahnen und bei *bolA* sind

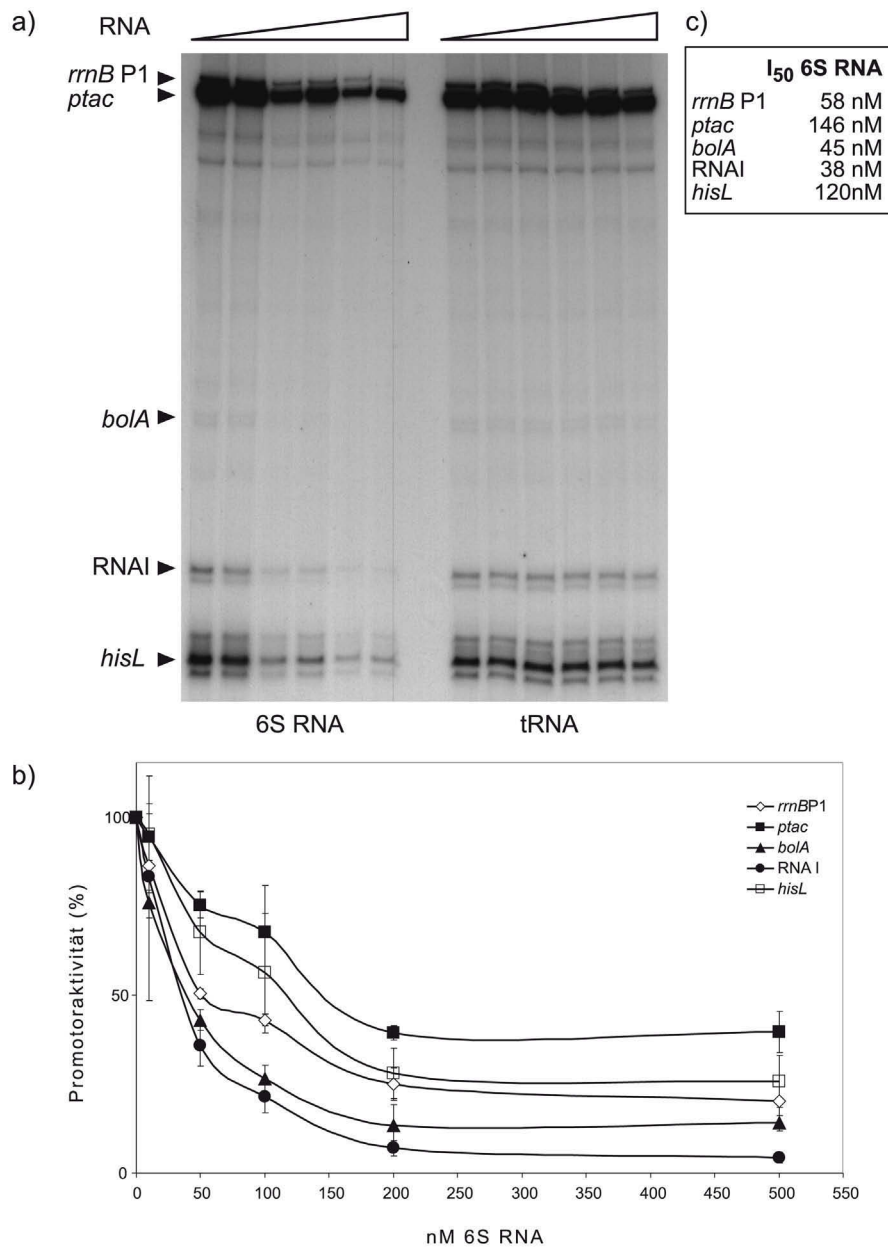


Abbildung 2.1 *In vitro* Transkription mit superhelikalem Multipromotortemplate

a) Die Transkription wurde durchgeführt mit 5 nM *Template* (pSH666-2) und 15 nM RNAP, RNA Konzentrationen betrugen 0/10/50/100/200/500 nM. Die spezifischen Transkriptionsprodukte sind seitlich mit Pfeilen markiert. **b)** Quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten, inklusive Standardabweichung. Die Normalisierung wurde für jeden Promotor auf die Aktivität bei 0 nM 6S RNA durchgeführt, diese wurde gleich 100% gesetzt. **c)** Als Indikator für die Stärke der Inhibierung ist für jeden Promotor die Konzentration 6S RNA angegeben, die zu einer Inhibierung um 50% führt.

ab 50 nM keine Transkripte mehr zu sehen. Bestätigt wird dies durch die in b) und c) gezeigte quantitative Auswertung. Für alle Promotoren ist oberhalb einer Konzentration von 250 nM kaum noch verstärkt Inhibierung zu sehen, es scheint als wäre ein Minimalwert erreicht, der

auch mit steigenden Mengen 6S RNA nicht mehr verringert werden kann. Dieser Minimalwert liegt jedoch für jeden Promotor bei einer anderen Restaktivität. Dies korreliert auch mit der Menge an 6S RNA, die für 50% Inhibierung benötigt wird ((2.1 c) I_{50} Wert). Während *ptac* und *hisL* auch bei hohen Mengen 6S RNA eine Minimalaktivität von ca. 30-40% behalten und erst bei 146/120 nM zu 50% inhibiert sind, reichen bei *bolA* und RNAI bereits Konzentrationen um 40 nM und die Minimalaktivität sinkt auf unter 20%. Der *rrnBP1* befindet sich sowohl bei der Minimalaktivität (ca. 20%) als auch bei dem I_{50} Wert (58 nM) im Mittelfeld. Dies zeigt klar, dass in einem *in vitro* System unter kompetitiven Bedingungen verschiedene Promotortypen inhibiert werden und keine Beschränkung auf σ^{70} -abhängige Promotoren zu erkennen ist, diese Inhibierung jedoch je nach Promotor unterschiedlich stark ausfällt. Dies und die Tatsache, dass der *rrnBP1* *in vitro* inhibiert, *in vivo* jedoch aktiviert wird (Geißen 2007), lässt den Schluss zu, dass die Rolle der 6S RNA *in vivo* sehr viel komplexer ist.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits damit begonnen die physiologische Bedeutung der 6S RNA in einer genomweiten Transkriptomanalyse (Microarray) zu untersuchen (Neußer 2008; Neußer, Polen *et al.* 2010). Basierend auf Beobachtungen in diesen Analysen wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführende *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Diese Werden in den nächsten Kapiteln ausführlich beschrieben.

2.1.2 Globale Rolle der 6S RNA in der Genregulation

Wie bereits im vorigen Kapitel erwähnt, wurde eine genomweite Transkriptomanalyse durchgeführt, um detailliertere Einblicke sowohl in die Promotorspezifität der 6S RNA als auch deren Einbindung in regulatorische Netzwerke zu erhalten (Neußer 2008; Neußer, Polen *et al.* 2010). Diese Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Tino Polen vom Institut für Biotechnologie II des Forschungszentrums Jülich. Es wurde Gesamt-RNA (5.2.2.2) aus einem 6S RNA defizienten *E. coli* Stamm (MM139) und dem korrespondierenden Wildtyp (MC4100BW) in der mittleren logarithmischen und der frühstationären Wachstumsphase isoliert. Mit dieser Gesamt-RNA wurden dann in einer Microarray Analyse (5.3.7) die relativen mRNA-Mengen sämtlicher, Protein kodierender Gene bestimmt. Als Ergebnis dieses Vergleichs zeigte sich unabhängig von der Wachstumsphase, dass es keine strikte Promotorspezifität für die Inhibierung durch 6S RNA gibt. Es wurden Promotoren sämtlicher Klassen als 6S RNA sensitiv identifiziert. Überraschenderweise wurden dabei neben

Inhibierungen durch 6S RNA auch reduzierte mRNA-Level festgestellt, wenn 6S RNA fehlte. Dies war ungewöhnlich, da für 6S RNA bislang nur Transkriptionseinhibition angenommen wurde. Besonders auffällig war dabei in der stationären Phase die Expression von Genen, die für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren kodieren. Nahezu alle Operons für ribosomale Proteine zeigten eine 1,5 bis 2-fach verringerte Expression in der *ssrS*-Mutante. Sowohl die fehlende Promotorspezifität als auch die Aktivierung durch 6S RNA stehen scheinbar im Widerspruch zu einer anderen Microarray Analyse, bei der nur σ^{70} -abhängige Promotoren, speziell extended -10 Promotoren, als inhibiert durch 6S RNA beschrieben wurden (Cavanagh, Klocko *et al.* 2008). Dazu muss jedoch bemerkt werden, dass in der betreffenden Arbeit RNA aus Zellkulturen verwendet wurde, die sich in der spätstationären Phase befanden (24h Wachstum) und sich darüber hinaus die Auswertung nur auf σ^{70} -abhängige Promotoren bezog.

2.1.3 Direkter Einfluss von 6S RNA auf die Expression des Translationsapparates *in vivo*

Bei der durchgeführten Transkriptomanalyse wurden Chips verwendet, die Oligonukleotide komplementär zur mRNA sämtlicher Protein kodierender Gene in *E. coli* aufweisen. Die Oligonukleotide für die Hybridisierung sind mehr oder weniger zufällig in den ORFs verteilt, es werden mRNA-Spiegel gemessen. Zum einen sind damit jedoch keinerlei Gene für ncRNAs erfasst und zum anderen werden RNAs nach der Transkription oft prozessiert und Leaderregionen nukleolytisch entfernt. Die gemessenen Unterschiede in einer Transkriptomanalyse können daher neben direkter Promotoraktivität des gemessenen Gens auch durch Lebensdauer, Prozessierung oder Durchlesen von *upstream* gelegenen Genen bestimmt sein. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Aktivierung der Gene des Translationsapparates durch 6S RNA ein direkter Effekt auf die Promotoraktivität ist, wurden Primer Extension Analysen mit Gesamt-RNA (5.2.2.2) durchgeführt. Bei der Primer Extension wird ein 5'-radioaktiv markiertes Oligonukleotid (5.2.7.5), mit spezifischer Sequenz für den jeweiligen Promotor, *downstream* des Transkriptionsstarts an die Ziel-RNA hybridisiert. Das 5'-markierte Oligonukleotid bindet dabei 3'-seitig unweit der Transkriptionsstartstelle der Ziel-RNA, so können auch Leaderregionen und Primärtranskripte detektiert werden. Man erhält daher genauere Informationen über die Promotoraktivität. Es wurden die identischen Stämme wie für die Transkriptomanalysen unter gleichen

Bedingungen angezogen. Die Zellernte erfolgte ebenfalls zu vergleichbaren Zeitpunkten. In Abbildung 2.2 sind exemplarisch die Wachstumskurven beider Stämme gezeigt. Es ist klar zu erkennen, dass beide Stämme identisches Wachstumsverhalten aufweisen. Dies stimmt überein mit bisherigen Beobachtungen, dass unter Standard-Laborbedingungen kein Phänotyp für 6S RNA zu beobachten ist (Lee, Fournier *et al.* 1985), somit waren Unterschiede in Transkriptmengen nicht auf Wachstumseffekte zurückzuführen. Die Markierungen A und B zeigen die Zeitpunkte der Zellernte für die Gesamt-RNA Isolation. Mit der RNA wurde dann stichprobenartig überprüft, ob die Beobachtungen in den Microarrays auf veränderte Promotoraktivitäten in Abhängigkeit von 6S RNA zurückzuführen waren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Vielzahl der Gene für ribosomale Proteine gelegt.

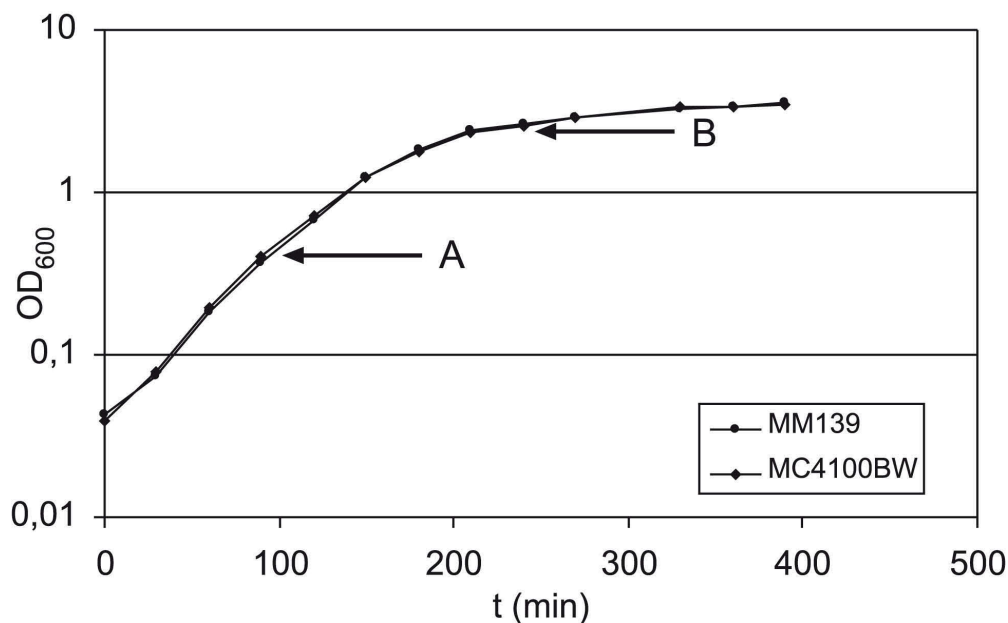


Abbildung 2.2 Wachstumskurve der Stämme MC4100BW (WT) und MM139 (*ssrS*)

Die Stämme wurden in 3 ml YT üN-Kulturen angezogen (MM139 mit 50 µg/ml Ampicilin) und 1:100 in YT angeimpft. Die Punkte A (exponentielle Phase) und B (frühstationäre Phase) markieren die Zeitpunkte der Zellernte für Gesamt-RNA Isolation.

Anschliessend folgt eine reverse Transkription mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV-RT). Die AMV-RT verwendet nun die RNA als Matritze und verlängert das Oligonukleotid komplementär zur Zielsequenz zu einer cDNA. Nach einer Denaturierung des RNA/cDNA-Hybridstranges und Längenauftrennung durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE 5.2.3.2) kann die cDNA durch die radioaktive Markierung am 5'-Ende mittels Autoradiographie (5.2.4.1) sichtbar gemacht werden und zeigt sich als geschwärzte Bande auf einem Röntgenfilm. Diese konnten quantitativ ausgewertet

werden. Aufgrund der Tatsache, dass viele der ribosomalen Proteine in gemeinsamen Operons liegen, bestimmt unter anderem die Aktivität des vorgeschalteten Promotors die mRNA Spiegel aller nachgeschalteten Gene. Für die vergleichenden Primer Extension Analysen wurden daher Oligonukleotide gewählt, die nahe des Transkriptionsstartes des jeweiligen Operons liegen. Abbildung 2.3 zeigt eine Zusammenfassung der Primer Extension Analysen und die quantitative Auswertung, im Vergleich zu den korrespondierenden Microarray Daten.

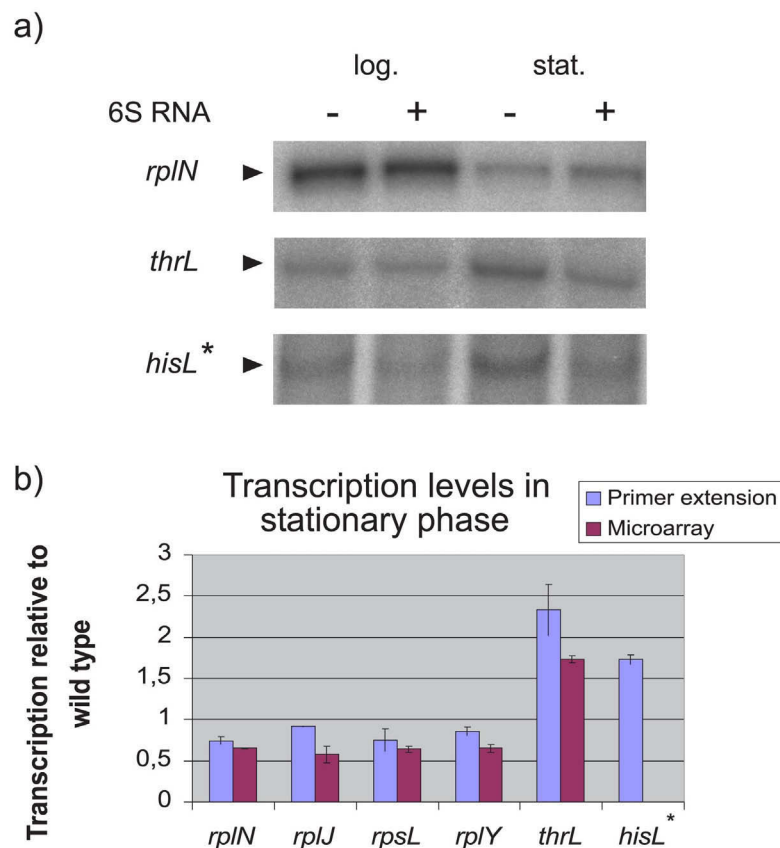


Abbildung 2.3 Quantitative Primer Extension Analyse im Vergleich zu Microarray Daten.

In **a)** ist exemplarisch die Primer Extension Analyse für drei repräsentative Promotoren in der logarithmischen (log) und stationären Wachstumsphase gezeigt. **b)** zeigt die Quantitative Auswertung aller in der Primer Extension untersuchten Promotoren im Vergleich mit den korrespondierenden Microarray Daten. Gezeigt ist die Transkriptmenge der 6S RNA Mutante relativ zum Wildtyp in der stationären Phase. Für die Primer Extension sind die Standardabweichungen aus 2-4 unabhängigen Experimenten angegeben, während für die Microarray Daten der p-value als Signifikanzindikator gezeigt ist. * Der *hisL* Promotor wurde in den Microarrays nicht als 6S RNA sensitiv identifiziert, wurde jedoch ebenfalls analysiert, da er zur selben physiologischen Gruppe wie *thrL* gehört und zusätzlich *in vitro* Daten vorliegen.

In a) sind exemplarisch Ausschnitte der Autoradiogramme dargestellt. Teil b) zeigt die quantitative Auswertung aller durchgeführten Primer Extension Analysen im Vergleich mit den korrespondierenden Microarray Daten. Gezeigt ist das Verhältnis der Transkriptmenge in der 6S RNA Mutante in Relation zum Wildtyp. Ein Wert unter 1 bedeutet verringerte Transkriptmengen in der Mutante. Der Promotor *rplN* kontrolliert das ribosomale Protein Operon *spc*, in diesem befinden sich die Proteine L14, S8 und L36. Für diese Gene wurden in den Microarray Analysen in der stationären Phase verringerte mRNA Spiegel in Abwesenheit von 6S RNA festgestellt. Auch für die Primer Extension Analysen ist zu beobachten, dass in der stationären Phase weniger Transkripte zu detektieren sind, wenn 6S RNA fehlt.

Um auch für Gene, bei denen erhöhte mRNA Spiegel in Abwesenheit von 6S RNA festgestellt wurden, eine Kontrolle der Promotoraktivität zu erhalten wurde der *thrL* Promotor unter gleichen Bedingungen analysiert. Auch hier bestätigte die Primer Extension die Ergebnisse aus den Microarray Analysen. Man erkennt eine deutlich Dereprimierung in Abwesenheit der 6S RNA. Für den *hisL* Promotor zeigten die Microarray Analysen zwar keinen Effekt durch 6S RNA, er wurde jedoch zusätzlich analysiert, da er funktionell zur gleichen Gruppe wie *thrL* gehört und bereits *in vitro* Daten zur 6S RNA Sensitivität vorliegen (2.1.1). Auch *hisL* wird *in vivo* inhibiert, wenn 6S RNA vorhanden ist, offensichtlich sogar schon in der exponentiellen Phase. In Abbildung 2.3 ist für alle untersuchten ribosomalen Protein Operons einheitlich zu erkennen, dass sowohl in den Microarrays als auch in den Primer Extension Analysen eine reduzierte Transkriptmenge zu beobachten ist, wenn 6S RNA fehlt. Auch der *thrL* Promotor zeigt in beiden Experimenten dieselbe Tendenz der Aktivierung. Man kann also davon ausgehen, dass die Beobachteten Unterschiede direkt auf Transkriptionsebene liegen. Bisher gibt es keine Indizien dafür, dass 6S RNA eine direkte Aktivierung an einem Promotor verursachen kann und auch die in dieser Arbeit gezeigten IVT Daten sprechen gegen eine 6S RNA abhängige Aktivierung. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der aktivierenden Wirkung auf die Transkription ribosomaler Komponenten um indirekte Effekte handelt.

Es ist eine bekannte Tatsache, dass die Ribosomensynthese und Synthese von Komponenten des Translationsapparates *in vivo* sehr komplex reguliert ist und über einen *Feedback* Mechanismus an die Synthese ribosomaler RNAs gekoppelt ist (Yates and Nomura 1981; Wagner 2001). Da in den Microarrays Gene für stabile RNAs nicht erfasst waren, wurde erneut mittels Primer Extension überprüft, ob auch die rRNA Synthese in Abwesenheit der 6S RNA in der stationären Phase reduziert war. Dazu wurde ein Primer (Oligo#1400, 4.3.1) gewählt, der komplementär zur Leaderregion aller sieben rRNA Operons in *E. coli* ist und

gleichzeitig die Synthese von cDNAs für die ribosomalen P1 und P2 Promotoren ermöglicht. Diese Leaderregion besitzt *in vivo*, mit ca. 40 s Halbwertszeit, nur eine sehr kurze Lebensdauer. Korrespondierende Transkripte spiegeln daher nur die Synthese von rRNA, also Promotoraktivität und nicht ihre Akkumulation wieder (Schäferkordt and Wagner 2001). Um die Auswertung für die komplexe Regulation der rRNA Synthese zusätzlich unempfindlich gegen Schwankungen der RNA Menge zu machen wurde ein interner Quantifizierungsstandard gesucht. Nach dem Test mehrerer, als konstitutiv exprimiert beschriebener Promotoren wurde *rhoL* als geeignet gewählt.

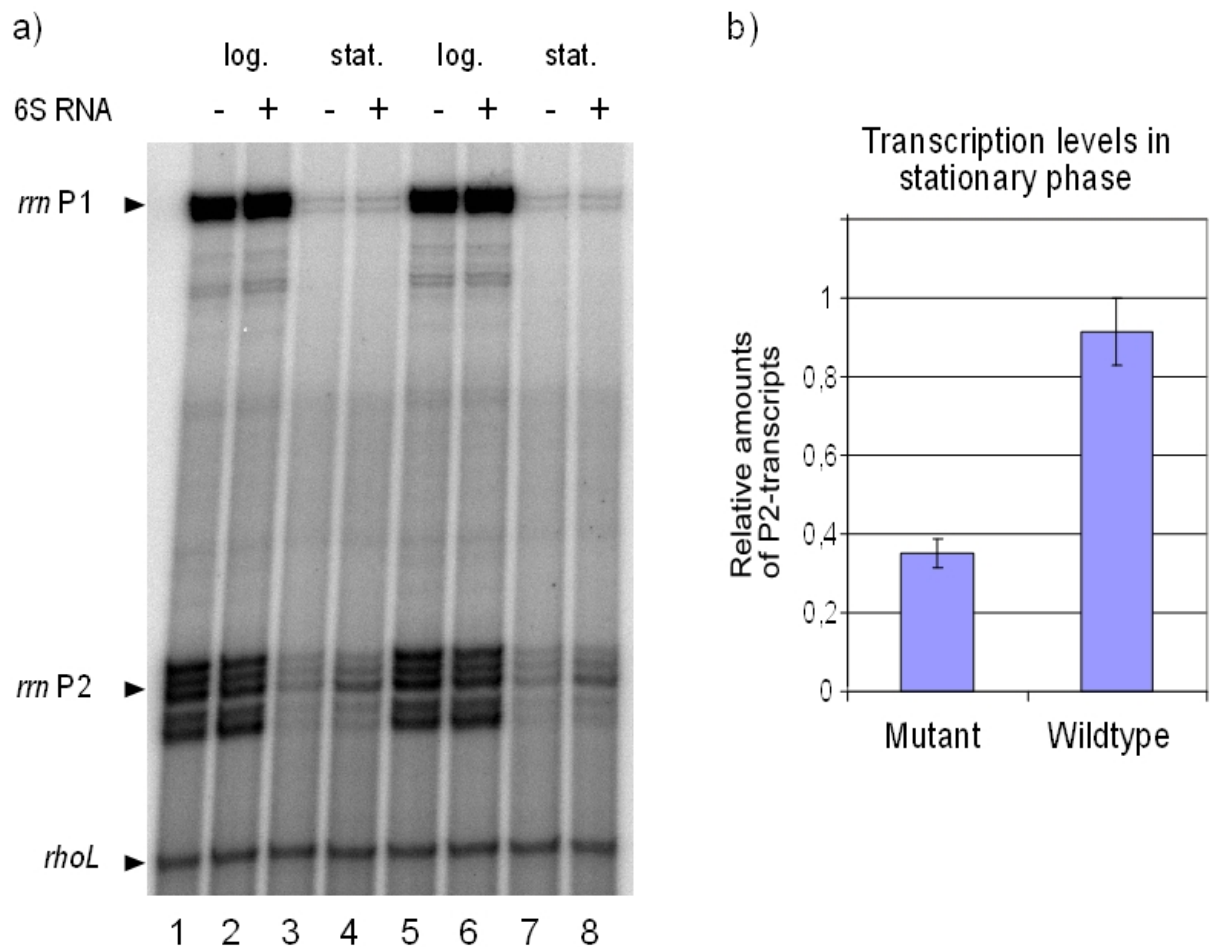


Abbildung 2.4 Effekt von 6S RNA auf die Synthese ribosomaler RNA

a) Zeigt das Ergebnis einer Primer Extension Analyse mit dem Primer Oligo#1400, mit welchem man die Gesamtheit aller Transkripte der ribosomalen P1 und P2 Promotoren detektieren kann. Es wurden zwei unabhängige RNA Proben von Stämmen ohne (-) und mit 6S RNA (+) untersucht, die bis zur logarithmischen (log.) und stationären Wachstumsphase (stat.) angezogen wurden. Die charakteristischen cDNA Produkte für den P1 und P2 Promotor sind angegeben. Aufgrund von Längenheterogenitäten der Leaderregion aller sieben rRNA Operons finden sich mehrere Banden. Das konstitutiv exprimierte *rhoL* Transkript dient als interner Quantifizierungsstandard. **b)** Quantitative Auswertung der P2 Transkripte von vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Rho ist der Transkriptionsfaktor der faktorabhängigen Termination und wird über Attenuation reguliert, daher wird der *Leader* konstitutiv exprimiert. In (Cavanagh, Klocko *et al.* 2008) wurde *rhoL* ebenfalls als nicht 6S RNA reguliert beschrieben. Für die Primer Extension wurde zusätzlich das Oligonukleotid rhoL2 (4.3.1) mit in den Hybridisierungsansatz gegeben und lieferte in der reversen Transkription charakteristische cDNA Banden, die nicht mit denen der ribosomalen Promotoren interferierten. Abbildung 2.4 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Analysen. Es wurden Doppelproben mit separaten Gesamt-RNA Präparationen durchgeführt. In a) ist das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese zu sehen. Die charakteristischen cDNA Banden für die ribosomalen P1 und P2 Promotoren sowie für *rhoL* sind markiert. Aufgrund von Längenheterogenitäten innerhalb der Leaderregionen aller sieben rRNA Operons sind für den P1 und P2 Promotor mehrere Banden zu erkennen.

Da die zuvor gezeigten Analysen mit Gesamt-RNA aus der stationären Wachstumsphase durchgeführt wurden, lag der Fokus auch hier auf der stationären Phase. In dieser ist die rRNA Synthese bereits stark gedrosselt (Wagner 2001), daher wurde eine relativ lange Expositionszeit gewählt (Vergleich der Spuren 1, 2, 5 und 6 gegen 3, 4, 7 und 8). Aus diesem Grund sind die Banden der logarithmischen Wachstumsphase bereits in Sättigung und die in (2.1.1) beschriebene Inhibierung des P1 Promotors in Abwesenheit der 6S RNA ist nicht mehr zu erkennen (siehe auch Kapitel 2.1.6). In der stationären Phase übernimmt der P2 Promotor die Hauptlast der Transkription der rRNA. Vergleicht man nun dessen Transkriptmengen in der 6S RNA Mutante (Spuren 3 und 7) mit denen im Wildtyp (Spuren 4 und 8), sieht man, dass im Wildtyp deutlich mehr cDNA Produkte für den P2 vorhanden sind. In b) ist die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten inklusive Standardabweichung gezeigt. Die Inhibierung der rRNA Synthese in Abwesenheit der 6S RNA liegt in der gleichen Größenordnung, wie für die ribosomalen Proteingene beobachtet und unterstützt die Schlussfolgerung, dass ein Fehlen der 6S RNA die Balance des Translationsapparates in der stationären Phase beeinflusst. Die möglichen Hintergründe dieser Regulation werden in Kapitel 2.1.5 näher untersucht.

2.1.4 Führt die 6S RNA zu einer globalen Inhibierung der Transkription?

Wie bereits beschrieben, wird der 6S RNA eine wichtige Rolle beim Umschalten der Transkription von exponentieller in die stationäre Phase zugeschrieben (Wassarman and Storz 2000; Kim, Shin *et al.* 2004) und viele Daten zeigen, dass außer σ^{70} abhängigen Promotoren auch Promotoren aller anderen Klassen inhibiert werden (Geißen 2007; Neußer, Polen *et al.* 2010). Daher bestand die Möglichkeit, dass die Transkription in Gegenwart von 6S RNA global gehemmt ist. Sowohl bei den Microarray- als auch den Primer Extension Analysen wurden exakt gleiche Mengen Gesamt-RNA beider Stämme eingesetzt. Im Falle einer globalen Transkriptionsinhibierung würde durch das Angleichen der RNA Mengen bei den Analysen das Ergebnis verfälscht und auch der als interner Standard verwendete *rhoL* Promotor wäre davon betroffen. Um zu überprüfen, ob eine globale Transkriptionsinhibierung vorlag, wurden vergleichende Primer Extension Analysen beider Stämme mit Gesamt-RNA durchgeführt, der vor der Präparation ein externer RNA-Standard zugesetzt wurde. Bei der Primer Extension wurden dann Primer für die Detektion von *rhoL* und dem externen Standard verwendet. Bei einer globalen Transkriptionsinhibierung wäre eine 6S RNA-abhängige Abweichung der Verhältnisse *rhoL* zu diesem Standard zu erwarten. Bei dem externen Standard handelte es sich um ein Halbfragment des Pflanzenpathogens PSTVd, welches keine Sequenzhomologien zu *E. coli* aufweist. Dieses wurde durch *in vitro* Transkription im präparativen Maßstab (RiboMax 5.2.7.2) mit dem linearisierten Vektor pRH751 hergestellt. Wildtyp-Stamm und die 6S RNA Mutante wurden wie gewohnt angezogen und zum gewünschten Zeitpunkt, in diesem Fall die stationäre Phase, geerntet. Bei der folgenden Gesamt-RNA Präparation (5.2.2.2) wurden dann pro geernteter OD Zellen 500 ng Viroid RNA mit in den Aufschluss gegeben. So war sichergestellt, dass für den externen Standard die gleichen Bedingungen herrschten, wie für die Gesamt-RNA. Anschliessend wurden PE Analysen mit 5 µg Gesamt-RNA und dem Primer für *rhoL* sowie dem Oligo Viroid UL, das nur spezifisch an die Viroid RNA bindet, durchgeführt. Abbildung 2.5 zeigt das Ergebnis der PE Analysen, die jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden. In den Spuren 1-4 wurde nur das Oligo für *rhoL* verwendet. Zwischen Mutante (1 und 3) und Wildtyp (2 und 4) ist kein auffälliger Unterschied in der Menge an *rhoL* Transkript zu beobachten. Dies stimmt überein mit dem in Abbildung 2.4 gezeigten Ergebnis (Spuren 3/4 und 7/8). In den Spuren 5-8 sind die gleichen RNA-Proben mit dem Viroid-spezifischen Oligo zu sehen, auch hier ist kein auffälliger Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp erkennbar.

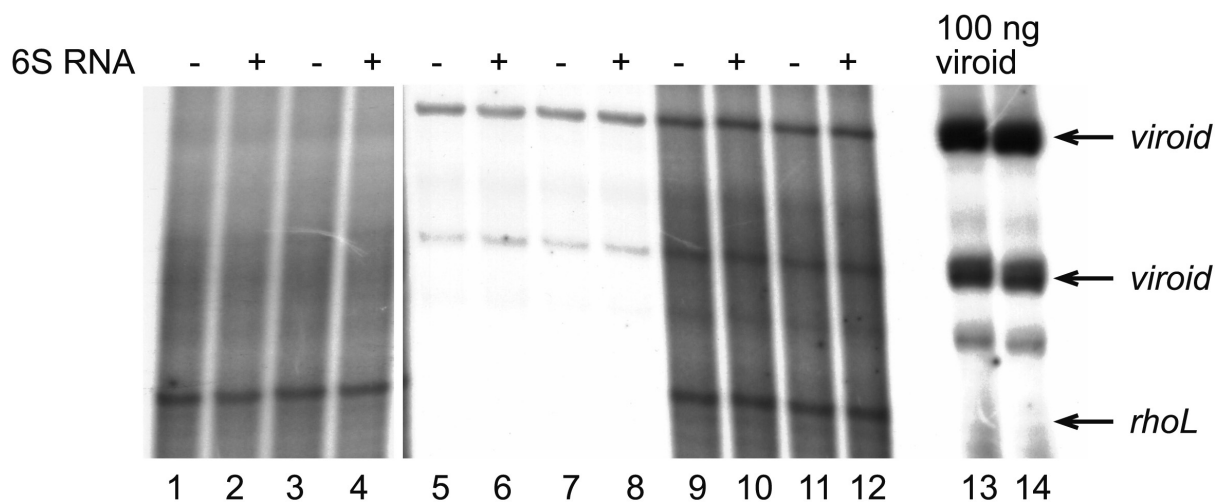


Abbildung 2.5 Effekt von 6S RNA auf die globale Transkription.

Zu sehen ist ein Autoradiogramm nach Primer Extension von 5 µg gRNA aus 6S RNA defizienten (-) und Wildtypzellen (+) der stationären Wachstumsphase. Vor der Aufreinigung der gRNA wurden als externer Standard, pro OD Zellernte, 500 ng eines RNA-Fragments, des Pflanzenviroids PSTVd, zugegeben. In den Spuren 1-4 wurde eine Oligo spezifisch für den konstitutiv exprimierten *rhoL* Promotor verwendet. Spuren 5-8 zeigen dieselben RNA-Proben mit einem Primer, welcher für das Viroid Fragment spezifisch ist. In den Spuren 9-12 wurden beide Oligos in den Hybridisierungsansatz gegeben. Spuren 13 und 14 enthielten nur 100 ng aufgereinigtes Viroidfragment und das Viroid-spezifische Oligo. Die jeweiligen cDNA Banden sind mit Pfeilen markiert.

Die Spuren 9-12 zeigen die Kombination beider Primer in den gleichen RNA-Proben und auch hier ist keine Varianz zwischen Mutante und Wildtyp zu verzeichnen. Darüber hinaus erkennt man, dass sich beide Primer nicht beeinflussen. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen, dass *rhoL* nicht durch 6S RNA reguliert ist und zeigt zum anderen klar, dass es in der stationären Phase nicht zu einer globalen Inhibierung der Transkription durch 6S RNA kommt.

2.1.5 6S RNA beeinflusst den zentralen Wachstumsraten Regulator ppGpp

Wie in Kapitel 2.1.3 gezeigt, führt ein Fehlen der 6S RNA in der stationären Phase dazu, dass die Synthese von rRNAs gedrosselt wird, mit dem Ergebnis einer ebenso reduzierten Synthese des Translationsapparates. Aus bereits genannten Gründen scheint eine direkte Aktivierung der betreffenden Operons durch 6S RNA eher unwahrscheinlich, daher stellte sich die Frage, wie das Fehlen von 6S RNA zu der beobachteten Reduktion führt.

Die Synthese von Ribosomen ist in der Zelle ein intensiv regulierter Vorgang und wird in der exponentiellen Phase direkt durch das niedermolekulare Effektormolekül Guanosintetraphosphat (ppGpp) gesteuert. So wird zum Beispiel bei Aminosäuremangel innerhalb kürzester Zeit von dem ribosomenassoziierten Protein RelA aus GTP und ATP die Konzentration an ppGpp von μM in mM Bereiche erhöht (Baracchini and Bremer 1988). Dies hat eine starke und rapide Inhibierung der Transkription stabiler RNAs (rRNAs, tRNAs) zur Folge. Im Gegenzug werden vor allem Gene für Aminosäure Operons aktiviert. Ein basaler ppGpp Spiegel im μM Bereich ist dagegen für die Wachstumsratenkontrolle zuständig und wird durch das bivalente Enzym SpoT aufrecht erhalten, das ppGpp aus GTP und ATP synthetisieren, aber auch zu GDP und Pyrophosphat hydrolysieren kann (Sarubbi, Rudd *et al.* 1989). Auch beim Übergang in die stationäre Phase ist ppGpp für das Drosseln der rRNA Synthese zuständig (Hernandez and Bremer 1990; Aviv, Giladi *et al.* 1996). Dabei wird die Transkription vom P1 Promotor auf den P2 Promotor verlagert, wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist. Prinzipiell gilt der P1 Promotor als Hauptziel für die ppGpp Regulation. Auch für den P2 Promotor ist eine Regulation durch ppGpp bereits gezeigt, diese fällt aber deutlich geringer aus (Zacharias, Göringer *et al.* 1989; Liebig and Wagner 1995). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob in Abhängigkeit von 6S RNA auch die basale ppGpp Konzentration in der stationären Phase verändert ist. Hierzu wurden 6S RNA⁻ und Wildtypzellen Zellen einem Labeling mit radioaktiv markiertem Phosphat unterzogen (5.3.2). Das freie Phosphat wird schnell in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt. Dadurch werden Phosphatverbindungen radioaktiv markiert und lassen sich durch Autoradiographie nachweisen. Führt man die Markierung nur kurzzeitig durch werden vorwiegend niedermolekulare Verbindungen wie Nukleotidtriphosphate markiert. Für die Analysen des basalen ppGpp Spiegels wurden die Zellen genauso angezogen, wie für die Microarray und Primer Extension Analysen und ebenfalls zum vergleichbaren Zeitpunkt der stationären Phase geerntet. Eine Stunde vor der Zellernte wurden die Zellen und nach der Ernte mit Ameisensäure aufgeschlossen und pelletiert.

2.1.6 Einfluss der 6S RNA auf die differentielle Regulation der rRNA Operons

Es ist bekannt, dass die P1 Promotoren der sieben rRNA Operons, abhängig vom Startnukleotid, nicht alle in gleicher Weise durch den Wachstumsratenregulator ppGpp reguliert werden. So zeigt der *rrnD* P1 Promotor, der als einziger rRNA P1 Promotor in *E. coli* ein G als Startnukleotid aufweist (alle anderen rRNA Operons starten am P1 mit A), *in vivo* eine reduzierte Sensitivität gegenüber ppGpp. Tauscht man das Startnukleotid G gegen ein A aus, entspricht die Empfindlichkeit für ppGpp *in vivo* der des *rrnB* P1 Promotors (Kolmsee 2005). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass auch der rRNA P1 Promotor in Abwesenheit der 6S RNA in der exponentiellen Phase leicht inhibiert wird (Geißen 2007; Neußer, Polen *et al.* 2010). In dieser Wachstumsphase ist bereits eine signifikante Menge an 6S RNA vorhanden (Kim and Lee 2004). Zusammen mit der im vorigen Kapitel gezeigten Koppelung des basalen ppGpp-Spiegels an das Vorhandensein von 6S RNA stellte sich die Frage, ob dies zu einer individuellen Regulation der rRNA P1 Promotoren führt. Dazu wurden 6S RNA Mutante und der Wildtypstamm mit Vektoren transformiert, die das Gen für Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) unter Kontrolle einzelner rRNA P1 Promotoren tragen. Dabei handelt es sich um die Promotoren *rrnB* P1 (pHD1-B), *rrnD* P1 (pHD1-D) und einen mutierten *rrnD* P1, bei dem das Startnukleotid von G zu A ausgetauscht wurde (pTK01).

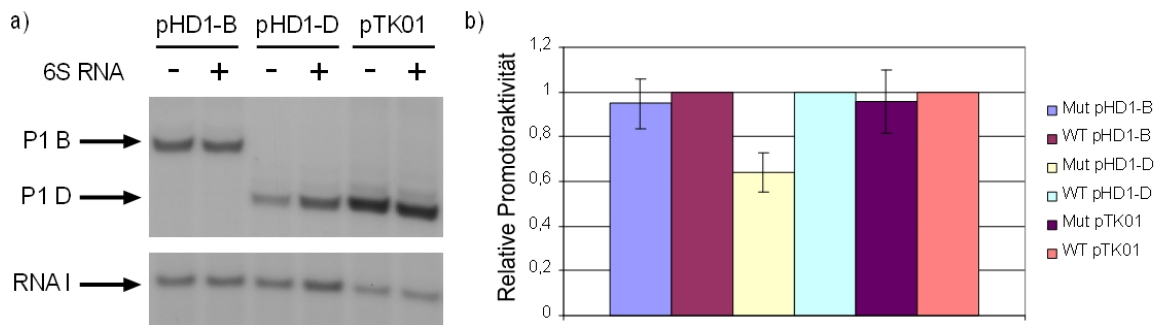


Abbildung 2.7 Differentielle Regulation der rRNA P1 Promotoren durch 6S RNA in Abhängigkeit des Startnukleotids. **a)** zeigt das Autoradiogramm einer Primer Extension von Gesamt-RNA aus der exponentiellen Wachstumsphase der Stämme MM139 (6S RNA-defizient) und MC4100BW (Wildtyp), die mit den Plasmiden pHD1-B (*rrnB* P1 Promotor, Startnukleotid A), pHD1-D (*rrnD* P1 Promotor, Startnukleotid G) und pTK01 (mutierter *rrnD* P1 Promotor mit Austausch des Startnukleotids G zu A) transformiert wurden. Die charakteristischen cDNA-Banden für die drei rRNA P1 Promotoren (*cat*-Oligo) und den plasmidkodierten RNA I Promoter (RNAI-Oligo) sind seitlich markiert. **b)** zeigt die quantitative Auswertung der P1 Promotoraktivität in der 6S RNA Mutante relativ zum Wildtyp, welcher als 1 gesetzt wurde. Die Banden für RNA I dienen als interner Quantifizierungsstandard. Ausgewertet wurden fünf unabhängige Experimente aus drei Gesamt-RNA-Präparationen.

Durch diese Mutation des *rrnD* P1 Promotors ist dessen Startregion identisch mit der des *rrnB* P1. Von den sechs transformierten Stämmen wurde in der exponentiellen und stationären Phase Gesamt-RNA (5.2.2.2) isoliert und dann mittels Primer Extension die relative Promotoraktivität der plasmidkodierte rRNA Promotoren bestimmt. In Abbildung 2.7 ist exemplarisch das Autoradiogramm für die Primer Extension der exponentiellen Phase mitsamt quantitativer Auswertung gezeigt. In der stationären Phase ist die Aktivität der P1-Promotoren stark gedrosselt, so dass keine verwertbaren Signale detektiert werden konnten. Die Abbildung zeigt für den *rrnB* P1 Promotor keinen Effekt durch 6S RNA (Spuren 1 und 2), während der *rrnD* P1 Promotor in Abwesenheit von 6S RNA um ca. 40 % inhibiert wird (Spuren 3 und 4). Bei dem Austausch des Startnukleotids im *rrnD* P1 Promotor von G zu A verschwindet dieser Effekt wieder.

Die Richtung dieser Wirkung widerspricht allerdings etwas den Erwartungen. Bei einer durch ppGpp verursachten differentiellen Regulation wäre zu vermuten gewesen, dass der *rrnB* P1 Promotor in Abwesenheit der 6S RNA (mehr basales ppGpp) inhibiert ist, während der *rrnD* P1 Promotor eher unbeeinflusst sein sollte. Dennoch lässt sich feststellen, dass einzelne ribosomale P1 Promotoren differentielle 6S RNA-abhängige Regulation zeigen. Die Art der Regulation deutet dabei weniger auf einen ppGpp-Effekt, als auf einen reduzierten GTP-Spiegel in der 6S RNA Mutante hin (siehe Diskussion 3.1.3).

2.1.7 Ist der beobachtete Phänotyp für 6S RNA auf einen Defekt im RSH-System zurückzuführen?

Während bei manchen Bakterien nur ein Enzym für die Aufrechterhaltung des basalen ppGpp-Levels und die rapide ppGpp Synthese im Rahmen der Stringenten Kontrolle zuständig ist, existieren bei *E. coli* zwei verschiedene. SpoT ist für das basale Level zuständig und RelA synthetisiert rasch ppGpp als Antwort auf Aminosäuremangel. Man nennt daher Enzyme für die ppGpp Synthese allgemein RSH-Enzyme, für RelA/SpoT Homolog. (1.4.1). Die Stämme, welche für die bisher gezeigten Analysen verwendet wurden, besitzen kein funktionierendes *relA* Gen. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte etwas mit dem Fehlen von *relA* zu tun haben, wurden Schlüsselexperimente mit einem 6S RNA defizienten Stamm wiederholt, der auf dem *E. coli* Stamm MG1655 basiert und ein vollständiges RSH-System aufweist. Sowohl die Analyse des Einflusses der 6S RNA auf die rRNA Synthese als

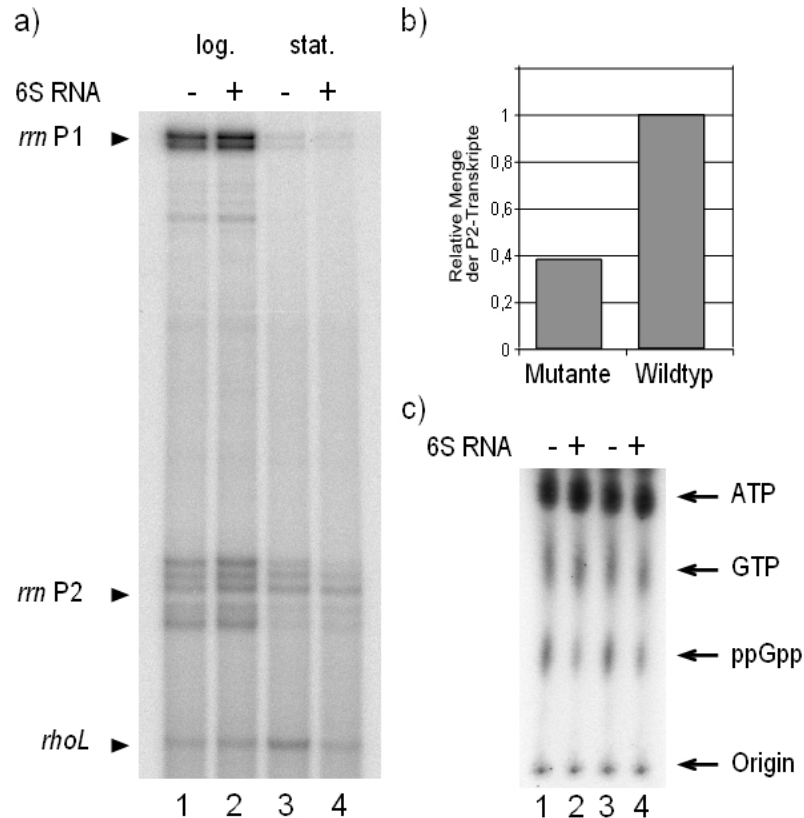


Abbildung 2.8 Effekt von 6S RNA auf die Synthese ribosomaler RNA und den intrazellulären ppGpp Spiegel in einem RSH intakten Stamm. **a)** Zeigt das Ergebnis einer Primer Extension Analyse mit dem Primer Oligo#1400, mit welchem man die Gesamtheit aller Transkripte der ribosomalen P1 und P2 Promotoren detektieren kann. Es wurden Gesamt-RNA Proben von Stämmen ohne (-) und mit 6S RNA (+) untersucht, die bis zur logarithmischen (log.) und stationären Wachstumsphase (stat.) angezogen wurden. Die charakteristischen cDNA Produkte für den P1 und P2 Promotor sind angegeben. Aufgrund von Längenheterogenitäten der Leaderregion aller sieben rRNA Operons finden sich mehrere Banden. Das konstitutiv exprimierte *rhoL* Transkript diente als interner Quantifizierungsstandard. **b)** Quantitative Auswertung der P2 Transkripte der stationären Phase. **c)** zeigt eine Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Gesamt-NTP Extraktionen der 6S RNA Mutante MW Δ ssrS (-) in den Spuren 1 und 3 sowie des Wildtyps MG1655 (+) in den Spuren 2 und 4. Die Zellen wurden 1 Std. vor Zellernte mit radioaktivem Phosphat markiert und in der frühstationären Phase geerntet.

auch die Überprüfung des intrazellulären ppGpp Spiegels wurden mit diesem Stamm und dem korrespondierenden Wildtyp durchgeführt. Abbildung 2.8 zeigt die Ergebnisse der Analysen. Die durchgeführten Experimente waren analog zu denen in Abbildung 2.4 und Abbildung 2.6. Es wird deutlich, dass unabhängig vom Stammhintergrund die Effekte der 6S RNA auf die Synthese von Komponenten des Translationsapparates, korrelierend mit einem veränderten, basalen ppGpp Spiegel, dieselben sind. Folglich kann ein sekundärer Effekt durch das Fehlen von *relA* ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist in Abbildung 2.8 a) bereits in der logarithmischen Wachstumsphase die leichte Inhibierung der rRNA-Synthese in der 6S RNA Mutante zu beobachten, die bereits beschrieben wurde (Geißen 2007; Neußer, Polen *et al.* 2010).

2.1.8 Rückkoppelung der Regulation des Purinstoffwechsels auf die 6S RNA

Eine weitere funktionell zusammenhängende Gruppe von Genen, die in den Microarray Analysen (2.1.2) als 6S RNA-abhängig exprimiert beobachtet wurde, gehört zum Purinstoffwechsel (Neußer, Polen *et al.* 2010). So zeigten sich in Abwesenheit von 6S RNA erhöhte Transkriptlevel für *guaD*, *add* und *fold*. Bei den ersten beiden handelt es sich um Gene für Guanin- und Adenosin Desaminasen und bei *fold* um eine bifunktionale 5,10-methylen-tetrahydrofolat Dehydrogenase/5,10-methylen-tetrahydrofolat Cyclohydrolase. Mit dem Gen *ygfA*, das mit 6S RNA cotranskribiert wird und eine 5-Formyltetrahydrofolat Cycloligase kodiert (Jeanguenin, Lara-Nunez *et al.*), ist ein funktionell eng verwandtes Enzym von *fold* im *ssrS*-Operon kodiert. Darüber hinaus ist das Gen für 6S RNA (*ssrS*) auch in anderen Bakterienspezies teilweise mit Genen des Purinstoffwechsels gekoppelt. So zeigt sich direkte Nachbarschaft des Gens für 6S RNA zum Beispiel mit *purD* in dem Humanpathogen *Helicobacter pylori* (Sharma, Hoffmann *et al.* 2010) oder *purK* in einigen Cyanobakterien Stämmen (persönliche Kommunikation mit Dr. Anne Rediger, Charité Berlin, siehe auch Kapitel 2.3). Um Hinweise auf einen möglichen Einfluss dieser Gene auf die intrazelluläre ppGpp Konzentration zu erhalten wurden mit Deletionsstämmen einiger dieser Gene ebenfalls Dünnschichtchromatographien von Gesamt-NTP Extraktionen, wie in Kapitel 2.1.5, durchgeführt. Die Deletionsstämmen und der korrespondierende Wildtyp stammen allesamt aus der *Keio Knockout Collection* (Baba, Ara *et al.* 2006). Bei dieser Stammsammlung wurde ausgehend von einem Wildtypstamm (BW 25113) systematisch jedes nicht essentielle, Protein-kodierende Gen durch Insertion einer Kanamycinkassette ausgeschaltet. Dadurch, dass alle Stämme den gleichen Stammhintergrund haben, hat man eine sehr gute Grundlage Deletionsstämmen miteinander zu vergleichen. In Abbildung 2.9 ist das Ergebnis der ppGpp Bestimmung zu sehen, alle Stämme wurden in YT-Medium angezogen und zeigten keine Wachstumsunterschiede (Daten nicht gezeigt). Die quantitative Auswertung zeigt deutlich, dass erhöhte basale ppGpp Level bei Deletion von *purE* und *guaD* auftreten. Auch bei *purK* und *add* sind nach quantitativer Auswertung Unterschiede festzustellen, jedoch schwanken die Werte sehr stark und können daher nicht als gesichert betrachtet werden.

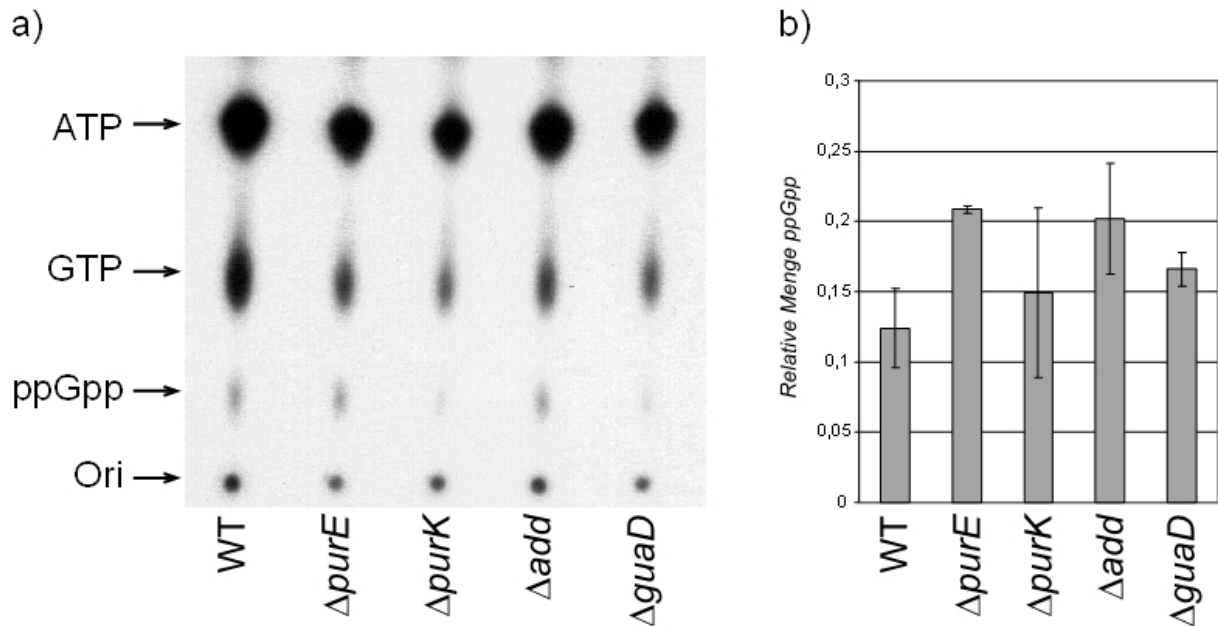


Abbildung 2.9 Effekt von Deletionen im Purinstoffwechsel auf die basale ppGpp Konzentration in der stationären Phase. a) zeigt eine Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv markierten Gesamt-NTP Extraktionen der Stämme BW25113 (WT), JW0512 ($\Delta purE$), JW 0511 ($\Delta purK$), JW1615 (Δadd) und JW5466 ($\Delta guaD$). Die Zellen wurden 1 Std. vor Zellernte mit [^{32}P -H $_3$ PO $_4$] markiert und in der frühstationären Phase geerntet. b) zeigt die quantitative Auswertung des ppGpp Spiegels von zwei unabhängigen Trennungen. Die relative ppGpp-Menge wird dabei bestimmt als Quotient aus der ppGpp-Menge zur Summe von ppGpp und GTP.

Aufgrund des Einfluss einzelner Gene des Purinmetabolismus auf die relative ppGpp Konzentration, der Tatsache, dass vermehrt solche Gene als 6S RNA reguliert gefunden wurden und dem Fakt, dass 6S RNA Gene oft mit Genen des Purinstoffwechsels gekoppelt sind, war von Interesse, inwieweit eine Rückkoppelung einzelner Gene des Purinstoffwechsels auf die intrazelluläre 6S RNA-Menge existiert. Dazu wurden mit den oben gezeigten Stämmen vergleichende Primer Extension Analysen durchgeführt. Dank der Verfügbarkeit der *Keio Collection* konnten darüber hinaus noch einige andere Deletionsstämme auf ihren 6S RNA Gehalt überprüft werden. Es wurden zusätzliche Deletionsstämme für *ygfA*, *rph* und *hfq* untersucht. Der $\Delta ygfA$ Stamm wurde aufgrund der Zugehörigkeit von *ygfA* zum Purinstoffwechsel und der genetischen Koppelung mit 6S RNA gewählt. Hfq sollte im weiteren Verlauf der Arbeit ausführlich behandelt werden, daher war eine Information über eine mögliche Hfq-Abhängigkeit der 6S RNA ebenfalls wichtig. Das Gen *rph* kodiert für die RNaseH und könnte an der Prozessierung oder dem Abbau der 6S RNA beteiligt sein. Abbildung 2.10 zeigt das Autoradiogramm dieser Primer Extension Analyse mit der quantitativen Auswertung. Für die Analysen wurde erneut das in Kapitel 2.1.4 beschriebene Viroidfragment als externer Standard vor der Gesamt-RNA Isolation zugegeben.

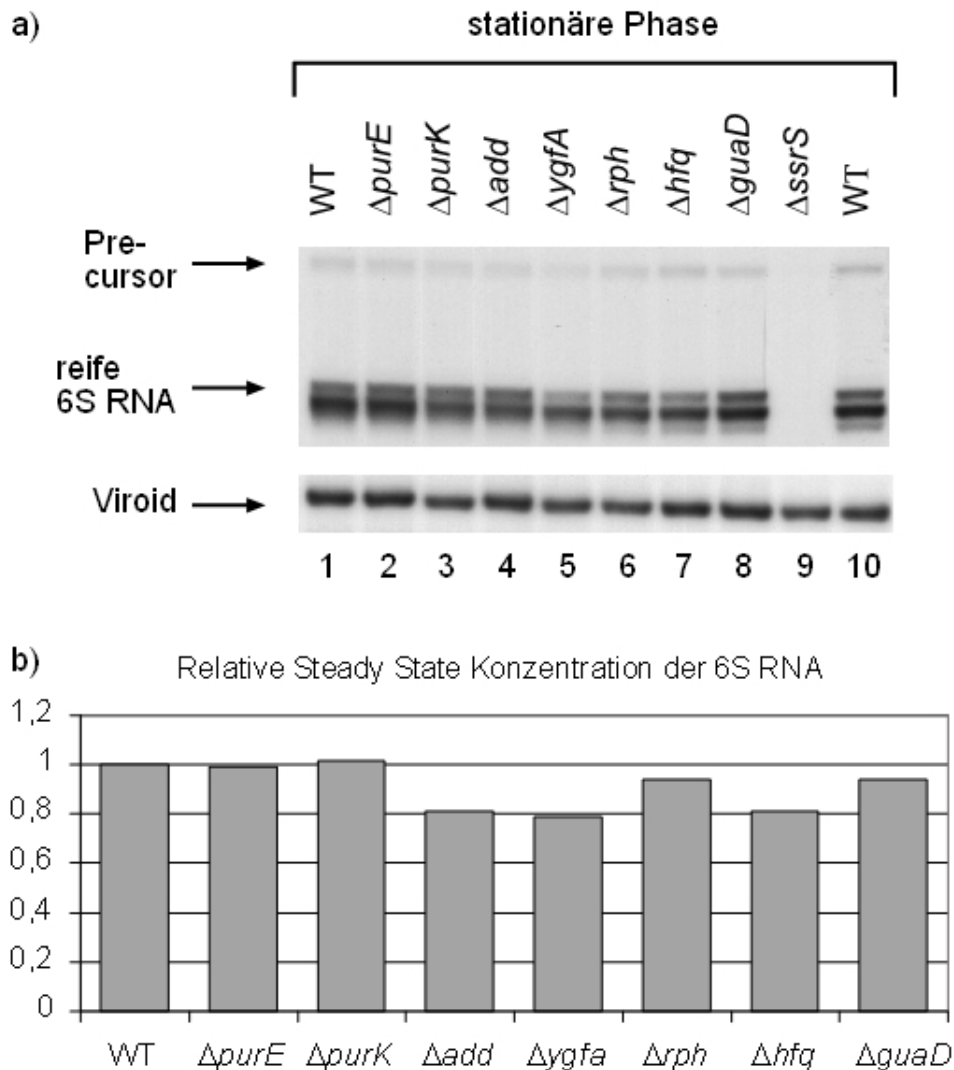


Abbildung 2.10 Vergleich der intrazellulären 6S RNA Menge in der stationären Wachstumsphase, abhängig von einzelnen Gendeletionen. a) zeigt eine Primer Extension Analyse mit 1 μ g Gesamt-RNA aus der stationären Wachstumsphase. Als externer Quantifizierungsstandard wurde 0,5 μ g Viroidfragment pro geernteter OD₆₀₀ vor der RNA-Isolation zugegeben. Die Spuren 1-8 zeigen Proben aus Stämmen der *Keio Collection* und besitzen den selben Stammhintergrund. In 9 und 10 wurde RNA der Stämme MM139 (6S RNA defizient) und MC4100BW verwendet. b) zeigt die quantitative Auswertung der Spuren 1-8 normiert auf den Wildtyp, der als 1 gesetzt wurde. Die Spuren 9 und 10 dienten lediglich der Anschauung und wurden nicht ausgewertet.

Aufgrund der Stabilität und Akkumulation der 6S RNA ist für ihren Nachweis mittels Primer Extension deutlich weniger Gesamt-RNA (1 μ g) nötig als für kurzlebige mRNAs (5-20 μ g). Aus diesem Grund wären die Signalstärken für das *rhoL* Transkript sehr schwach und *rhoL* daher als Standard nicht geeignet. Zudem war unklar, ob *rhoL* in den verwendeten Deletionsmutanten der *Keio Collection* ebenfalls konstitutiv exprimiert ist. Für einen Großteil der untersuchten Stämme waren keine Auffälligkeiten in der Menge der 6S RNA zu beobachten. Lediglich in den Deletionsstämmen für *add*, *ygfA* und *hfq* ist eine leichte Reduktion der 6S RNA zu erkennen (Spuren 4, 5 und 7). Für die Deletion von *ygfA* liegt

dieser Effekt vermutlich nicht in einer Wirkung von *ygfA* selbst. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde beschrieben, dass *downstream* der reifen 6S RNA, noch vor dem ORF von *ygfA*, mehrere Rho-abhängige Terminationssignale existieren. Zusätzlich wird dadurch vermutlich auch die 3'-Prozessierung der 6S RNA durch Exonukleasen beeinflusst (Chae, Han *et al.* 2010). Die *ygfA* Deletion ist durch Insertion einer Kanamycinkassette durchgeführt und die Wahrscheinlichkeit daher hoch, dass durch die inserierte Kanamycinkassette die Termination und/oder die 3'-Prozessierung der 6S RNA betroffen sind (Baba, Ara *et al.* 2006). Der Effekt der *add*-Deletion auf die 6S RNA-Menge in der stationären Phase ist dagegen noch unklar. Es muss dazu bemerkt werden, dass dieses Experiment nicht statistisch abgesichert wurde und daher die Ergebnisse nicht zwingend als signifikant anzusehen sind. Es ist eher davon auszugehen, dass kein *feedback* Mechanismus auf die Akkumulation der 6S RNA existiert.

Mögliche Ursachen für die Reduktion in der Hfq Mutante werden in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit (2.2) und der Diskussion und näher betrachtet.

2.1.9 Rolle der 6S RNA während eines *outgrowth* aus der stationären Phase

In der stationären Phase, wenn die zelluläre Konzentration an 6S RNA sehr hoch ist, komplexiert diese eine große Anzahl der verfügbaren RNA-Polymerasen und inhibiert zu einem Grossteil die Transkription. Dies ist wichtig für die Zelle um in Mangelsituationen Ressourcen zu sparen (Wassarman and Storz 2000). Lange war unklar, wie die Zelle reagiert um diese Blockade aufzuheben, wenn sich die Wachstumsbedingungen verbessern. Inzwischen ist bekannt, dass nach einem *nutritional upshift* ein ungewöhnlicher Mechanismus in Kraft tritt, der die Polymerase aus dem Komplex mit 6S RNA entlässt. Im Labor wird ein solcher *upshift* durch Wachstum in Mangelmedium (stationäre Phase) und anschließender Zugabe von 10-fach Komplexmedium (*outgrowth*) simuliert. Innerhalb kürzester Zeit nach *upshift* (30 s - 10 min) werden durch die RNAP mit der 6S RNA als Matrize kurze (14-20 NT), so genannte *de novo* RNAs (dnRNAs) synthetisiert. Infolge dieser ungewöhnlichen, RNA-basierten Transkription zerfällt der Komplex aus 6S RNA und RNAP und die RNAP ist verfügbar für die Transkription von Promotoren. Darüber hinaus ist ein schneller Abbau der 6S RNA zu beobachten (Wurm, Neußer *et al.* 2010). Ausgelöst wird die Komplex-Dissoziation vermutlich durch strukturelle Umlagerungen der 6S RNA (Steuten unveröffentlicht). Zusätzlich unterstützt wird diese Strukturänderung dadurch, dass die

dnRNA ein stabiles Hybrid mit der 6S RNA bildet (Wurm, Neußer *et al.* 2010). Die Synthese von dnRNA und der daraus resultierende Komplexzerfall lassen sich *in vitro* durch hohe Konzentrationen von NTPs induzieren (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007; Wurm, Neußer *et al.* 2010).

Aus diesem Grund und aufgrund der auch hier gezeigten Verbindung der 6S RNA zum NTP-Metabolismus wurde untersucht, ob der *nutritional upshift* auch *in vivo* einen erhöhten NTP-Spiegel zur Folge hat und ob 6S RNA diesen beeinflusst. Dazu wurden erneut Dünnschichtchromatographien von radioaktiv markierten Gesamt-NTP Extraktionen, wie in den Kapiteln 2.1.5 und 2.1.8, durchgeführt, jedoch unter Bedingungen des *nutritional upshift* (5.2.2.2). Es wurden die 6S RNA Mutante und der Wildtyp über Nacht in M9-Minimalmedium wachsen lassen und 1 Stunde vor *upshift* mit radioaktiv markiertem Phosphat (0,2 mCi/ml) versetzt. Der *upshift* erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 10-fach LB Medium (supplementiert mit 2% Glukose). Zum Zeitpunkt 0 sowie 1, 3 und 5 Minuten nach Zugabe des Mediums wurden Proben entnommen und einem Ameisensäureaufschluss unterzogen (5.3.2). Die Analyse erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (5.3.2.1). In Abbildung 2.11 a) ist das Autoradiogramm dieser Auftrennung gezeigt. Bedingt durch die geringe Zelldichte und dem reduzierten Metabolismus in dem Minimalmedium ist die Markierungseffizienz deutlich geringer, als in 2.1.5 und 2.1.8 gezeigt. Quantitativ ausgewertet wurde daher exemplarisch ATP. Man erkennt, dass innerhalb einer Minute nach *upshift* eine deutliche Erhöhung des intrazellulären ATP-Spiegels auftritt und diese nach fünf Minuten mit dem Zweieinhalbfachen ein Maximum erreicht. Allerdings ist kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und 6S RNA Mutante festzustellen, weder im Kurvenverlauf noch im Maximum. Als Folge des *upshift* wird das Transkriptionsmuster drastisch geändert, schließlich ändern sich die Mediumsbedingungen rasch und es muss auf eine Vielzahl von Parametern, vor allem auf das erhöhte Nährstoffangebot reagiert werden.

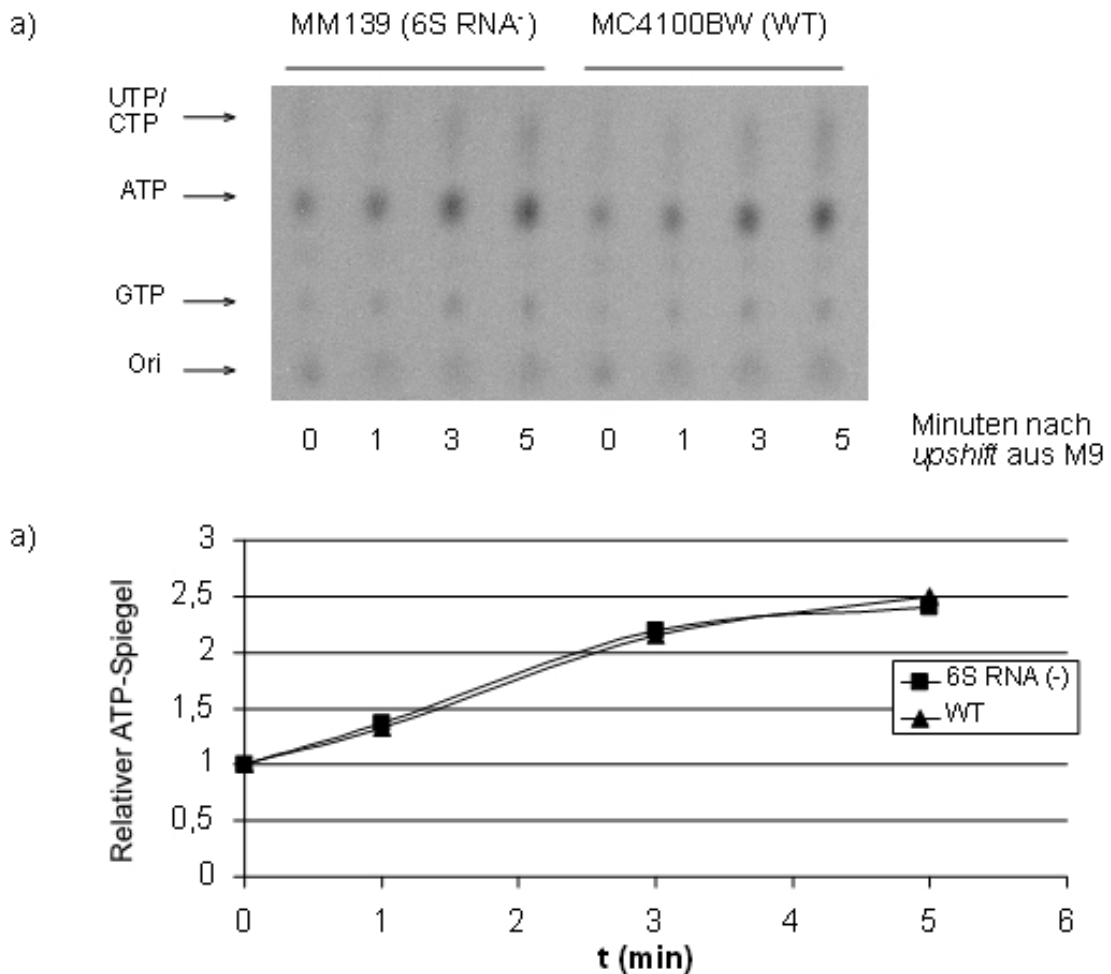


Abbildung 2.11 Einfluss der 6S RNA auf den intrazellulären NTP-Spiegel nach *nutritional upshift*

a) zeigt eine Dünnschichtchromatographie von radioaktiv markierten NTPs aus den Stämmen MM139 (6S RNA defizient) und MC4100BW (WT) nach Wachstum in M9-Minimalmedium und *nutritional upshift* mit 10-fach LB Medium (2 % Glukose). In **b)** ist der zeitliche Verlauf exemplarisch für ATP quantitativ ausgewertet.

Auch die 6S RNA ist durch die dnRNA-Synthese von dieser Umstellung betroffen. Um möglichen Funktionen der 6S RNA und/oder der dnRNA während des *upshift* zu offenbaren war also von besonderem Interesse, ob im Zuge dieser Umstellung Unterschiede in der Transkription zwischen 6S RNA Mutante und Wildtyp zu beobachten sind. Um dies zu analysieren wurden erneute Microarray Analysen, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, unternommen, diesmal unter Bedingungen des *nutritional upshift*. Die Analysen wurden wieder in Zusammenarbeit mit Dr. Tino Polen vom Institut für Biotechnologie II des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Zellanzucht und Medien waren wie oben beschrieben und es wurden zum Zeitpunkt 0, 3 und 10 Minuten nach Zugabe des 10-fach LB Mediums Zellen für Gesamt-RNA Isolation geerntet (5.2.2.2). Für die Analysen wurden je Stamm zwei unabhängige Zellkulturen einem *upshift* unterzogen. Zusätzlich zu den Proteinkodierenden Genen wurden diesmal auch Oligonukleotide zur Detektion der 6S RNA (*ssrS*), der Leaderregion der rRNA Operons und der 6S RNA-kodierten dnRNA auf den DNA-Chips

verwendet. Anders als bei den Microarray Analysen aus (Neußer, Polen *et al.* 2010), bei denen eine globale Auswertung der Daten erfolgte, wurde diesmal explizit der zeitliche Verlauf der mRNA-Verhältnisse, der bereits bekannten Kandidatengene aus den vorangegangenen Microarrays während des *upshift* beobachtet.

In Tabelle 2.1 ist eine repräsentative Übersicht über diese Gene gezeigt. Die gesamte Tabelle mit Standardabweichungen der Doppelbestimmung ist im Anhang zu finden (Tabelle 7.11). Von den selbst gewählten Oligos konnten für die ribosomalen Leaderregionen und die dnRNA keine verwertbaren Signale detektiert werden. Für die dnRNA scheint dies in der Aufreinigung der cDNA-Präparationen zu liegen, dabei werden freie Nukleotide und kleine Nukleinsäure-Fragmente abgetrennt (5.3.7.1). Für die rRNA Leaderregion ist der Grund jedoch unklar, möglicherweise ist durch die rasche Umstellung des Stoffwechsels die Halbwertszeit stark reduziert. Mit dem 6S RNA-spezifischen Primer ist ein Verhältnis von kleiner als 1:200 für Mutante zu Wildtyp zu erkennen, dies bestätigt das Fehlen der 6S RNA in der Deletionsmutante. Für die in Kapitel 2.1.4 als konstitutiv exprimiert beschriebene *rhoL* mRNA ist eine leichte Umkehr des Verhältnisses zwischen Mutante und Wildtyp zu beobachten. Vor dem *upshift* ist ca. 20% weniger Transkript in der Mutante nachweisbar, 5 min danach scheint kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp zu herrschen und nach 10 min wird geringfügig mehr exprimiert. Bei Standardabweichungen von 0,11/0,03 und 0,008 kann dies als signifikant angesehen werden. Mögliche Gründe dafür werden in der Diskussion näher erläutert (3.1.5). Für *guaD* ist sowohl vor Auslösen des *upshift* als auch 5 und 10 min danach ein erhöhtes mRNA Niveau in der Mutante festzustellen. Dies stimmt überein mit den Microarray Analysen für die exponentielle und frühstationäre Phase, auch dort war *guaD* in Abwesenheit der 6S RNA erhöht. In der stationären Phase war diese Erhöhung auch in vergleichbarer Stärke (2,8-fach). Es ist jedoch ein Trend zu erkennen, dass mit zunehmender Dauer des *upshifts* diese verstärkte Expression abnimmt.

Tabelle 2.1 Ausgewählte Gene mit auffälligen Änderungen im Expressionsniveau während des *nutritional upshift*

			Mittelwert der mRNA Level Mutante/WT		
Synonym	Gen	Beschreibung	Vor <i>upshift</i>	3 min nach <i>upshift</i>	10 min nach <i>upshift</i>
Eigene Oligonukleotide					
b2911	<i>ssrS</i>	noncoding 6S RNA	0,0028	0,0076	0,0048
b3782	<i>rhoL</i>	rho operon leader peptide	0,7833	0,9385	1,1282
Enzyme des Purinstoffwechsels					
b2883	<i>guaD</i>	guanine deaminase	3,6624	3,0752	2,2048
b0529	<i>fold</i>	bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	1,5717	1,4308	1,6522
Ribosomale Proteine					
b0911	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	0,7154	1,3813	1,6944
b3296	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	0,5431	1,0401	1,2726
b3230	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	0,5929	1,2058	1,9796
b3342	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	0,4191	1,2199	1,9097
b3165	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	0,9891	1,2624	1,6049
b1480	<i>sra</i>	30S ribosomal protein S22	0,6720	0,6417	0,9550
b1480	<i>sra</i>	30S ribosomal protein S22	0,9406	0,7990	1,4028
b3985	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	0,5839	0,8601	1,2302
b3310	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	0,5352	0,8344	1,2776
b2185	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	0,6753	1,1309	1,7565
b3312	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	0,5456	0,7432	1,0782
b1089	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	0,5634	1,1461	1,0128
b1717	<i>rpml</i>	50S ribosomal protein L35	1,0320	0,8678	1,3161
b3299	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	0,6545	0,9624	1,6006
Translationsfaktoren und rProtein modifizierende Enzyme					
b3980	<i>tufB</i>	protein chain elongation factor EF-Tu (duplicate of tufA)	0,7222	1,3584	1,7640
b1718	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	0,7903	1,1220	1,2528
b3339	<i>tufA</i>	protein chain elongation factor EF-Tu (duplicate of tufB)	0,6522	1,0307	1,5846
b0884	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	0,6590	1,0038	1,3064
b0852	<i>rimK</i>	ribosomal protein S6 modification protein	0,9581	1,3288	0,7533
b1066	<i>rimJ</i>	ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase	0,9693	1,0745	0,8893
b4373	<i>rimI</i>	ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase	1,1023	1,0080	1,0573
b4371	<i>rsmC</i>	16S ribosomal RNA m2G1207 methyltransferase	1,0788	0,9533	0,8949
b4371	<i>rsmC</i>	16S ribosomal RNA m2G1207 methyltransferase	1,1039	0,9382	1,0428
b1427	<i>rimL</i>	ribosomal-protein-L7/L12-serine acetyltransferase	0,6160	0,6262	0,6113
b3259	<i>prmA</i>	ribosomal protein L11 methyltransferase	0,9243	1,2530	1,4721
b2607	<i>trmD</i>	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	0,3732	0,8368	1,2156
b3651	<i>trmH</i>	tRNA (Guanosine-2'-O-)-methyltransferase	0,6037	1,0987	1,2083
RNA Polymerase Untereinheiten					
b3295	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0,5525	0,9999	1,7019
b3987	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0,3577	0,7544	1,1835
b3988	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	0,4047	0,4067	0,9841
b3649	<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	0,8284	1,3804	1,3373
b3067	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor D	0,6263	1,1615	1,1720
b2741	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor S	0,9315	1,0096	0,8174
b3461	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma factor H	1,5741	0,8897	1,1762
b3202	<i>rpoN</i>	RNA polymerase sigma factor N	0,8620	1,2606	0,9247
b2573	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma factor E	1,6642	1,1804	1,3859
b1922	<i>fliA</i>	RNA polymerase sigma factor F	0,6222	1,0727	1,1667
b4293	<i>fecl</i>	RNA polymerase sigma factor 19	0,7659	1,0805	0,7560

Für *fold* ist ein ähnliches Bild zu beobachten. Vor Zugabe des 10-fach Mediums ist ein erhöhtes Transkriptniveau in der Mutante festzustellen, das in der Stärke der Ausprägung ebenfalls vergleichbar ist mit den Microarray-Daten der stationären Phase (1,67-fach erhöht). Dieses Verhältnis bleibt im Verlauf des *upshifts* allerdings nahezu unverändert. Als

sehr auffällig zeigte sich, analog der ersten Transkriptomanalysen und der Primer Extension Analysen in Abbildung 2.3, erneut die Gruppe der ribosomalen Proteine. Mit wenigen Ausnahmen (*rpmL*, *rpsO*) sind nahezu sämtliche rProteine in der 6S RNA-Mutante reprimiert. Diese Tatsache und auch die Ausprägung des Effekts finden sich ebenfalls in den bisherigen Analysen der stationären Phase wieder.

Aufgrund des Wachstums üN in Minimalmedium ist der Zeitpunkt vor *upshift* einer stationären Phase sehr ähnlich und macht diese Beobachtungen, einer reduzierten Menge der mRNAs für rProteine, plausibel. Darüber hinaus zeigte sich für alle rProteine, dass die Expression in der Mutante im Verhältnis zum Wildtyp im Verlauf des *upshifts* ansteigt. Bei *rplY* (L25) zum Beispiel ist vor dem Auslösen in der Mutante ca. 1,5-fach weniger mRNA vorhanden, 5 min danach bereits 1,13-fach mehr und nach 10 min 1,76-fach mehr. Ein vergleichbares Verhalten zeigt *rpsO* (S15), zwar ist vor *upshift* kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und WT zu erkennen, aber im zeitlichen Verlauf ist in Abwesenheit der 6S RNA ein Anstieg im Verhältnis zum Wildtyp auf das 1,6-fache zu beobachten. Dazu passend ist für diverse Translationsfaktoren (*infA*, *infC*, *tufA*, *tufB*) das gleiche Verhalten zu erkennen. Dagegen ist für Enzyme, die rProteine modifizieren (*rimI*, *rimJ*, *rimK*, *rimL*), kein solcher Umschwung zu erkennen. Interessanterweise zeigen *trmD* und *trmH* im Verlauf auch eine übermäßig verstärkte Menge an mRNA im Verhältnis zum Wildtyp. Auch für die Gene des RNA Polymerase *core* Enzyms (*rpoB* und *rpoC*) sind in den vorangegangenen Microarrays verringerte mRNA-Mengen in der stationären Phase beobachtet worden. Übereinstimmend damit finden sich hier für alle Gene des *core* Enzyms (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC* und *rpoZ*) verringerte Expressionen vor *upshift*. Für *rpoA*, *rpoB* und *rpoC* ist dies teilweise darauf zurückzuführen, dass diese in ribosomalen Operons kodiert sind. Für *rpoZ* ist hingegen ein separater Promotor verantwortlich und auch das *upstream* gelegene Gen *gmk* steht nicht im Zusammenhang mit der Translation. Sämtliche Gene des RNAP *core* Enzyms zeigen im Verlauf des *upshifts* den gleichen Umschwung von verringert zu erhöht in der Mutante. Bemerkenswerterweise ist von allen Genen für Sigma-Faktoren nur für *rpoD*, dem Gen für den *housekeeping* Sigma-Faktor σ^{70} , das gleiche Verhalten der verstärkten Transkription in der Mutante zu beobachten.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass sowohl die Gene für die Translationmaschinerie als auch Gene für die Transkription der exponentiellen Phase Gene im Zuge des *upshifts* in der Mutante in Relation zum Wildtyp verstärkt exprimiert werden (siehe Diskussion).

2.2 Hfq, ein weiterer Interaktionspartner für 6S RNA

Hfq (*host factor required for phage Q β RNA replication*) aus *E. coli* (1.6) ist ein 102 Aminosäuren Protein mit einem Molekulargewicht von 11,2 kDa, das funktionell als Hexamer auftritt. Ursprünglich entdeckt als essentieller Faktor bei der Replikation des RNA-plus Stranges des Bakteriophagen Q β (Franze de Fernandez, Eoyang *et al.* 1968) ist inzwischen viel über seine Funktion als RNA Chaperon (Arluison, Hohng *et al.* 2007) und damit einhergehend, als Mediator der Interaktion von ncRNAs mit ihren Zielen bekannt (Valentin-Hansen, Eriksen *et al.* 2004). Lange Zeit war nur die RNA-Polymerase als zellulärer Interaktionspartner für 6S RNA bekannt, erst in jüngster Zeit wurde auch eine Interaktion zu Hfq gezeigt (Windbichler, von Pelchrzim *et al.* 2008). Es ist bekannt, dass Hfq bevorzugt an A/U-reiche Regionen bindet, die benachbart zu gepaarten Stammregionen liegen (Brescia, Mikulecky *et al.* 2003; Moll, Afonyushkin *et al.* 2003). In der veröffentlichten Sekundärstruktur der 6S RNA trifft dieses Kriterium auf die zentrale Blase zu und zeigt damit gute Bindemotive für Hfq (1.7.1). In Abbildung 2.10 ist zu sehen, dass in einem Hfq Deletionsstamm in der stationären Wachstumsphase eine verringerte Menge an 6S RNA zu finden ist. Zusammen mit der bereits gezeigten Interaktion von Hfq und 6S RNA ergab sich daraus die Frage, ob Hfq Einfluss auf die 6S RNA-abhängige Funktion hat und dies möglicherweise auch die intrazelluläre Konzentration der 6S RNA beeinflusst.

2.2.1 Hfq bindet an 6S RNA

Als erstes wurde die Bindung von Hfq an 6S RNA mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) verifiziert (5.3.3). In einem Ansatz wurden 15 nM 6S RNA mit steigenden Konzentrationen Hfq versehen und 10 min bei 30°C inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da auch der Einfluss von Hfq auf die Bindung von 6S RNA an die RNAP untersucht werden sollte und *in vitro* Reaktionen mit der RNAP i.d.R. bei 30°C durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde der Reaktionspuffer für die RNAP (80 mM KGlu) als Bindepuffer gewählt. Abbildung 2.12 zeigt das Ergebnis einer solchen Gelretardierung. Um unspezifische Wechselwirkungen abzufangen wurde nach der Komplexbildung bei 30°C Heparin (Endkonzentration 100 ng/ μ l) zugegeben. Dabei war es unerheblich, ob Heparin nachträglich zugegeben wurde oder bereits bei der Komplexbildung vorlag (Daten nicht gezeigt). Man erkennt, dass bereits bei 1 μ M Hfq eine deutliche Komplexbande (6S RNA~Hfq I) auftritt. Diese nimmt bei 2 μ M an Stärke zu, während gleichzeitig ein zweiter Komplex erscheint (6S

RNA~Hfq II). Mit steigender Menge Hfq nimmt Komplex I ab und Komplex II zu. Vermutlich existieren zwei unabhängige Bindestellen für Hfq, die mit unterschiedlicher Affinität besetzt werden. Anhand der quantitativen Auswertung lässt sich eine apparente Bindekonstante von 2,4 μM für das Monomer, respektive 400 nM für das Hexamer bestimmen. Angesichts der Tatsache, dass die intrazelluläre Konzentration von Hfq Hexameren bei ca. 1,6 μM liegt, ist dies im physiologischen Bereich (Vassilieva Iu and Garber 2002).

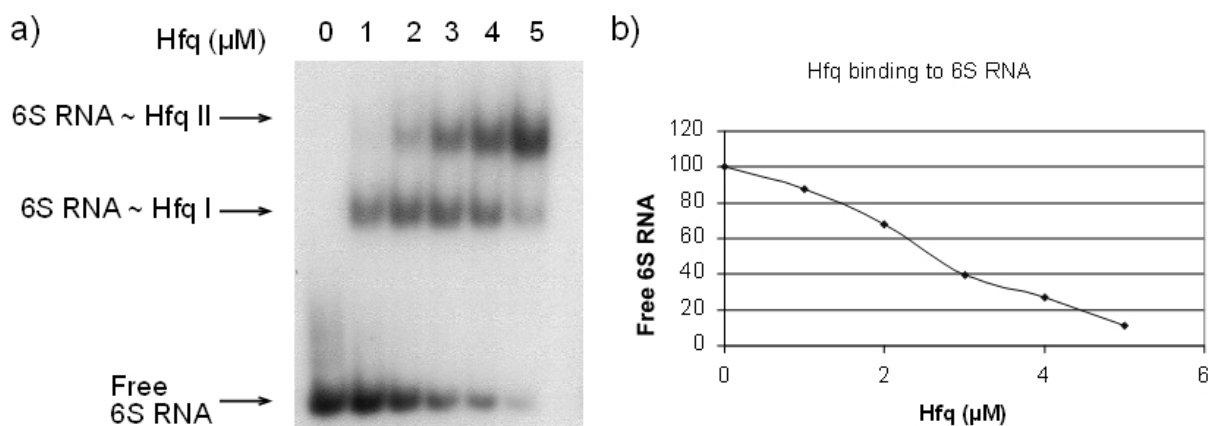


Abbildung 2.12 Interaktion von Hfq aus *E. coli* mit 6S RNA aus *E. coli*

In a) ist das Autoradiogramm einer Gelretardierung (5 % native PAGE) von 6S RNA (15 nM) mit steigenden Konzentrationen Hfq gezeigt. Die oberhalb der Spuren angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Hfq-Monomer. Die Positionen der freien 6S RNA sowie zweier spezifischer Hfq Komplexe sind seitlich markiert. Die quantitative Auswertung in b) zeigt, dass bei 2,4 μM Hfq 50 % der RNA komplexiert sind.

2.2.2 Hfq stört die Komplexbildung zwischen 6S RNA und RNA Polymerase

Aufgrund der eindeutigen Interaktion von Hfq mit 6S RNA wurde untersucht, inwieweit dadurch die Wechselwirkung von 6S RNA mit der RNA Polymerase beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls Retardierungsanalysen, wie oben beschrieben, durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Anordnungen gewählt. Zum einen Präinkubation von 6S RNA und RNAP mit anschließender Zugabe von Hfq und zum anderen simultane Zugabe aller Reaktionskomponenten und gleichzeitige Inkubation. In Abbildung 2.13 ist ein Autoradiogramm dieser Analysen gezeigt. In (A) wurden zunächst 15 nM 6S RNA und 15 nM RNAP für 10 min bei 30°C inkubiert, anschliessend wurden die angegebenen Mengen Hfq dazu gegeben und erneut für 10 min bei 30°C inkubiert. In (B) wurden Hfq und RNAP gleichzeitig zur 6S RNA gegeben und zur Komplexbildung für 10 min bei 30°C inkubiert. Freie 6S RNA (15 nM) mit und ohne 4 μM Hfq wurden als Kontrolle in (C) aufgetragen. Bei

bereits gebildeten 6S RNA~RNAP Komplexen haben auch hohe Konzentrationen Hfq nahezu keinen Einfluss, es wird lediglich freie 6S RNA gebunden und die Komplexmengen für 6S RNA~Hfq erreichen nicht das Niveau wie bei 6S RNA und 4 μ M Hfq in (C). Bei simultaner Zugabe von Hfq und RNAP ist eine deutliche Abnahme der 6S RNA~RNAP Komplexe, bei gleichzeitiger Zunahme der 6S RNA~Hfq Komplexe zu erkennen. Diese erreichen auch etwa das Niveau wie bei alleiniger Hfq Zugabe. Hfq ist also in einer Kompetition mit RNAP in der Lage die Bindung der RNAP an 6S RNA zu inhibieren, kann aber bereits gebildete 6S RNA~RNAP Komplexe unter den Versuchsbedingungen nicht auflösen.

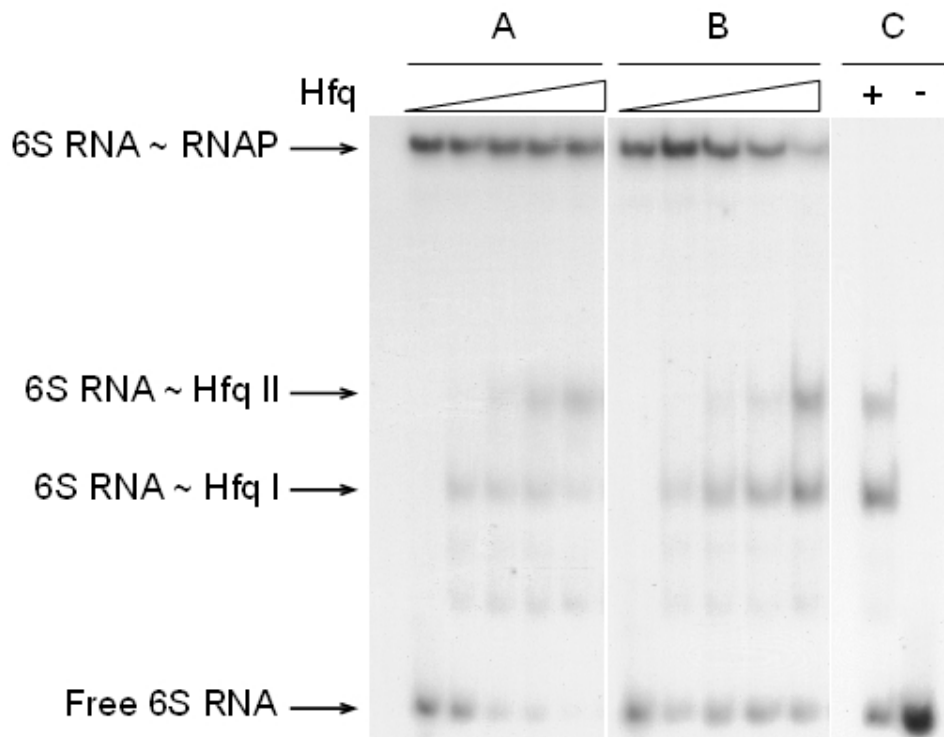


Abbildung 2.13 Einfluss von Hfq auf die Komplexbildung von 6S RNA und RNA Polymerase

Autoradiogramm nach Gelretardierung mittels 5 %iger nativer PAGE. Die Reihenfolge der Hfq Zugabe (0/1/2/3/4 μ M) wurde variiert. (A) Komplexe aus 15 nM 6S RNA und 15 nM RNAP wurden vor der Addition von Hfq gebildet. (B) simultane Zugabe von Hfq und RNAP zur 6S RNA. (C) freie 6S RNA (-) und 6S RNA zusammen mit 4 μ M Hfq (+) als Kontrolle.

2.2.3 Einfluss von Hfq auf die *in vitro* Transkriptionshibierung durch 6S RNA

Nachdem gezeigt wurde, dass Hfq die Interaktion der RNAP mit 6S RNA stören kann, sollte überprüft werden, ob dies auch funktionell Einfluss auf die Transkriptionshibierung durch 6S RNA hat. Denkbar wäre eine verminderte Inhibierung in Gegenwart von Hfq. Um dies zu analysieren wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen (5.2.7.7), wie in Abbildung 2.1

gezeigt, durchgeführt, diesmal jedoch zusätzlich mit steigenden Mengen Hfq. Als *Template* wurde wieder der Multipromotor-Vektor pSH666-2 (4.2.2) verwendet und auch die Reaktionsbedingungen waren analog. Vergleichbar mit den oben gezeigten Retardierungen wurden zwei verschiedene Reihenfolgen für die Zugabe von Hfq gewählt, simultan mit und 10 min nach Zugabe der RNAP.

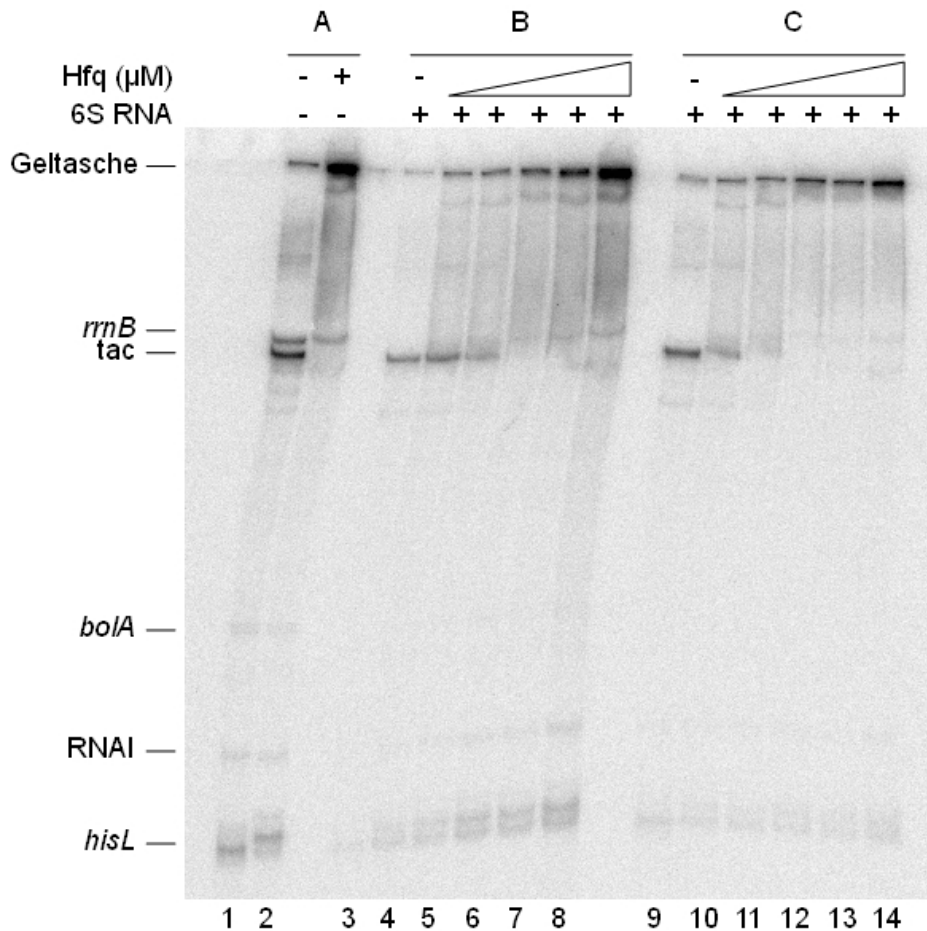


Abbildung 2.14 Hfq unterbindet die 6S RNA-abhängige Inhibierung bei der *in vitro* Transkription

Gezeigt ist ein Autoradiogramm nach IVT mit 5 nM Multipromotor-Vektor (pSH666-2), 15 nM RNAP, 300 nM 6S RNA und steigenden Hfq-Konzentrationen (1/2/3/4/5 μM). In (A) ist die Reaktion ohne 6S RNA, aber mit (+) und ohne (-) 5 μM Hfq gezeigt. Die spezifischen Transkriptionsprodukte der verschiedenen Promotoren sind seitlich markiert. (B) RNAP und Hfq wurden zeitgleich zum Reaktionsansatz gegeben und die Reaktion nach 10 min durch Zugabe von NTPs gestartet. (C) Hfq Addition 10 min nach Bildung der Initiationskomplexe aus RNAP und *Template*, bzw. RNAP und 6S RNA. Nach erneuter Inkubation für 10 min Start der Reaktion durch NTP-Zugabe.

In Abbildung 2.14 ist das Autoradiogramm einer solchen IVT nach 15 % dPAGE (5.2.3.2) gezeigt. In (A) ist die Auswirkung von Hfq allein auf die Transkription zu sehen. Es fallen zwei Effekte auf. Für den *rrnB* Promotor ist eine leichte Inhibierung zu beobachten und für das *tac*-Transkript ist scheinbar keine Bande mehr vorhanden, dafür verstärkt Produkte in den Geltaschen (Spur 2). Für den *rrnB* Promotor ist bekannt, dass hohe Kationen-Konzentrationen

die Transkription inhibieren (Gourse 1988). Hfq liegt in einem Puffer vor, der 200 mM NaCl enthält (5.2.5.3). Es gelangt folglich mit Hfq auch noch zusätzlich Salz in den Reaktionsansatz. Die leichte Inhibierung (Spur 2) ist demnach nicht auf Hfq, sondern auf einen Ionen-Effekt zurückzuführen. Der *tac* Promotor ist dagegen als nicht Salz-sensitiv beschrieben (Heinemann and Wagner 1997). Die gleichzeitige Zunahme von Produkten in der Auftragstasche mit der Abnahme der *tac* Transkripte lässt zwei Vermutungen zu. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Hfq während der Transkription an das Transkript bindet und die Termination verhindert. Somit hätten die Transkripte eine undefinierte Länge und laufen deshalb nicht ins Gel ein. Zum anderen könnte Hfq als RNA-bindendes Protein an das *tac*-Transkript binden und somit eine Verzögerung im Gel verursachen. Durch eine Phenol-Chloroform Extraktion nach der Reaktion konnte dies bestätigt werden (Abbildung 2.15). Für die restlichen Promotoren ist ebenfalls eine minimale Inhibition durch Hfq, bzw. den salzhaltigen Puffer zu beobachten.

In (B) wurde analog zu Abbildung 2.13 (B) Hfq gleichzeitig mit der RNAP dem Reaktionsansatz hinzugefügt und konnte um die Bindung der Polymerase an 6S RNA konkurrieren. Ohne Hfq erkennt man deutlich die Transkriptionsinhibierung aller Promotoren durch 6S RNA (Spuren 1 und 3). Mit steigenden Mengen Hfq nimmt diese Inhibierung ab. Besonders gut ist das für den *hisL* und RNAI Promotor zu erkennen, dort erreicht die Transkriptmenge nahezu das Niveau, wie in Abwesenheit der 6S RNA (Spuren 4-8 im Vergleich mit Spur 1). Das Hfq-gebundene *tac*-Transkript zeigt bei höchster Hfq-Konzentration auch eine Bandenstärke, die derjenigen ohne 6S RNA entspricht (Spur 2 und 8). Für den *rrnB* Promotor ist die aufgehobene Inhibierung ebenfalls zu beobachten, jedoch ist die Bande durch das Schmieren des retardierten *tac*-Transkripts nur undeutlich zu erfassen. Der *bolA* Promotor ist generell ein relativ schwacher Promotor und wird noch durch 6S RNA zusätzlich inhibiert. In (C) wurde Hfq erst nach Vorinkubation der RNAP mit dem *Template* und der 6S RNA der Reaktion hinzugefügt. Unter diesen Bedingungen ist Hfq, ähnlich wie bei den Retardierungen aus Abbildung 2.13, nicht in der Lage die Inhibierung durch 6S RNA aufzuheben. Es sind allenfalls bei 5 μ M Hfq in Spur 14 minimal stärkere Banden zu beobachten. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass Hfq in der Lage ist die Transkriptionsinhibierung durch 6S RNA *in vitro* zu unterbinden, bzw. abzuschwächen.

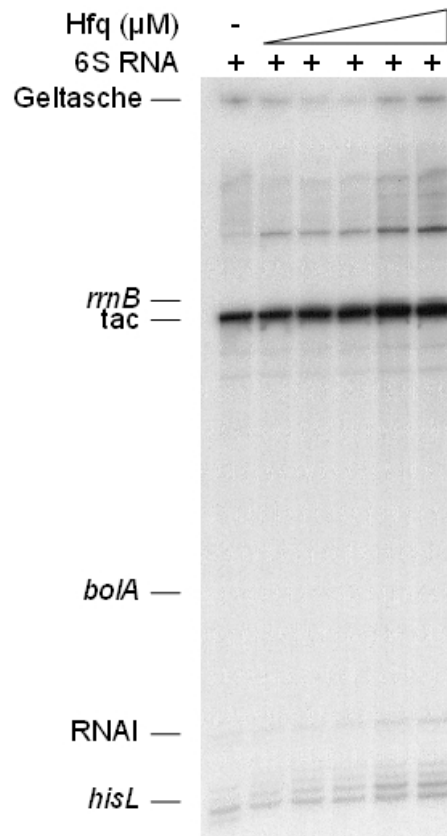


Abbildung 2.15 *In vitro* Transkription in Gegenwart von 6S RNA und steigenden Konzentrationen Hfq nach einer Phenol-Chloroform Extraktion. Zu sehen ist das Autoradiogramm einer IVT mit 5 nM Multipromotor-Vektor (pSH666-2), 15 nM RNAP, 300 nM 6S RNA und steigenden Konzentrationen (1/2/3/4/5 μM) nach 15 % dPAGE. Vor dem Gellauf wurden die Proben mit Phenol-Chloroform extrahiert und Ethanol gefällt um sämtliche Proteine zu entfernen.

2.2.4 Spezifische Bindung von Hfq an die 6S RNA-kodierte dnRNA

Wie in den Kapiteln 1.7 und 2.1.9 beschrieben, wird *in vivo* nach einem *nutritional upshift* in einer ungewöhnlichen Reaktion die 6S RNA als *Template* für die *de novo* Synthese einer kurzen RNA von 14-20 NT genutzt. Diese dnRNA, manchmal wenig anschaulich auch pRNA (*product* RNA) genannt, lässt sich *in vitro* durch den Einsatz hoher NTP-Konzentrationen synthetisieren (Wassarman and Saecker 2006; Gildehaus, Neusser *et al.* 2007; Wurm, Neußer *et al.* 2010). Aufgrund der Bindung von Hfq an 6S RNA und der Fähigkeit 6S RNA~RNAP Interaktion zu stören war von Interesse, ob auch die Synthese der dnRNA in Anwesenheit von Hfq verändert ist. Bei dem Versuch dnRNA in Gegenwart von Hfq zu synthetisieren zeigte sich jedoch nach dPAGE ein ähnliches Phänomen, wie für die *tac*-Transkripte beobachtet (Abbildung 2.14). Es waren nur verschmierte Produktbanden zu beobachten und der Hauptteil der Produkte verblieb in den Probentaschen (Daten nicht gezeigt). Dies wies darauf hin, dass Hfq auch die 6S RNA kodierte dnRNA binden kann. Um diesen unerwarteten Effekt zu

überprüfen wurden erneut Retardierungsanalysen durchgeführt, diesmal mit radioaktiv markierter dnRNA. Bei der eingesetzten dnRNA handelte es sich um synthetische RNA-Oligonukleotide mit dnRNA-Sequenz, die kommerziell bezogen wurden. Es wurden 15 nM dnRNA, am 5'-Ende radioaktiv markiert (5.2.7.5), mit steigenden Mengen Hfq in Gegenwart von 80 mM KGlu für 10 min bei 30°C inkubiert und anschliessend auf einer 5 %igen nativen PAGE getrennt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen somit exakt den Bindungsanalysen und IVTs von 6S RNA mit Hfq und RNAP. Da für Hfq bekannt ist, dass bevorzugt A/U-reiche Regionen gebunden werden (Senear and Steitz 1976; de Haseth and Uhlenbeck 1980; de Haseth and Uhlenbeck 1980), wurden ebenfalls DNA- und RNA-Oligos mit verschiedenen A/U, bzw. A/T-Gehalten getestet. Das Ergebnis der Analysen ist in Abbildung 2.16 gezeigt. Aufgrund der geringen Länge der Oligonukleotide, dem relativ hohen Salzgehalt und der niedrigen Prozentigkeit des PAA-Gels trennen die Banden der freien Oligonukleotide nicht sehr gut auf. Eine Überprüfung der Oligonukleotide erfolgte mittels einer separaten dPAGE (Daten nicht gezeigt).

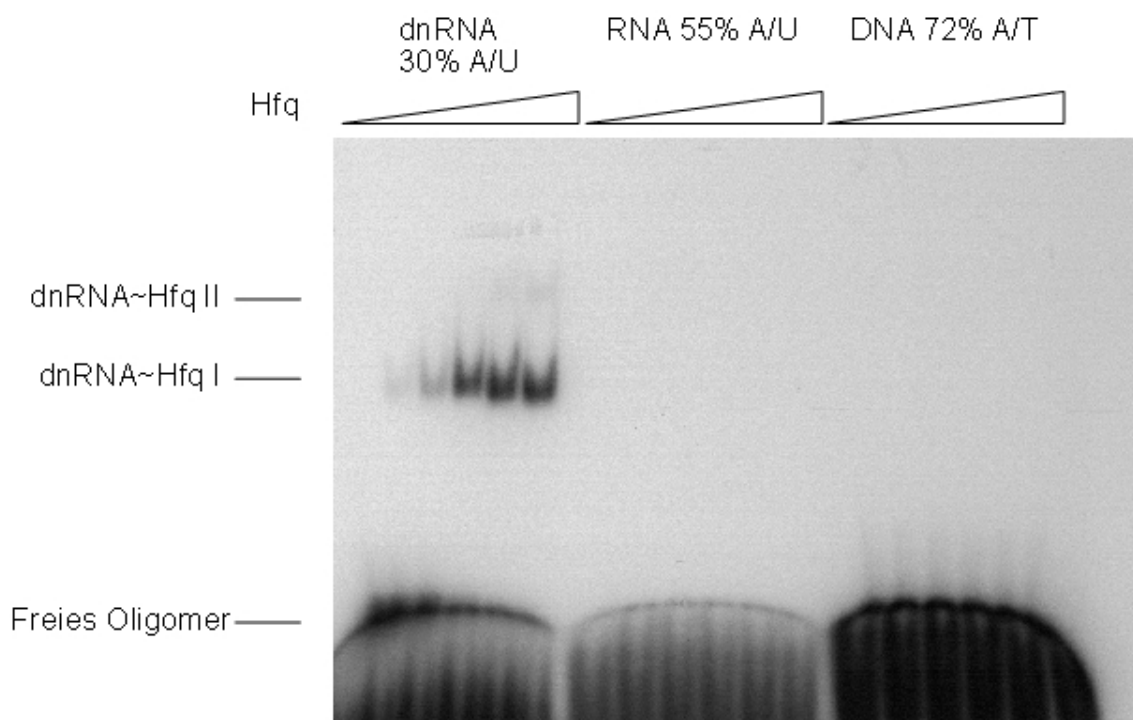


Abbildung 2.16 Hfq bindet mit hoher Affinität und Spezifität 6S RNA-spezifische dnRNA

Gezeigt ist das Autoradiogramm einer Retardierungsanalyse auf einem nativen 5 % PAA-Gel. Es wurden je 15 nM radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit steigenden Mengen Hfq (0,1/0,2/0,5/1 und 2 μ M) bei 80 mM KGlu zur Komplexbildung inkubiert. Links: dnRNA (20 NT) mit einem A/U-Gehalt von 30%, mitte: synthetisches zufälliges RNA-Oligomer mit 55% A/U (5'-P-adapt RNA, 18 NT), rechts: rhoL2 DNA-Oligomer mit 72 % A/U (29 NT). Die Laufweiten der freien Oligomere, bzw. Hfq-Komplexbanden sind seitlich markiert.

Auf der linken Seite ist die Bindung von Hfq an dnRNA zu sehen. Bereits bei 100 nM Hfq ist eine Komplexbande zu erkennen, bei 500 nM Hfq ist mehr als 50 % der dnRNA komplexiert und es ist eine schwache, zweite Komplexbande zu sehen. Oberhalb von 1 μ M ist keine freie dnRNA mehr zu beobachten. Sowohl bei dem RNA-Oligonukleotid in der Mitte (5'P-Adapt RNA mit 18 NT) als auch bei dem DNA-Oligo mit hohem A/T-Gehalt (rhoL2-Oligo mit 29 NT) sind keinerlei Hfq-Komplexe zu sehen. Neben diesen drei Oligonukleotiden wurden noch andere RNA-Oligos mit A/U-Gehalten von 38-65 % und ein DNA-Oligo mit dnRNA-Sequenz getestet, bei keinem ließen sich unter den gleichen Bedingungen Komplexe mit Hfq identifizieren.

Hfq bindet also mit hoher Spezifität und Affinität ($K_D < 100$ nM für das Hexamer) an das 6S RNA-spezifische *de novo* Transkript.

2.2.5 Einfluss von Hfq auf die Synthese von 6S RNA kodierter dnRNA

Da mit der gezeigten Bindung von Hfq an dnRNA die Ursache geklärt war, warum in den *in vitro* Transkriptionen mit 6S RNA als *Template* keine Produkte detektiert werden konnten, wurden diese wiederholt. Im Grunde handelt es sich bei der dnRNA Synthese um die gleiche *in vitro* Transkription, wie in mehreren vorigen Kapiteln beschrieben. Der Ablauf war daher analog, RNAP und Hfq wurden zeitgleich in den Reaktionsansatz gegeben. Da jedoch die dnRNA-Synthese nicht so effektiv ist wie eine Promotor-gesteuerte Transkription und *in vitro* erst bei höheren NTP-Konzentrationen gute Ausbeuten liefert (Wurm, Neußer *et al.* 2010) wurden die Konzentrationen der Reaktionspartner angepasst. So wurde 50 nM RNAP verwendet und statt 65 μ M der nicht radioaktiven NTPs wurden 300 μ M NTPs verwendet. Der wesentliche Unterschied bei dieser IVT war das *Template*, als einziges mögliches *Template* wurde 300 nM 6S RNA angeboten. Analog der in Abbildung 2.15 gezeigten IVTs wurden die Ansätze vor der Trennung auf einer 15 %igen dPAGE einer Phenol-Chloroform Extraktion und anschliessender Ethanolfällung unterzogen um das Hfq zu entfernen. Abbildung 2.17 zeigt ein Autoradiogramm der dnRNA Synthese. In Spur 2 und 3 ist die dnRNA-Synthese ohne Hfq, aber einmal ohne (2) und einmal mit dem Hfq-Aufbewahrungspuffer (3) zu sehen. Man erkennt eine Verschiebung zu etwas kürzeren Transkriptionsprodukten, vermutlich ein Salzeffekt wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, aber keine ausgeprägte Inhibierung oder Aktivierung. In den Spuren 4-7 lagen im Reaktionsansatz steigende Mengen Hfq (0,1-1 μ M) vor. Es ist bei keiner Konzentration ein Effekt auf die Menge an dnRNA, weder Erhöhung noch Verminderung zu beobachten. Die Tatsache, dass

durch die Hfq-Bindung theoretisch weniger 6S RNA als *Template* zur Verfügung steht (siehe Abbildung 2.13), aber dennoch keine verminderte *de novo* Synthese zu beobachten ist, lässt die Vermutung zu, dass Hfq die Synthese zwar begünstigt, dies aber durch die verminderte *Template*-Menge kompensiert wird.

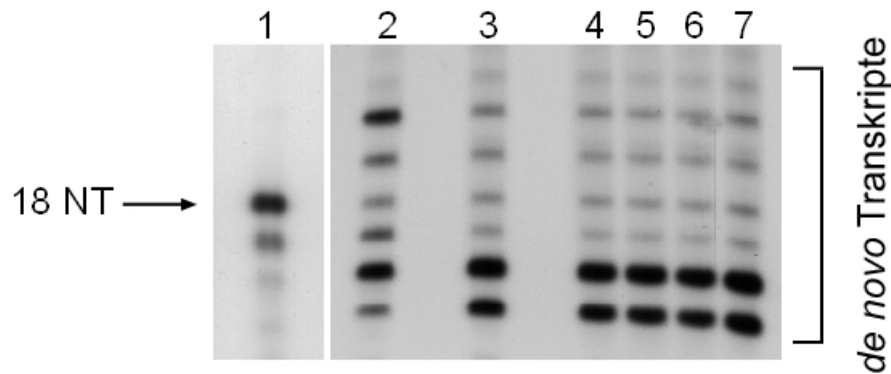


Abbildung 2.17 6S RNA-basierte dnRNA Synthese in Gegenwart von Hfq

Zu sehen ist eine IVT mit 50 nM RNAP und 300 nM 6S RNA als einziges *Template* und steigenden Mengen Hfq. In Spur 1 ist ein synthetisches 18mer als Längenmarker gezeigt. Spur 2 enthielt kein Hfq und auch keinen Hfq-Proteinpuffer (GF-Puffer). Die Spuren 3-7 enthielten 0/0,1/0,2/0,5 und 1 μ M Hfq. Die Ansätze wurden vor der Trennung mittels 15 %iger dPAGE einer Phenol-Chloroform Extraktion und anschließend einer Ethanolfällung unterzogen.

2.2.6 Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe in Gegenwart von Hfq

Die Analysen im vorigen Kapitel lassen vermuten, dass Hfq *in vitro* keinen Einfluss auf die Menge an gebildeter dnRNA hat. In Anbetracht der inhibierten Bindung von 6S RNA an die RNAP in Gegenwart von Hfq und der starken Affinität von Hfq zur dnRNA war dieses Ergebnis etwas unerwartet. Unter Umständen sorgt Hfq nicht für vermehrte Synthese von dnRNA, sondern beschleunigt diese und damit den Zerfall der 6S RNA~RNAP Komplexe. Diese Möglichkeit wurde mit Retardierungsanalysen in Gegenwart hoher NTP-Konzentrationen untersucht (5.3.3). In (Wurm, Neußer *et al.* 2010) wurde mit dieser Methode bereits gezeigt, dass vorinkubierte Komplexe aus 6S RNA und RNAP nach Zugabe hoher NTP-Konzentrationen zerfallen und neben freier RNA auch Komplexe aus 6S RNA mit der *de novo* synthetisierten dnRNA entstehen. Es handelt sich dabei um eine *in vitro* Simulation des *nutritional upshift*. Im vorliegenden Fall wurden zunächst 15 nM 6S RNA

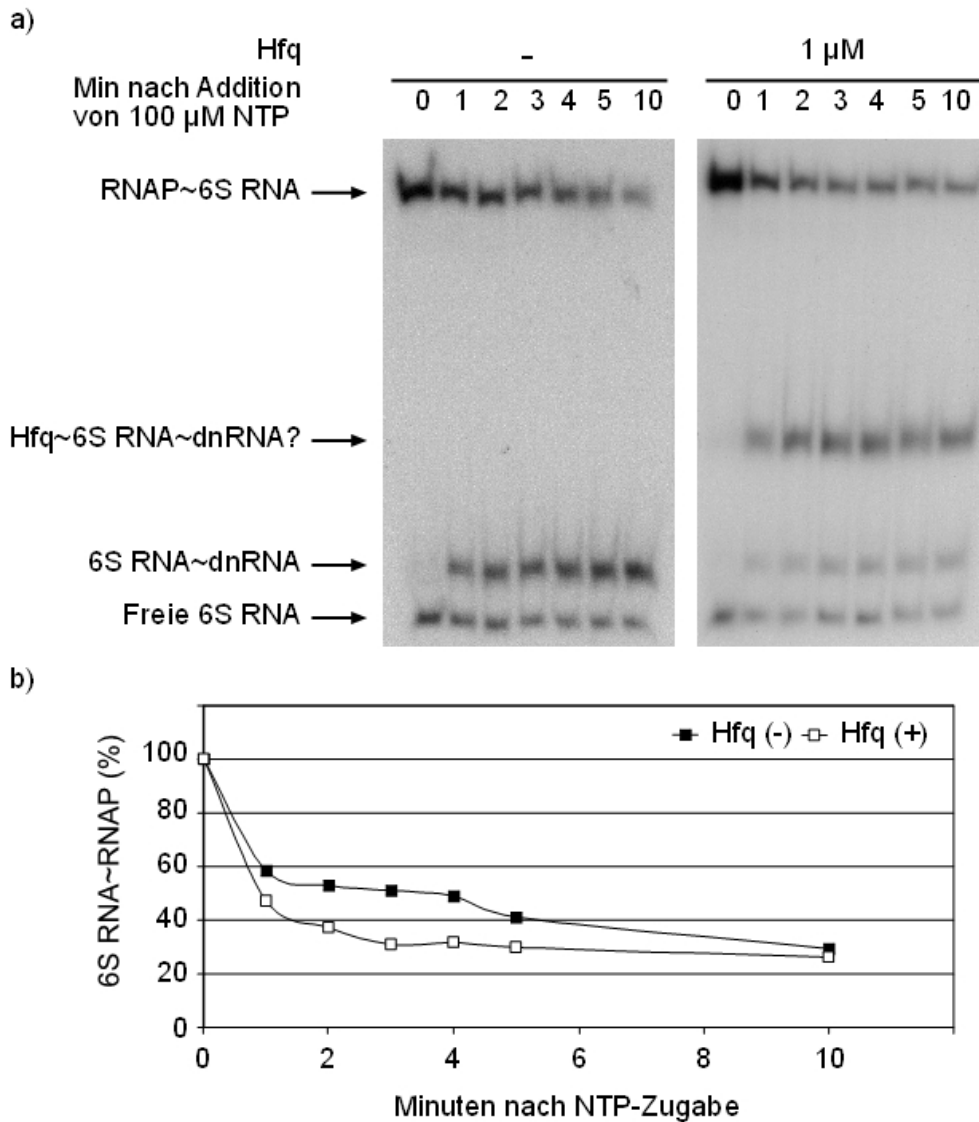


Abbildung 2.18 Wirkung von Hfq auf den zeitabhängigen Zerfall der 6S RNA~RNAP Komplexe nach NTP-Zugabe a) zeigt das Autoradiogramm einer Retardierungsanalyse der Komplexe von 6S RNA (15 nM) und RNAP (50 nM) nach NTP-Zugabe und der An- bzw. Abwesenheit von 1 μ M Hfq. Vorgebildete 6S RNA~RNAP Komplexe wurden mit Hfq versehen und im Anschluss erfolgte die Addition von 100 μ M NTPs. Nach den angegebenen Zeitabständen wurden Aliquots mit 50 mM EDTA versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Komplexe bzw. freie RNA sind seitlich angegeben. In b) ist die quantitative Auswertung der verbleibenden RNAP~6S RNA Komplexe gezeigt.

und 50 nM RNAP in 80 mM KGlu für 10 min bei 30°C zur Komplexbildung vorinkubiert. Anschliessend wurde der Reaktionsansatz geteilt und zu einer Hälfte 1 μ M Hfq hinzugefügt, die andere Hälfte wurde mit der entsprechenden Menge des Hfq-Aufbewahrungspuffers supplementiert um die Salzbedingungen auszugleichen. In Kapitel 2.2.2 wurde bereits gezeigt, dass Hfq bei dieser Reihenfolge der Zugabe keinen Einfluss auf die 6S RNA~RNAP Komplexe hat. Zu beiden Ansätzen wurde dann ein 4NTP-Mix (Endkonzentration 100 μ M) zugegeben und die Reaktion in Abständen von 0/1/2/3/4/5 und 10 min durch EDTA (Endkonzentration 50 mM) abgestoppt. EDTA komplexiert das im KGlu-Puffer enthaltene Magnesium, welches die RNAP für aktive Transkription benötigt und

beendet damit die Synthese der dnRNA. Anschliessend wurden die Ansätze auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel getrennt und autoradiographiert. In Abbildung 2.18 a) ist das Autoradiogramm gezeigt. Auf der linken Seite ist der zeitliche Verlauf des Komplexzerfalls ohne Hfq zu sehen. Bereits nach einer Minute ist die Menge an 6S RNA~RNAP Komplexen deutlich reduziert. Im gleichen Verhältnis taucht ein zusätzlicher Komplex oberhalb der freien 6S RNA auf. Dabei handelt es sich um ein Hybrid aus 6S RNA und dnRNA, das sich durch die volle Komplementarität der dnRNA zur 6S RNA bildet. In Gegenwart von 1 μ M Hfq ist ebenfalls bereits nach einer Minute eine deutliche Abnahme der 6S RNA~RNAP Komplexe zu beobachten und das 6S RNA~dnRNA Hybrid wird sichtbar. Allerdings entspricht die Menge dieses Hybrids nicht der Abnahme der 6S RNA~RNAP Komplexe, zusätzlich erscheint eine Bande mittig im Gel. Diese Bande nimmt im zeitlichen Verlauf zu. Ob es sich bei dieser Bande um Komplexe aus freigewordener 6S RNA und Hfq oder um ternäre Komplexe mit dnRNA zusammen handelt, ist an dieser Stelle unklar und wurde separat analysiert. Anhand der quantitativen Auswertung der verbleibenden Mengen 6S RNA~RNAP Komplexe in **b)** ist zu erkennen, dass nach zehn Minuten etwa gleich viele Komplexe zerfallen sind. Die Geschwindigkeit des Zerfalls ist jedoch in Gegenwart von Hfq höher. So sind nach etwa einer Minute bereits 50 % der 6S RNA~RNAP Komplexe dissoziiert, ohne Hfq ist dies erst nach ca. drei Minuten der Fall. Hfq beschleunigt daher offenbar den Komplexzerfall *in vitro* unter *upshift* Bedingungen.

2.2.7 Hfq bindet an 6S RNA~dnRNA Hybride

Im vorigen Kapitel war zu beobachten, dass *in vitro* nach einer durch NTP-Zugabe ausgelösten Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe in Gegenwart von Hfq neben den 6S RNA~dnRNA Hybriden ein unbekannter Komplex auftaucht. Um Informationen darüber zu erhalten, ob es sich dabei um binäre Komplexe aus freigewordener 6S RNA und Hfq oder um ternäre Komplexe mit dnRNA zusammen handelt, wurden Bindungsanalysen von 6S RNA~dnRNA Komplexen mit Hfq durchgeführt. Dazu wurde zunächst in einem Bindungs-Prämix 15 nM 5'-endmarkierte dnRNA (5.2.7.5) mit 6S RNA auf 70°C erhitzt und anschliessend langsam (1°C/min) auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei schmilzt die Sekundärstruktur der 6S RNA auf und die dnRNA kann sich an ihre komplementäre Region anlagern, aufgrund der vollständigen Komplementarität ist diese Hybridisierung sehr effizient.

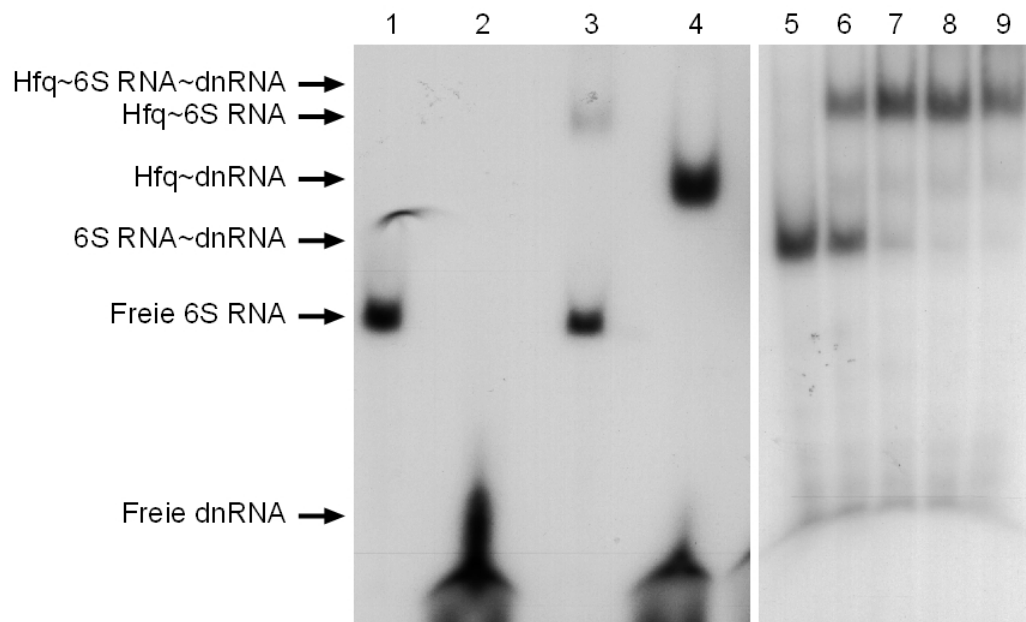


Abbildung 2.19 Ternärer Komplex aus 6S RNA, dnRNA und Hfq

Gezeigt ist das Autoradiogramm einer Retardierungsanalyse von 15 nM 6S RNA~dnRNA Komplexen mit steigenden Konzentrationen Hfq in den Spuren 5-9 (0/0,5/1/3/5 µM). In den Spuren 1-4 wurden verschiedene Größenmarker aufgetragen. 1 und 3: 3'-endmarkierte 6S RNA ohne (1) und mit (3) 1 µM Hfq. 2 und 4: 5'-endmarkierte dnRNA ohne (2) und mit (4) 1 µM Hfq. Die freien RNAs und Hfq-spezifischen Komplexe sind mit Pfeilen markiert.

Der Prämix enthielt neben 80 mM KGlu auch Heparin (Endkonzentration 100 ng/µl), um unspezifische Wechselwirkungen abzufangen. Anschliessend wurden aus diesem Prämix Aliquots zu den gewünschten Hfq-Konzentrationen gegeben und zur Komplexbildung 5 min bei 30°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte mittels einer 5 %igen nativen PAGE (5.3.3). Das Ergebnis nach Autoradiographie ist in Abbildung 2.19 gezeigt. Um die Zuordnung zu erleichtern wurden neben ungebundener dnRNA auch dnRNA zusammen mit Hfq sowie freie und Hfq-gebundene 6S RNA aufgetragen. In Spur 5, ohne Hfq, erkennt man, dass die Hybridisierung von dnRNA und 6S RNA nahezu vollständig ist. Bereits bei 0,5 µM Hfq in Spur 6 ist ein *Shift* des 6S RNA~dnRNA Hybrids zu erkennen. Die Bande läuft deutlich höher als dnRNA im Komplex mit Hfq (Spur 4) und geringfügig höher als der 6S RNA~Hfq Komplex (Spur 3). Es handelt sich also offenbar um eine Bindung von Hfq an das 6S RNA~dnRNA Hybrid. Mit steigender Hfq-Konzentration nimmt der ungebundene 6S RNA~dnRNA Komplex weiter ab und bei 5 µM Hfq sind sämtliche 6S RNA~dnRNA Komplexe gebunden. Zusätzlich ist ab 0,5 µM Hfq schwach eine weitere Komplexbande zu erkennen, die auf der Höhe der dnRNA~Hfq Komplexe läuft. Mit steigender Hfq-Menge nimmt diese jedoch nicht zu.

In Abbildung 2.18 sind diese Komplexe nicht zu detektieren, da dort 6S RNA und nicht die dnRNA radioaktiv markiert ist. Hfq bindet demnach auch 6S RNA~dnRNA Hybride und kann sie in geringem Maße auflösen.

2.2.8 Hfq erhöht die Flexibilität der zentralen Blase der 6S RNA

Um mechanistische Informationen darüber zu erhalten, warum die Komplexdissoziation von 6S RNA und RNAP in Gegenwart von Hfq beschleunigt wird, wurden Strukturanalysen der 6S RNA in Gegenwart von Hfq durchgeführt. Dazu wurde eine relativ neue Methode namens SHAPE (*Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) verwendet (Mortimer and Weeks 2008). Bei dieser Methode wird zuerst die 2'-OH Gruppe der Nukleotide in einer RNA durch elektrophile Substitution acyliert und im Anschluss an diese Modifikation wird mit der RNA eine Primer Extension Reaktion (5.2.7.4) durchgeführt. Die Acylierung erfolgt umso effizienter, je flexibler ein Nukleotid innerhalb der RNA-Struktur ist, also werden ungepaarte Nukleotide eher modifiziert. Durch diese Modifikation kann die reverse Transkriptase in der PE an dem betroffenen Nukleotid nicht verlängern und es kommt zu einem Kettenabbruch, ähnlich einer Sequenzierung. Es gibt verschiedene Reagenzien, die als Elektrophil eingesetzt werden können (Wilkinson, Vasa *et al.* 2009), aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit wurde Benzoylcyanid (BzCN) verwendet. In Abbildung 2.20 ist schematisch die Acylierung am Beispiel des BzCN gezeigt.

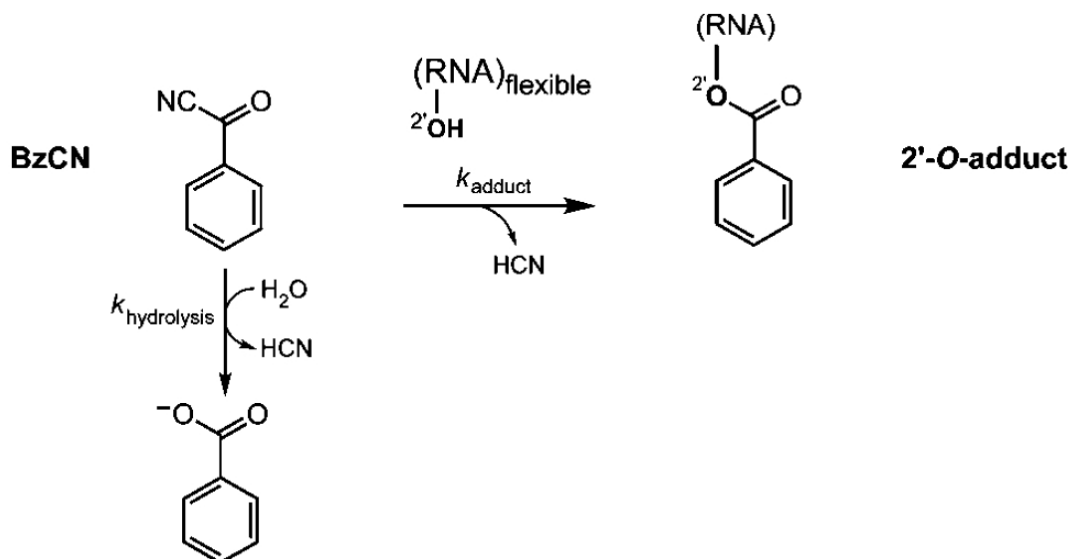


Abbildung 2.20 Mechanismus der RNA SHAPE-Chemie mit Benzoylcyanid aus (Mortimer and Weeks 2008) Benzoylcyanid (BzCN) reagiert entweder mit der 2'-OH Gruppe flexibler Nukleotide in der RNA oder wird durch Lösungswasser hydrolysiert und dadurch inaktiviert.

Der Vorteil dieser Modifikation liegt darin, dass sie selbst-quenchend ist und sehr schnell abläuft, im Fall von BzCN im Bereich von 1 s. Es wurde zunächst 6S RNA oder 6S RNA~dnRNA Komplexe mit steigenden Mengen Hfq zur Komplexbildung inkubiert und im Anschluss mit BzCN (Endkonzentration 150 mM) versetzt. Bei erfolgreicher Reaktion stellte sich eine kurzzeitige Trübung der Lösung durch das entstehende HCN ein. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, nach Ethanolfällung wurden die Proben in PE Hybridisierungspuffer inklusive 5'-endmarkiertem Primer aufgenommen und einer Primer Extension unterzogen (5.2.7.4).

Abbildung 2.21 zeigt das Autoradiogramm einer solchen SHAPE Analyse nach Trennung durch dPAGE (5.2.3.2), es wurde der Primer Oligo 6S-4 verwendet, dieser bindet an die Positionen 89-68 der reifen 6S RNA und liefert so cDNAs von bis zu 89 NT. In Spur 3 der Abbildung a) ist zu beobachten, dass bei der 6S RNA bereits mit 0,5 μM Hfq deutlich verstärkte Abbruchbanden im Bereich A57-A45 auftreten. Diese nehmen jedoch oberhalb von 0,5 μM jedoch schon wieder ab. Ungewöhnlich war, dass der starke Effekt bei der kleinsten Hfq-Konzentration auftrat und dann wieder abnahm. Um auszuschliessen, dass es sich um einen unspezifischen Effekt, hervorgerufen durch Verunreinigungen der Hfq-Präparation, handelt wurde eine Feintitration durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei 0,05 und 0,1 μM kein Effekt auftrat und bei 0,3 μM die Ausprägung maximal war (siehe Abbildung 7.1 im Anhang). In den Spuren 6-9 fallen zunächst vermehrt Abbruchbanden oberhalb von A45 auf, vermutlich verursacht durch 6S RNA gebundene dnRNA. Die dnRNA bindet sehr stark an 6S RNA und behindert dadurch die reverse Transkriptase. In den Spuren 8 und 9 sind die gleichen verstärkten Abbruchbanden für das 6S RNA~dnRNA Hybrid, wie für die 6S RNA alleine zu beobachten. Diese gehäuften Abbrüche der reversen Transkription weisen auf eine erhöhte Flexibilität der Nukleotide in der zentralen Blase hin, wenn Hfq anwesend ist. Dies ist sowohl bei der 6S RNA als auch bei den 6S RNA~dnRNA Hybriden der Fall. Es wurde auch versucht mit dem Primer Oligo 6S-B (bindet das extreme 3'-Ende der 6S RNA) diese Analysen durchzuführen, um Informationen über das gesamte Molekül zu erhalten. Mit diesem Oligo lieferte die PE leider keine cDNAs bis zum reifen 5'-Ende der 6S RNA. Vermutlich stört die ausgeprägte Sekundärstruktur der 6S RNA die Hybridisierung in der Binderegion des Oligos (Daten nicht gezeigt).

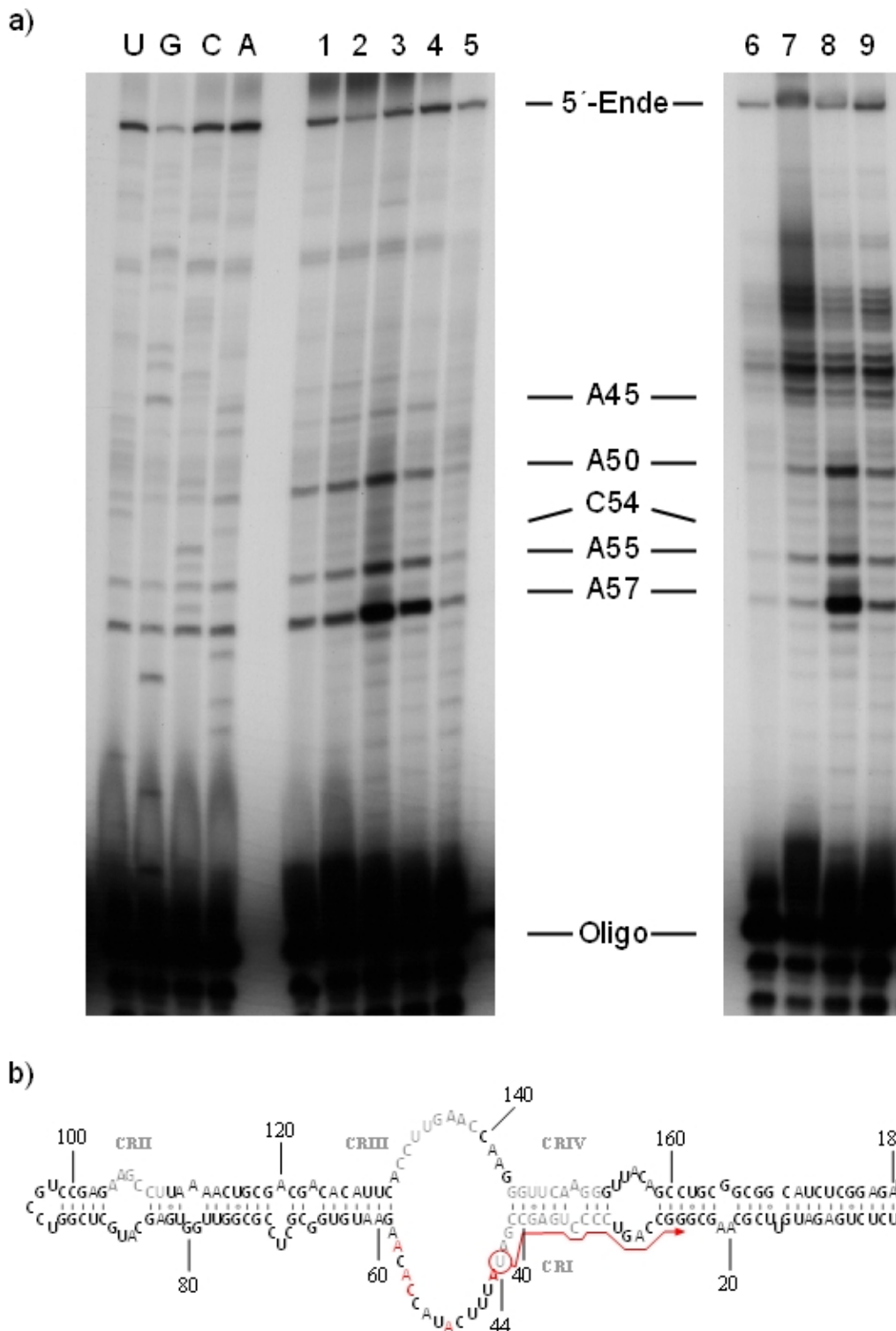


Abbildung 2.21 SHAPE Analysen von 6S RNA und 6S RNA~dnRNA Komplexen in Gegenwart steigender Konzentrationen Hfq. a) zeigt das Autoradiogramm nach der Primer Extension mit dem Primer Oligo 6S-4, dieser bindet an die Positionen 68-89 der reifen 6S RNA. Links ist eine Sequenzierung gezeigt, in den Spuren 1-5 wurde 100 ng 6S RNA und in den Spuren 6-9 wurden 100 ng 6S RNA im Komplex mit dnRNA eingesetzt. Die Spuren 1 und 6 enthielten weder Hfq noch den Hfq-Puffer. In Spur 2-5 befanden sich 0/0,5/1 und 5 μ M Hfq und in 7-9 0/0,5 und 1 μ M Hfq. Die angegebenen Nukleotide markieren Positionen erhöhter Zugänglichkeit. In **b)** ist die Sekundärstruktur der 6S RNA gezeigt, die konservierten Regionen (CRI-CRIV) sind hellgrau markiert (Brown and Ellis 2005) und die Sequenz, die als *Template* für die *de novo* Synthese dient, ist mit einem roten Pfeil angegeben (verändert nach Steuten). Nukleotide mit erhöhter Zugänglichkeit sind ebenfalls rot markiert.

2.2.9 Deletion von Hfq reduziert die Mengen dnRNA nach *nutritional upshift*

Die bisher gezeigten Analysen machen *in vitro* eine Interaktion von Hfq mit 6S RNA und der *de novo* synthetisierten dnRNA deutlich. Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob Hfq auch *in vivo* einen Einfluss auf 6S RNA und/oder die dnRNA unter *upshift* Bedingungen hat. Dazu wurden *Northern Blot* (5.3.4) und Primer Extension Analysen mit Gesamt-RNA aus dem *E. coli* Stamm JW4130 (Δhfq) und dem korrespondierenden Wildtyp BW25113 durchgeführt. Der *nutritional upshift* wurde, wie in Kapitel 2.1.9 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 2.22 ist das Ergebnis dieser Analysen dargestellt. In a) ist das Verhältnis von dnRNA und 6S RNA in beiden Stämmen im Verlauf des *upshift* mittels *Northern Blot* (5.3.4) untersucht worden. Als Referenz sind links jeweils 1 pmol synthetische dnRNA und 6S RNA aufgetragen.

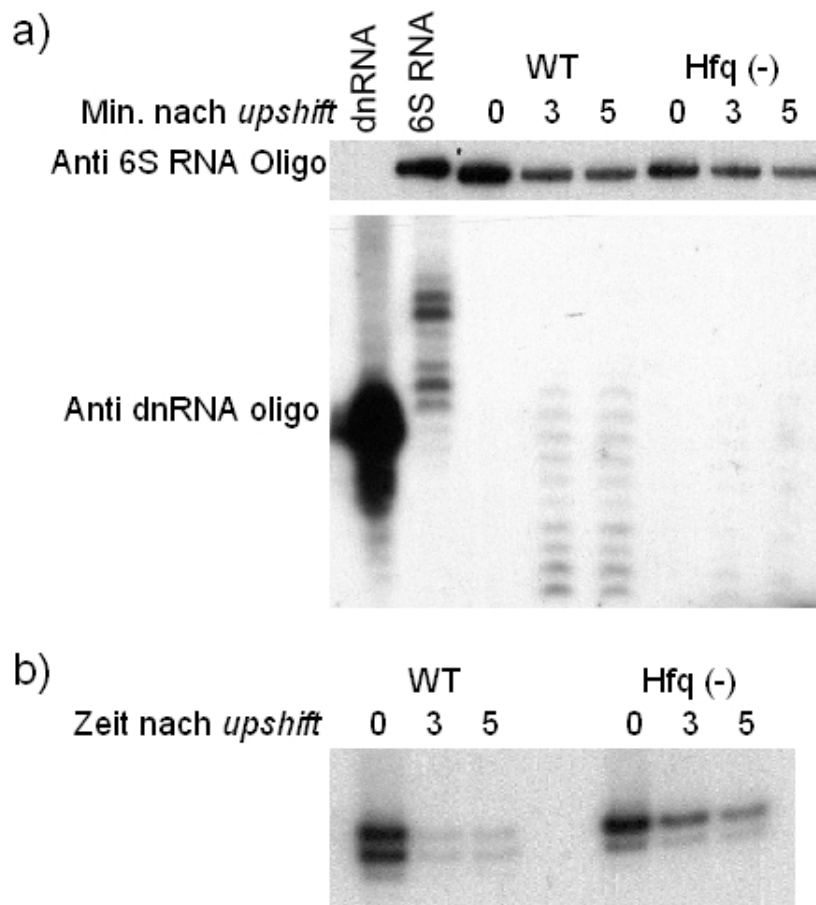


Abbildung 2.22 Vergleich der dnRNA und 6S RNA Mengen nach Auslösen der *de novo* Synthese

Die *E. coli* Stämme BW25113 (WT) und JW4130 (Δhfq) wurden einem *nutritional upshift* unterzogen und zu den genannten Zeitpunkten wurden Zellen für Gesamt-RNA Isolation geerntet. **a)** zeigt einen *Northern Blot* mit Primern komplementär zur 6S RNA (Oligo 6S-1) und dnRNA (ADN1), links wurden jeweils 1 pmol dnRNA und 6S RNA als Referenz aufgetragen. **b)** zeigt eine Primer Extension Analyse der selben RNA-Proben mit dem Oligo 6S-1, aufgrund einer 5 NT-Überlappung des Oligos mit der Binderegion der dnRNA führt dies in der Primer Extension zu geringeren Produktausbeuten als im *Northern Blot*.

Aufgrund einer Teilkomplementarität des ADN1-Oligos zur 6S RNA lassen sich damit auch 6S RNA Fragmente detektieren, jedoch mit deutlich geringerer Sensitivität. Man erkennt zum Zeitpunkt 0 keinerlei dnRNA in beiden Stämmen und reduzierte 6S RNA im Hfq (-) Stamm, eine leichte Reduktion der 6S RNA in diesem Stamm wurde bereits in Kapitel 2.1.8 gezeigt. Bereits 3 Minuten nach *upshift* ist im Wildtyp deutlich dnRNA vorhanden und bleibt bis zum Zeitpunkt von 5 Minuten konstant. In Abwesenheit von Hfq ist nach 3 Minuten nahezu keine dnRNA nachzuweisen und auch nach 5 Minuten ist nur ein Bruchteil der Menge des Wildtyps existent. Die 6S RNA-Menge ist nach *upshift* in beiden Stämmen etwa gleich groß. Ausgehend von den Mengen vor *upshift* jedoch im Wildtyp deutlich stärker reduziert. Bei der in b) gezeigten Primer Extension ist dagegen ein deutlicherer Unterschied zu erkennen. Im Wildtyp ist die 6S RNA-Menge bereits nach 3 Minuten deutlich reduziert und bleibt auch nach 5 Minuten auf diesem Level. In Abwesenheit von Hfq ist 3 Minuten nach *upshift* deutlich mehr 6S RNA vorhanden als im Wildtyp und sinkt nach 5 Minuten nochmal leicht ab. Dies korreliert mit der leichten Zunahme der dnRNA von 3 nach 5 Minuten in diesem Stamm. Insgesamt bleibt das 6S RNA Level aber auf einem höheren Niveau als im Wildtyp. Wahrscheinliche Gründe für diese Unterschiede werden in der Diskussion (3.2.3) erläutert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hfq nach einem *nutritional upshift* zu signifikant erhöhten Mengen dnRNA führt.

2.2.10 Existieren weitere zelluläre Interaktionspartner der 6S RNA?

In Zusammenarbeit mit Sabine Schneider aus unserer Arbeitsgruppe wurde in Affinitätsbindestudien, mittels Streptavidin Microbeads und biotinylierter 6S RNA, nach weiteren Bindepartnern für 6S RNA in Gesamt-Protein Extraktionen gesucht (5.3.6). Es wurden in drei unabhängigen Experimenten, von zwei unabhängigen Gesamt-Protein Extraktionen, sieben Proteine mit Molekulargewichten von ca. 19 kDa bis 50 kDa als 6S RNA-bindend beobachtet. Diese wurden von Dr. Tino Polen vom Institut für Biotechnologie II des Forschungszentrum Jülich massenspektrometrisch analysiert. Es konnte leider nur ein einziges Protein einwandfrei identifiziert werden, dabei handelte es sich um die N-terminale Domäne des Proteins Fole, einer GTP-cyclohydrolase (Lee, Ahn *et al.* 2002). Interessanterweise ist dieses Enzym im Purin-Stoffwechsels involviert und beeinflusst den GTP-Spiegel.

2.3 Mechanismen der 6S RNA-abhängigen Regulation in Cyanobakterien

In Enterobakterien ist die nicht kodierende 6S RNA weit verbreitet (Barrick, Sudarsan *et al.* 2005) und beinahe täglich werden, vorwiegend durch *in silico* Studien, neue 6S RNA Homologe entdeckt. Ein weiteres, gut untersuchtes Beispiel ist die 6S RNA aus *Bacillus subtilis*, dort existieren sogar zwei verschiedene 6S RNAs (BsrA und BsrB) (Trotochaud and Wassarman 2005). Beide zeigen *in vitro* ein homologes Verhalten mit der für die Transkription der *B. subtilis housekeeping* Gene verantwortlichen RNA Polymerase, wie dies für *E. coli* detailliert untersucht ist. So finden sich Transkriptionseinhibierungen und auch die dnRNA Synthese ist *in vitro* und *in vivo* für BsrA nachgewiesen (Beckmann, Grunweller *et al.* 2010; Irnov, Sharma *et al.* 2010). Bisherige Analysen der 6S RNA Funktion bezogen sich immer auf relativ eng verwandte Spezies. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob grundlegende Mechanismen der 6S RNA-abhängigen Regulation auf Spezies übertragbar sind, die nicht so eng mit *E. coli* verwandt sind. In Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe **bacnets** von Dr. Ilka Axmann der Charité Berlin, bot sich die Chance *in vitro* Funktionsanalysen mit 6S RNAs aus Cyanobakterien durchzuführen. Bei Cyanobakterien handelt es sich um, auch als Blaualgen bezeichnete, Gram-negative Bakterienarten, die in der Lage sind Photosynthese zu betreiben. Ihre natürlichen Habitate sind Gewässer.

Das erste cyanobakterielle 6S RNA Homolog wurde Ende der 90er Jahre in den Frischwasserarten *Synechococcus* PCC6301 und *Synechocystis* PCC6803 identifiziert, jedoch noch nicht als 6S RNA Homolog erkannt und daher als 6Sa RNA bezeichnet (Watanabe, Sugiura *et al.* 1997). Erst vor wenigen Jahren erkannte man anhand von Strukturhomologien, dass es sich dabei um eine echte 6S RNA handelt. Zeitgleich wurden Homologe in diversen weiteren Gattungen von *Prochlorococcus* und *Synechococcus* entdeckt. Interessanterweise liegen die Gene, die für die jeweiligen 6S RNAs kodieren, oft *downstream* des Gens *purK*, einem Gen des Purinstoffwechsels (Axmann, Kensche *et al.* 2005; Barrick, Sudarsan *et al.* 2005). Auch für die *E. coli* 6S RNA ist in der vorliegenden Arbeit bereits ein Zusammenhang mit dem Purinstoffwechsel gezeigt und bei *Helicobacter pylori* liegt das *ssrS* Gen ebenfalls in Nachbarschaft eines Gens (*purD*) aus dem Purinstoffwechsel (Sharma, Hoffmann *et al.* 2010). Einzigartig in der Bakterienwelt ist bei Cyanobakterien das Vorkommen einer sogenannten *circadian clock*, diese steuert in einem Tag-Nachtrhythmus die Genexpression. Unter anderem ist auch die Verwendung der Sigma-Faktoren in Cyanobakterien durch diese *circadian clock* reguliert (Nair, Ditty *et al.* 2002; Ditty, Williams *et al.* 2003).

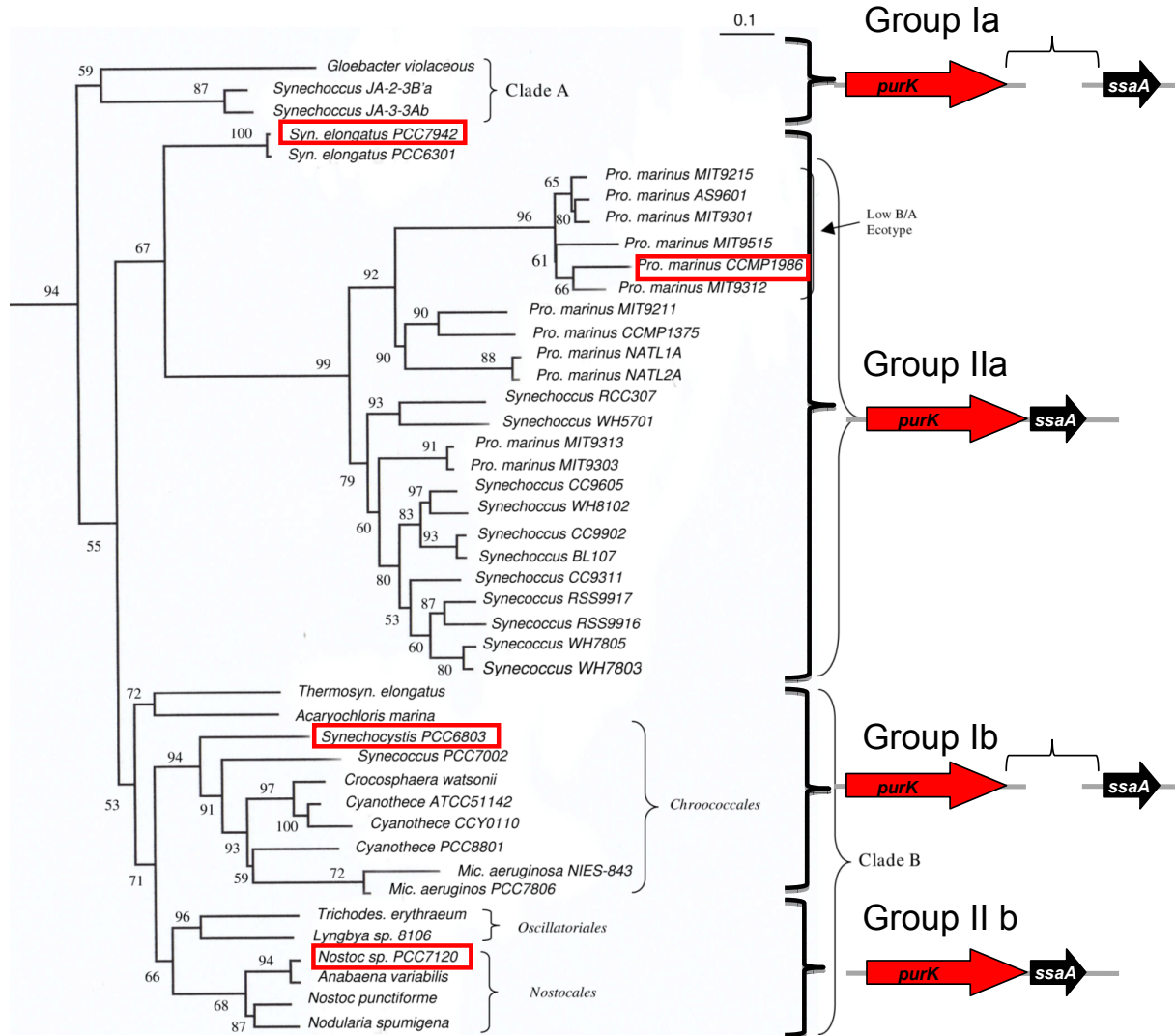


Abbildung 2.23 Phylogenetischer Baum verschiedener Cyanobakterien

Der Stammbaum ist ausgerichtet auf die Co-Lokalisation des 6S RNA Gens in Cyanobakterien (*ssaA*) mit *purK*. Es deuten sich zwei Gruppen I und II an, Gruppe II zeigt Co-Lokalisation von *ssaA* und *purK*, Gruppe I dagegen nicht. Rot eingrahmt sind die Spezies deren 6S RNAs für weitergehende *in vitro* Studien verwendet wurden. Verändert nach (Gupta and Mathews).

Für den marinen Vertreter *Prochlorococcus Med4* ist darüber hinaus bereits gezeigt, dass auch die 6S RNA-Expression einem Tag-Nachtrhythmus unterliegt (Axmann, Holtzendorff *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit sollten 6S RNAs aus verschiedenen Cyanobakterien auf ihre funktionellen Eigenschaften, im Zusammenspiel mit der σ^{70} -assoziierten RNAP aus *E. coli*, untersucht werden. In Abbildung 2.23 ist ein Stammbaum gezeigt, der die Nachbarschaft des 6S RNA Gens der Cyanobakterien (*ssaA*) mit dem Gen *purK* zeigt. Im Wesentlichen existieren zwei Gruppen I und II, die sich je nach Lage im Stammbaum in Untergruppen unterteilen lassen. Gruppe II zeigt dabei eine genetische Koppelung von *purK* und *ssaA*, Gruppe I dagegen nicht. Bei der Auswahl der Organismen wurde darauf geachtet, dass aus jeder Gruppe ein Vertreter gewählt wurde. So war sichergestellt, auch weiter entfernt

verwandte cyanobakterielle 6S RNAs für den Vergleich zu erhalten. Die ausgewählten Vertreter sind rot umrahmt, dabei handelt es sich um *Synechocystis* PCC6803, *Nostoc* 7120, *Synechococcus* 7942 und *Prochlorococcus* CCMP1986 (*Prochlorococcus* Med4). Für eine bessere Übersicht werden die vier Vertreter im weiteren Verlauf nur noch *Synechocystis*, *Nostoc*, *Synechococcus* und *Med4* genannt. Für alle 4 6S RNAs ist eine Expression *in vivo* bereits nachgewiesen. Dabei zeigt sich für *Med4* die Existenz zweier stabiler Formen, die sich deutlich in der Länge unterscheiden. Ein kurzes Transkript von 222 NT Länge, das seinen Ursprung in einem Promotor *downstream* von *purK* hat und eine lange Variante von 333 NT, die durch Prozessierung eines *Precursors* entsteht, der der kodierenden Region von *purK* entspringt (Axmann, Holtzendorff *et al.* 2007). Für die vorliegende Arbeit wurde ausschliesslich das kurze Transkript verwendet. Die drei anderen 6S RNAs haben Längen von 188 (*Synechocystis*), 186 (*Nostoc*) und 184 (*Synechococcus*) NT. Im Fall von *Synechocystis* ist darüber hinaus durch *deep sequencing* bereits *in vivo* die Existenz einer kurzen RNA bestätigt, die, analog der *E. coli* 6S RNA-abhängigen dnRNA, komplementär zu einem Bereich ist, der seinen Ursprung im Bereich der zentralen Blase hat (persönliche Mitteilung Prof. W. Hess).

In Abbildung 2.24 ist ein Strukturalignment der cyanobakteriellen 6S RNAs zusammen mit der 6S RNA aus *E. coli* gezeigt. Das zugrundeliegende Sequenzalignment findet sich in Abbildung 7.2 im Anhang. Anhand des Strukturalignments ist zu erkennen, dass sowohl der Closing Stem als auch der Internal Stem konservierte Elemente beinhalten, von denen in beiden Stems, Regionen auf Sequenz- und Strukturebene (rot markierte Basenpaare) über alle fünf 6S RNAs hoch konserviert sind

Die folgenden Ergebnisse wurden im wesentlichen in Zusammenarbeit mit Dr. Anne Rediger der Arbeitsgruppe **bacnets**, in den Laboren des Instituts für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität erarbeitet. Sämtliche cyanobakteriellen 6S RNAs wurden im Vorfeld von Dr. Anne Rediger synthetisiert und aufgereinigt.

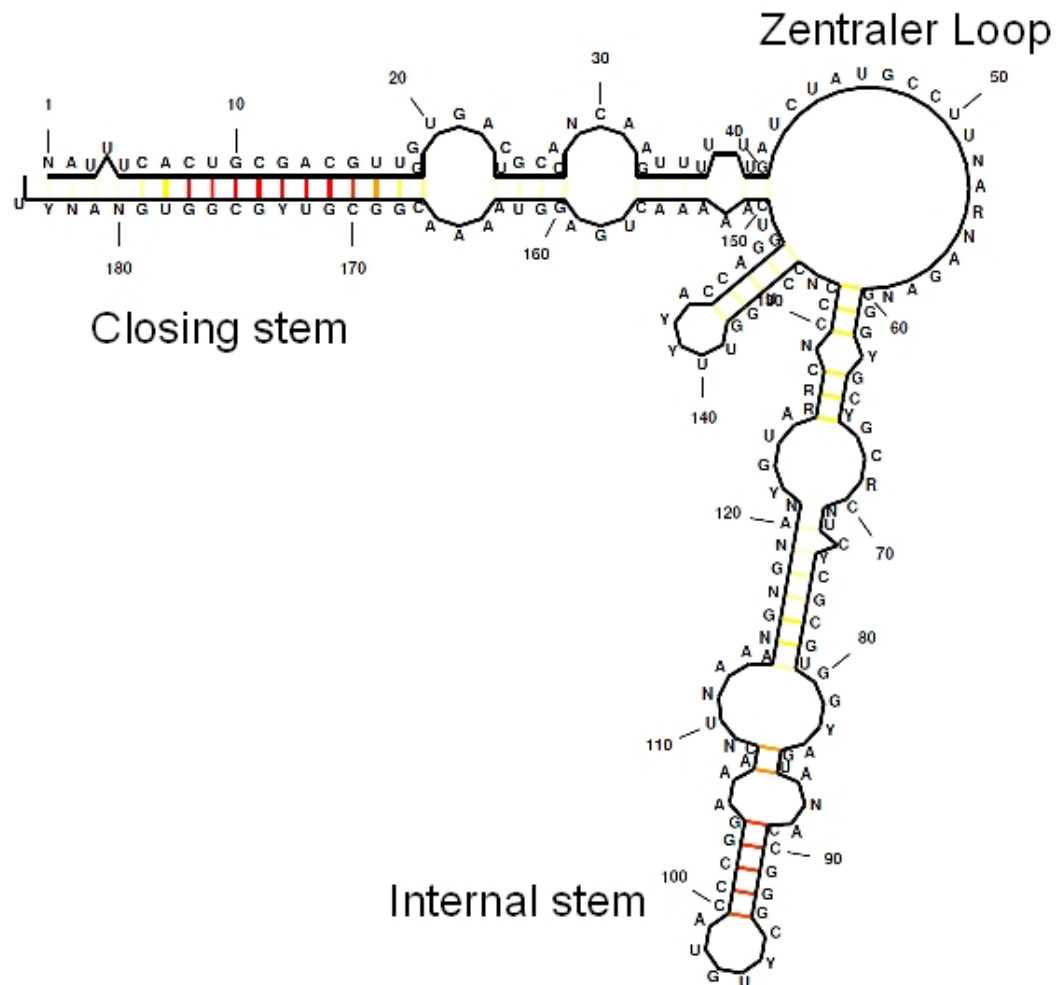


Abbildung 2.24 Strukturalignment verschiedener cyanobakterieller 6S RNAs und der 6S RNA aus *E. coli*

Basis für das Strukturalignment ist das Sequenzalignment der 6S RNAs aus *E. coli*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Synechococcus* und *Med4* (Abbildung 7.2). Angegeben sind sowohl Sequenz- als auch Basenpaarkonserviertheiten (N= Purin und R = Pyrimidin, Rot: hoch konserviert, Weiss: nicht konserviert). Angefertigt wurde dieses Alignment mit Hilfe der Software MAFFT Version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

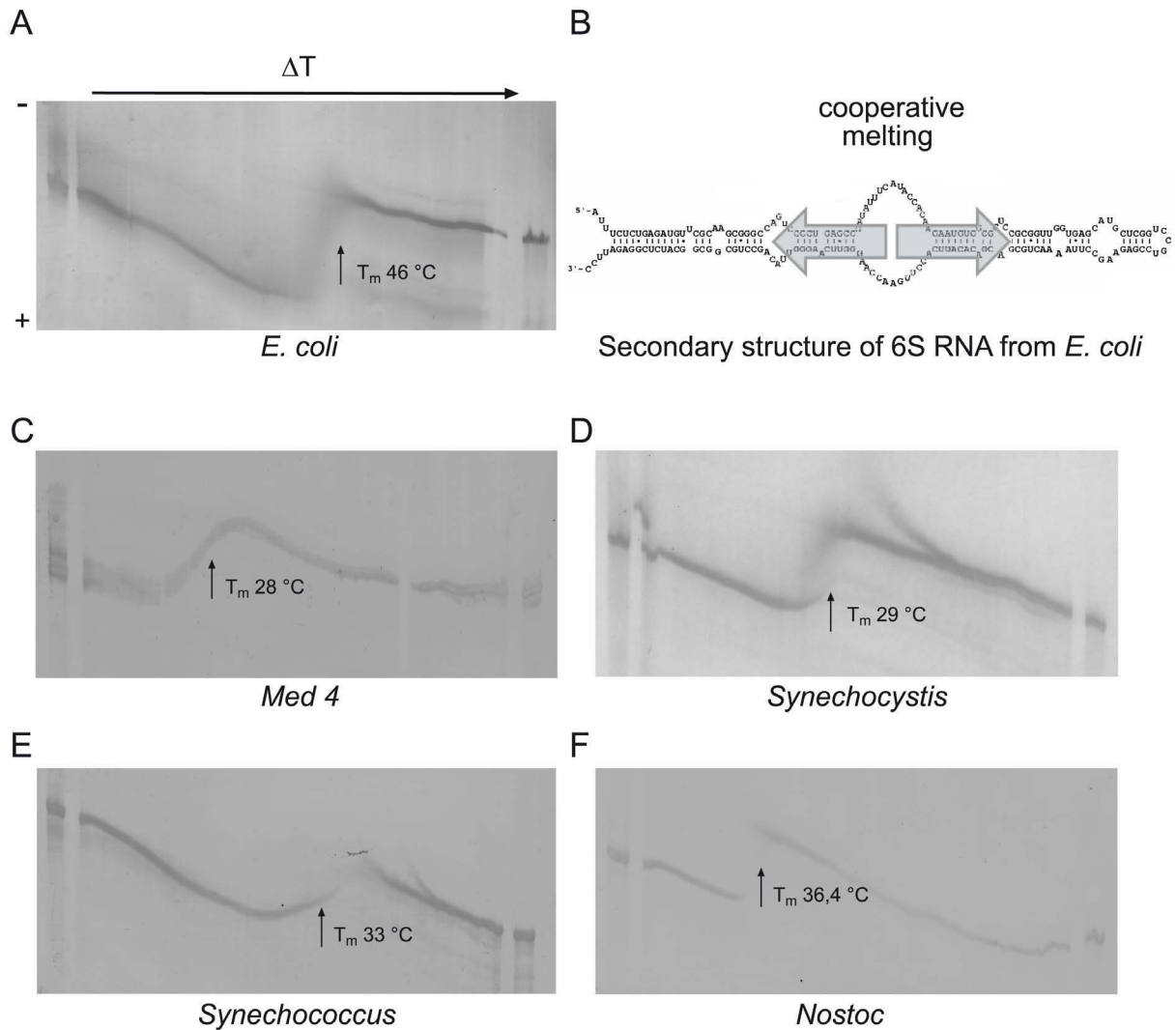
2.3.1 Cyanobakterielle 6S RNAs besitzen ähnlich dynamische Strukturen wie die 6S RNA aus *E. coli*

Die Sekundärstruktur für *E. coli* 6S RNA ist seit langem durch enzymatische und chemische Mapping Analysen bekannt (Gildehaus 2005; Trotochaud and Wassarman 2005) und auch die temperaturabhängige Dynamik dieser Struktur wurde schon mittels Temperatur-Gradienten-Gel Elektrophorese (TGGE) gezeigt (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). So zeigt sich bei einer Temperatur von etwa 46°C ein kooperatives Aufreissen der Sekundärstruktur, das aus der zentralen Blase heraus auf beide angrenzenden Stammregionen übergreift (Abbildung 2.25

B). Da 6S RNA Homologien *in silico* anhand der charakteristischen Sekundärstruktur ermittelt werden, wurde untersucht, ob auch die verschiedenen cyanobakteriellen 6S RNAs dieses Verhalten zeigen. Dazu eignete sich die Methode der TGGE (5.2.3.3).

Bei der TGGE handelt es sich um eine Horizontalgelelektrophorese, in der senkrecht zur Laufrichtung ein Temperaturgradient angelegt wird. Nukleinsäuremoleküle nehmen temperaturabhängig verschiedene Konformationen ein und je nach Konformation verändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese (Rosenbaum and Riesner 1987). So können Strukturübergänge als Mobilitätsveränderung im Gel festgestellt werden. Für die Analysen wurden alle vier cyanobakteriellen 6S RNAs und als Vergleich die 6S RNA aus *E. coli* mittels TGGE untersucht. Es wurde jeweils 1-1,5 µg 6S RNA auf einer 7,5 %igen nativen PAGE aufgetrennt, die optimalen Temperaturgradienten wurden in Pilotexperimenten ermittelt. Die Detektion der RNAs erfolgte anschliessend mit Silberfärbung (Beidler, Hillard *et al.* 1982). Die RNAs wurden vor der Geltrennung jeweils auf 70°C erhitzt und langsam (1°C/min) auf RT abgekühlt. Dabei schmilzt die Sekundärstruktur auf und durch das langsame Renaturieren wird eine einheitliche Struktur begünstigt.

Abbildung 2.25 zeigt die Zusammenfassung dieser Strukturanalysen nach der Silberfärbung. In (A) und (B) ist das Profil der 6S RNA aus *E. coli* sowie ihre charakteristische Sekundärstruktur zu sehen. Mit steigender Temperatur ist zunächst eine erhöhte Mobilität der 6S RNA zu erkennen. Dies beruht allein auf der temperaturabhängigen, erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit und ist nicht in einer strukturellen Änderung der 6S RNA begründet. Bei einer Temperatur von 46°C ist eine drastische Verzögerung der Probe im Gel zu erkennen. An diesem Punkt reisst, vermutlich ausgehend von der zentralen Blase der 6S RNA, die komplette Sekundärstruktur auseinander (in (B) durch die divergierenden Pfeile verdeutlicht) und liegt als Einzelstrang vor. Während die 6S RNA in der strukturierten Form kompakt ist und dadurch eine relativ hohe Mobilität im Gel besitzt, hat der Einzelstrang aufgrund seiner Flexibilität ein deutlich verzögertes Laufverhalten. Am Schmelzpunkt (T_m bei 46°C) ist scheinbar kein direkter Übergang der strukturierten zur aufgeschmolzenen RNA zu erkennen, vielmehr "springt" die Bande in einem diskontinuierlichen Übergang innerhalb des Gels. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass der Aufschmelzvorgang irreversibel geschieht und keine Intermediate aus halb denaturierten Formen existieren.



kontinuierlichem und irreversiblen Aufreissen zu erkennen. Scheinbar schmelzen zunächst einzelne Basenpaare nacheinander auf und ab einem kritischen Punkt wird die verbliebene Struktur so instabil, dass alle verbliebenen Paarungen gleichzeitig aufgehen. Ein deutlicher Unterschied zur *E. coli* 6S RNA ist der T_m -Wert, der bei den cyanobakteriellen 6S RNAs 10-18°C unterhalb dem der 6S RNA aus *E. coli* liegt. Ausserdem gibt es auch zwischen den cyanobakteriellen 6S RNAs untereinander deutliche Unterschiede im T_m -Wert. Interessanterweise korreliert die Varianz der T_m -Werte mit den Temperaturen, die jede Spezies für optimales Wachstum braucht (siehe 3.3.2).

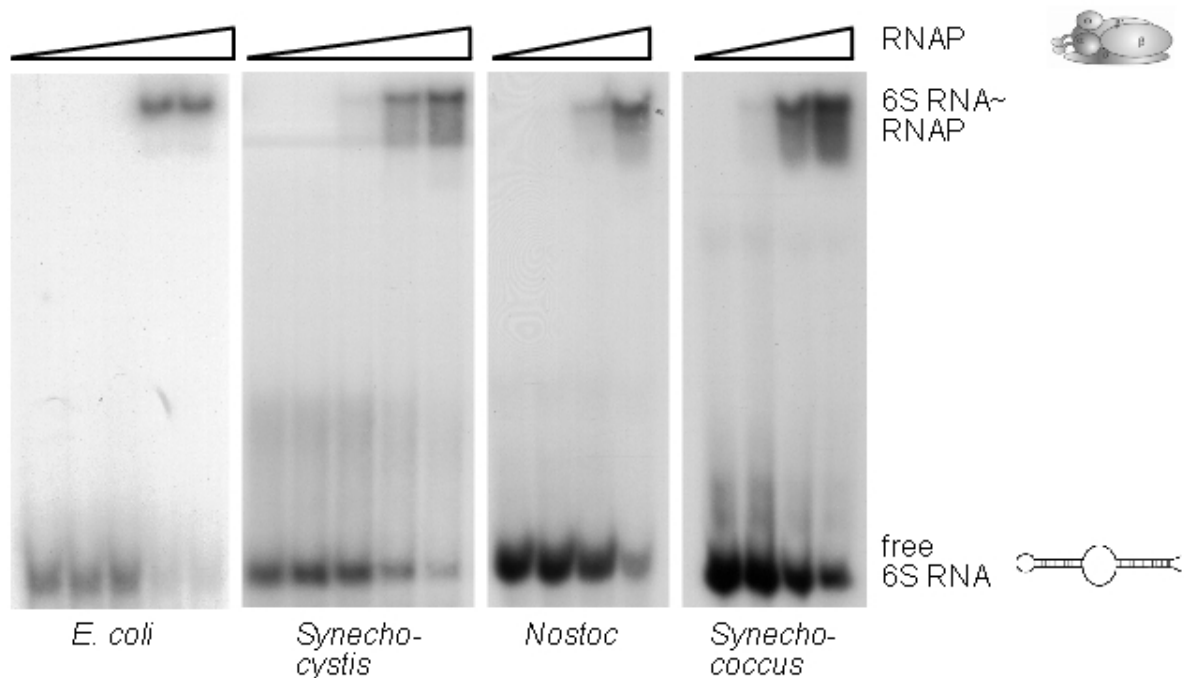
2.3.2 Interaktion der cyanobakteriellen 6S RNAs in einem heterologen System mit der RNAP aus *E. coli*

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass die *in silico* berechneten Strukturhomologien der cyanobakteriellen 6S RNAs zu ähnlichem Dynamikverhalten in einer TGGE führen. Im weiteren wurde daher überprüft, ob sich auch funktionell Homologien zur 6S RNA aus *E. coli* zeigen lassen. Über die Transkriptionsregulation in Cyanobakterien ist bislang relativ wenig bekannt. Zwar teilen sich alle Organismen einen ähnlichen strukturellen Aufbau der RNAP, es existiert bei Cyanobakterien jedoch überdies eine β -Untereinheit, die eine zusätzliche 70 kDa große Domäne aufweist (Schyns, Jia *et al.* 1998). Auf Promotorebene zeigen sich nach ersten Analysen ähnliche Konsensstrukturen wie bei anderen Eubakterien. So existiert eine -10-Region mit den konservierten Nukleotiden T(-12), A(-11) und T(-7). Diese sind auch in *E. coli* hoch konserviert (1.3.4). Darüber hinaus sind für einige Gene (*rpl21*, *rps12*, *kaiB* und *ccmK*) Promotoren identifiziert worden, die identische -35-Regionen aufweisen, wie sie bei *E. coli* σ^{70} Promotoren konserviert sind. Zusätzlich existiert bei Cyanobakterien eine Aufteilung der σ -Faktoren in nicht-essentielle und den essentiellen *Housekeeping* Sigma-Faktor RpoD1, einem Homolog des *E. coli* Sigma⁷⁰ (Imamura, Asayama *et al.* 2003; Vogel, Axmann *et al.* 2003). Es spricht also einiges für eine Vergleichbarkeit der Systeme. Sämtliche Funktionsanalysen wurden daher im heterologen System mit dem σ^{70} -Holoenzym (RNAP) aus *E. coli* durchgeführt.

Als primärer Schritt wurde überprüft, ob die verschiedenen cyanobakteriellen 6S RNAs an die RNAP binden können. Dazu wurden Gelretardierungen, ähnlich wie für die Interaktion von Hfq mit 6S RNA (2.2), durchgeführt. In Abbildung 2.26 ist eine Übersicht der durchgeführten Bindungsanalysen gezeigt. In (A) ist links die Bindung der *E. coli* 6S RNA an die RNAP zu

sehen, bei 50 nM RNAP ist kaum noch freie RNA zu beobachten. Unterhalb der Komplexbande aus 6S RNA und RNAP sieht man leicht eine zweite Bande, dabei handelt es

A



B

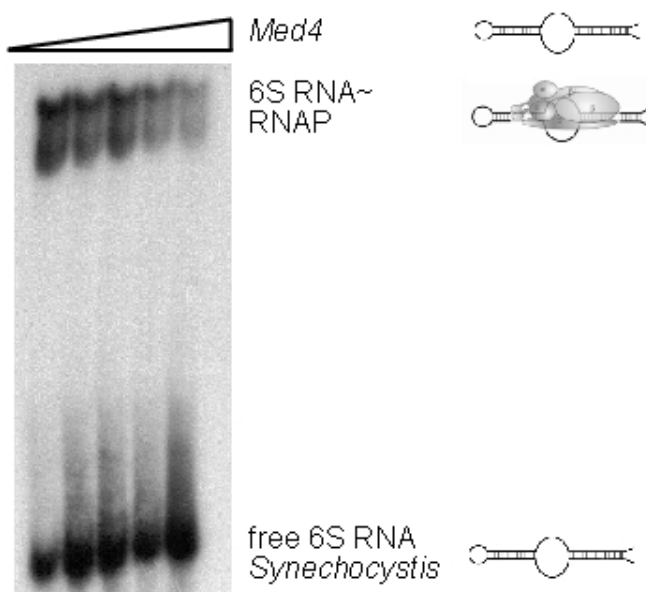


Abbildung 2.26 Interaktion von cyanobakteriellen 6S RNAs mit dem $E\sigma^{70}$ aus *E. coli*

Gezeigt sind die Autoradiogramme von Retardierungsanalysen nach Trennung mittels einer 5 %igen PAGE. (A): Jeweils 15 nM 6S RNA (3'-endmarkiert mit [5'- 32 P]-pCp) wurden mit steigenden Mengen RNAP (0/5/15/50 nM und bei *E. coli* und *Synechocystis* zusätzlich 100 nM) für 10 min, in 80 mM KGlu, bei 30°C zur Komplexbildung inkubiert. Um unspezifische Komplexe abzufangen wurde anschliessend Heparin (Endkonzentration 100 ng/μl) zugegeben. Freie 6S RNAs und RNAP-spezifische Komplexe sind seitlich markiert. (B): Konkurrenz der Komplexbildung von *Synechocystis* 6S RNA durch *Med4* 6S RNA. 15 nM *Synechocystis* 6S RNA wurden mit 50 nM RNAP in Gegenwart von steigenden Konzentrationen unmarkierter *Med4* 6S RNA (0/15/50/100 und 200 nM) zur Komplexbildung inkubiert. Auch hier wurden unspezifische Komplexe durch 100 ng/μl Heparin abgefangen.

sich um Komplexe aus 6S RNA und dem *core* Enzym der RNA Polymerase. Diese Komplexe sind bereits beschrieben und treten in geringen Anteilen auf (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). Auch für die drei anderen 6S RNAs in (A) (*Synechocystis*, *Nostoc* und *Synechococcus*) sind deutlich Komplexbanden zu erkennen, die bei steigender Polymerase Konzentration zunehmen. Ebenfalls sind bei allen RNAs die Komplexe mit dem *core* Enzym zu beobachten. Im Fall von *Synechocystis* und *Synechococcus* ist bei 50 nM RNAP verhältnismässig mehr ungebundene RNA zu beobachten als bei *E. coli*. Die Affinität scheint also etwas geringer. Für *Nostoc* ist hingegen bei 50 nM RNAP ebenfalls nahezu alle RNA im Komplex, diese Tatsache deutet auf eine vergleichbare Affinität zur RNAP wie für die *E. coli* 6S RNA hin. Im Falle der 6S RNA aus *Med4* konnte auf diese Weise keine Bindung überprüft werden, denn diese RNA ließ sich mittels pCp-Ligation nicht effizient radioaktiv markieren. Ein möglicher Grund liegt in der Sekundärstruktur (Abbildung 3.3).

Das extrem überhängende freie 3'-Ende kann umfallen und mit sich selbst hybridisieren. Dadurch ist wahrscheinlich die nötige Zugänglichkeit für die T4-RNA-Ligase am 3'-Ende nicht gegeben. Um dennoch nachzuweisen, ob diese 6S RNA an die RNAP binden kann, wurde die Bindung der radioaktiv markierten *Synechocystis* 6S RNA in Gegenwart von wachsenden Mengen an unmarkierter *Med4* 6S RNA durchgeführt. In (B) ist deutlich zu sehen, dass bei steigender Menge an *Med4* 6S RNA die Komplexe aus RNAP und *Synechocystis* 6S RNA abnehmen, allerdings ist erst bei einem deutlichen Überschuss der *Med4* 6S RNA (100 nM zu 15 nM) eine signifikante Abnahme der Komplexbanden zu erkennen. Durch die simultane Zugabe von beiden RNAs in den Bindungsansatz deutet dies auf eine geringere Affinität der *Med4* 6S RNA zur RNAP hin.

2.3.3 Auch cyanobakterielle 6S RNAs haben inhibitorische Wirkung auf die Transkription *in vitro*

Im vorigen Kapitel wurde deutlich gezeigt, dass alle vier untersuchten 6S RNAs aus Cyanobakterien an die RNAP binden und die Affinitäten der Bindung in der gleichen Größenordnung liegen wie für 6S RNA aus *E. coli*. Daher war von Interesse, ob diese 6S RNAs, ebenso wie die *E. coli* 6S RNA, in der Lage sind Transkription *in vitro* zu inhibieren. Zur Klärung dieser Frage wurden *multiple round in vitro* Transkriptionen (5.2.7.7) durchgeführt, wie sie bereits in Kapitel (2.1.1) beschrieben sind. In Abbildung 2.27 ist das Ergebnis dieser IVTs im Vergleich mit der Inhibierung durch die *E. coli* 6S RNA gezeigt. Es

ist deutlich zu erkennen, dass alle cyanobakteriellen 6S RNAs in der Lage sind, die Transkription mit der *E. coli* RNAP zu inhibieren. Ähnlich wie in Kapitel (2.1.1) gezeigt, betrifft diese Inhibition sämtliche vorhandenen Promotoren und in (B) ist zu sehen, dass der Grad der Inhibition ebenfalls eine leichte Korrelation mit der Promotorstärke zeigt. Bei allen RNAs wird z.B. für den *tac* Promotor die höchste Menge 6S RNA benötigt, um eine Inhibition von 50% zu erreichen.

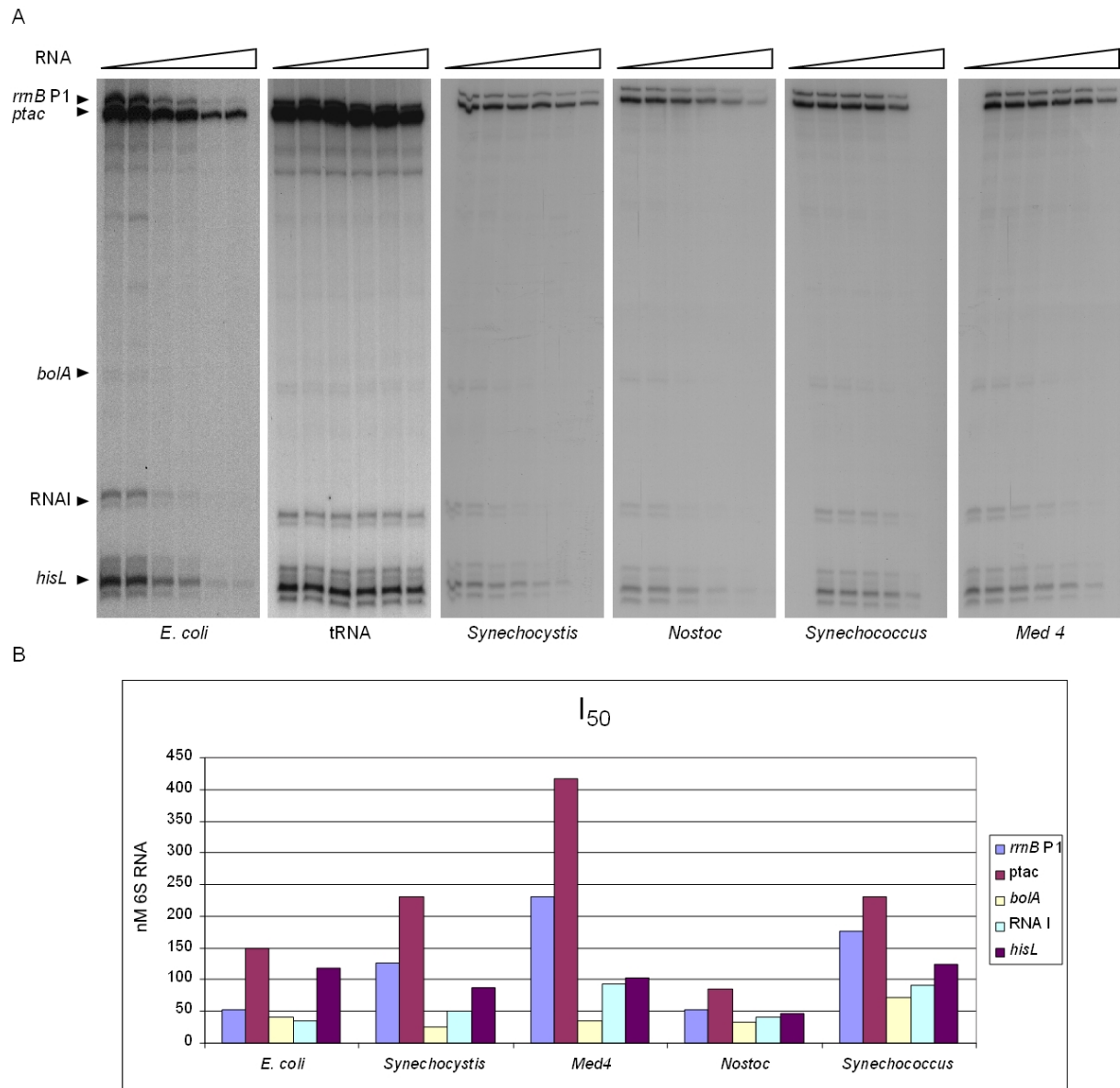


Abbildung 2.27 Inhibition von *in vitro* Transkription mit superhelikalem Multipromotortemplate durch 6S RNAs aus *E. coli* und vier verschiedenen Cyanobakterien

(A) Die Transkription wurde durchgeführt mit 5 nM *Template* (pSH666-2) und 15 nM RNAP, RNA Konzentrationen betrugen 0/10/50/100/200/500 nM. Die spezifischen Transkriptionsprodukte sind seitlich mit Pfeilen markiert. (B) Quantitative Auswertung, die Normalisierung wurde für jeden Promotor auf die Aktivität bei 0 nM 6S RNA durchgeführt, diese wurde gleich 100% gesetzt. Als Indikator für die Stärke der Inhibition ist für jeden Promotor die Konzentration 6S RNA angegeben, die zu einer Inhibition von 50% führt.

Die Reihenfolge der Promotoren, angefangen mit dem höchsten I_{50} -Wert (*ptac*), bis zum niedrigsten (*bolA*) ist für alle cyanobakteriellen 6S RNAs identisch und mit Ausnahme des *bolA* und RNAI Promotors auch mit der 6S RNA aus *E. coli* vergleichbar. Die I_{50} -Werte für den *bolA* und RNAI Promotor bei der *E. coli* 6S RNA liegen jedoch sehr nah beieinander und die Unterschiede sind im Rahmen der Auswertung daher nicht zwingend signifikant.

2.3.4 Hohe NTP-Konzentrationen führen *in vitro* zur Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe

Nachdem die Bindung der cyanobakteriellen 6S RNAs und die daraus resultierende Transkriptionsinhibierung *in vitro* bestätigt wurde, war von Interesse, ob es, analog der 6S RNA aus *E. coli*, möglich ist, diese Komplexe wieder aufzulösen. Um dies zu analysieren wurden in Retardierungsanalysen vorgeformte Komplexe aus den cyanobakteriellen 6S RNAs und der RNAP in Gegenwart steigender NTP-Konzentrationen untersucht. Es wurden in einem Mastermix jeweils 15 nM 6S RNA mit 50 nM RNAP zur Komplexbildung inkubiert (siehe 2.3.2) und die Komplexe anschliessend zu steigenden Konzentrationen ribo-NTPs (vorgewärmt auf 30°C) gegeben. Nach einer erneuten Inkubation für 5 min bei 30°C wurden die Ansätze über eine 5 %ige native PAGE getrennt und autoradiographiert. Aufgrund der Unmarkierbarkeit der *Med4* 6S RNA (siehe 2.3.2) musste die Untersuchung dieser RNA entfallen. In Abbildung 2.28 sind die Autoradiogramme der Analysen gezeigt. Man erkennt bei der *E. coli* 6S RNA bereits ab 50 μ M NTPs eine deutliche Abnahme der Komplexbande und gleichzeitig erscheint in gleichem Verhältnis eine Bande des 6S RNA~dnRNA Hybrids oberhalb der freien 6S RNA. Die Menge freier 6S RNA nimmt jedoch nicht wesentlich zu. Bei 500 μ M NTPs sind schliesslich keine 6S RNA~RNAP Komplexe mehr detektierbar. Bei *Synechocystis* zeigt sich ein ähnliches Bild. Bei 50 μ M NTPs nimmt die Komplexbande deutlich ab und es wird eine Bande oberhalb der freien RNA sichtbar. Im Unterschied zur *E. coli* 6S RNA sind jedoch auch bei 500 μ M NTPs noch RNA~RNAP Komplexe zu erkennen. Darüber hinaus erscheint eine zweite Bande oberhalb des ersten 6S RNA~dnRNA Hybrids. Für *Nostoc* und *Synechococcus* ist erst bei einer Konzentration von 100 μ M NTPs eine Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe und das Auftauchen der Hybridbande zu beobachten.

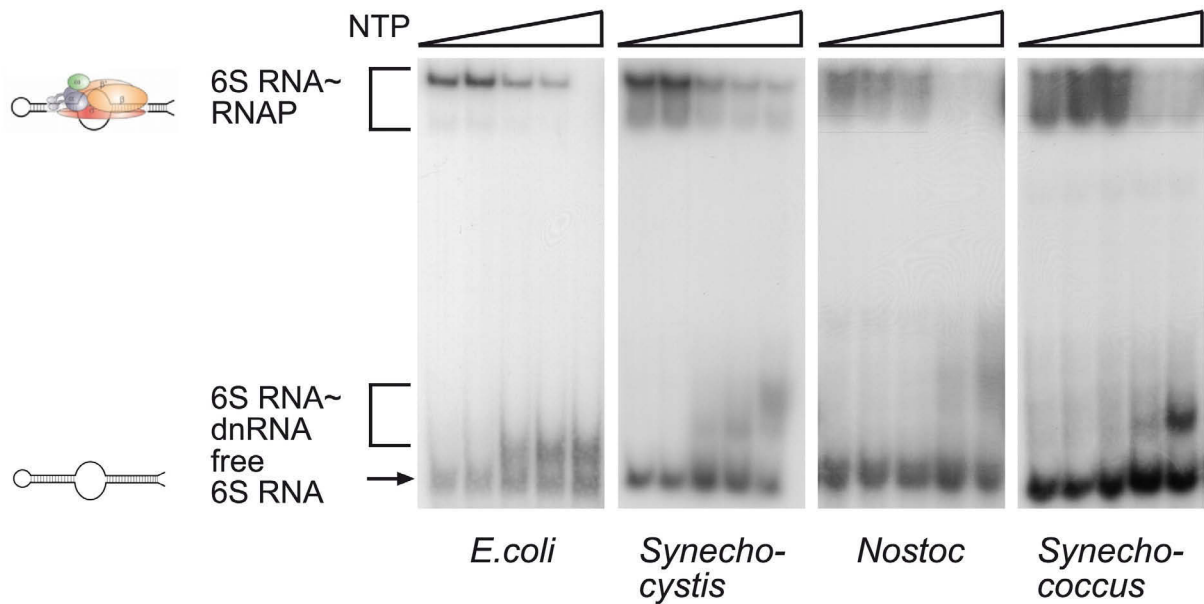


Abbildung 2.28 Komplexdissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe in Gegenwart von NTPs *in vitro*

Radioaktiv 3'-endmarkierte 6S RNAs (15 nM) wurden mit 50 nM RNAP zur Komplexbildung vorinkubiert und anschliessend mit steigenden Mengen NTPs behandelt (0/5/50/100 und 500 nM). Nach erneuter Inkubation erfolgte die Trennung auf einem 5 %igen PAA-Gel. Die freien RNAs, 6S RNA~RNAP Komplexe und resultierende Komplexe aus 6S RNA mit dnRNA sind seitlich markiert.

Selbst bei 500 μ M NTPs sind nicht alle RNA~RNAP Komplexe zerfallen. Im Fall von *Nostoc* scheint die 6S RNA~dnRNA Hybridbande deutlich langsamer zu laufen als für die drei anderen RNAs. Möglich wären zwei verschieden lange dnRNAs, die an die 6S RNA gebunden sind oder eine strukturelle Änderung innerhalb der 6S RNA.

2.3.5 *E. coli* RNA Polymerase ist in der Lage cyanobakterielle 6S RNAs als *Template* für *de novo* Synthese zu nutzen

Zuvor wurde gezeigt, dass *in vitro* der gleiche Mechanismus, der bei der *E. coli* 6S RNA eine Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe verursacht, auch bei cyanobakteriellen 6S RNAs greift. Ebenfalls ist nach dem Komplexzerfall in Retardierungsanalysen ein Komplex zu erkennen, der dem Hybrid aus 6S RNA und dnRNA entspricht. Für *Synechocystis* PCC6803 wurde in *deep sequencing* Analysen bereits eine sRNA entdeckt, die komplementär zu einer Region der 6S RNA nahe dem 5'-Ende ist (persönliche Mitteilung Dr. Ilka Axmann/Prof. Wolfgang Hess). Dieses Transkript ist mit 30 NT zwar länger als die *E. coli* dnRNA (14-20 NT), dennoch handelt es sich dabei um das dnRNA Homolog in *Synechocystis*. Im Gegensatz zu *E. coli* existiert allerdings auf dem non-*Template* Strang ein möglicher Promotor für die Synthese der dnRNA.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich dnRNA synthetisiert wird, wurden *in vitro* Transkriptionen mit den cyanobakteriellen 6S RNAs als *Template* durchgeführt (5.2.7.8).

In Abbildung 2.29 ist das Ergebnis der *in vitro* Transkription der *Synechocystis* 6S RNA im Vergleich mit der *E. coli* 6S RNA gezeigt. Für *E. coli* sind mit steigender Menge RNAP vermehrt kurze Transkripte von 14-20 NT zu sehen, dabei handelt es sich um die dnRNA, die an Position U44 der 6S RNA startet (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007; Wurm, Neußer *et al.* 2010). Für *Synechocystis* ist ebenfalls zu beobachten, dass dnRNAs gebildet werden und diese mit steigender Menge RNAP zunehmen. Insgesamt sind die Transkriptmengen etwas schwächer, aber die Transkripte sind mit bis zu 30 NT länger. Diese Länge entspricht exakt der Länge, die in den *deep sequencing* Analysen bereits beobachtet wurde. Es handelt sich dabei also wahrscheinlich um ein echtes *de novo* Transkript, dass durch Ablesen der *Synechocystis* 6S RNA synthetisiert wird. In (B) ist eine modellierte Sekundärstruktur für die *Synechocystis* 6S RNA gezeigt, in der die Positionen markiert sind, die der dnRNA entsprechen. Es fällt auf, dass der wahrscheinliche Start der Transkription an einer prägnanten Stelle innerhalb der zentralen Blase liegt, der vergleichbar mit der Startposition der dnRNA-Synthese in der *E. coli* 6S RNA ist.

Diese Analysen wurden auch mit den anderen cyanobakteriellen 6S RNAs durchgeführt, das Ergebnis ist in Abbildung 2.30 gezeigt. Von allen cyanobakteriellen 6S RNAs lassen sich *in vitro* dnRNAs synthetisieren. Für *Med4* sind nur relativ geringe Transkriptmengen zu erkennen. Dies liegt möglicherweise an der etwas abweichenden Länge (210 NT) und Struktur dieser RNA. Die Bindungsanalysen in Kapitel 2.3.2 zeigen auch eine schwächere Affinität zur RNAP für *Med4* 6S RNA, als für die *E. coli* oder anderen cyanobakteriellen 6S RNAs.

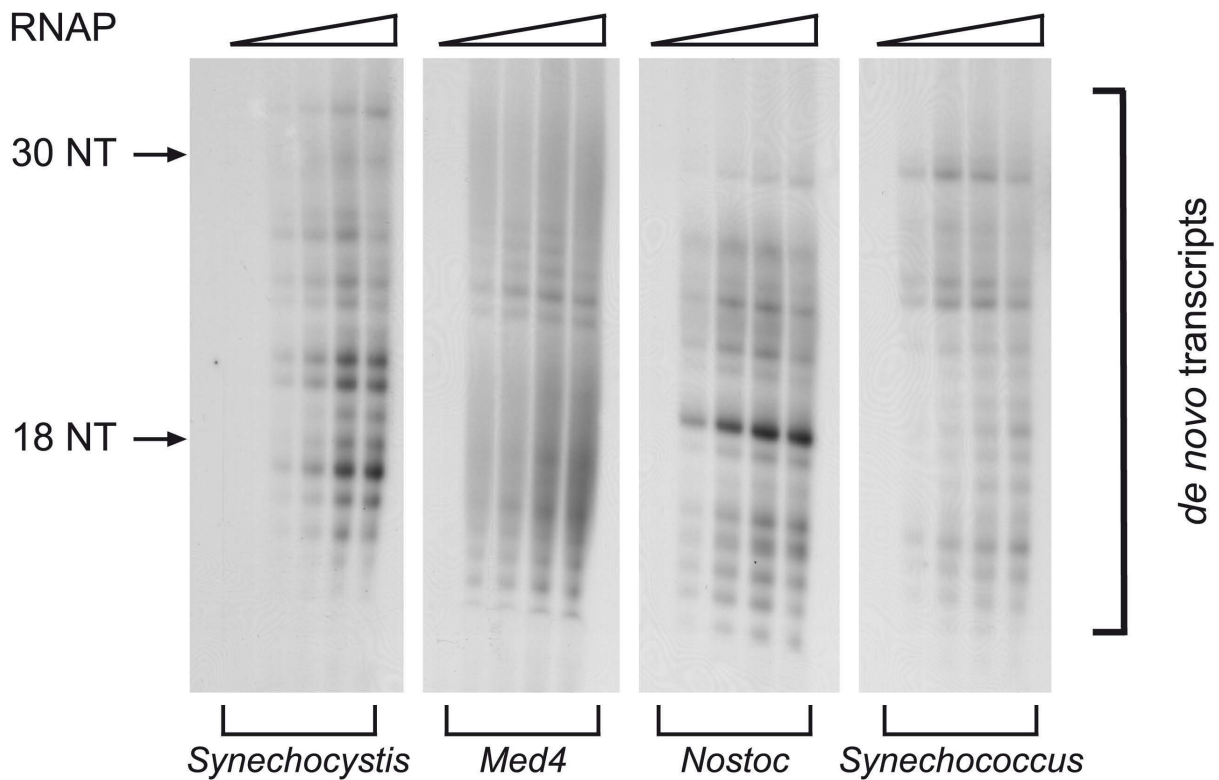


Abbildung 2.30 Synthese von 6S RNA basierten dnRNAs

300 nM 6S RNA (*Synechocystis* PCC6803, *Prochlorococcus* Med4, *Nostoc* 7120 und *Synechococcus* 7942) wurden mit steigenden Mengen RNAP aus *E. coli* (0/50/100/200/500 nM) in Abwesenheit jeglicher DNA inkubiert. Die radioaktive Markierung erfolgte durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP. Die Ansätze wurden vor der Trennung auf einer 15 %igen dPAGE mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung aufgereinigt. Die spezifischen *de novo* Transkripte und 2 Längenstandards sind seitlich markiert.

3 Diskussion

3.1 Physiologische Rolle der 6S RNA

3.1.1 Promotorspezifität der 6S RNA aus *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit sollten weiterführende Untersuchungen zur beschriebenen Promotorspezifität der 6S RNA-abhängigen Transkriptionsinhibierung durchgeführt werden. 6S RNA bindet bevorzugt an das σ^{70} -Holoenzym aus *E. coli*. Dem gängigen Modell nach inhibiert 6S RNA speziell σ^{70} -abhängige Promotoren, besonders effizient solche mit einer extended -10-Region (Wassarman and Storz 2000; Cavanagh, Klocko *et al.* 2008). Aufgrund einer eher konstitutiven Expression und der hohen Stabilität der 6S RNA akkumuliert diese über die Wachstumsphase und erreicht in der stationären Phase ein Maximum von 5000-10000 Molekülen in der Zelle (Kim and Lee 2004; Gildehaus 2005). Es wird daher vermutet, dass die 6S RNA massgeblich an der Umstellung der Transkription beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase beteiligt ist und indirekt zu einer Aktivierung der σ^{38} -abhängigen Transkription führt. Allerdings war, von einer minimal verbesserten Fitness bei langzeitstationärem Wachstum abgesehen, bislang kein ausgeprägter Phänotyp für die 6S RNA bekannt (Lee, Fournier *et al.* 1985; Trotochaud and Wassarman 2004).

Aus *in vivo* Einzelpromotoranalysen und einer genomweiten Transkriptomanalyse ist dagegen bereits bekannt, dass Promotoren sämtlicher Klassen durch 6S RNA beeinflusst sind. Dabei wurden in einer 6S RNA-defizienten Mutante *in vivo* sowohl Derepression als auch Inhibierungen festgestellt (Geißen 2007; Neußer, Polen *et al.* 2010). Bei *in vitro* Untersuchungen zeigten sich dagegen stets Inhibierungen der Transkription durch 6S RNA (Gildehaus 2005; Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch isolierte Promotoren untersucht. Um weiterführende Informationen über die Promotorspezifität der 6S RNA zu erhalten wurden *in vitro* Transkriptionen mit einem Multipromotor-*Template* durchgeführt. Der Vorteil liegt darin, dass sämtliche Promotoren auf dem selben *Template* liegen und direkte Wettbewerbsbedingungen herrschen. Dadurch ist eine selektive Inhibierung besser zu ermitteln.

Wie die Abbildung 2.1 des Ergebnisteils erkennen ließ, werden sämtliche Promotoren durch 6S RNA inhibiert werden, diese Inhibierung jedoch unterschiedlich stark ausfällt. Der

intrinsisch sehr starke *tac*-Promotor benötigte die höchste Konzentration 6S RNA für eine Transkriptionshemmung von 50% (146 nM). Bei schwachen Promotoren, wie dem *bolA* oder RNA I Promotor reichten dagegen schon Konzentrationen um 45 nM für den gleichen Grad der Hemmung.

Die Stärke eines Promotors ist Abhängig von der Affinität zur RNAP (Initiation zum RPc), der Isomerisierung zum offenen Komplex (RPo), der Effizienz der Bildung des ternären Komplexes durch Einbau der ersten NTPs (RP_{NTP}) und der Bildung des Elongationskomplexes (TEC) (siehe auch Abbildung 1.3).

Die Affinität eines Promotors zur RNAP ist *in vitro* in erster Linie von seiner Übereinstimmung mit der Konsensussequenz abhängig. Der *tac* Promotor weist die perfekte Konsensussequenz σ^{70} -abhängiger Promotoren auf und wird daher sehr gut von $E\sigma^{70}$ transkribiert. Die hohe Affinität dieses Promotors zur RNAP kann erst durch hohe Mengen 6S RNA kompetiert werden. Bei dem *bolA* Promotor handelt es sich dagegen um einen σ^{38} -abhängigen Promotor. Dieser wird zwar auch durch $E\sigma^{70}$ erkannt, hat aber speziell in der -35-Region nur eine sehr schwache Übereinstimmung mit der σ^{70} Konsensussequenz. Aus diesem Grund ist die Affinität von $E\sigma^{70}$ zu *bolA* deutlich schwächer, ersichtlich an sehr schwachen IVT-Produkten. Es reichen daher geringere Mengen 6S RNA für den gleichen Grad der Hemmung. Für alle Promotoren in Abbildung 2.1 ist zu erkennen, dass bei zunehmender Transkriptstärke (starke Aktivität *in vitro*) mehr 6S RNA für die Hemmung benötigt wird. 6S RNA tritt mit den Promotoren um die Bindung an die RNAP in Konkurrenz, wirkt also der Bildung von Initiationskomplexen (RPc) entgegen. Je stärker die Affinität eines Promotors zur RNAP ist, desto mehr 6S RNA wird für die Hemmung benötigt. Passend dazu wurde bei *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart von ppGpp und DksA (aktivieren den *hisL* Promotor *in vitro*) beobachtet, dass die notwendige 6S RNA-Konzentration für eine Hemmung des *hisL* Promotors deutlich anstieg (Daten nicht gezeigt).

Gestützt wird diese These der Bindungskompetition durch die Tatsache, dass die Bindung der 6S RNA an die RNAP über die gleichen Bindedomänen von σ^{70} erfolgt, die auch an der Erkennung von Promotoren beteiligt sind (Cavanagh, Klocko *et al.* 2008; Shephard, Dobson *et al.* 2010).

Dabei zeigt sich jedoch, dass eine leichte Erweiterung der Region 4.2 für die Bindung an der 6S RNA von Bedeutung ist. Die Domäne 4.2 ist über ein Helix-Turn-Helix Motiv an der Erkennung der -35-Region beteiligt. In Abbildung 3.1 ist schematisch gezeigt, welche Aminosäurepositionen für die Bindung an 6S RNA oder einem DNA Promotor entscheidend sind. Während für die Bindung an einen DNA Promotor scheinbar nur die Region 4.2

entscheidend ist, spielt bei der Bindung von 6S RNA auch Aminosäuren im C-Terminus eine entscheidende Rolle. Aminosäureaustausche in dieser Region führen zu einer verminderten Bindung von 6S RNA an die RNAP, die Promotorerkennung bleibt jedoch unbeeinflusst (Klocko and Wassarman 2009). Dies ist eine mögliche Erklärung, warum der starke *rrnB* P1 Promotor durch 6S RNA *in vitro* effizient inhibiert wird. Für ribosomale P1 Promotoren ist gezeigt, dass das UP-Element upstream der -35-Region ein entscheidender Faktor für die intrinsische Promotostärke ist. Über das UP-Element kann die RNAP zusätzlich zum Sigma-Faktor die mit dem Promotor interagieren und so die Bindung der RNAP verstärken (rekrutieren) (Ebright and Busby 1995). Die Bindung von 6S RNA an Sigma⁷⁰ über die Domäne 4.2 hinaus interferiert möglicherweise mit der Interaktion der α -Untereinheiten am UP-Element und führt zu der beobachteten, starken Inhibierung des *rrnB* P1.

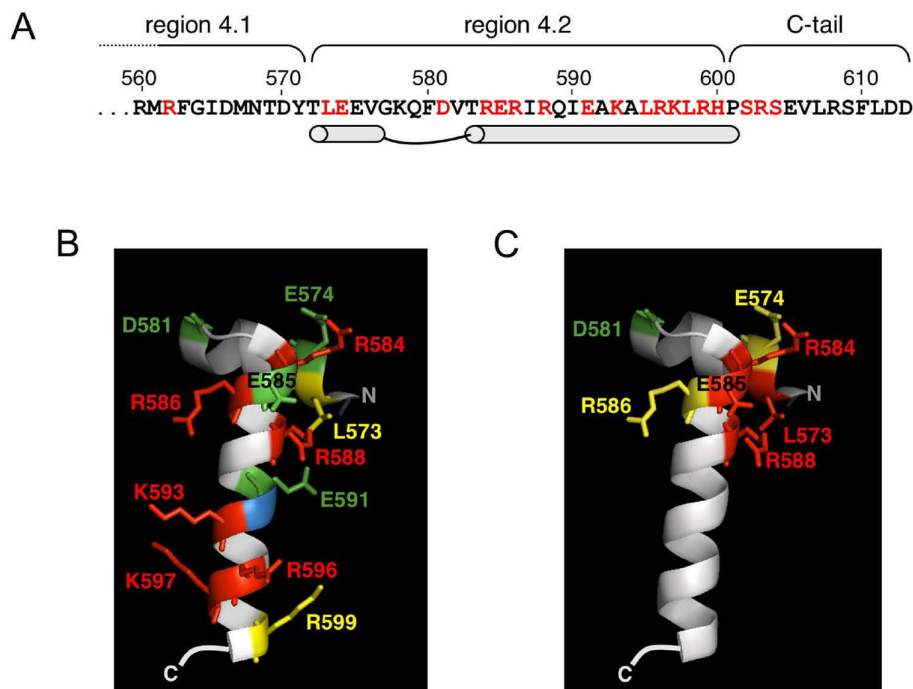


Abbildung 3.1 Bindedomäne 4.2 des *E. coli* Sigma⁷⁰-Faktors und Beteiligung an der Bindung von 6S RNA oder einem DNA-Promotor. (A) zeigt die Binderegionen 4.1 und 4.2, die an der Erkennung der -35-Region beteiligt sind. Die Bindung erfolgt über das schematisch dargestellte Helix-Turn-Helix Motiv (572-601). In Rot sind Positionen markiert, die durch Alanin substituiert wurden. In (B) und (C) sind die Effekte der Alanin-Substitutionen in diesem HTH-Motiv auf die Bindung von 6S RNA (B) und Promotor-DNA (C) gezeigt. Rot, stark verminderte Bindung; Gelb, leicht verminderte Bindung und Grün, verbesserte Bindung (Klocko and Wassarman 2009).

Ein Wettbewerbsmodell der 6S RNA mit Promotoren um die Bindung an die RNAP erklärt auch warum *in vivo* sämtliche Promotorklassen durch 6S RNA betroffen sind. Mit Ausnahme

der σ^{54} -abhängigen Promotoren können auch andere Promotorklassen, besonders σ^{38} -abhängige Promotoren, teilweise von $E\sigma^{70}$ erkannt werden (Becker and Hengge-Aronis 2001). Abhängig von der Übereinstimmung des Promotors mit der σ^{70} -Konsensussequenz ist die Affinität zur RNAP jedoch unterschiedlich stark und die 6S RNA tritt in Konkurrenz um die RNAP-Bindung. Durch die bevorzugte Bindung der 6S RNA an $E\sigma^{70}$ kann man eher von einer Polymerase-spezifischen Wirkung der 6S RNA als von einer Promotor-spezifischen Wirkung sprechen. Viele Stressgene können (z.B. *bolA*, *osmY*) *in vivo* auch durch $E\sigma^{70}$ transkribiert werden. Die Inhibierung durch 6S RNA könnte die Zelle in die Lage versetzen, Stressgene unter Bedingungen optimalen Wachstums stillzulegen. Für *osmY* ist zum Beispiel gezeigt, dass es bei osmotischem Stress zu einer Expressionzunahme auf das Sechs- bis Zehnfache kommt (Barron, May *et al.* 1986). In Abwesenheit der 6S RNA wurde in der stationären Phase eine Zunahme auf das Achtfache festgestellt (Geißén 2007). Es kommt also ohne 6S RNA zu einer Überexpression eines Stressgens, ohne dass der betreffende Stress vorliegt.

3.1.2 Physiologische Rolle der 6S RNA in der stationären Wachstumsphase

In den genomweiten Transkriptomanalysen zeigte sich zum einen, dass keine strikte Promotorspezifität für die 6S RNA-abhängige Transkriptionseinhibierung festgelegt werden kann. Zum anderen zeigte sich in der stationären Wachstumsphase überraschend eine Inhibierung von Genen des Translationsapparates bei fehlender 6S RNA. Es waren nahezu alle ribosomalen Protein Operons und auch diverse Translationsfaktoren betroffen (Neußer, Polen *et al.* 2010). Anhand aller bisher existierenden und der hier in Kapitel 2.1.1 gezeigten Daten scheint eine direkte Aktivierung der Transkription durch 6S RNA unwahrscheinlich. Es war sogar eine globale Inhibierung der Transkription denkbar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine globale Transkriptionseinhibierung durch 6S RNA erfolgt und ob die verringerten mRNA-Level bei fehlender 6S RNA auf eine veränderte Promotoraktivität der betreffenden Operons zurück zu führen war. Die Ergebnisse in Kapitel 2.1.4 zeigen klar, dass es nicht zu einer globalen Transkriptionseinhibierung durch 6S RNA kommt. Der als konstitutiv exprimiert festgestellte *rhoL* Promotor zeigte auch nach Normierung auf einen extern zugefügten RNA-Standard, unabhängig der Wachstumsphase, keinerlei Aktivitätsunterschiede zwischen 6S RNA Mutante und Wildtyp.

Methodisch bedingt wurden in den Microarray Analysen nur mRNA-Spiegel erfasst. Da mRNAs post-transkriptioneller Regulation (Lebensdauer, Prozessierungen) unterliegen, spiegeln mRNA-Mengen jedoch nicht zwingend die Promotoraktivitäten wider (2.1.3). Daher wurden exemplarisch einzelne Promotoren ribosomaler Protein Operons auf ihre Aktivität in der stationären Wachstumsphase überprüft. Dazu wurden vergleichende Primer Extension Analysen mit promotornahen Primern durchgeführt. Es zeigte sich, dass in Korrelation mit den verringerten mRNA-Spiegeln für Gene ribosomaler Proteine, die korrespondierenden Promotoren bei fehlender 6S RNA ebenfalls inhibiert waren (2.1.3). Da jedoch die direkte Aktivierung der betreffenden Promotoren durch 6S RNA unwahrscheinlich schien, wurde ein indirekter Effekt vermutet.

Die Ribosomen-Synthese ist ein komplex regulierter Vorgang und über einen *translational feedback* Mechanismus an die Synthese ribosomaler RNAs gekoppelt (Yates and Nomura 1981; Wagner 2001; Kaczanowska and Ryden-Aulin 2007). In den Microarray Analysen wurden stabile RNAs nicht erfasst, daher wurde überprüft, ob auch die Synthese ribosomaler RNAs 6S RNA-abhängig verändert war. In den durchgeführten Primer Extension Analysen (Abbildung 2.4) zeigte sich, dass in der stationären Phase die Gesamtheit der rRNA P2 Promotoren in der 6S RNA Mutante verringerte Transkription aufwies. In der stationären Wachstumsphase ist die Aktivität der starken P1 Promotoren deutlich reduziert und die Hauptlast der rRNA Transkription wird durch die P2 Promotoren getragen (Aviv, Giladi *et al.* 1996). Die Reduktion der rProtein Transkription scheint daher eine Folge der verminderten rRNA Synthese in der stationären Phase zu sein.

Es ist bekannt, dass auch in der stationären Phase die Aktivität der rRNA P2 Promotoren durch den Wachstumsratenregulator ppGpp inhibiert wird (Zacharias, Göringer *et al.* 1989).

Die Analysen aus Kapitel 2.1.5 zeigen, dass in Korrelation mit der reduzierten Promotoraktivität der rRNA P2 Promotoren die basale ppGpp-Menge in der 6S RNA Mutante erhöht ist. Dieser Effekt ist darüber hinaus unabhängig von dem Ribosomen-assoziierten Protein RelA, das bei der Stringenten Kontrolle für die rasche Synthese hoher ppGpp-Mengen verantwortlich ist (Harshman and Yamazaki 1971; Block and Haseltine 1975). Zwar existieren Hinweise darauf, dass das Fehlen von 6S RNA zu einer erhöhten RelA Expression in der stationären Phase führt (Cavanagh, Chandrangsu *et al.* 2010), aber die RelA-abhängige ppGpp-Synthese ist ein Translations-gekoppelter Vorgang und die Translation ist in der stationären Phase bereits gedrosselt (Murray, Schneider *et al.* 2003). Auch ist nicht die Menge an RelA für eine effiziente ppGpp-Synthese entscheidend. RelA kann nach der Synthese von ppGpp vom Ribosom dissoziieren und an weiteren blockierten Ribosomen die Synthese

durchführen (Wendrich, Blaha *et al.* 2002). Zusätzlich zeigen die vorliegenden Analysen auch, dass die Translationskomponenten durch das Fehlen der 6S RNA reduziert sind, es also unwahrscheinlich ist, dass gleichzeitig die Translation verstärkt wird. Darüber hinaus handelt es sich bei den Stämmen aus den Transkriptomanalysen und den Analysen in den Kapiteln 2.1.2 bis 2.1.6 um *relA* defiziente Stämme. Die Wiederholung einiger Schlüsselexperimente mit einem *relA*-wildtypischen Hintergrund bestätigen zudem den Befund der reduzierten rRNA-Synthese, in Korrelation mit einer erhöhten basalen ppGpp-Menge in der 6S RNA Mutante (2.1.7). Daher lassen sich *relA*-abhängige Effekte ausschliessen.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich vermuten, dass die Zelle ein Ungleichgewicht der Wachstumsanpassung, verursacht durch den Wegfall der 6S RNA, mittels einer erhöhten basalen ppGpp-Konzentration ausgleicht. Das verantwortliche Enzym für den basalen ppGpp-Spiegel ist SpoT, das sowohl ppGpp synthetisieren als auch hydrolysieren kann (Sarubbi, Rudd *et al.* 1988). Möglicherweise ist durch das Fehlen der 6S RNA die Balance zwischen Hydrolyse und Synthese verschoben. Für eine direkte Interaktion von 6S RNA mit SpoT existieren keine Hinweise, aber eine Bindung von tRNAs an SpoT konnte bereits gezeigt werden (Richter, Fehr *et al.* 1979). Ein weiterer Effektor der SpoT Regulation ist zum Beispiel das Acyl-Carrier Protein (ACP) aus dem Fettstoffwechsel, dass unter *Starvation*-Bedingungen die SpoT-Aktivität moduliert (Battesti and Bouveret 2006). Auch ein Mangel an Phosphat- und Kohlenstoffquellen sind mögliche Faktoren, die SpoT beeinflussen (Wagner 2010). In der stationären Phase liegt generell ein Mangel an vielerlei Substraten vor und es zeigte sich, dass in der stationären Phase auch die Expression vieler Membranproteine und Transporter durch 6S RNA beeinflusst ist (Neußer, Polen *et al.* 2010).

Möglicherweise führt eine veränderte Fähigkeit, Metaboliten aufzunehmen oder zu sekretieren zu der Änderung der SpoT Aktivität. Da ppGpp direkt vom Nukleotidpool in der Zelle abhängt, ist auch die Korrelation der 6S RNA zum Purinstoffwechsel (häufige transkriptionelle Koppelung von *ssrS*-Genen mit Genen des Purinstoffwechsels) eine mögliche Verbindung zur ppGpp-Synthese.

3.1.3 Bedeutung der 6S RNA bei der Aufrechterhaltung des NTP-Spiegels in der logarithmischen Wachstumsphase

In Kapitel 2.1.6 wurde deutlich, dass es 6S RNA-abhängig zu einer differentiellen Regulation einzelner rRNA P1 Promotoren in der logarithmischen Wachstumsphase kommt. Während der *rrnB* P1 Promotor unbeeinflusst durch 6S RNA war, zeigte sich der *rrnD* P1 Promotor als

negativ 6S RNA reguliert. Die Konsensusregionen beider Promotoren sind sehr ähnlich, es handelt sich daher vermutlich nicht um einen Wettbewerbseffekt der 6S RNA auf die Transkriptionsinitiation. Ein entscheidender Unterschied zwischen beiden Promotoren besteht im Startnukleotid der Transkription. Bei *rrnD* P1 handelt es sich dabei um ein G, bei allen anderen rRNA P1 Promotoren, inklusive des *rrnB* B P1 wird dagegen ein A eingebaut. Nach einem Mutageneseaustausch G zu A beim Startnukleotid des *rrnD* P1 wurde dieser insensitive gegen 6S RNA (Abbildung 2.7). Bei *in vivo* Untersuchungen zur ppGpp-Sensitivität konnte bereits gezeigt werden, dass der *rrnD* P1 und *rrnB* P1 differentiell durch ppGpp inhibiert werden. Allerdings zeigte sich dabei, dass der *rrnD* P1 Promotor deutlich weniger inhibiert wird, als der *rrnB* P1 (Kolmsee 2005). Im vorliegenden Fall handelt es sich aber um einen umgekehrten Effekt, der daher nicht auf eine 6S RNA-abhängige Änderung des ppGpp-Spiegels in der logarithmischen Wachstumsphase zurückzuführen ist. Für rRNA P1 Promotoren ist bekannt, dass ihre Transkription unabhängig der ppGpp-Konzentration eine starke Abhängigkeit zur Konzentration des initialen NTPs (iNTP) besitzen (Gaal, Bartlett *et al.* 1997). Dabei steigert eine erhöhte iNTP-Konzentration die Lebensdauer der offenen Initiationskomplexe, erhöhte ppGpp-Mengen hingegen setzen diese herab.

Die verringerte Aktivität des *rrnD* P1 (Start mit G) in der 6S RNA Mutante, die nach dem Austausch G zu A komplementiert wird, ist daher möglicherweise auf eine Reduktion im GTP-Pool zurückzuführen. In Abwesenheit der 6S RNA wurde in Transkriptomanalysen eine deutliche Aktivierung (Faktor 12-18 erhöht) des Gens *guaD* festgestellt (Neußer, Polen *et al.* 2010). Dieses Gen kodiert für das Enzym Guanindesaminase, das durch Desaminierung von Guanin zu Xanthin den Abbau von Guanin katalysiert. Eine erhöhte Expression führt also direkt zu einem verringerten Guaninpool in der Zelle und könnte damit sekundär auch zu einer verringerten GTP-Menge führen. Dies könnte die Ursache für eine verringerte Aktivität des *rrnD* P1 Promotors sein. Zwar wurde auch das Gen *add* (Adenindesaminase) als verstärkt exprimiert in der 6S RNA Mutante beobachtet, der ATP-Spiegel scheint jedoch nicht verändert. Zum einen stieg die Expression in der Mutante hierbei nur auf den Faktor 2 an und zum anderen unterliegt der ATP-Spiegel als Hauptenergielieferant in der Zelle eher einer robusteren Homöostase.

Bereits in der exponentiellen Wachstumsphase sind mit etwa 1000 Molekülen pro Zelle signifikante Mengen 6S RNA vorhanden (Kim and Lee 2004). Zusammen mit der Tatsache, dass ohne 6S RNA *guaD* und auch *add* (Adenindeaminase) verstärkt exprimiert werden, spricht dies für eine Funktion der 6S RNA als Modulator des Purin/GTP-Metabolismus in der logarithmischen Wachstumsphase.

Die Suche nach weiteren zellulären Interaktionspartnern (2.2.10) hat gezeigt, dass ein weiteres Gen des Purinstoffwechsels in Zusammenhang mit 6S RNA steht. Durch die Affinitätsbindestudien wurde das Enzym FolE als potentieller Bindepartner für 6S RNA identifiziert. Bei FolE handelt es sich um eine GTP-Cyclohydrolase. Dieses katalysiert den Abbau von GTP zu H₂-neopterin-PPP und Formiat (Suzuki and Brown 1974). Eine Bindung von 6S RNA an dieses Enzym könnte dessen Aktivität modulieren und 6S RNA dadurch über einen weiteren Weg den GTP-Spiegel in der Zelle beeinflussen (siehe auch 3.1.3).

3.1.4 6S RNA ist sowohl in der logarithmischen als auch der stationären Phase an der Wachstumsbalance beteiligt

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 6S RNA sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase im Zentrum der Wachstumsadaptation steht. Es deutet sich an, dass dies jedoch durch zwei verschiedene Mechanismen geschieht. In der exponentiellen Phase scheint die Wirkung direkt über die Kontrolle des Purinstoffwechsels zu erfolgen. Gene für die Purinverwertung (*add*, *folD*, *guaD*) werden durch 6S RNA inhibiert. Die starke Inhibierung von *guaD* (10 bis 18-fach in der exponentiellen Phase) deutet dabei auf einen direkten Effekt hin. Diese Inhibierung stabilisiert den NTP-Pool, der für die Synthese ribosomaler RNAs ein wichtiger Schrittmacher ist (Gaal, Bartlett *et al.* 1997).

In der stationären Wachstumsphase führt das Fehlen der 6S RNA dazu, dass die Transkription der *housekeeping* Gene nicht gedrosselt wird und wichtige Ressourcen verschwendet werden. Als Folge wird kompensatorisch über eine, noch ungeklärte Änderung der SpoT-Aktivität die basale Menge ppGpp erhöht und die Transkription der rRNAs reduziert. Als Resultat der reduzierten rRNA-Synthese wird auch die Ribosomensynthese vermindert (Yates and Nomura 1981). Für den NTP-Pool und die basale ppGpp-Menge ist diese bivalente Wirkung bereits beschrieben (Murray, Schneider *et al.* 2003). Demnach wäre die 6S RNA also sowohl an der Aufrechterhaltung schnellen Wachstums in der exponentiellen Phase als auch an der Reduzierung Ressourcen-intensiver Synthesen während der stationären Phase beteiligt.

Für die 6S RNA ist im Zusammenspiel mit Eσ⁷⁰ in der stationären Phase zusätzlich eine ähnliche Rolle denkbar, wie sie bereits für den *ribosome modulation factor* RMF bekannt ist. Durch Komplexierung von 70S Ribosomen mit diesem RMF während Mangelperioden entstehen inaktive Ribosomen, die als 100S Ribosomen "gelagert" werden. Bei verbesserten Bedingungen, z.B. einem *nutritional upshift*, müssen diese dann nicht aufwendig neu

synthetisiert werden und es kann eine schnelle Proteinbiosynthese stattfinden (Yamagishi, Matsushima *et al.* 1993; Yoshida, Maki *et al.* 2002). Interessanterweise ist auch für die Transkription von *rmf* dem Gen für RMF eine positive Wirkung der basalen ppGpp-Konzentration bekannt (Izutsu, Wada *et al.* 2001). Der erhöhte ppGpp-Spiegel in der 6S RNA Mutante könnte also zusätzlich zu einer vermehrten Ribosomeninaktivierung in der stationären Phase führen. Dadurch würde trotz der fortgeführten Transkription von *housekeeping* Genen die Translation dieser Gene nicht im gleichen Verhältnis stattfinden und Metabolite würden gespart. Translation ist, neben dem Verbrauch an Aminosäuren, zum Beispiel ein Hauptkonsument von GTP und ATP in der Zelle (Schneider, Gaal *et al.* 2002).

3.1.5 Einfluss der 6S RNA während des *outgrowth* aus der stationären Wachstumsphase

Durch die Akkumulation der 6S RNA über den Wachstumsverlauf wird angenommen, dass in der stationären Wachstumsphase ein Großteil des σ^{70} Holoenzym durch 6S RNA inaktiviert wird (Wassarman and Storz 2000; Kim and Lee 2004). Die Transkription würde demnach vorwiegend von dem stationäre Phase spezifischen Holoenzym $E\sigma^{38}$ übernommen. Durch den Mechanismus der dnRNA Synthese wird die RNAP aus dem Komplex mit 6S RNA entlassen und diese Blockade aufgehoben (Wassarman and Saecker 2006; Wurm, Neußer *et al.* 2010). Es stellt sich jedoch die Frage, ob 6S RNA oder die dnRNA selbst darüber hinaus eine Funktion während des *outgrowth* aus der stationären Phase ausübt. Um Informationen über 6S RNA-abhängige Regulation während des *outgrowth* zu erhalten, wurden Microarray Analysen mit 6S RNA Mutante und Wildtyp nach einem *nutritional upshift* durchgeführt. Bei der Vielzahl möglicher Zielgene wurde explizit auf die Gengruppen geachtet, die auch schon in den Microarrays der stationären Wachstumsphase Auffälligkeiten zeigten. Hauptsächlich handelte es sich dabei um Gene für ribosomale Proteine, Translationsfaktoren und Bestandteile der RNA Polymerase (Neußer, Polen *et al.* 2010). Dabei wurde im zeitlichen Verlauf die Veränderung der relativen Verhältnisse der mRNA-Mengen zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet.

Bei den meisten Genen für ribosomale Proteine wurde festgestellt, dass sie vor dem *upshift* eine Reduktion der mRNA Level in der Mutante aufweisen (Tabelle 2.1, Tabelle 7.11). Die Situation vor *upshift* (üN-Wachstums in Mangelmedium) ist vergleichbar mit einer stationären Wachstumsphase. Die Reduktion der rProteine ist daher in Übereinstimmung mit

den Microarray-Daten der stationären Phase. Im zeitlichen Verlauf des *upshifts* zeigt sich dann einheitlich für alle rProtein-Gene, dass die Expression in der 6S RNA Mutante im Verhältnis zum Wildtyp ansteigt. Für das Gen *rpsL* zum Beispiel ist vor *upshift* ein Verhältnis Mutante/WT von 0,42 zu beobachten. Nach 5 Minuten ist die Expression in der Mutante bereits leicht höher als im WT (1,2) und 10 Minuten nach *upshift* wurde in der Mutante fast doppelt soviel mRNA für *rpsL* festgestellt, wie im WT (1,9). Dieses Verhalten betrifft auch die Translationsfaktoren, z.B. EF-Tu und IF1, jedoch nicht alle rProtein-modifizierenden Enzyme (*rimJ*, *rimL*, *rsmC*). Offenbar sind die rProtein-modifizierenden Enzyme nicht limitierend für Ribosomensynthese und nicht in vollem von der Regulation Umfang betroffen. Um das verbesserte Nahrungsangebot effizient nutzen zu können gleicht die Zelle offensichtlich, den Mangel an Translationskomponenten in der 6S RNA Mutante durch erhöhte Expression aus. Denkbar ist auch hier wieder die Rückkoppelung über eine vermehrte rRNA-Synthese (leider lieferten die Primer für die rRNA Promotoren keine verwertbaren Signale in den Microarrays).

Die rRNA-Synthese selbst ist komplex reguliert und es können neben ppGpp auch noch andere Transkriptionsregulatoren, wie zum Beispiel FIS (*factor for inversion stimulation*) beteiligt sein. FIS stimuliert die Transkription der ribosomalen P1 Promotoren in der exponentiellen Phase durch Bindung in der *upstream* Region und dadurch resultierendem *recruitment* der RNAP (Afflerbach, Schröder *et al.* 1999). Aufgrund der Tatsache, dass *fis* in den vorangegangenen Transkriptomanalysen der stationären Phase nicht auffällig war, wurde in den vorliegenden Analysen nach *upshift* die mRNA-Spiegel für *fis* zunächst nicht ausgewertet. Jedoch zeigte sich nach erneuter Sichtung der Daten, dass auch für *fis* der gleiche Trend der erhöhten mRNA-Menge in der 6S RNA Mutante zu beobachten gewesen ist (Tabelle 7.11). FIS ist also möglicherweise ein bestimmender Faktor für die erhöhte Expression des Translationsapparates in der Mutante. Gestützt wird die Idee der Kompensation in der Mutante dadurch, dass auch der Transkriptionsapparat in der 6S RNA Mutante stärker induziert wird als im WT. Dabei sind jedoch hauptsächlich die Gene betroffen, die für die Rekonstitution der *housekeeping* RNAP $E\sigma^{70}$ von Bedeutung sind: α , β , β' , ω und σ^{70} (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoZ* und *rpoD*). Alternative Sigma-Faktoren zeigen kein einheitliches Bild der verstärkten Expression in der Mutante.

Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch das Fehlen der 6S RNA viel $E\sigma^{70}$ DNA-gebunden vorliegt und somit wenig freies $E\sigma^{70}$ vorhanden ist. Im Wildtyp wird die Menge an freiem $E\sigma^{70}$ unter *upshift* Bedingungen schnell durch die dnRNA-Synthese erhöht (Wurm, Neußer *et al.* 2010). Die Mutante kann diesen Mechanismus nicht nutzen und versucht daher,

den Pool freier $E\sigma^{70}$ RNAP auf andere Weise zu erhöhen. Für eine verstärkte Synthese der Transkriptionsmaschinerie in der Mutante spricht auch der, im Verhältnis zum Wildtyp, leichte Anstieg des Transkriptionsfaktor Rho.

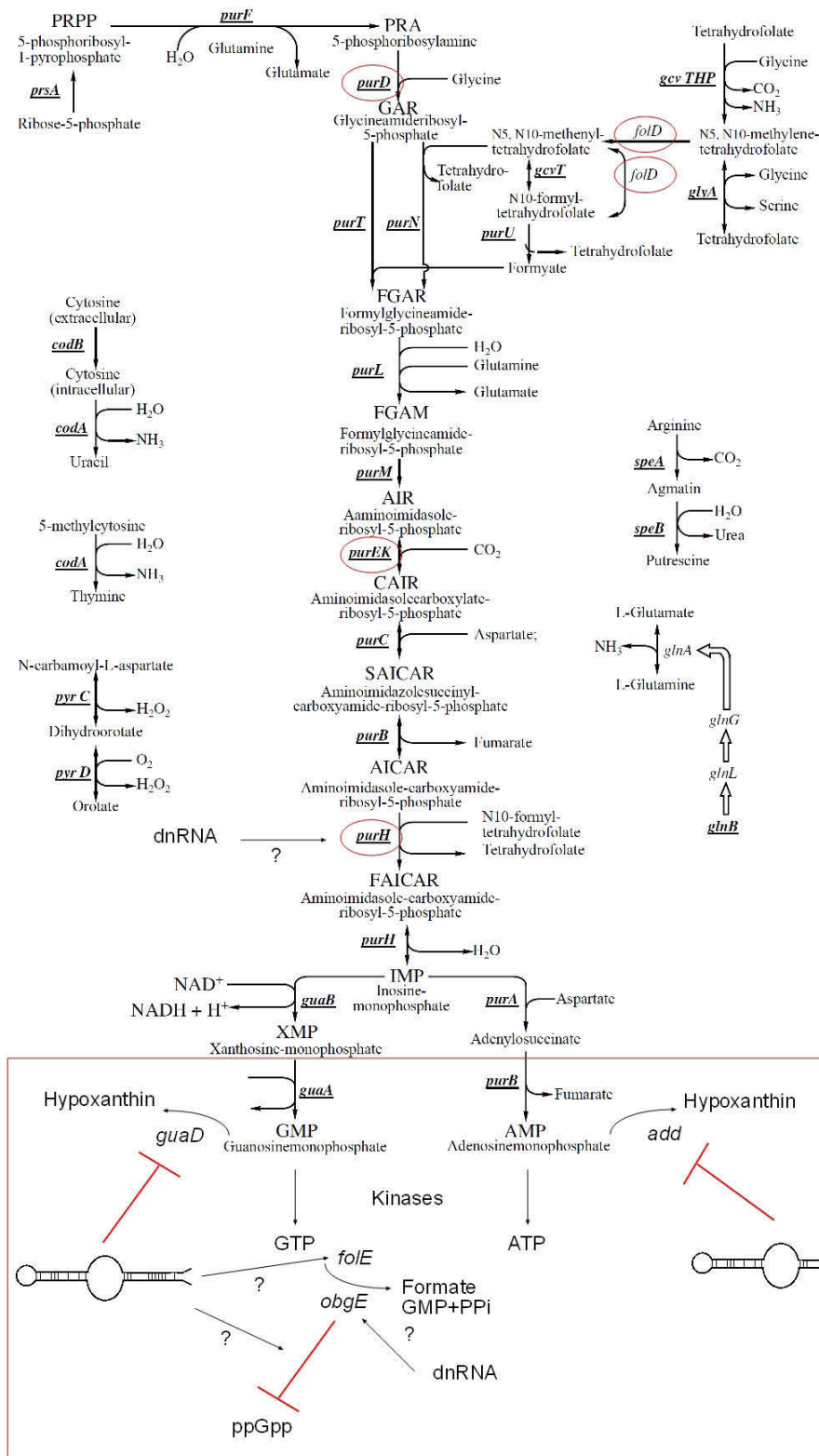
Bislang wird angenommen, dass der Prozess der dnRNA-Synthese wichtig für die Aufhebung der RNAP-Blockade durch 6S RNA ist. Über mögliche Funktionen der dnRNA selbst ist bis dato nichts bekannt. Da es sich bei der dnRNA ebenfalls um eine kleine ncRNA handelt, könnte eine mögliche Funktion in der Regulation von Genen liegen. Es wurde daher über den Webserver sRNATarget (Cao, Zhao *et al.* 2009) eine Vorhersage über mögliche Zielgene der dnRNA unternommen. Der Webserver nutzt das Model sRNATargetNB, welches auf 1000 sogenannte *classifier* zurückgreift. Ein Resultat von 0,5 sagt zum Beispiel aus, dass 500 der 1000 *classifier* ein positives Ergebnis für die ncRNA-Target Interaktion vorhersagen. Eine Übersicht aller vorhergesagten Treffer mit einem Resultat größer 0,1 ist im Anhang gezeigt (Tabelle 7.13) gezeigt. Bei den 63 potentiellen Zielgenen der dnRNA fielen besonders *purH* (0,116) und *obgE* (0,861) auf. Das Gen *purH* kodiert für ein Enzym, dass an der Synthese von Inosinmonophosphat (IMP), einem Grundbaustein der Purinsynthese, beteiligt ist (Aiba and Mizobuchi 1989). Eine mögliche Regulation dieses Gens im Zuge des *nutritional upshift* würde indirekt den Purinpool beeinflussen. Eine Hfq-vermittelte Funktion der dnRNA ist in diesem Zusammenhang ebenfalls denkbar (siehe auch 3.2.3)

Bei *obgE* handelt es sich um das Gen für eine GTPase. Für einen Deletionsstamm dieses Enzyms ist bereits gezeigt, dass es zu einer Verschiebung der SpoT-Aktivität kommt, resultierend in einem erhöhten basalen ppGpp-Spiegel (Jiang, Sullivan *et al.* 2007). In den Microarray Analysen zeigte sich zwar eine leichte Erhöhung in der 6S RNA Mutante, dennoch könnte eine mögliche Regulation der *obgE*-Expression durch dnRNA die Verbindung zum veränderten basalen ppGpp-Spiegel in der 6S RNA Mutante sein (2.1.5). Die Veränderungen im ppGpp-Spiegel wurden in der stationären Wachstumsphase festgestellt, in der keine Induktion der dnRNA-Synthese stattfindet, die Synthese geringer Mengen dnRNA kann jedoch auch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Bei Überexpression der 6S RNA ist bereits in der logarithmischen Wachstumsphase eine dnRNA-Synthese beobachtet worden (Steuten 2009).

3.1.6 Einbau aller gefundenen Zusammenhänge von 6SRNA und dem Purinstoffwechsel

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung der 6S RNA am Purinstoffwechsel beobachtet. Darüber hinaus sind bereits Fakten zur Koppelung von 6S RNA Transkriptionseinheiten mit Genen des Purinmetabolismus beschrieben. In Abbildung 3.2 wurden die neuen Erkenntnisse mit den bekannten Fakten schematisch in den Purinmetabolismus integriert. Es finden sich Gene, deren Transkription durch 6S RNA beeinflusst sind, wie z. B. *folD* im C1-Folatmetabolismus, *guaD* und *add* im Abbau von Purinen. Auch Gene, die genetisch mit 6S RNA in Zusammenhang stehen wie *purD* im C1-Stoffwechsel und *purE/K* (essentiell bei der Bildung von Vorstufen des IMP) sind zu erkennen. Weiterhin ist mit *folE* ein potentieller Interaktionspartner für 6S RNA beim Abbau von GTP beteiligt. Schliesslich finden sich auch Gene, die mögliche Ziele für eine dnRNA-abhängige Regulation darstellen (*purH* bei der Synthese von IMP, *obgE* im Abbau von GTP und als Modulator des ppGpp-Spiegels). Dies zeigt die wahrscheinliche Einbindung der 6S RNA in einen zentralen Metabolismus *in vivo*.

Eine ähnlich zentrale Rolle einer regulatorischen RNA konnte für die ncRNA RsaE (93 Nukleotide) in *S. aureus* bereits gezeigt werden. Dort ist RsaE zentral im C1- und Folatmetabolismus eingebunden (Bohn, Rigoulay *et al.* 2010).

Abbildung 3.2 Purin Metabolismus von *E. coli*

Zu sehen ist eine schematische Darstellung des Purin Metabolismus aus *E. coli*. Die Gennamen der korrespondierenden Enzyme sind angegeben. Dabei sind Gene, für die es experimentelle Daten gibt unterstrichen. Mit roten Kreisen sind im oberen Teil Gene markiert, die in Zusammenhang mit 6S RNA oder einer Regulation durch 6S RNA/dnRNA stehen. Im rot eingerahmten unteren Teil ist das Schema zusätzlich um funktionelle Zusammenhänge ergänzt, die in der vorliegenden Arbeit erarbeitet wurden. Verändert nach (Ravcheev, Gel'fand *et al.* 2002).

3.2 Effekte von Hfq auf 6S RNA

3.2.1 Bindung von Hfq an die 6S RNA

Das bakterielle RNA Chaperon Hfq ist in viele ncRNA-vermittelte Regulationen in *E. coli* involviert und die Familie der Hfq-Proteine ist in gram-negativen, wie in gram-positiven Bakterien weit verbreitet (Sun, Zhulin *et al.* 2002). Zusammen mit der kürzlich entdeckten Bindung von Hfq an die 6S RNA aus *E. coli* (Windbichler, von Pelchrzim *et al.* 2008) stellte sich die Frage, ob auch die 6S RNA-abhängige Regulation durch Hfq moduliert wird. Hfq bindet bevorzugt einzelsträngige A/U-reiche Regionen, die in Nachbarschaft zu gepaarten Stammregionen liegen ((Folichon, Arluison *et al.* 2003). Diese Kriterien treffen auch für die zentrale Blase der 6S RNA zu (Abbildung 1.11). Die Bindestudien in Abbildung 2.12 belegen eine spezifische Bindung von Hfq an die 6S RNA. Die K_d für die Bindung lag mit ca. 400 nM (Hfq₆) für eine Hfq-RNA Interaktion zwar relativ hoch, sie liegt aber dennoch im physiologischen Bereich für Hfq ((Kajitani and Ishihama 1991; Vassilieva, Rouzanov *et al.* 2002). Die Bindung erfolgt vermutlich an die distale Bindeposition auf dem Hfq-Hexamer, da die proximale Höhlung mit 8-10 Å Durchmesser zu eng ist (Brennan and Link 2007). Auch für gekrümmte A-reiche dsDNA-Fragmente ist eine Bindung an die distale Bindeposition für Hfq bereits gezeigt, die Bindekonstanten lagen ebenfalls bei 400 nM für das Hexamer (Updegrove, Correia *et al.* 2010). Oft ist eine intrinsische Krümmung bei DNA auf hohen AT-Gehalt zurückzuführen, welcher auch zu einem erleichterten Aufschmelzen der DNA, ähnlich einem offenen Promotor führt. Auch die Sekundärstruktur der 6S RNA zeigt diese Homologie zu einem aufgeschmolzenen Promotor (Abbildung 1.11). Dies könnte eine Erklärung für ähnliches Bindeverhalten der 6S RNA und dsDNA an Hfq sein.

In den Retardierungsanalysen zeigten sich für die Bindung von Hfq an 6S RNA zwei Komplexbanden, wovon die schneller laufende bei steigenden Hfq-Konzentrationen verschwand (Abbildung 2.12). Dies deutet entweder auf zwei unabhängige Bindepositionen von Hfq auf der 6S RNA hin oder es erfolgt eine Dimerisierung von Hfq-Hexameren an der 6S RNA. Eine solche Dimerisierung ist bereits für die Bindung von Hfq an die Domäne II der DsrA RNA bekannt (Sun and Wartell 2006).

Bei weiterführenden Bindestudien (2.2.2) zeigte sich, dass die Komplexbildung von 6S RNA mit der RNAP in Gegenwart von Hfq gestört war. Die Komplexbildung war jedoch nur in einer direkten Kompetiton von Hfq und RNAP um die Bindung an 6S RNA behindert. Die

Gegenwart von Hfq führte unter den gewählten Bedingungen nicht zur Dissoziation bereits gebildeter 6S RNA~RNAP Komplexe. In direkter Konkurrenz resultierte die Gegenwart von Hfq auch zu einer deutlich verringerten 6S RNA-abhängigen Inhibierung der *in vitro* Transkription. Bei hohen Hfq-Konzentrationen (5 μ M Monomer) war die 6S RNA-abhängige Inhibierung vollständig aufgehoben (2.2.3). Hfq ist demnach in der Lage die Transkriptionsinhibierung der 6S RNA durch "wegfangen" zu reduzieren. Für Hfq ist bekannt, dass es in Kombination mit dem ribosomalen Protein S1 mit der RNAP interagieren kann und dies bei gekoppelten Transkriptions-Translations-Systemen zu einer verbesserten Transkription führt (Sukhodolets and Garges 2003). Diese Möglichkeit ist jedoch in den hier verwendeten IVT-Systemen nicht gegeben und durch die Aufreinigung des Hfq sind Verunreinigungen mit S1 ausgeschlossen (Vassilieva, Rouzanov *et al.* 2002). Die Vergleiche der Transkriptmengen in Abbildung 2.14 (Spuren 1 und 2) zeigen ebenfalls keine Änderung der Transkriptionseffizienz durch Hfq. Dieser *countersilencing*-Effekt von Hfq auf die inhibitorische Wirkung von 6S RNA könnte *in vivo* einer der Gründe sein, warum es nicht zu einer globalen Transkriptionsinhibierung durch 6S RNA kommt (2.1.4). Da dies ein wenig effizienter Weg wäre um lediglich die Inhibierung der 6S RNA zu modulieren, liegt die Vermutung nahe, dass Hfq weitere Funktionen in Zusammenhang mit 6S RNA ausübt, z.B. im Turnover der 6S RNA nach *upshift* oder während der dnRNA-Synthese.

3.2.2 Effekt von Hfq auf die dnRNA-Synthese und Dissoziation der 6S RNA~RNAP Komplexe *in vitro*

Die Konkurrenz von Hfq mit der RNAP um die Bindung an 6S RNA ließ vermuten, dass auch die Synthese der dnRNA durch die Bindung von Hfq an das *Template* 6S RNA verringert wird. Um den Einfluss von Hfq auf die *de novo* Synthese zu überprüfen wurden IVTs mit 6S RNA als *Template* in Gegenwart von Hfq durchgeführt. Dabei zeigte sich überraschenderweise kein Effekt von Hfq auf die gebildete Menge dnRNA (Abbildung 2.17). In den Studien zum Zerfall der 6S RNA~RNAP Komplexe unter Bedingungen der dnRNA-Synthese zeigte sich dagegen eine erhöhte Zerfallsrate, während der ersten Minuten nach NTP-Zugabe (Abbildung 2.18). Es ist daher möglich, dass eine verringerte *Template*-Menge in Gegenwart von Hfq durch eine Erhöhung der Syntheserate kompensiert wird. Ein Grund für die erhöhte Syntheserate könnte in der veränderten Flexibilität der zentralen Blase der 6S RNA in Gegenwart von geringen Mengen Hfq liegen (2.2.8). Diese Flexibilitätsänderung

betrifft die *upstream* Region der dnRNA Synthese. Wie später gezeigt können in der zentralen Blase durchaus gepaarte Bereiche vorliegen, die möglicherweise die Zugänglichkeit der Startregion der dnRNA-Synthese stören (3.3.1). Es ist denkbar, dass Hfq in einem ternären Komplex mit 6S RNA und RNAP die offene Promotorstruktur in der Startregion der dnRNA-Synthese bevorzugt wird. Eine solche Chaperon-Funktion ist für Hfq bereits bei der Bindung an die *sodB* mRNA gezeigt, dort führt Hfq zu der partiellen Öffnung eines Loop-Bereichs (Geissmann and Touati 2004).

In den Bindestudien zeigte sich klar, dass Hfq auch die 6S RNA-abhängige dnRNA binden kann. Die Bindung zeichnete sich dabei durch hohe Affinität und Selektivität aus (2.2.4). Eine Bindung von Hfq an kleine RNA-Oligos ist lange bekannt und auch die hohe Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich ist beschrieben. Die Bindung kann dabei an die distale oder proximale Bindeposition erfolgen (Sun and Wartell 2006). Unerwartet ist jedoch die scheinbare Spezifität der Bindung an die dnRNA. In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch verschiedene DNA/RNA-Oligonukleotide auf ihre Hfq-Bindung untersucht. Um eine Spezifität der Hfq-dnRNA Bindung weiter zu verifizieren, wäre es erforderlich, Bindestudien mit permutierten dnRNA-Sequenzen durchzuführen.

Weiterhin zeigte sich in den Bindestudien eine Komplexbande mit Hfq, die weder ein Hfq~6S RNA Komplex noch eine Komplex aus Hfq und dnRNA zu sein schien (2.2.7). Die Analysen zeigten, dass sowohl 6S RNA als auch dnRNA Bestandteil dieses Komplexes sein mussten. Dabei kann jedoch nicht zwischen Komplexen aus Hfq und dem 6S RNA~dnRNA Hybrid und ternären Komplexen aller drei Partner unterschieden werden. Hfq ist in der Lage durch seine beiden Bindestellen solche ternären Komplexe auszubilden und durch Bindung an die proximale und distale Seite die Interaktion von ncRNAs mit Ziel mRNAs zu erleichtern (Mikulecky, Kaw *et al.* 2004; Updegrove, Correia *et al.* 2011). Darüber hinaus kann die Bindung von Hfq an ein RNA-Hybrid aber auch zur Ablösung eines Stranges führen (Hopkins, Panja *et al.* 2009). Denkbar ist eine Bindung von Hfq an das 6S RNA~dnRNA Hybrid und Ablösung der dnRNA. Ein mögliches Indiz für das Ablösen der dnRNA ist die zusätzliche Bande auf Höhe der Hfq-dnRNA Komplexe in Abbildung 2.28.

In vivo könnte eine potentielle Funktion der dnRNA als Regulator durch Hfq vermittelt werden. Eine Hfq-vermittelte Funktion der dnRNA ist zum Beispiel für die in Kapitel 3.1.5. beschriebenen potentiellen Zielgene der dnRNA denkbar. Diese sind zwar bislang nicht als Hfq-abhängig beschrieben, es wurde bisher jedoch auch nicht nach Zielgenen für Hfq unter *outgrowth*-Bedingungen gesucht. Ein bekanntes Gen, das unter der Kontrolle von Hfq steht, ist *hha*. Es ist zusammen mit Hfq an der Entstehung von multiantibiotikaresistenten

Persisterzellen beteiligt. In einem Hfq-Deletionsstamm wurde eine 2-fach erhöhte Expression festgestellt (Kim and Wood 2009; Kim and Wood 2010). Auch in der 6S RNA Mutante zeigte sich ein erhöhter mRNA-Spiegel in der stationären Phase (2,4-fach). Diese Korrelation weist auf eine gemeinsame Regulation durch 6S RNA und Hfq hin.

3.2.3 Einfluss von Hfq auf 6S RNA und dnRNA *in vivo*

Die bisher gezeigten *in vitro* Daten zeigen klar eine Interaktion von Hfq mit 6S RNA, dnRNA und dem 6S RNA~dnRNA Hybrid. Um zu überprüfen, ob dies auch *in vivo* von Bedeutung ist, wurden *upshift* Experimente mit einem Hfq-defizienten Stamm und dem korrespondierenden Wildtyp durchgeführt und die Mengen von 6S RNA und dnRNA mittels Northern Blot überprüft (2.2.9). Denkbar waren dabei sowohl ein Schutz von 6S RNA und dnRNA durch Hfq als auch eine beschleunigte Degradation. Es zeigte sich, dass in der Hfq-Mutante vor *upshift* eine verringerte Menge 6S RNA vorhanden ist. Die reduzierte 6S RNA-Menge wurde auch durch Primer Extension Analysen in der stationären Phase bestätigt (Abbildung 2.10). Da in Abwesenheit von Hfq weniger 6S RNA zu detektieren war, kann vermutet werden, dass Hfq die 6S RNA durch Bindung im Bereich der zentralen Blase vor Abbau schützt.

Im Zuge des *upshifts* nahm die Menge an 6S RNA in beiden Stämmen ab, dabei war die Abnahme in der Mutante in Relation zur Ausgangsmenge jedoch deutlich geringer. Für die dnRNA liessen sich im Wildtyp bereits 3 Minuten nach Auslösen des *upshifts* signifikante Mengen dnRNA nachweisen, die bis 5 Minuten nach *upshift* konstant blieben. In der Mutante war die Menge nach 3 Minuten deutlich geringer und blieb, trotz eines Anstiegs nach 5 Minuten, hinter der Menge im Wildtyp zurück. Die höhere dnRNA-Menge im Wildtyp kann auf Schutz vor Abbau durch die effektive Bindung von dnRNA an Hfq zurückzuführen sein. Der Vergleich der *Northern Blot* Signale für 6S RNA mit den Signalen der parallel durchgeführten Primer Extension lässt jedoch die Vermutung zu, dass auch die Synthese der dnRNA durch Hfq stimuliert wird.

Dazu muss bemerkt werden, dass es sich bei dem in der Primer Extension verwendeten Primer um denselben handelt wie für die *Northern Blot* Analysen. Dieser weist eine leichte Überlappung mit der Binderegion der dnRNA auf. Während die *Northern Blot* Analysen relativ unempfindlich gegenüber dieser Interferenz von dnRNA sind, liefert die Primer Extension jedoch verringerte cDNA Mengen. Gründe dafür liegen wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Art der Probentrennung und Hybridisierung beider Methoden (siehe

5.2.7.3, 5.3.5). Korrespondierend mit den deutlich geringeren Mengen dnRNA, die im Northern Blot detektiert wurden, ist der Unterschied in den gemessenen 6S RNA-Mengen zwischen Northern Blot und Primer Extension daher ein Indiz dafür, dass im Wildtyp auch mehr dnRNA synthetisiert wurde. Für eine beschleunigte Synthese der dnRNA durch Hfq wurden in der vorliegenden Arbeit Anhaltspunkte gezeigt (2.2.6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Hfq *in vivo* die Stabilität der 6S RNA erhöht und auch die Menge der dnRNA nach *nutritional upshift* erhöht. Der Effekt auf die dnRNA ist dabei sowohl durch erhöhte Lebensdauer zu erklären als möglicherweise auch auf verbesserte Synthese zurückzuführen. Hfq könnte daher zusammen mit 6S RNA eine wichtige Rolle beim *outgrowth* aus der stationären Phase spielen, indem es hilft die Blockade der RNAP durch 6S RNA zu überwinden. Eine weitere Funktion von Hfq als Mediator einer dnRNA-vermittelten Regulation durch *annealing* an eine Ziel-RNA steht ebenfalls im Raum (siehe auch 3.1.5).

3.3 Mechanismen der 6S RNA in Cyanobakterien

Da mit Ausnahme der 6S RNA aus *B. subtilis* bislang nur Funktionsanalysen zur 6S RNA aus *E. coli* existieren, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob grundlegende Mechanismen der 6S RNA Funktion auch auf 6S RNAs aus Cyanobakterien übertragbar sind. Für ein besseres Verständnis der Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 Strukturvorhersagen für alle 4 verwendeten cyanobakteriellen 6S RNAs und der 6S RNA aus *E. coli* (E) gezeigt. Die *E. coli* Sekundärstruktur stimmt sehr gut mit dem veröffentlichten Strukturmodell aus Abbildung 1.11 überein. Anhand der angegebenen Basenpaarwahrscheinlichkeiten (rot = hoch) ist zu erkennen, dass die Stammregionen sehr konserviert sind und im Bereich des zentralen Loops erhöhte Flexibilität zu erwarten ist. Bei *Synechocystis* (A), *Nostoc* (B), und *Synechococcus* (C) weichen die Strukturvorhersagen auf den ersten Blick etwas von dieser Struktur ab. Es sind in dem Bereich des zentralen Loops 1-3 zusätzliche Hairpin-Strukturen zu erkennen. Die thermodynamischen Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Basenpaarungen und Stammregionen in diesem Bereich weisen jedoch auf eine relativ große Flexibilität dieser Strukturelemente hin. In einer aktuellen Arbeit wurde am Beispiel der 6S RNA gezeigt, dass sich eine Strukturhomologie von RNAs oft auf der Ebene suboptimaler Sekundärstrukturen erstreckt. Die Strukturhomologie liegt demnach darin, dass sich verschiedene 6S RNAs suboptimale Strukturen teilen und diese teilweise ineinander übergehen. Die individuellen, thermodynamisch stabilsten Strukturen können dabei deutlich voneinander abweichen (Panek,

Krasny *et al.* 2010). Allen 6S RNAs gemein ist dabei die Flexibilität im Bereich der zentralen Blase. Für die 6S RNA aus *Med4* ist anhand der vorhergesagten Sekundärstruktur zunächst keine Homologie zu erkennen. Die Zugehörigkeit zur Gruppe der 6S RNAs wurde erst durch Strukturalignments (siehe auch Abbildung 2.24) mit anderen cyanobakteriellen 6S RNAs ermittelt (Axmann, Kensche *et al.* 2005; Axmann, Holtzendorff *et al.* 2007). Die 6S RNA aus *Med4* ist mit 222 Nukleotiden deutlich länger als die 6S RNAs aus *E. coli* und den drei anderen Cyanobakterien. Durch die abweichende Länge bildet sich, trotz Sequenzhomologien zu den anderen cyanobakteriellen 6S RNAs (siehe Abbildung 7.2), eine deutlich veränderte optimale Sekundärstruktur. Man erkennt mehrere nebeneinander liegende Hairpin-Loops im Bereich der dem Closing Stem entspricht. Im korrespondierenden Bereich des Terminal Stem ist zu sehen, dass das 3'-Ende umgeklappt ist und mit sich selbst eine Stammregion bildet, während 5'-seitig ein Überhang herrscht. Durch diese Selbstkomplementarität ist das 3'-Ende vermutlich unzugänglich für die Endmarkierung durch RNA-Ligase (2.3.2). In dem Bereich der vermutlich den zentralen Loop repräsentiert sind mehrere thermodynamisch instabile Basenpaarungen zu sehen.

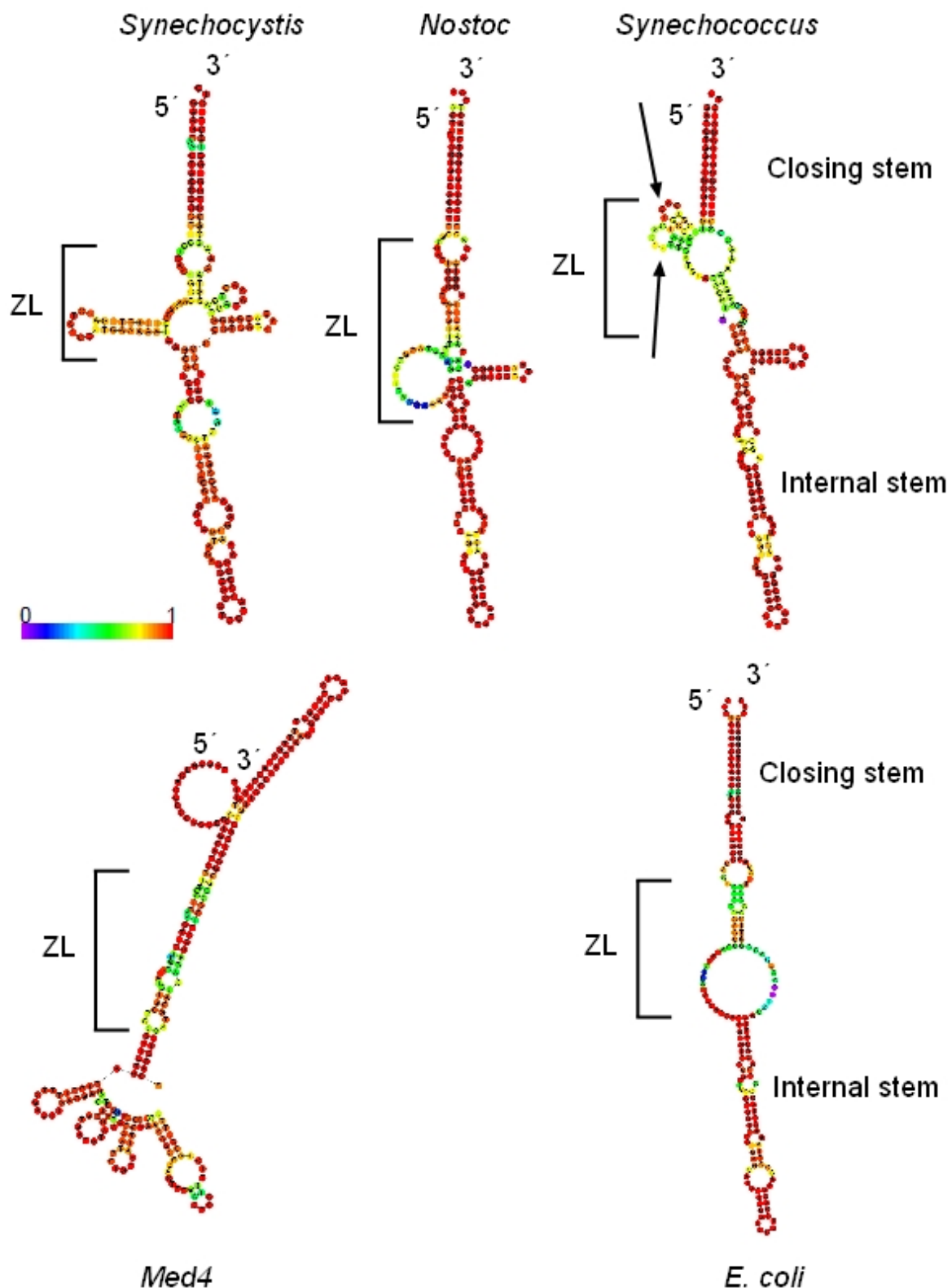


Abbildung 3.3 Sekundärstrukturvorhersagen der vier cyanobakteriellen 6S RNAs sowie der 6S RNA aus *E. coli*. **A:** *Synechocystis*, **B:** *Nostoc*, **C:** *Synechococcus*, **D:** *Med4* und **E:** *E. coli*. Die Vorhersagen wurden mittels des RNAfold Servers der Universität Wien durchgeführt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), dabei wurde der Algorithmus nach Turner 2004 verwendet. Der Farbcode gibt die thermodynamische Wahrscheinlichkeit für Basenpaarung der einzelnen Nukleotidpositionen an. ZL kennzeichnet einen strukturell dynamischen Bereich, der den zentralen Loop darstellt. Die Pfeile bei *Synechococcus* markieren instabile Hairpins, die vermutlich aufschmelzen können, ohne die Stabilität des Closing Stem und Internal Stem zu beeinflussen.

3.3.1 Temperaturabhängige Dynamik der cyanobakteriellen 6S RNAs

Zunächst wurde mittels TGGE Analysen untersucht, ob auch die cyanobakteriellen 6S RNAs eine Strukturdynamik wie die 6S RNA aus *E. coli* besitzen (2.3.1). Für die 6S RNA aus *E. coli* ist bekannt, dass bei einem T_m von ca. 46°C ein einziger diskontinuierlicher Übergang zu beobachten ist (Gildehaus, Neusser *et al.* 2007). Dabei handelt es sich um ein irreversibles Aufreissen in beide Richtungen der Sekundärstruktur, ausgehend von der zentralen Blase. Dadurch, dass dieser Vorgang aus dem Zentrum heraus gleichzeitig in beide Stammregionen geschieht, wird die gesamte Struktur plötzlich auseinander gerissen. Auch für die cyanobakteriellen 6S RNAs war ein ähnliches Verhalten zu beobachten. So zeigten alle 4 RNAs bei einem definierten T_m eine strukturell bedingte Mobilitätsänderung im Gel und oberhalb dieses T_m keine weiteren Auffälligkeiten im Laufverhalten. Während bei drei von vier RNAs dieser Übergang ebenfalls diskontinuierlich war, zeigte die 6S RNA aus *Med4* einen kontinuierlichen Übergang. Dies deutet auf einen reversiblen Aufschmelzvorgang mit intermediären Strukturen hin. Darüber hinaus waren für *Med4* auch unterhalb des T_m mehrere Strukturisomere zu erkennen, die sich im Übergang zu einer gemeinsamen Struktur zusammenfanden.

Anhand der abweichenden Sekundärstruktur der *Med4* RNA (Abbildung 3.3) lässt sich vermuten, dass es sich um koexistierende Strukturen handelt, in denen die 4 Hairpins im Bereich der Closing Stem Region variieren. Erst bei einer Temperatur nahe des T_m setzt sich eine dominante Form durch und führt zur Vereinigung der Banden im Gel. Im Verlauf des Aufschmelzens öffnen sich diese Bulge-Loops unabhängig voneinander und führen so zu einer kontinuierlichen Mobilitätsänderung. Dadurch, dass das Aufreissen der Struktur von einem Ende her passiert, können auch die instabilen Stammregionen nacheinander denaturieren und so ein kontinuierliches Aufschmelzen gewährleisten. Die Laufprofile für die 6S RNAs aus *Nostoc* und *Synechocystis* waren, abgesehen des niedrigeren T_m , homolog zu der *E. coli* 6S RNA und wiesen einen einzigen irreversiblen Übergang auf. Diese Tatsache weist darauf hin, dass auch hier nur eine einzige abrupte Strukturänderung stattfindet und ein Aufreissen der Sekundärstruktur von der zentralen Blase ausgeht. Beim Blick auf die Strukturvorhersagen lässt sich dieser Vorgang mit den vielen instabilen Basenpaarungen im Bereich des zentralen Loops erklären. Es finden sich mehrere Hairpin Loops bei der *Synechocystis* RNA und ein einzelner bei *Nostoc*, die direkt an der zentralen Blase liegen und bei Aufreissen dieser Blase nicht mehr genügend Stabilität behalten. Dadurch wird, analog zur *E. coli* 6S RNA, die komplette Sekundärstruktur instabil und denaturiert.

Der kombinierte Übergang bei der *Synechococcus* 6S RNA weist darauf hin, dass sich zunächst die beiden benachbarten metastabilen Hairpin Loops an der Zentralen Blase öffnen und zu einem Vergrößern der Blase führen (markiert durch Pfeile in Abbildung 3.3). Die Gesamtstruktur wird durch Fortbestand der beiden Stammregionen jedoch noch nicht destabilisiert. Erst durch weitere Temperaturerhöhung beginnt, analog zu *E. coli*, bei *Synechocystis* und *Nostoc* das komplette Aufreissen aus der zentralen Blase heraus und verursacht den irreversiblen Übergang im Gel. Die cyanobakteriellen 6S RNAs zeigen also, abgesehen von differentiellen Ausprägungen, eine ähnliche Dynamik im Bereich der zentralen Blase. In Abbildung 3.4 ist der Vergleich des Strukturalignments aus Abbildung 2.24 mit der Sekundärstruktur der *E. coli* 6S RNA alleine gezeigt. Man erkennt die große Homologie beider Strukturen. Im Vergleich zu den einzelnen Sekundärstrukturen fällt auf, dass beide Strukturen sehr ähnlich zu der 6S RNA von *Nostoc* sind, die optimale *E. coli* Sekundärstruktur in Abbildung 3.3 jedoch etwas abweicht und nicht den zusätzlichen Hairpin im Bereich der zentralen Blase aufweist. Möglicherweise ist die optimale Sekundärstruktur

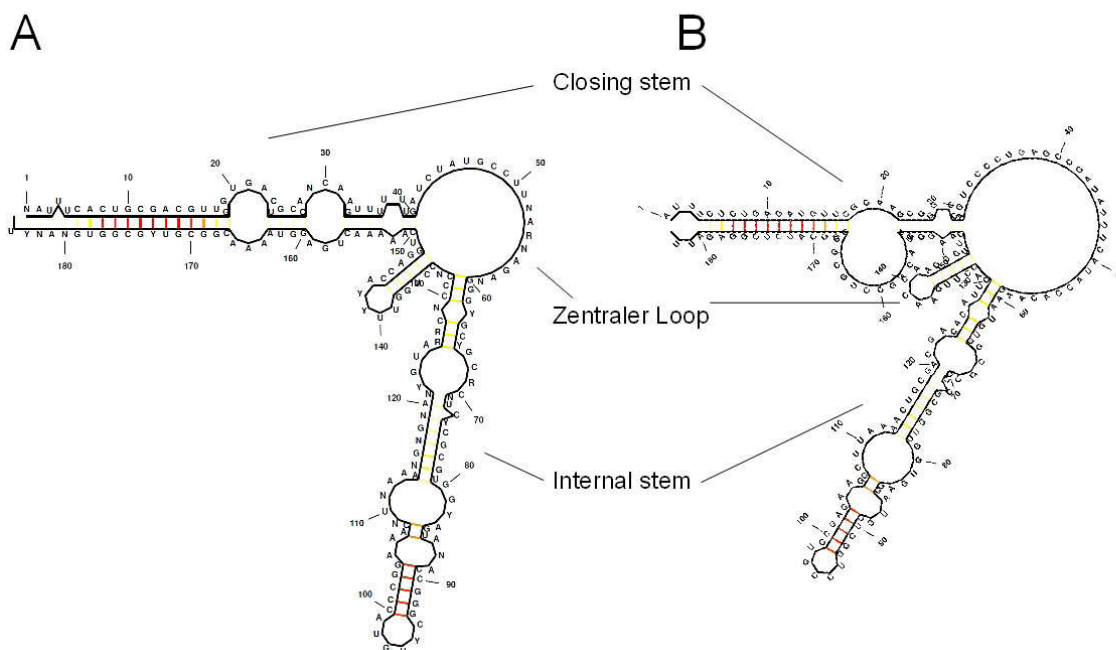


Abbildung 3.4 Strukturalignment verschiedener cyanobakterieller 6S RNAs und der 6S RNA aus *E. coli* im Vergleich zur Sekundärstruktur der *E. coli* 6S RNA

In (A) ist das Strukturalignment für alle cyanobakteriellen 6S RNAs zusammen mit der *E. coli* 6S RNA gezeigt. Basis für das Strukturalignment ist das Sequenzalignment der 6S RNAs aus *E. coli*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Synechococcus* und *Med4* (Abbildung 7.2). Angegeben sind sowohl Sequenz- als auch Basenpaarkonserviertheiten (N= Purin und R = Pyrimidin, Rot: hoch konserviert, Weiss: nicht konserviert). Angefertigt wurde dieses Alignment mit Hilfe der Software MAFFT Version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). In (B) ist die berechnete Sekundärstruktur der 6S RNA unter den gleichen Bedingungen gezeigt.

der 6S RNA aus *Nostoc* der gemeinsame Nenner der verwendeten 6S RNAs und bei den anderen 6S RNAs die suboptimale Struktur, die die Homologie erkennen lässt.

Neben der Gemeinsamkeit der suboptimalen Sekundärstrukturen gibt es eine weitere interessante Beobachtung. Die Unterschiede der T_m -Werte der einzelnen RNAs folgen der gleichen Reihenfolge, wie auch die Temperaturoptima für das Wachstum aller verwendeten Stämme. So hat z.B. *Med4* ein ideales Wachstum bei 20-22 °C und mit 28°C den niedrigsten T_m , während die Bedingungen für *Nostoc* bei 30°C am besten sind (persönliche Mitteilung Dr. Anne Rediger) und hier auch der höchste T_m der cyanobakteriellen 6S RNAs bestimmt wurde. Das Temperaturoptimum liegt für *E. coli* bei 37°C und auch der T_m ist mit 46°C deutlich höher als bei den 6S RNAs der Cyanobakterien. Dies weist auf eine Anpassung der 6S RNA-Strukturen, bzw. thermischen Stabilität an die bevorzugten Umgebungsbedingungen hin. Möglicherweise sind die variablen Temperaturbereiche des Aufschmelzens der Fähigkeit angepasst auch unter niedrigeren Temperaturen dnRNA-Synthese zu betreiben (siehe 3.3.2).

3.3.2 Interaktion der cyanobakteriellen 6S RNAs mit der RNA Polymerase aus *E. coli*

Mittels Bindestudien und Funktionsanalysen im heterologen System mit der RNAP aus *E. coli* wurde untersucht, ob die cyanobakteriellen 6S RNAs *in vitro* die gleichen Funktionen erfüllen können, wie die 6S RNA aus *E. coli*. Bei den Bindestudien zeigte sich, dass alle vier cyanobakteriellen 6S RNAs in der Lage sind, an $E\sigma^{70}$ zu binden. Die Affinität der RNAP zu den einzelnen 6S RNAs zeigte je nach 6S RNA Unterschiede (*E. coli* > *Nostoc* > *Synechocystis* > *Synechococcus* > *Med4*). Diese Unterschiede sind vermutlich zumindest teilweise auf die unterschiedlichen T_m -Werte zurückzuführen. Da die Aktivität der RNAP auch temperaturabhängig ist (Chamberlin, Nierman *et al.* 1979) wurden zur besseren Vergleichbarkeit sämtliche Funktionsanalysen mit der RNAP bei 30°C durchgeführt. Zwar liegen die T_m -Werte in einer TGGE experimentell bedingt unter den T_m -Werten in Lösung, dennoch ist es möglich, dass durch die Reaktionstemperatur von 30°C leichte Strukturvarianzen aufgetreten sind und somit zu einer reduzierten Bindefähigkeit geführt haben. Da für alle cyanobakteriellen 6S RNAs eine Bindung nachgewiesen werden konnte, wurde diesem Punkt nicht weiter nachgegangen.

In den Funktionsanalysen wurde bei *in vitro* Transkriptionen mit einem superhelikalen *Template* gezeigt, dass alle cyanobakteriellen 6S RNAs in der Lage sind, verschiedene

Promotorklassen zu inhibieren (2.3.3). Dabei zeigte sich analog zur 6S RNA aus *E. coli*, dass der Grad der Inhibierung invers zur Promotorstärke korreliert. Je stärker ein Promotor *in vitro* ist, desto mehr 6S RNA wird zur Inhibierung benötigt. Dieser Fakt bestätigt, dass auch cyanobakterielle 6S RNAs in der Lage sind, mit Promotoren um die Bindung an die RNAP zu kompetieren.

Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass sich *in vitro* die Komplexe aus 6S RNA und RNAP durch den gleichen Mechanismus der NTP-Zugabe auflösen lassen, wie er für *E. coli* bereits bekannt ist (Wurm, Neußer *et al.* 2010). Durch *in vitro* Transkriptionen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass alle cyanobakteriellen 6S RNAs als *Template* für eine dnRNA-Synthese genutzt werden können (2.3.4, 2.3.5). Für *Synechocystis* ist eine dnRNA *in vivo* bereits nachgewiesen worden, diese stimmt auch in der Länge von 30 Nukleotiden mit dem *in vitro* Produkt überein. Durch die Existenz eines potentiellen Promotors auf dem korrespondierenden antisense DNA-Strang bestand die Möglichkeit, dass diese ncRNA auf herkömmlichem Wege DNA-abhängig synthetisiert wird. Diese Option kann zwar durch die vorliegenden Resultate nicht ausgeschlossen werden, es ist anhand der gezeigten Daten jedoch plausibel, dass der Weg der RNA-basierten *de novo* Synthese auch *in vivo* durch die RNAP stattfindet.

Im Vergleich zur dnRNA aus *E. coli* (14-20 Nukleotide) fällt auf, dass die cyanobakteriellen dnRNAs mit ca. 14-30 Nukleotiden einheitlich länger sind. Die Synthese der dnRNA endet vermutlich durch eine Strukturänderung der 6S RNA, die dadurch begünstigt wird, dass die dnRNA perfekt mit der konservierten Region CR I paart (Abbildung 1.11). Als Resultat der dnRNA-Bindung an 6S RNA wird die CR IV frei und kann mit CR III interagieren, es folgt eine Strukturänderung der zentralen Blase (Steuten unveröffentlicht). Die Startpunkte der dnRNA-Synthese sind für *E. coli* und *Synechocystis* bekannt und liegen innerhalb der zentralen Blase. Die Endpunkte liegen für diese beiden RNAs am Beginn des Closing stems. Der Closing stem hat die höchste Stabilität innerhalb der 6S RNA. Vermutlich ist dieser Bereich für die RNAP schwieriger aufzuschmelzen und die Strukturumlagerung der zentralen Blase wird begünstigt.

Der Closing Stem ist sowohl auf Sequenz- als auch Strukturebene in all den verwendeten 6S RNAs hoch konserviert (siehe Abbildung 2.24), während der dynamische Bereich der zentralen Blase, der als Startpunkt der dnRNA-Synthese dient, variabel ist. Im Vergleich zur 6S RNA aus *E. coli* (31 NT) umfasst der dynamische Bereich jedoch eine höhere Nukleotidzahl (*Synechocystis* 42 NT, *Nostoc* 41 NT, *Synechococcus* 35 NT). Für *Nostoc*, *Synechococcus* und *Med4* existieren zwar keine Sequenzdaten zu möglichen dnRNAs, anhand

der hier gezeigten funktionellen Homologien ist jedoch wahrscheinlich, dass die Synthese ebenfalls im Bereich der zentralen Blase startet. Die abweichenden Längen der cyanobakteriellen dnRNAs könnten daher ein Resultat eines längeren *Template*-Bereichs innerhalb der zentralen Blase sein. Für *Med4* konnte aufgrund der abweichenden Sekundärstruktur dieser Bereich nicht genau bestimmt werden (siehe Abbildung 3.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich grundlegende Mechanismen der 6S RNA-Interaktion mit der RNAP aus *E. coli* auch auf heterologe Systeme mit 6S RNAs aus anderen Bakterienarten übertragen lassen. Dabei stellt die Struktur der 6S RNA ein entscheidendes Kriterium für funktionelle Homologie dar. Eine mögliche Anpassung an Lebensräume scheint dabei über die Flexibilität der zentralen Blase zu erfolgen, welche durch hohe Strukturvielfalt und daraus resultierende thermodynamisch Variabilität eine Anpassung der 6S RNA-abhängigen Regulation an verschiedene Temperaturbereiche ermöglicht.

3.4 Ausblick

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Rolle der 6S RNA *in vivo* weit komplexer ist, als nur für ein Umschalten der Transkription beim Übergang in die stationäre Phase zu sorgen. Die gezeigte Interaktion von 6S RNA mit dem Enzym FolE sollte unbedingt durch weitere Analysen verifiziert werden. Dazu wäre zunächst ein System zur präparativen Aufreinigung von FolE wichtig. Anschliessend könnten *in vitro* Binde- und Funktionsanalysen mit FolE in Gegenwart von 6S RNA durchgeführt werden. Dabei wäre eine geänderte Enzymaktivität von FolE in Gegenwart von 6S RNA relevant.

Die gezeigte Korrelation des basalen ppGpp-Spiegels mit dem Vorhandensein der 6S RNA wirft die Frage auf, welche Mechanismen hinter der 6S RNA-abhängigen Regulation des ppGpp-Spiegels stehen. Eine mögliche direkte Interaktion von 6S RNA mit dem bifunktionalen Enzym SpoT wäre dabei von Bedeutung und könnte mittels Bindestudien untersucht werden. Ebenfalls wäre hier die Untersuchung der Enzymaktivität in Gegenwart wichtig.

Im gleichen Zusammenhang wäre von Interesse, ob die potentielle Regulation des Gens *obgE* durch dnRNA *in vitro* und *in vivo* stattfinden kann und ob Hfq an dieser Regulation beteiligt ist. Um darüber Informationen zu erhalten könnten *in vitro* Interaktionsstudien mit dnRNA und der *obgE* mRNA, in An- und Abwesenheit von Hfq durchgeführt werden.

Für *in vivo* Analysen in diesem Zusammenhang bietet sich zunächst ein vorhandener Überexpressionsstamm von 6S RNA an, dort lassen sich auch in der stationären Phase bereits signifikante Mengen dnRNA nachweisen. Alternativ wäre ein 6S RNA-unabhängiges Expressionssystem für dnRNA von großem Interesse.

Aufgrund der wahrscheinlichen Beteiligung der 6S RNA auf vielen Ebenen des Purinstoffwechsels wären detailliertere Analysen unter Purinmangelbedingungen wichtig. Zum einen besteht die Möglichkeit die Purinsynthese gezielt mit dem Antibiotikum Decoyinin (Inhibitor der GMP-Synthetase) zu Inhibieren und zum anderen könnten diverse Stämme mit defekten im Purinstoffwechsel in Purinminimalmedium auf 6S RNA-abhängige Effekte untersucht werden.

Die *in vitro* und *in vivo* gezeigte Interaktion von Hfq mit 6S RNA und dnRNA sollte *in vitro* um detaillierte Strukturanalysen der Bindung von Hfq an 6S RNA und erweiterte Untersuchungen zur Spezifität der Hfq-Bindung an dnRNA ergänzt werden. Für weitergehende *in vivo* Analysen wäre eine Doppelmutante *ssrS/hfq* von Interesse.

Aufgrund der funktionellen Homologie der cyanobakteriellen 6S RNAs zur 6S RNA aus *E. coli* sollten Untersuchungen im homologen System mit der RNAP aus Cyanobakterien wiederholt werden. Dabei bietet sich an, mit diesem Enzym auch das invers heterologe System 6S RNA aus *E. coli* und RNAP aus Cyanobakterien zu testen. In diesem Zusammenhang könnte man auch untersuchen, ob durch Expression cyanobakterieller 6S RNAs in einem *E. coli ssrS* Deletionsstamm die gezeigten Phänotypen komplementierbar sind.

4 Material

4.1 Allgemeines

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders vermerkt den Reinheitsgrad *pro analysis*. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich hochreines Milli-Q-Wasser (hauseigene Anlage mit nachgeschaltetem *water purification system* EPA Est. 41237-MA-1 Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet. Dieses Wasser wird nachfolgend als *Aqua dest.* bezeichnet.

4.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten *Escherichia coli* Stämme mit Genotypen und Referenzen

Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100 BW	F ⁻ , araD139, lacΔU169, relA, rpsL150, thi, mot, flbB5310, deoc7, ptsF, rbsR,	Aus dem Beckwith-Labor, ursprünglich (Peters, Thate et al. 2003)
MM139	ssrS ⁻ Derivat von MC4100BW	(Lee, Fournier et al. 1985)
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , ilvG ⁻ , rfb-50, rph ⁻¹	(Blattner, Plunkett III et al. 1997)
MWΔssrS	MG1655RH-Derivat; Kan ^r , Kan-Kassette im Gen der 6S RNA (<i>ssrS</i>)	konstruiert von M. Weber, Labor Roland Hartmann, Marburg
BW25113	<i>lacIq rrnBT14 ΔlacZ</i> WJ16 <i>hsdR514 ΔaraBAD</i> AH33 <i>ΔrhaBAD</i> LD78	Parentaltyp für die Keio Collection of Single Knockout Strains(Datsenko and Wanner 2000)
JW0511	Aus der Keio Collection, Δ <i>purK</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
JW0512	Aus der Keio Collection, Δ <i>purE</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
JW1615	Aus der Keio Collection, Δ <i>add</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
JW2879	Aus der Keio Collection, Δ <i>ygfA</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
JW3618	Aus der Keio Collection, Δ <i>rph</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
JW4130	Aus der Keio Collection, Δ <i>hfq</i>	(Baba, Ara et al. 2006)

JW5466	Aus der Keio Collection, <i>ΔguaD</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
BL21DE3(+) pEH10	Überexpressionsstamm für Hfq Aufreinigung	Freundliche Gabe von Udo Bläsi, Wien

4.2.2 Plasmide

pUC18-T7-6S	pUC18-T7 Derivat, trägt <i>ssrS</i> -Gen unter der Kontrolle des T7 Φ 10 Promotors. (Gildehaus 2001)
pHD 1-B	282 BP PCR Insert mit <i>rrnB</i> UAS (-264-+18) in die SmaI Site von pKK 232-8. (Hillebrand, Wurm et al. 2005)
pHD 1-D	267 BP PCR Insert mit <i>rrnD</i> UAS (-252-+18) in die SmaI Site von pKK 232-8. (Hillebrand, Wurm et al. 2005)
pTK01	pHD 1-D Derivat mit Austausch G +1 zu A und T+3 zu C (Kolmsee 2005)
pSH666-2	Derivat von pKK223-3 mit einkloniertem <i>rrnB</i> P1-T1T2 Promotorfragment und <i>bolA</i> -T1T2 Promotorfragment in der MCS und einkloniertem <i>phisGT1T2</i> im Tet-Resistenzgen (Schoengraf 2008)

4.3 Nukleinsäuren

4.3.1 Oligonukleotide

6S Oligo-1	5'-GTG GTA TGA AAT ATC GGC-3' bindet Nt 39 bis Nt 56 der reifen 6S RNA, für PE und NB Analysen verwendet
6S Oligo-4	5'-GCA TGC TCA CCA ACC GCG GAG C-3' bindet Nt 68 bis Nt89 der reifen 6S RNA, für PE Analysen verwendet
ADN1	5'-GTC CCC TGA GCC GAT A-3' hybridisiert gegen <i>de novo</i> RNA (<u>anti</u> <i>de novo</i> 1) und wurde zur Hybridisierung von Northern Blots verwendet.

Oligo#1400	5'-GAT TGT CTG ATA AAT TGT T-3' hybridisiert gegen die <i>leader</i> -Positionen L-C56 bis L-A38, die sich <i>upstream</i> aller ribosomalen <i>rrn</i> Operons befindet.
rhoL2	5'-GGA AAT TAC AAG ATT CAA ACT TAA TAA GG-3' bindet Nt 19 bis Nt 47 <i>downstream</i> des <i>rhoLP</i> an das Transkript, verwendet für PE Analysen
thrL	5'-CCT GTG GTA ATG GTG ATG G-3' bindet Nt 75 bis Nt 92 <i>downstream</i> des <i>thrLP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
rplJ	5'-GGC TTC CTT CAT TCG CAC C-3' bindet Nt 101 bis Nt 119 <i>downstream</i> des <i>rplJP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
rplK	5'-ACG CCT CTG AGA GGC TCC-3' bindet Nt 51 bis Nt 68 <i>downstream</i> des <i>rplKP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
rplN	5'-CGG CGA CGT TCA GCA TAG-3' bindet Nt 89 bis Nt 107 <i>downstream</i> des <i>rplNP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
rpsL	5'-GCG AGC ACG TGG TTT GCG-3' bindet Nt 95 bis Nt 112 <i>downstream</i> des <i>rpsLP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
rplY	5'-CGG CTC GCA CCC TTA CCC-3' bindet Nt 114 bis Nt 131 <i>downstream</i> des <i>rplYP</i> , an das Transkript verwendet für PE Analysen
cat-Oligo	5'-CCT ACT CAA GCT TGG CTG-3' komplementär von +13 bis +30 zum (+)-Strang (<i>upstream</i> der Ribosomenbindestelle) des <i>cat</i> -Gens der Vektoren pHD 1B/pHD 1D/pTK01
Viroid_UL	5'-CCC TCG CCC CGA AGC AAG TAA GAT AGA GAA-3
RNAI-Oligo	5'-TCAGCAGAGCGCAGATACCA-3'

bindet an die RNAI von Position +28 bis +9 und ergibt in der Primer Extension Reaktion ein cDNA-Produkt von 28 Nukleotiden.

de novo RNA	5'-AUC GGC UCA GGG GAC UGG CC-3'
dnRNA	RNA Oligo mit Sequenz der, 6S RNA abhängigen dnRNA (Positionen U44-T25 der reifen 6S RNA)

4.3.2 Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat, „FPLC ultra pure“	Pharmacia, München
Adenosin-5'-[γ - 32 P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat, „FPLC ultra pure“	Pharmacia, München
Cytidin-3',[5'- 32 P]-diphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-[α - 32 P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat, „FPLC ultra pure“	Pharmacia, München
Uridin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Uridin-5'-triphosphat, „FPLC ultra pure“	Pharmacia, München
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2', 3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat, Ultrapure	Roche, Mannheim
2', 3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat, Ultrapure	Roche, Mannheim
2', 3'-Dideoxyguanosin-5'-triphosphat, Ultrapure	Roche, Mannheim
2', 3'-Dideoxythymidin-5'-triphosphat, Ultrapure	Roche, Mannheim

4.3.3 Molekulargewichtsmarker

1 Kb-Leiter	Invitrogen, Carlsbad, California
SmartLadder (Sml)	Eurogentec, Seraing, Belgien

4.4 Proteine

4.4.1 Restriktionsendonukleasen

StuI

New England Biolabs, USA

RNaseU2

Sankyo, Tokyo, Japan

4.4.2 Polymerasen

AMV-Reverse-Transkriptase

Promega, Madison, USA

T7-RNA-Polymerase

Promega, Madison, USA

RNA-Polymerase aus *E. coli*

Holoenzym nach (Burgess and Jendrisak 1975), verändert nach (Gonzales, Wiggs et al. 1977), charakterisiert nach (Chamberlin, Nierman et al. 1979); freundliche Gabe von R. Wurm

4.4.3 Enzyme und sonstige Proteine

DNase I (RNase-frei)

Roche, Mannheim

Inorganische Pyrophosphatase

Sigma, St. Louis, USA

Lysozymchlorid

Sigma, St. Louis, USA

Phosphatase (CIP)

Roche, Mannheim

Proteinase K

Sigma, St. Louis, USA

Rinderserumalbumin (BSA)

New England Biolabs, USA

Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert

New England Biolabs, USA

Ribonuklease A (RNase A)

Sigma, St. Louis, USA

RNasin

Promega, Madison, USA

T4-Polynukleotidkinase

New England Biolabs, USA

T4-DNA-Ligase

Roche, Mannheim

T4-RNA-Ligase

New England Biolabs, USA

4.5 Puffer und Medien

4.5.1 Puffer

Formamid-Probenpuffer:

95 % (v/v) deionisiertes Formamid
25 mM EDTA, pH 8,0
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
0,1 % (w/v) Xylencyanol

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat, pH 7,5 50 mM EDTA, pH 8,0
5 x TAE-Probenpuffer:	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin in 5 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
1 x TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0

4.5.2 Medien

YT-Medium	8 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest.</i> auf pH 7,4 einstellen und autoklavieren.
YT-Festmedium (YT-Agarplatten):	YT-Medium mit 15 g/l Agar
5 x M9-Minimalmedium:	30 g/l Na_2HPO_4 15 g/l KH_2PO_4 2,5 g/l NaCl 5 g/l NH_4Cl autoklavieren und lagern, bei Bedarf auf 1 x verdünnen und mit Glukose (Endkonzentration 0,2 %) im Erlenmey- erkolben autoklavieren. Vor dem Animpfen sterile Lösungen Thiamin (Endkonzentration 1

mg/l), MgSO_4 (Endkonzentration 1 mM) und CaCl_2 (Endkonzentration 0,1 mM) zugeben.

10 x LB-Medium mit 2 % Glukose:

2 g Glukose
10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
mit *Aqua dest.* auf 100 ml auffüllen und auf pH 7,5 einstellen.

4.5.3 Feinchemikalien

Acrylamid
Agar
Agarose
Agarose ultrapure
Amberlite MB-1 (Ionenaustauscher)
Ammoniumacetat
Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Ampicillin
Brij 35
Bromphenolblau
Calciumchlorid
Chloramphenicol
Chloroform
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
Dithiothreitol (DTT)
Essigsäure
Ethidiumbromid
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)
Formaldehyd
Formamid
Glycerin
Glycin
Harnstoff
Hefe-Extrakt
Heparin

Serva, Heidelberg
Sigma, St. Louis, USA
Sigma, St. Louis, USA
Seakem, Hamburg
ICN Biomedicals, USA
Acros Organics, Geel, Belgien
Merck, Darmstadt
Sigma, St. Louis, USA
Aldrich, Steinheim
Merck, Darmstadt
Acros Organics, Geel, Belgien
Roche, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Riedel-de-Haen, Seelze
Fluka Chemie AG, Schweiz
Roth, Karlsruhe
Roche, Mannheim
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
J.T. Baker, Gross-Gerau
J.T. Baker, Gross-Gerau
Roth, Karlsruhe
J.T. Baker, Gross-Gerau
Gibco BRL, Eggenstein
Sigma, St. Louis, USA

Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Kaliumacetat	J.T. Baker, Gross-Gerau
Kaliumchlorid	J.T. Baker, Gross-Gerau
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	J.T. Baker, Gross-Gerau
Kaliumglutamat	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Riedel-de-Haan, Seelze
Natriumchlorid	J.T. Baker, Gross-Gerau
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG ₆₀₀₀)	Sigma, St. Louis, USA
Rifampicin	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Difco, Detroit, USA
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.6 Verschiedenes

Amberlite Mischbettionenaustauscher	Roth, Karlsruhe
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
DE 81-Papier	Whatman, England
Dialysemembran, VS 0,025 μm , $\varnothing$ 2,5 cm	Millipore, Schwalbach
Expositionskassetten	Siemens
Glaswolle, silanisiert	ICN Biochemicals, USA
MN Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren
Amersham Hybond TM -N ⁺	GE Healthcare, UK
Phosphoimager-Screens BAS 2340	Fuji, Japan
Röntgenfilme RX	Fuji, Japan
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, New Haven, USA
Sterilfilter FB 030/3 (0,2 μm)	Schleicher und Schuell, Dassel
E1000 Entwickler/F1000 Fixierer	Christiansen GmbH, München

Thermopapier K65HM-CE	Mitsubishi Electric Europe, England
Verstärkerfolie Du Pont Cronex Lightning Plus Screen	DuPont, Bad Homburg
Gelbondfolie Gel-Fix [®] for PAG260 mm x 203 mm	Serva, Heidelberg

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

Bei dem Umgang mit Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, dabei wurden die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit GvO's (S1) eingehalten. Anfallender mikrobiologischer Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

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

5.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Alle Bakterienstämme wurden vor der Benutzung aus Sicherheitsstocks auf YT-Platten (4.4), die gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum supplementiert wurden, mit einer sterilen Impfföse ausgestrichen und bei 37 °C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Anschließend konnten die Einzelkolonien auf eine neue Platte (Masterplatte) umgesetzt oder in Flüssigkultur übernommen werden.

5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen

Zur Anzucht von üN-Kulturen wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte gepickt, und in 3 ml bzw. 25 ml YT-Medium (4.5.2), welches gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versehen wurde, überführt. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm) bei 37 °C über Nacht.

5.1.4 Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerinstocks)

Zur langfristigen Sicherung von Bakterienstämmen wurden 800 µl einer über Nacht (üN)-Kultur des gewünschten Stammes in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl 100 % (v/v) Glycerin versetzt und 1 bis 2 Stunden auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, LS 10) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur bei -70°C eingefroren und gelagert.

5.1.5 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen (Dagert and Ehrlich 1979) wurden zunächst 100 ml YT-Medium mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 bis 0,6 (exponentielle Wachstumsphase) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 50 ml der Kultur wurden in sterile, vorgekühlte Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen 5 min bei 4500 rpm und 4°C pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) der Resuspension wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml eiskalter 85 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % Glycerin vorsichtig aufgenommen. Die Zelllösung wurde dann zu je 200 µl in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert. Nach Inkubation für 1 bis 16 Stunden, bei 0°C konnten die Zellen entweder direkt für Transformationsexperimente verwendet oder bei -70°C eingefroren und gelagert werden.

5.1.6 Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA

Die Transformation erfolgte nach einer Methode von Hanahan (Hanahan 1985). Für jedes Transformationsexperiment wurde ein Aliquot von 200 µl kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 5 – 30 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach dreiminütigem Hitzeschock bei 42°C wurden 800 µl vorgewärmtes YT-Medium (4.5.2) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln, bevor 100 – 200 µl Kultur auf selektive und vorgewärmte YT-Platten (4.5.2) ausgestrichen wurden. Diese wurden dann über Nacht bis zum Anwachsen von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert. Durch Auszählen der Kolonien konnte bei Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge und des

ausplattierten Kulturvolumens die Transformationsrate der kompetenten Zellen pro μg Plasmid-DNA bestimmt werden. Diese lag abhängig von Stamm und Plasmid bei 10^4 bis 10^5 Transformanten pro μg DNA.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Messen von Konzentrationen

5.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm im Beckman UV/VIS-Spektralphotometer (Typ DU 64). Zur Messung wurden ausschließlich Suprasil-Quarzküvetten verwendet. Um in einem linearen Bereich zu messen, wurde die Probe falls nötig mit *Aqua dest.* verdünnt, so dass die Absorptionswerte in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,9 lagen. 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:

$$1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml doppelsträngiger Nukleinsäure}$$

$$1A_{260} = 37 \mu\text{g/ml einzelsträngiger Nukleinsäure}$$

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurde mit einem UV-Spektrum der Wellenlängen von 220 nm bis 320 nm überprüft. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt. Für eine reine Probe sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Verunreinigungen durch Proteine oder Phenolreste würden den Wert verringern.

5.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Das Bakterienwachstum wurde im Spektralphotometer (Beckman, Typ DU 64) mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um im linearen Bereich messen zu können wurde die Probe gegebenenfalls mit sterilem YT-Medium (4.5.2) verdünnt, damit die OD-Werte maximal 0,9 erreichten. Das Spektralphotometer wurde zuvor gegen steriles YT-Medium kalibriert.

5.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von proteinhaltigen Lösungen erfolgte mittels des "Bradford-Microassays" der Firma Bio Rad. Dazu wurden 5 – 20 µl Proteinlösung mit 780 - 795 µl *Aqua dest.* und 200 µl Bradford-Reagenz (4.5.3) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Probe in einem Beckman Spektralphotometer (Typ DU 64) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Das Photometer wurde zuvor gegen 780 – 795 µl *Aqua dest.*, 5 - 20 µl des sich in der Proteinlösung befindlichen Puffers und 200 µl Bradford-Reagenz kalibriert. Anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden mit bekannten Proteinkonzentrationen wurde die Konzentration der untersuchten Probe ermittelt.

5.2.1.4 Messung von Radioaktivität

Radioaktivitätsbestimmungen von ^{32}P -Proben wurden im Tritium-Kanal eines Beckman LS 5000 TD Szintillationszählers ohne Szintillationsflüssigkeit durch Messung der Cerenkov-Strahlung durchgeführt. Dabei wurde stets 1 µl der zu analysierenden Probe eingesetzt.

5.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Plasmidisolation im analytischen Maßstab ("Minipräp")

Die Isolation von Plasmid DNA erfolgte mittels selektiver Fällung durch Polyethylenglycol (Schmitz and Riesner 2006). Hierzu wurden 3 ml üN-Kulturen, versehen mit entsprechenden Antibiotika als Selektionsmarker, in zwei Schritten in Eppendorfgefäßen pellettiert und in 180 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurde 180 µl Lösung II dazu gegeben, 6 x invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Im folgenden Schritt wurden 180 µl eiskalte Lösung III zugegeben, 6 x invertiert und 5 min bei 0°C inkubiert (Achtung die Lösung fällt beim Abkühlen leicht aus). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm (Hettich Mikrofuge 200 R) wurde der Überstand mit einer Mischung aus 100 µl 50% PEG₆₀₀₀ und 70 µl 5M NaCl gefällt und erneut 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Nukleinsäurepellet mit 300 µl eiskaltem 80%igen Ethanol überschichtet und ein letztes Mal bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und 10 µl davon auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (5.2.3.1)

Lösung I	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA (frisch zugeben)
Lösung II	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung III	3M KOAc, pH 5,5

5.2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA (gRNA) erfolgte in Anlehnung an Liebig und Wagner ((Liebig and Wagner 1995). Hierzu wurden 5-15 ml einer Flüssigkultur zur gewünschten Wachstumsphase geerntet und 5 Minuten bei 6000 rpm und 4°C pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Die Zellpellets wurden dann in 0,5 ml Puffer I resuspendiert und sofort mit 0,5 ml 60°C heißem Phenol (gesättigt mit 20 mM NaOAc pH 5,3) durch Vortexen gemischt und 5 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die wässrige Phase nochmals mit 0,5 ml heißem Phenol behandelt. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2.4) und ein Verdau mit DNaseI um DNA-Verunreinigungen zu entfernen (5.2.7.1). Die Konzentration der RNA wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt (5.2.1.1) und die Qualität auf einem 1%igen Agarosegel (5.2.3.1) überprüft.

Puffer I:	20 mM NaOAc, pH 5,3 1 mM EDTA, pH 8,0 0,5 % (w/v) SDS
-----------	---

Für die *upshift*-Experimente wurde zunächst aus einer üN-Kultur eine 25 ml üT-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 angezogen um sicher zu stellen, dass nur teilungsaktive Zellen verwendet wurden. Hieraus wurde eine 100 ml üN-Kultur in M9-Minimalmedium (0,2 % Glukose) im Verhältnis 1:100 angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 10 ml je Kultur entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch Zugabe von 10 ml vorgewärmten 10 x LB-Medium (2% Glukose) (4.5.2) wurde der *upshift* ausgelöst, zum gewünschten Zeitpunkt jeweils 10 ml Zellkultur entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert um die Zellen zu pellettieren. Dies wurde solange durchgeführt, wie noch gefrorene Mediumsreste vorhanden waren. Die Zellepellets wurden dann einer gRNA Isolation unterzogen.

5.2.2.3 Glaswolleelution aus Agarosegelen

Hierzu wurde zunächst in 0,5 ml Reaktionsgefäße, mit einer heißen Kanüle ein kleines Loch in den Boden gebohrt und anschliessend das Reaktionsgefäß zu ca. einem Drittel mit steriler, silikonisierter Glaswolle gestopft. Auf diese Glaswolle wurden dann die zu eluierenden Gelstücke gelegt, das Reaktionsgefäß in ein 1,5 ml Gefäß gestellt und ca. 10 min bei 13000 rpm (Hettich Mikrofuge 200 R) zentrifugiert. Dabei tritt die Flüssigkeit, mitsamt der Nukleinsäure aus dem Gelstück aus und sammelt sich in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis keine Flüssigkeit mehr austrat. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2.4) und Ethanolfällung (5.2.2.5) um die Nukleinsäure zu präzipitieren.

5.2.2.4 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, anschließend wurde zur Trennung der Phasen fünf Minuten zentrifugiert. Bei kleinen Volumina (Eppendorfgefäß) wurde bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge 15), bei präparativen Volumina (Greiner Röhrchen) 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 Phase wurde anschließend eine Extraktion mit einem Volumen Chloroform durchgeführt.

5.2.2.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde die entsprechende Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2-3 Volumen absolutem Ethanol (-20 °C) versetzt. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für 30-60 Minuten oder in flüssigem Stickstoff für 3 Minuten. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren durch 30-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm (kleine Volumina, Eppendorfgefäß, Heraeus Biofuge 15) oder bei 6000 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 20-minütige Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurden die Pellets im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophyliert und zum Schluss in einem geeigneten Volumen *Aqua dest.* oder TE-Puffer (4.5.1) aufgenommen.

5.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

5.2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde 0,5-1 %iges (w/v) Agarosegel verwendet (Maniatis, Fritsch et al. 1982). Dazu wurden 100 ml 1 x TAE-Puffer (4.5.1) 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 µg/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 (4.5.1), der ebenfalls 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, überschichtet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit einem Volumen 2 x TAE-Probenpuffer versetzt und bei 80 bis 120 V für 1-2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, welches sich in die doppelsträngigen Bereiche der RNA 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. Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden Schlitten, Kämme und Elektrophoresekammer üN mit 0,1%iger DEPC-Lösung behandelt.

Bei präparativen Gelen befand sich nur im Laufpuffer Ethidiumbromid. Im Anschluss an den Gellauf wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und über Glaswollee-lution (5.2.2.3) aufgereinigt

5.2.3.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)

Die denaturierende PAGE wurde zur Produktanalyse von diversen Reaktionen verwendet. Es wurden 5-15%ige Polyacrylamidgele mit einer Vernetzung von 19:1 oder 29:1

(Acrylamid:Bisacrylamid) hergestellt, die als denaturierendes Agens 7 M Harnstoff 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 zuvor gründlich mit *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt wurden. Die Dimension des Gels betrug 310 mm x 395 mm x 0,5 mm (B x H x T).

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1 x TBE-Laufpuffer (4.5.1) befüllt. Das Gel wurde vor der Auftragung der Proben vorgeheizt (10 min 25 W, 10 min 50 W, 10 min 75 W). Die zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden mit einem halben Volumen Formamid-Probenpuffer (4.5.1) versetzt, 3 Minuten bei 96 °C denaturiert und danach sofort auf Eis überführt. Anschließend wurden die Proben auf das vorgeheizte Gel aufgetragen und für 2 bis 4 Stunden bei 75 bis 90 W aufgetrennt. Die aufgetrennten Proben wurden über Autoradiographie 5.2.4.2) sichtbar gemacht.

Gellösung 10%iges Gel :	42 g Harnstoff
	10 ml 10 x TBE-Puffer
	25 ml (40 % Acrylamid-/
	Bisacrylamid-Lösung (19:1)
	ad 100 ml mit <i>Aqua dest.</i>

Gellösung 15%iges Gel :	42 g Harnstoff
	10 ml 10 x TBE-Puffer
	37,5 ml (40 % Acrylamid-/
	Bisacrylamid-Lösung (20:1)
	ad 100 ml mit <i>Aqua dest.</i>

5.2.3.3 Temperatur Gradienten Gelelektrophorese (TGGE)

Diese von Rosenbaum und Riesner (Rosenbaum and Riesner 1987) entwickelte Methode erlaubt es temperaturbedingte Strukturveränderungen eines Nukleinsäuremoleküls mittels Gelelektrophorese zu analysieren. Senkrecht zur Laufrichtung des Gels wird ein linearer Temperaturgradient angelegt, der dazu führt, dass das zu analysierende Molekül eine von der Temperatur abhängigen Struktur annimmt. Als Resultat veränderter

Sekundär/Tertiärstrukturen treten Abweichungen im Laufverhalten auf und geben so Hinweise auf Struktur motive. Als Gelsystem diente hierbei ein natives PAA-Gel (7,5%, Vernetzung 29:1; 0,5x TBE) welches zur besseren Handhabung auf eine Gelbondfolie (4.6) gegossen wird. Um eine stufenlose Auftrennung des Moleküls zu gewährleisten wurde eine einzige lange Probentasche verwendet und lediglich an den Außenseiten zwei kleine Taschen zusätzlich benutzt, um das Laufverhalten an den Grenzpunkten des Gradienten isoliert beobachten zu können. Das Gel wurde mit der Unterseite auf die Apparatur gelegt, zur gleichmäßigen Wärmeleitung wurde die Heizplatte mit einer dünnen Schicht 30%igem Glycerin versehen. Die Proben konnten nun aufgetragen werden und zunächst für 15 min und 200 V bei der niedrigen Temperatur in das Gel einlaufen lassen. Anschließend konnte der Gradient mittels der vortemperierten Wasserbäder angelegt werden. In der Zeitspanne bis zum Erreichen des Gradienten wurde die Elektrophorese bei 50 V fortgeführt um Diffusion zu vermeiden. Anschließend wurde die Elektrophorese für ca. 3h bei 300 V fortgesetzt. Da bei dieser Art der Elektrophorese das Gel nicht von Puffer umschlossen ist, wurden Schwammtücher, getränkt mit Laufpuffer, für die Stromleitung benutzt und das Gel durch Abdecken vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurde eine Silberfärbung durchgeführt (5.2.4.1). RNA-Proben wurden vor der Trennung zunächst auf 70°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt (ca. 1°C/min) dies sollte eine möglichst einheitliche Strukturverteilung innerhalb der Probe gewährleisten.

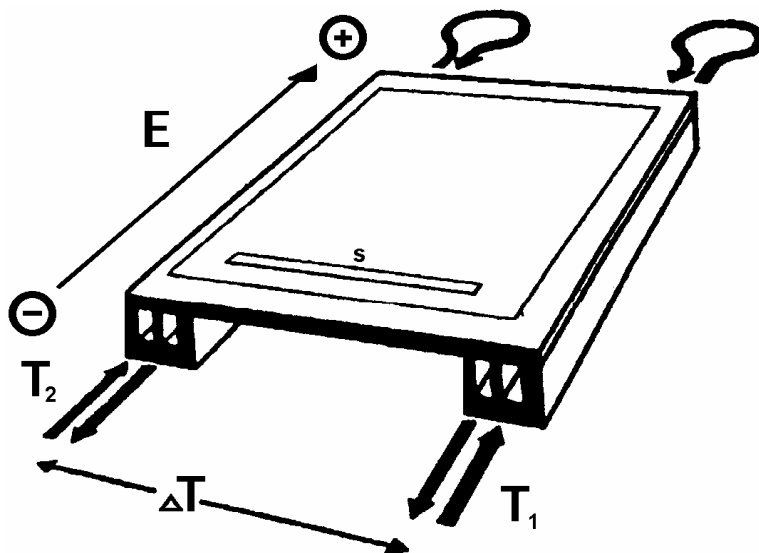


Abbildung 5.1 Aufbau einer TGGE

In die Auftrags tasche (s) wird die zu analysierende Probe gefüllt. Das Gel liegt flach auf einer Heizplatte, auf welcher über zwei verschieden temperierte Wasserbäder (T1 und T2) ein linearer Temperaturgradient (ΔT) aufgebaut wird. Die Pfeile zeigen die Fließrichtung des Wassers an. Die elektrische Spannung (E) wird im rechten Winkel zum Temperaturgradienten angelegt.

5.2.4 Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen

5.2.4.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Durch die Silberfärbung nach (Beidler, Hillard et al. 1982) können Nukleinsäuremengen ab 5 ng in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden. Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst 5 min in Fixierlösung I geschwenkt und dann 10 min in Silbernitratlösung inkubiert. Das Gel wird dann 3 x mit *Aqua dest.* für je 1 min gespült und danach so lange in frisch angesetzter Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten. Der Entwicklungsprozess wird durch 10-minütiges Schwenken in Fixierlösung II gestoppt.

Fixierlösung I	10% Ethanol/0,5% Essigsäure
Entwicklerlösung	15 g NaOH
	0,08 NaBH ₄
	4 ml Formaldehyd (frisch zugeben)
	ad 1l
Fixierlösung II	0,75% Na ₂ CO ₃

5.2.4.2 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen erfolgte über die Belichtung 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. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR oder Zea New RP) auf das Gel gelegt, und dieser für 2 bis 14 Tage bei -20 °C exponiert. Falls nötig wurde zusätzlich noch eine Verstärkerfolie (DuPont Cronex) aufgelegt und der Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in der Entwicklermaschine Agfa Curix 60. Als Lösungen dienten dabei der Entwickler E1000 und der Fixierer F1000 der Firma Euromed.

5.2.4.3 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden Phosphoimager Screens (BAS 2340, FUJI) auf die Polyacrylamidgele gelegt und diese über Nacht 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 *Multi Gauge V3.0* ausgewertet. Alternativ wurden die entwickelten Röntgenfilme eingescannt (Umax-Scanner mit Durchlichteinheit) und ebenfalls mittels *Multi Gauge V3.0* ausgewertet.

5.2.5 Reinigung und Konzentrierung von Proteinen

5.2.5.1 Gesamt Protein Extraktion im analytischen Maßstab

Zur gewünschten Wachstumsphase wurde die gewünschte Zellmenge, in der Regel 6-20 OD, in einem Greiner Röhrchen bei 4°C pellettiert (10 min bei 6000 rpm, Hettich Megafuge 1.0 R). Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen, in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 4°C pellettiert (10 min bei 13000 rpm, Hettich Mikrofuge 200 R). Anschließend wurden die Zellen in 250-500 µl 250 mM Tris-HCl, pH 7,8 resuspendiert und einem Ultraschallaufschluss unterzogen (Labsonic U, Braun Biotech Int.). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und 10-40 µl der Proteinlösung auf einem SDS-Gel analysiert (5.2.6.1). Für Affinity Binding Experimente wurde statt 250 mM Tris-HCl der, in (5.3.6) beschriebene Binde/Waschpuffer verwendet.

PBS-Puffer	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	10,1 ml Na ₂ HPO ₄
	ad. 1 l mit <i>Aqua dest</i>

Ultraschallaufschluss der Zellen:

Sonde:	Nadelsonde 40 T
Leistung:	40 W
Repeating Duty Cycle:	0,9
Power Range Switch:	low

30 Sekunden Ultraschall

30 Sekunden auf Eis

4 Zyklen

5.2.5.2 Aufreinigung von Hfq im präparativen Maßstab

Mit 5 µl aus einem Glycerinstock des Stamm BL21DE3(+)*pEH10* wurde eine 100 ml üN-Kultur (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Aus dieser üN-Kultur wurde im Verhältnis 1:100 eine 1l üT-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Es folgte eine Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) für 3h. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion sowie bei den folgenden Schritten wurden jeweils Proben für ein analytisches SDS-Gel (5.2.6.1) genommen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm pelletiert (Beckmann J2-21, JA10 Rotor) und dann, pro 4 g Zellpellet, mit 20 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Nach einer üN Inkubation wurde 10 µg/ml DNaseI zugegeben, ein Ultraschallaufschluss durchgeführt (Labsonic U, Braun Biotech Int.) und 20 min bei 0°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 6000 rpm (Hettich Megafuge 1.0 R). Der proteinhaltige Überstand wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, 20 min bei 85°C inkubiert, 40 min bei 4°C und 14000 rpm (Hettich Mikrofuge 200 R) zentrifugiert und nach Vereinigung (Gesamt ca. 25 ml) einer FPLC (*fast protein liquid chromatography*) unterzogen.

Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8
	1,5 M NaCl
	250 mM MgCl ₂
	autoklavieren und vor Benutzung noch
	5 mM DTT, 1mM PMSF zugeben

Ultraschallaufschluss der Zellen:

Sonde:	konische Sonde 50 T
Leistung:	120 W
Repeating Duty Cycle:	0,9
Power Range Switch:	high

15 Sekunden Ultraschall

60 Sekunden auf Eis

8 Zyklen

5.2.5.3 FPLC von Hfq

Die Aufreinigung von Hfq konnte dank eines His-Tags mit Ni-NTA-Agarose durchgeführt werden. Hierzu wurde das Econo-System der Firma Bio-Rad verwendet, dieses System besteht aus einer Pumpe, einem Fraktionssammler, einem Durchflussspektralphotometer und einem Schreiber. Es wurde eine Säule mit ca. 1 cm Ø und 12 cm Höhe verwendet (Volumen ca. 9,4 cm³, Totvolumen ca. 3 ml). Diese wurde zunächst 2 mal mit Waschpuffer üT (Durchflussrate 0,2 ml/min) äquilibriert. Anschließend wurde der Hfq-haltige Überstand, mit einer Durchflussrate von 0,3 ml/min auf die Säule gegeben und in Fraktionsgrößen von ca. 3 ml aufgefangen. Unter Vermeidung des Austrocknens der Säule wurde anschließend mit ca. 15 Totvolumen Waschpuffer nachgespült. Kurz nach Anlegen des Waschpuffers (Fraktionen 5-8) wurde ein starker Proteinpeak gemessen, dieser sollte alle Protein Verunreinigungen enthalten, Hfq ist an die Ni-NTA-Agarose gebunden. Es wurde solange mit Waschpuffer gespült, bis keine Signale mehr zu detektieren waren und anschließend mit 3 Säulenvolumen GF-Puffer gespült. Danach erfolgte die Elution mittels eines Imidazol-Gradienten von 0-500 mM in GF-Puffer (Fraktionen 26-29 enthielten die Haupt-Ausbeute). Um das Imidazol zu entfernen wurde anschließend 2 mal gegen 400 ml GF-Puffer dialysiert.

Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8 200 mM NaCl 3 M Harnstoff
GF-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8 200 mM NaCl

5.2.5.4 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Entsalzung von Proteinlösungen wurde eine Dialyse mittels Dialyseschlauch (SpectraPor Porengröße 6000-8000 Ø 20,4 mm) durchgeführt. Die Dialyseschläuche wurden vor der Benutzung 30 Minuten in einer Na₂CO₃-Lösung gekocht, dann zweimal mit *Aqua dest.* gespült und anschließend erneut für 15 Minuten in *Aqua dest.* gekocht. Die so vorbereiteten Schläuche wurden bis zur Verwendung bei 4 °C in 50 % Ethanol gelagert. Vor der Dialyse wurden die Schläuche mit *Aqua dest.* gespült und in den Puffer eingelegt, gegen den die

Probe dialysiert wurde. Der Schlauch mit eingefüllter Proteinlösung wurde dann in das gewünschte Volumen Puffer gehängt und die Dialyse bei 4 °C, unter Rühren durchgeführt. Anschliessend wurde die Proteinkonzentration der Probe mit Hilfe des Bradford-Assays (5.2.1.3) bestimmt.

5.2.6 Gelelektrophorese von Proteinen

5.2.6.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) eingesetzt. Bei einer diskontinuierlichen Elektrophorese werden ein engporiges Trenngel (310 mm x 180 mm x 1 mm) und ein weitporiges Sammelgel (310 mm x 50 mm x 1 mm) (B x H x T) miteinander kombiniert, durch unterschiedliche pH-Werte in Trenn- und Sammelgel wird die Auflösung erhöht.

Als denaturierendes Agens diente Natriumdodecylsulfat (SDS), welches fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen im Protein zerstört. Die hydrophoben Reste der SDS-Anionen binden an die Proteinketten (1,4 g SDS/g Protein) (Lottspeich & Zorbas, 1998) und überdecken dadurch die Eigenladung der Proteine.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{4}$ Volumen 4 x SDS-Probenpuffer (4.5.1) sowie mit 3 µl β -Mercaptoethanol versetzt, 3 Minuten bei 96 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der Proben erfolgte üN bei 120 V, als Elektrophoresepuffer diente 1 x SDS-Laufpuffer. Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel anschließend mit Coomassie 5.2.6.2) gefärbt.

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
Trenngel (15 %):	35 ml Lösung A

17,5 ml Lösung B
0,7 ml Lösung C
ad 70 ml mit *Aqua dest.*
70 µl TEMED
700 µl 10 % (w/v) APS

Sammelgel (6 %):

4 ml Lösung A
5 ml Lösung D
0,2 ml Lösung C
ad 20 ml mit *Aqua dest.*
20 µl TEMED
200 µl 10 % (w/v) APS

5.2.6.2 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Coomassie

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte bei der Coomassie-Färbung mit dem Farbstoff 'Coomassie Brilliant Blue R250' für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler. Mit Hilfe der Entfärbelösung wurde das Gel solange entfärbt, bis der Hintergrund hellblau bis klar war und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Gele wurden anschließend in Folie eingeschweißt und gescannt (UMAX, Astra 4000U). Mit der Coomassie-Färbung können Proteinbanden ab 300 ng nachgewiesen werden, zudem ermöglicht es diese Methode eine quantitative Aussage über Proteinkonzentrationen im Gel zu treffen.

Färbelösung:

50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

5.2.7 Enzymatische Reaktionen

5.2.7.1 DNase-Hydrolyse von Gesamt-RNA Extraktionen

Hierzu wurde die wässrige Phase nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit 40 µl DNaseI *Inkubation Buffer* und 4 U DNaseI (RNase frei) 60-90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung (5.2.2.5) um die DNaseI zu entfernen und die RNA zu präzipitieren.

5.2.7.2 Präparative Gewinnung von 6S RNA mittels *in vitro* Transkription (RiboMAX)

Das von Promega vertriebene RiboMAX-System erlaubt die *in vitro* Synthese von RNA in präparativem Maßstab. Dafür wird die Phagen-spezifische T7-RNA-Polymerase verwendet, welche für die Transkriptionsinitiation den T7-Promotor benötigt. Dieser befindet sich auf dem Plasmid pUC18-T7, in den das Gen für die 6S RNA (*ssrS*) mitsamt einer *downstream* gelegenen, singulären Schnittstelle (StuI) einkloniert wurde. Durch Linearisierung des Vektors *downstream* des jeweiligen Gens kann die Polymerase von dem *Template*-Plasmid abfallen und eine neue Transkription initiieren. Man nennt diese Art der *in vitro* Transkription „multiple-round run-off“ Transkription.

Ein Ansatz enthielt 3 pmol linearisiertes Plasmid (pUC18-T7-6S), 3 mM 4 x NTP-Mix, 0,15 U Pyrophosphatase, 15 U RNasin und 288 U T7-RNA-Polymerase in 1 x RiboMAX-Puffer. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurden zu jedem Ansatz erneut 288 U T7-RNA-Polymerase zugegeben und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die jeweils gleichen Ansätze vereinigt und über ein präparatives Agarosegel (5.2.3.1) aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten, die RNA aus dem Gel eluiert und aufgereinigt (5.2.2.3).

5 x RiboMAX-Puffer:	400 mM Hepes-KOH, pH 7,5
	60 mM MgCl ₂
	10 mM Spermidin
	200 mM DTT

5.2.7.3 Primer Extension (PE) von gesamt RNA (gRNA)

Primer Extension Reaktionen wurden ähnlich der von Stern beschriebenen Methode durchgeführt (Stern, Moazed et al. 1988). Sie dienten zur Analyse von Reaktionen, welche nicht direkt mit 3'-markierter RNA durchgeführt wurden. Bei der Primer-Extension wird die zu analysierende RNA als *Template* genutzt, von welchem eine virale Reverse Transkriptase (AMV) *in vitro* eine sequenzspezifische 'copy DNA' (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA-

Fragmentegeben indirekt die Fragmentlängen der RNA wieder und können über dPAGE aufgetrennt werden. Für die Primer Extension wurde zunächst ein γ - 32 [P]ATP markiertes, spezifisches Oligonukleotid an die zu untersuchende RNA hybridisiert. Hierzu wurden 5-15 μ g gRNA mit 0,5 pmol spezifischem Oligonukleotid (2×10^5 - 5×10^5 cpm) in 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 in einem Volumen von 9 μ l bei 68°C für 3 min inkubiert. Um Kondensation zu vermeiden wurde die Hybridisierung in einem Hybridisierungssofen durchgeführt und ein, auf Hybridisierungstemperatur vorgeheizter, Metallblock auf die inkubierenden Reaktionsgefäße gestellt. Dann wurde langsam (1°C/min) auf Raumtemperatur (<28°C) abgekühlt. 4 μ l dieses Hybridisierungsansatzes wurden anschließend mit 6 μ l eines PE-Prämixes 30 min bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l Formamid- oder Harnstoff-Probenpuffer gestoppt. Vor dem Auftragen auf eine 10% oder 15% dPAGE wurden die Proben 3 min bei 96°C denaturiert.

PE-Prämix: 3,58 μ l Tris-HCl 100 mM, pH 7,5
 2 μ l 5x AMV Puffer
 0,2 μ l 4 dNTP-Mix 10 mM
 0,22 μ l AMV Reverse Transkriptase 10 U/ μ l

5.2.7.4 Primer Extension von 6S RNA

Diese erfolgte analog der Reaktion mit gRNA, jedoch mit kleinen Änderungen. Es wurden nur 100 ng RNA für die Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung wurde nach 3 min sofort auf Eis gestellt (Snap Cooling). Die Reaktion erfolgte bei 55°C für 45 min. Abbruch und Trennung erfolgten wie bei gRNA. Um sicher zu gehen, daß die verfügbaren dNTPs nicht limitierend waren, wurden diese 3-fach konzentriert dem Prämix zugefügt.

PE-Prämix: 3,18 μ l Tris-HCl 100 mM, pH 7,5
 2 μ l 5x AMV Puffer
 0,6 μ l 4 dNTP-Mix 10 mM
 0,22 μ l AMV Reverse Transkriptase 10 U/ μ l

Bei der Sequenzierung wurden zusätzlich vom gewünschten ddNTP 0,15 μ l 10 mM zugegeben, das Volumen an Tris-HCl wurde dementsprechend reduziert.

5.2.7.5 Phosphorylierung von Oligonukleotiden (5'-Markierung mit [γ 32 P]-ATP)

An 5'-endständige Hydroxylgruppen von synthetisch gefertigten Oligonukleotiden ('Primern') lassen sich radioaktive Phosphatreste mit der T4-Polynukleotidkinase anfügen. Hierzu wurden 10 pmol Oligonukleotid in einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl mit 2 µl 2 µM [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (20 µCi) und 8 U T4-Polynukleotidkinase für 45 min in 1 x Kinasepuffer bei 37°C inkubiert. Nach der Umsetzung wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 68°C gestoppt, die markierten Oligonukleotide durch Zugabe von 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (NH_4OAc , pH 5.0), 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml) und 5 Volumen absoluten Ethanol gefällt und anschließend 45 min bei 12000 rpm und 4°C (Heraeus Biofuge A) pelletiert. Das Pellet wurde 2 x mit 100 µl 80%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und durch mehrfaches Spülen des Pellets resuspendiert.

5.2.7.6 3'-Endmarkierung von RNA (pCp-Markierung)

Für die 3'-Endmarkierung von 6S RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 µg 6S RNA mit 20 µCi [5^{32}P]pCp und 20 U T4-RNA Ligase üN bei 4°C inkubiert. Der Ansatz enthielt neben 1-fach T4-RNA Ligase Puffer zusätzlich 10% DMSO als Lösungsvermittler. Alternativ kann die Inkubation auch für 2h bei 37°C erfolgen. Nach der Inkubation wurde das Ansatzvolumen mit *Aqua dest.* oder TE-Puffer auf 100 µl erhöht und eine Phenol/Chloroform Extraktion 5.2.2.4) durchgeführt. Die anschließende Ethanolfällung (5.2.2.5) erfolgte unter Zugabe von 1/20 Volumen Glycogen (20 mg/ml) und 1/10 Volumen NaOAc (3M, pH 5,3). Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Für präparative Aufreinigungen von endmarkierter RNA wurden 10-fach Ansätze angesetzt und über ein 5% PAA-Gel (Vernetzung 29:1) getrennt. Auf diese Gele wurde dann für ca. 1h ein Röntgenfilm aufgelegt und an den Ecken geklammert, um Markierungspunkte zu haben. Nach dem Entwickeln wurde die Position der markierten Vollängen-RNA aus dem Röntgenfilm ausgeschnitten und dieser als Schablone benutzt um das gewünschte Gelstück auszuschneiden. Die RNA wurde dann durch zweimal 30-minütiges Schütteln bei 50°C und 800 rpm (Thermoschüttler HLC Mk13) in Elutionspuffer (TE mit 300 mM NaOAc pH 5,3/0,1 mM EDTA) passiv eluiert. Durch Messung des Gelstücks sowie des Eluats im Szintillationszähler konnte überprüft werden, ob die Elution erfolgreich war (Ausbeute >80%). Das Eluat wurde dann mit 3 Vol. EtOH_{abs} präzipitiert. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität nach der Aufreinigung, jegliche Aktivität entspricht markierter 6S RNA, reichen ca. 50 cps für starke Signale nach Autoradiographie üN.

5.2.7.7 *Multiple round in vitro* Transkription mit superhelikalem *Template* (IVT)

Die *in vitro* Transkriptionen wurden ausnahmslos mit $E\sigma^{70}$ Holoenzymen (RNAP) durchgeführt, als *Template* diente der Vektor pSH666-2 (4.2.2) in der *supercoiled* form (ccc). In einem Gesamtvolumen von 10 μ l wurden stets 5 nM *Template* und 15 nM RNAP eingesetzt. Die benötigte Menge an 6S RNA wurde aus einer niedrig konzentrierten Lösung (in *Aqua dest.*) im Reaktionsgefäß vorgelegt und mittels Lyophylle eingetrocknet. Dies vermied Schwankungen in der RNA Menge durch verschiedene Verdünnungen. Die RNA wurde nun mit 6 μ l *Template*-Premix resuspendiert und anschliessend wurden 2 μ l RNAP (75 nM in AB-Diluent) zugegeben. Nach exakt 5 min Inkubationszeit bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l NTP-Mix gestartet und 8 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 μ l Chase-Lösung und erneute Inkubation für 10 min bei 30°C wurde ermöglicht, alle initiierten Transkripte zu beenden, die Neuinitiation durch Anwesenheit von Heparin jedoch verhindert. Den Ansätzen wurden jeweils 5 μ l Formamid-Probenpuffer hinzugefügt, 14 μ l je Ansatz auf einer 10%igen dPAGE getrennt und autoradiographiert.

<i>Template</i> -Premix	1 μ l 50 nM pSH 666-2 1 μ l 10 x KGlu80 4 μ l <i>Aqua dest.</i>
NTP-Mix	0,4 μ l [α^{32} P]-CTP (4 μ Ci); 0,1 μ l ATP/GTP/UTP-Mix (6,5 mM); 0,5 μ l CTP (100 μ M) 1 μ l <i>Aqua dest.</i>
Chase-Lösung	je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP 2 mg/ml Heparin 1 mM Tris-HCl, pH 7,0

5.2.7.8 *In vitro* Transkriptionen zur Synthese von dnRNA

Die Synthese von dnRNA erfolgte ähnlich der oben beschriebenen *multiple round* IVT, jedoch mit 6S RNA als *Template*. Hierbei wurden stets 300 nM 6S RNA und 50 nM RNAP verwendet. Da bereits bekannt war, dass die Synthese von 6S RNA gerichteten dnRNAs *in vitro* erst bei höheren NTP-Konzentrationen stattfindet, wurde ein modifizierter NTP-Mix verwendet. Da die dnRNAs aufgrund ihrer Größe (~20 NT) nahe der Salzfront laufen und die Proben mit 80 mM Kaliumglutamat relativ salzhaltig waren, wurden die Ansätze nach Zugabe

der Chase-Lösung auf 100 µl aufgefüllt (TE oder *Aqua dest.*), Phenol/Chloroform extrahiert und vor der Trennung auf einer 15%igen dPAGE mit Ethanol gefällt. Dieses Vorgehen entfernt ebenfalls vorhandene Proteine, was speziell bei Hfq nötig war, da Hfq selbst unter denaturierenden Bedingungen in der Lage war Transkripte zu binden.

NTP-Mix	0,4 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-CTP (4 µCi); 0,1 µl ATP/GTP/UTP-Mix (30 mM); 05 µl CTP (100µM); 1 µl <i>Aqua dest.</i>
---------	---

5.2.7.9 RNA-Footprint Analysen

Hierfür wurde PAA-Gel gereinigte, 3'-radioaktiv markierte 6S RNA verwendet (5.2.7.6), um störende Abbauprodukte zu vermeiden. Prinzipiell handelte es sich um Retardierungsansätze (5.3.3), denen im Anschluss an die Komplexbildung RNase U2 zugegeben wurde. Diese schneidet einzelstrang spezifisch an Purinen, mit einer Präferenz für Adenin. In einem Ansatz von 10 µl wurden ca. 50 cps 6S RNA mit steigenden Mengen Hfq zur Komplexbildung für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl RNase U2 (0,03 U/µl in 2-fach RNase U2-Puffer) zugegeben und erneut 10 min bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit *Aqua dest.* auf 100 µl aufgefüllt und einer Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanolfällung unterzogen. Nach dem Trocknen wurden die Proben in einem Gemisch aus 10 µl *Aqua dest.* und 5 µl Formamid Probenpuffer resuspendiert, auf einer 12%igen dPAGE getrennt und autoradiographiert.

5.2.7.10 Biotinylierung von 6S RNA

Biotinylierte 6S RNA wurde für Affinitätsbindeexperimente mittels Streptavidin-Microbeads 5.3.6) verwendet. Für die Markierung wurde das "Pierce® RNA 3' End Biotinylation Kit" der Firma Thermo Fisher verwendet. Hierbei handelt es sich im Grunde um die gleiche Reaktion wie unter 5.2.7.6 beschrieben, mit dem Unterschied, dass kein radioaktiv markiertes pCp, sondern ein biotinyliertes pCp verwendet wurde. Bei diesem ist das Biotin kovalent an die Base Cytidin gebunden. Die Markierung erfolgte nach Herstellerangaben mit 50 pmol (3,6 µg) 6S RNA. In einem Test zeigte sich, dass die biotinylierte 6S RNA ein geringfügig verzögertes Laufverhalten in einer dPAGE aufweist als nicht biotinylierte 6S RNA. Die Markierung konnte daher mittels dPAGE (5.2.3.2) und anschließender Silberfärbung (5.2.4.1) überprüft werden.

5.3 Spezielle Methoden

5.3.1 SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension)

Bei dieser Methode macht man sich zunutze, daß verschiedene elektrophile Substituenten selektiv Ester mit der 2'-OH Gruppe von RNA bilden und diese Reaktion abhängig von der Flexibilität/Zugänglichkeit des betreffenden Nukleotids ist. Dadurch lassen sich strukturelle Aussagen über Sekundärstrukturen von RNA treffen. Hier wurde mit dieser Methode untersucht, ob es durch die Bindung von Hfq zu strukturellen Änderungen in der 6S RNA kommt. In Anlehnung an (Mortimer and Weeks 2008) wurde als Elektrophiles Reagenz Benzoylcyanid (BzCN) benutzt. Der Vorteil der Methode und besonders der Verwendung von BzCN liegt darin, daß sie sehr schnell geht (~1s) und selbst-quenchend ist. Das BzCN reagiert, in Konkurrenz zur Esterbildung mit der RNA, auch mit Lösungswasser zu Benzoat. Bei der Reaktion wird Blausäure (HCN) gebildet, erkennbar an leichter, kurzer Trübung des Reaktionsansatzes. Aus diesem Grund muss das BzCN in wasserfreiem DMSO gelöst werden. Der Nachweis der Modifikation erfolgt mittels Primer Extension (5.2.7.4), an modifizierten Nukleotiden erfolgt vorzeitiger Syntheseabbruch. In einem Ansatz von 11 µl wurden 100 ng 6S RNA mit steigenden Mengen Hfq zur Komplexbildung für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 0,6 M BzCN (frisch angesetzt in wasserfreiem DMSO) zugegeben, die Ansätze auf 100 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und einer Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.2.4) unterzogen. Nach abschließender Ethanolfällung wurde die RNA in 9 µl Hybridisierungslösung resuspendiert und einer Primer Extension verwendet.

Hybridisierungslösung	100 mM KCl
	50 mM Tris-HCl pH 8
	0,5 pmol radioaktiv markiertes Oligo6S-4

5.3.2 Analyse des Nukleotidpools von *E. coli*

Mittels *Pulse Labeling* mit [³²P]H₃PO₄ können Nukleotide und Derivate *in vivo* radioaktiv markiert werden, um sie anschließend quantitativ zu untersuchen. Das radioaktive Phosphat kann als niedermolekulare Verbindung schnell in die Zelle aufgenommen und metabolisch verarbeitet werden. Für die Markierung wurde in Anlehnung an (Boes, Schreiber et al. 2008) zunächst 200 µCi ³²PH₃PO₄ (3,7 µl Stammaktivität) mit 33,3 µl 151 mM NaOH neutralisiert.

Anschließend wurden 100 µl einer YT üT-Kultur, 1 Std vor dem gewünschten Zeitpunkt des Aufschlusses, mit 20 µCi der neutralisierten [^{32}P]H₃PO₄ versetzt. Der Aufschluss erfolgte durch Zugabe von 100 µl 1 M Ameisensäure, sofortigem Durchfrieren in flüssigem Stickstoff und dreimaliger Tau-Frierlyse. Dabei wird die Zellwand durchlässig für niedermolekulare Verbindungen, diese treten in Lösung und Zelltrümmer, sowie hochmolekulare Phosphatverbindungen (Polynukleotide, Nukleinsäuren etc.) können durch 15minütige Zentrifugation bei 12000-15000 rpm abgetrennt werden. In der Regel befanden sich ca. 90% der eingesetzten Radioaktivität im Überstand, davon war jedoch ein Großteil freies, nicht verstoffwechseltes Phosphat. Der Überstand konnte dann für Dünnschichtchromatographien verwendet werden.

5.3.2.1 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie zur quantitativen ppGpp Bestimmung

Der Überstand wurde dann auf PEI_{UV254} Polygramm CEL 300 Platten (Macherey-Nagel) chromatographiert. Dazu wurden die DC-Platten zunächst unbeladen mit 2 N Ameisensäure (pH 2,2 mit Pyridin eingestellt) als Laufmittel "leer" chromatographiert, getrocknet und anschließend 6-20 µl des Überstand aufgetragen. Dabei war darauf zu achten, zum Rand der Platte und zwischen einzelnen Proben jeweils ca. 1cm Platz zu lassen. Außerdem wurde in 2 µl Schritten aufgetragen und zwischen den einzelnen Auftragungen gut getrocknet um ein "Verschmieren" der Spots zu vermeiden. Es folgte zunächst ein Vorlauf mit *Aqua dest.* als Laufmittel, dabei werden Salze aus den Proben ausgespült und somit eine sauberer Trennung ermöglicht. Nach dem Vorlauf wurden die Platten erneut getrocknet, anschließend mit 1,5 M KH₂PO₄ (pH 3,4) als Laufmittel chromatographiert und nach erneutem Trocknen autoradiographiert (5.2.4.2).

5.3.2.2 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Diese diente als Ergänzung zur eindimensionalen Chromatographie. Zum Einen um auszuschließen, dass dort gemessene Unterschiede im ppGpp Pool auf Nukleotide/Derivate zurückzuführen sind, die sich nicht von ppGpp oder GTP trennen und im Hintergrund mit erfasst werden, zum Anderen um eine besserer Auflösung aller Nukleotide und Derivate zu erhalten. Die Markierung, der Zellaufschluss und die Vorbereitung der DC-Platten erfolgte analog der eindimensionalen Chromatographie. In Anlehnung an (Jensen, Houlberg et al. 1979) wurde jedoch das weitere Vorgehen geändert. Zunächst wurden die DC-Platten nach Probenauftrag für 10 min in 10%iger Zitronensäure gewaschen, dies entfernt einen Großteil

des freien Phosphats und sorgt so für einen sauberen Lauf. Danach wurden die Platten 2 mal 10 min in *Aqua dest.* gewaschen, getrocknet und anschließend mit 0,85 M KH_2PO_4 (pH 3,4) chromatographiert. Nach Trocknung konnten die Platten autoradiographiert werden, um den Lauf der 1ten Dimension zu überprüfen. Bei Bedarf, wenn noch viel freies Phosphat zu erkennen war, konnte an dieser Stelle der Waschschrift mit Zitronensäure wiederholt werden. War die erste Dimension zufriedenstellend wurde erneut mit *Aqua dest.* gewaschen, getrocknet und es erfolgte, senkrecht zur ersten Dimension, die zweite Dimension mit 1 M $\text{LiCl}/10\% \text{ H}_3\text{BO}_3$ als Laufmittel. Nach abschließender Trocknung wurden die DC-Platten autoradiographiert.

5.3.3 Verzögerungsgelelektrophorese (Retardierung)

Diese Methode eignet sich um qualitative und quantitative Aussagen über Protein-Nukleinsäure Wechselwirkungen zu treffen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung von 6S RNA mit der RNAP und dem RNA Chaperon Hfq untersucht. Als Gelsystem kam hierbei ein natives 5%iges PAA-Gel (Vernetzung 46:1, 0,5x TBE) zum Einsatz. Aufgrund des höheren Molekulargewichts laufen Protein-Nukleinsäure Komplexe deutlich langsamer in ein natives Gel ein als die freie Nukleinsäure, sie werden retardiert. Da das Laufverhalten bei der Elektrophorese auch vom Salzgehalt der Probe abhängt wurde streng darauf geachtet, dass in sämtlichen Proben identische Puffer- und somit Salzbedingungen herrschten. In einem Gesamtvolumen von 15 μl wurden 15 nM 3'-radioaktiv markierte 6S RNA (5.2.7.6) mit variablen Konzentrationen RNAP und/oder Hfq und 80 mM KGlu (5.2.7.7) für 10 min bei 30°C zur Komplexbildung inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen abzufangen enthielten die Ansätze zusätzlich noch Heparin (Endkonzentration 100 ng/ μl). Während bei Hfq die Anwesenheit von Heparin bei der Komplexbildung keinen Effekt zeigte, war es im Fall der RNAP wichtig, dies erst nach erfolgter Komplexbildung hinzuzugeben. Nach erfolgter Komplexbildung waren auch 6S RNA/RNAP Komplexe Heparin-stabil. Aus diesem Grund wurde auch bei der Arbeit mit Hfq das Heparin erst nach der Inkubation bei 30°C zugegeben. Anschliessend wurden 5 μl 2x TBE-Probenpuffer zugegeben, die Ansätze auf der 5%igen PAGE getrennt und autoradiographiert (5.2.4.2).

Für den Komplexzerfall unter NTP-Zugabe wurde ein 15 μl Retardierungsansatz mit 15 nM 6S RNA und 50 nM RNAP auf ein 6-faches aufskaliert und nach erfolgter Komplexbildung wurden davon 15 μl auf 5 μl , vorgewärmten 4NTP-Mix (Endkonzentration 0/5/50/100/500 μM) gegeben und erneut 5 min bei 30°C inkubiert. Anschliessend wurden 5 μl 2,5 x TBE

Probenpuffer zugegeben, die Proben auf einer 5%igen PAGE getrennt (Vernetzung 46:1) und autoradiographiert.

5.3.4 Northern Blot Analysen

Hierbei wurden zunächst 1-5 µg gRNA auf einer 10-15%igen dPAGE (5.2.3.2) aufgetrennt, anschliessend wurde der Bereich des Gels, in dem sich die gesuchten Produkte befanden ausgeschnitten und auf eine passende Nylon-Membran (GE, Amersham HybondTM-N⁺) gelegt, bzw. direkt mit dieser Membran von der Glasplatte der dPAGE abgezogen, zwischen jeweils 3 Lagen feuchtes Whatmann 3MM Papier gelegt und in die Elektroblotapparatur (Owi, PantherTM Semidry Electrobloetter, Model HEP-1) überführt. Die Gelseite muss dabei zur Kathode und die Membran zur Anode gerichtet sein. Der Blot erfolgte für 75 min bei 600 mA, anschliessend wurde die RNA durch UV-Crosslinken kovalent an der Membran gebunden (Stratagene, UV StratalinkerTM 1800, Autocrosslink, entspricht 120 mJ).

Für die Detektion bestimmter RNA-Moleküle mit spezifischen Oligonukleotiden wurde die Membran, mit der RNA-Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt und zunächst 2 h mit 20 ml Hybridisierungslösung (ohne Oligonukleotid) bei der gewählten Hybridisierungstemperatur (5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur des Oligonukleotids) prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit 20 ml Hybridisierungslösung über Nacht. Zum Schluss wurde die Membran 3 mal 30 min mit je 50 ml Waschpuffer gewaschen und autoradiographiert.

Hybridisierungslösung:	5 x SSC-Puffer
	7,5 % SDS
	50 µg/ml Heringsperm-DNA
	5-10 pmol ³² P markiertes Oligonukleotid

Waschpuffer:	5 x SSC-Puffer
	0,1 % SDS

20 x SSC-Puffer:	300 mM Natriumcitrat
	3 M NaCl
	pH 7,0

5.3.5 Unterschied im Nachweis der 6S RNA mit dem 6S Oligo 1 in Northern Blot und Primer Extension nach *nutritional upshift*

Dazu muss bemerkt werden, dass es sich bei dem in der Primer Extension verwendeten Primer um den Selben handelt wie für die *Northern Blot* Analysen. Dieser weist eine leichte Überlappung mit der Binderegion der dnRNA auf. Während die *Northern Blot* Analysen relativ unempfindlich gegenüber dieser Interferenz von dnRNA sind, liefert die Primer Extension jedoch verringerte cDNA Mengen. Gründe dafür liegen wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Art der Probentrennung und Hybridisierung beider Methoden. Für den Northern Blot wird die Gesamt-RNA zunächst über denaturierende PAGE getrennt, anschliessend erfolgt vor der Hybridisierung der Sonde eine mehrstündige Prähybridisierung mit großer Volumina Hybridisierungslösung, die verworfen wird. Durch die dPAGE-Trennung und Prähybridisierung wird wahrscheinlich eine große Menge der dnRNA entfernt und stört bei der folgenden Hybridisierung nicht. In der Primer Extension erfolgt die Hybridisierung ohne vorherige dPAGE und Prähybridisierung in sehr kleinen Volumina. Es ist daher sämtliche dnRNA mit im Reaktionsansatz und interferiert mit der Bindung der Sonde an die 6S RNA. Auch Störungen der reversen Transkription durch die gebundene dnRNA sind nicht ausgeschlossen (siehe 2.2.8).

5.3.6 Affinity Binding Experimente

Mit dieser Methode wurde untersucht, ob potentielle Bindepartner für die 6S RNA in Gesamt-Protein Extrakten aus *E. coli* existieren. Hierzu wurde das "µMACS Streptavidin Kit" der Firma Milteny Biotec verwendet. Im Wesentlichen besteht dieses Kit aus Säulen, die mit Edelstahlkügelchen gefüllt sind und den "µMacs Micro Beads". Diese Beads sind magnetische Partikel an die kovalent Streptavidin gebunden ist. Fixiert man die Säulchen mit den Edelstahlkügelchen in einem starken Magneten und gibt die MicroBeads auf die Säule, werden diese im Magnetfeld immobilisiert. Streptavidin kann mit sehr hoher Affinität an das Vitamin Biotin binden und ermöglicht es so spezifisch, biotinylierte Moleküle und daran gebundene Wechselwirkungspartner zu isolieren. Um mögliche zelluläre Interaktionspartner für 6S RNA zu finden wurde wie folgt vorgegangen.

Es wurden 50 pmol biotinylierte, eingetrocknete 6S RNA (5.2.7.10) in 50 µl gProtein, gelöst in Binde/Waschpuffer, resuspendiert (je nach Proteinpräparation waren das 500-650 µg) und 1Std. bei 4°C unter leichtem Schütteln (300 rpm, Thermomixer HLC MKR13) inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz auf 100 µl mit Binde/Waschpuffer aufgefüllt, mit 100 µl der µMACS MicroBeads vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Säulen nach Herstellerangaben mit Equilibrierungspuffer für Proteinisolation vorbereitet und 1-2 mal mit Binde/Waschpuffer gespült. Anschließend wurde der gesamte 200 µl Bindungsansatz auf die Säule aufgetragen, der Durchfluss wurde aufgefangen und zwei weitere Male auf die Säule aufgetragen. Es folgten 5 Waschschrte mit 100 µl Binde/Waschpuffer, die anschließende Elution der an 6S RNA gebundenen Proteine erfolgte mit 100 µl Waschpuffer, supplementiert mit 1 M NaCl. Bei jedem dieser Schritte wurde der Durchfluss aufgefangen, mit 4 Volumen Aceton gefällt und auf einem SDS-Gel (5.2.6.1) analysiert. Bei den Waschschrten 2-5 wurde Binde/Waschpuffer ohne RNasin verwendet, da dieses auf dem SDS-Gel mit erfasst wurde und ggf. gestört hätte.

Da die biotinylierte 6S RNA bei der Elution an der Säule haften bleibt, konnte die Säule erneut verwendet werden, um zu testen ob das RNA Chaperon Hfq unter diesen Bedingungen an 6S RNA binden kann. Dazu wurde diese lediglich 3-4 mal mit 200 µl Binde/Waschpuffer gespült und dann 100 µl 5 µM Hfq in Binde/Waschpuffer auf die Säule gegeben. Die restlichen Schritte waren analog der Vorgehensweise mit gProtein. Hierbei konnte vollständig auf RNasin verzichtet werden, da es sich um ein gereinigtes Protein handelte.

Binde/Waschpuffer	10 mM HEPES pH 7
	50 mM KCl
	10 % Glycerin
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	RNasin 1U/µl

Um zu überprüfen, ob die Integrität der 6S RNA weder durch die Bindung des Streptavidins, noch durch den Versuchsablauf beeinträchtigt war, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, mit 150 µl TE-Puffer von der Säule gewaschen und konnte auf einer dPAGE (5.2.3.2) mit anschließender Silberfärbung (5.2.4.1) analysiert werden.

5.3.7 Transkriptomanalysen

Die Transkriptom-Analysen wurden im Forschungszentrum Jülich am Institut für Biotechnologie in Zusammenarbeit mit Dr. Tino Polen durchgeführt.

5.3.7.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden synthetisiert, die der gleichen Menge der zu vergleichenden RNA-Proben (15-25 µg) entsprachen. Die Synthese erfolgte durch Umschreibung präparierter RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase (Superscript II) mit Zufallshexamer-Primern im 30 µl-Ansatz. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden jeweils die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm) mit je 100 µM im Nukleotidmix (500 µM dATP, dGTP, dCTP, 200 µM dTTP, Invitrogen) eingesetzt. Nach der Synthese (2 h, 42°C) wurde die RNA in 25 mM NaOH hydrolysiert (10 min, 70°C), mit HCl neutralisiert und der Ansatz (50 µl) zum Abtrennen von nicht eingebauten Nukleotiden mit Wasser in 500 µl verdünnt und über Membranen (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach) durch Größenausschluss eingeeengt (3 Wiederholungen, Vereinigung von Cy3- und Cy5-markierter Sonde nach der ersten Wiederholung). Die so erhaltenen Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA-Sonde (in 5-15 µl) der zu vergleichenden RNA-Proben wurden sofort in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

5.3.7.2 Hybridisierungsexperimente mit *E. coli* DNA-Chips und fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Die verwendeten *E. coli* DNA-Chips wurden von Operon bezogen und basieren auf gespotteten 70mer Oligo-DNA-Nukleotiden (Operon *E. coli* Genome AROS™ Version 2.0,). Diese DNA-Chips umfassen 9308 Oligonukleotide von insgesamt vier verschiedenen *E. coli* Genomen und 3 Plasmiden. Die Anzahl der ORFs ist wie folgt: 4269 ORFs von K12, 5306 ORFs von O157:H7 (EDL933), 5251 ORFs von O157:H7 (Sakai), 5366 ORFs von CFT073, 3 Gene von OSAK1, 10 Gene von pO157_Sakai und 97 Gene von pO157_EDL933. In dieser Arbeit wurde sich auf die Auswertung der ORFs des K12-Stamms beschränkt. Jedes Oligonukleotid hat einen Amino-Linker am 5'-Ende für die kovalente Kopplung an die beschichtete Glasoberfläche.

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenz markierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Dazu wurden die vereinigten und aufgereinigten Cy3- / Cy5-markierten cDNA-Sonden (<5 µl Volumen) in 55 µl Hybridisierungspuffer (Operon) aufgenommen, 5 min bei 65°C denaturiert und auf den vorbereiteten Chip gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht in einer Hybridisierungsstation Molecular Devices (MAUI, Biomicro). Sowohl die Vorbehandlung der DNA-Chips als auch das

stringente Waschen nach der Hybridisierung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Hybridisierungs-Puffer-Kit OPHYB-1, Operon). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte direkt nach dem Waschen und Trocknen (Zentrifugation für 10 min bei 200 x g) der DNA-Chips.

5.3.7.3 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz hybridisierter DNA-Chips

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots korreliert direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben und ist ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon, Smith et al. 1996).

Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenPix 4000 A laser scanner (Axon Inc.) verwendet. Dieser bestrahlt die DNA-Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppe von Cy3- und Cy5-dUTP mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen, je eine zur Anregung von Cy3-dUTP und Cy5-dUTP (532 nm, 635 nm), und registriert die daraufhin emittierte Cy3- und Cy5-Fluoreszenz (im grünen bzw. roten Wellenlängenbereich) mit lichtempfindlichen Kathoden. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird (GenPix 4000 A laser scanner, Axon Inc.). Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz und wird durch die Software numerischen Intensitäten auf einer Skala von 0 bis 65535 zugeordnet (GenePix Pro 6.0 Software, Axon Inc.). Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert (GenePix Pro 6.0 Software).

Fluorogramme wurden mit der Software GenePix Pro 6.0 quantitativ analysiert. Mit der Software wurden die Medianwerte der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten von den Fluorogramm-Bildpunkten (1 Bildpunkt entsprach 10 x 10 µm auf dem DNA-Chip) innerhalb des kreisförmig markierten Bereichs eines Spots (Abbildung 5.2 A und B) ermittelt und nach Subtraktion der jeweiligen Medianwerte der Hintergrundintensität das Verhältnis der Cy3- / Cy5-Netto-Fluoreszenzintensitäten berechnet (Abbildung 5.2 C). Dieses Verhältnis wurde verwendet, um den relativen mRNA-Spiegel der Gene anzugeben.

Die Berechnung von Signal/Rausch-Verhältnissen für Cy3- und Cy5- Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spot-Hintergrund}}$. Wenn

das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

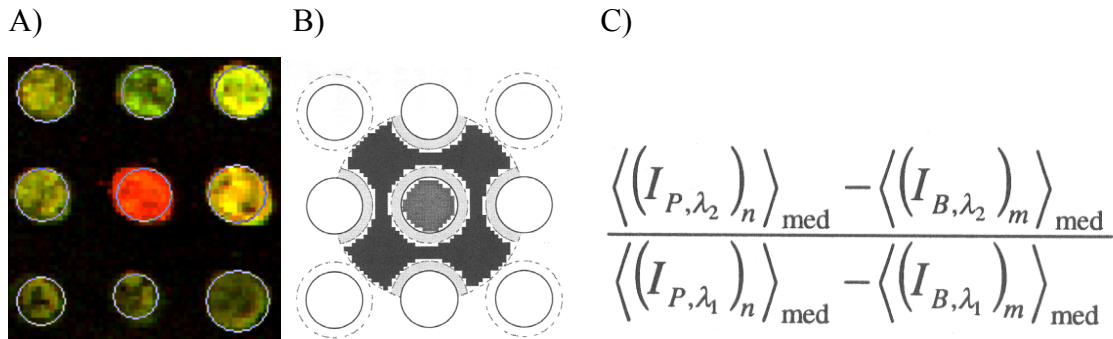


Abbildung 5.2 Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten.

A) Die Quantifizierung der Fluoreszenz der einzelnen Spots auf DNA-Chips erfolgte mit Hilfe der Software GenePix Pro 6.0. B) Schematische Darstellung der Quantifizierung der Spot-Fluoreszenz. Alle Bildpunkte innerhalb des Kreises (grau) gehören zum Spot. Außerhalb einer 2-Bildpunkte-breiten Kreisregion (hellgrau), deren Intensitäten nicht berücksichtigt werden, liegen die Bildpunkte des Hintergrundes (doppelter Spotsdurchmesser, dunkelgrau). Jeder Bildpunkt enthält die numerische Information der orts aufgelösten Cy3- und Cy5-Fluoreszenz. Vor der Berechnung des Cy3-/Cy5-Netto-Fluoreszenz-Verhältnisses eines Spots wurde der Medianwert der Hintergrundfluoreszenz von dem Medianwert der Spotfluoreszenz subtrahiert C) (aus dem Handbuch zur GenePix Pro 6.0 Software).

5.3.7.4 Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Speicherung der Chip-Daten

Um die durch die Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen, Spellman et al. 1998). Die Hintergrundkorrektur und Normalisierung erfolgte mit Hilfe der R-packages marray (Dudoit 2002) und limma (Ritchie, Silver et al. 2007). Alle Fluorogramme und für weitere Analysen relevanten DNA-Chip-Daten, wie Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten, normalisierte Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse (relativer mRNA-Spiegel), Positionen der Gene auf dem DNA-Chip sowie die Informationen zur Durchführung des Experiments wurden in der Jülich Microarray Database elektronisch gespeichert (Polen and Wendisch 2004).

6 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Adenosin
A_{260}	Absorption bei 260 nm

A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Bis	Bisacrylamid
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	‘counts per minute‘
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Coreenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eσ ³⁸	σ ³⁸ -Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>

$E\sigma^{70}$	σ^{70} -Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
f.c.	final concentration
FIS	‘factor for inversion stimulation‘
G	Guanosin
G	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H-NS	‘histone-like nucleoid structuring protein‘
k	kilo (10^3)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGlu	Kaliumglatamat
λ	lamda
l	Liter
LRP	‘leucine-responsive regulatory protein‘
m	milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mRNA	‘messenger RNA‘
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	Nano (10^{-9})
ng	Nanogramm
NS	Nukleinsäure
Nt	Nukleotid
ω	omega
OD	Optische Dichte

ORF	„open reading Frame“
[³² P]	Phosphorisotop (Massenzahl 32)
p	pico (10 ⁻¹²)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
%	Prozent
ppGpp	Guanosintetraphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
RP _C	geschlossener Promotorkomplex
RP _{init}	Initiationskomplex
rpm	‘rounds per minute‘
RP _O	offener Promotorkomplex
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
σ	sigma
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
ss	einzelsträngig
StpA	‘Supressor beim Spleißen des T4-Phagen introns td‘
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U	Uridin
UAS	‘upstream activating sequence‘
üN	über Nacht
üT	über Tag

&	und
UTP	Uridintriphosphat
UP-Element	‘upstream element‘
UV	ultraviolett
V	Volt
Vis	sichtbares Licht
v/v	‘volume per volume‘
W	Watt
w/v	‘weight per volume‘
z.B.	zum Beispiel

7 Anhang

7.1 Abbildungen

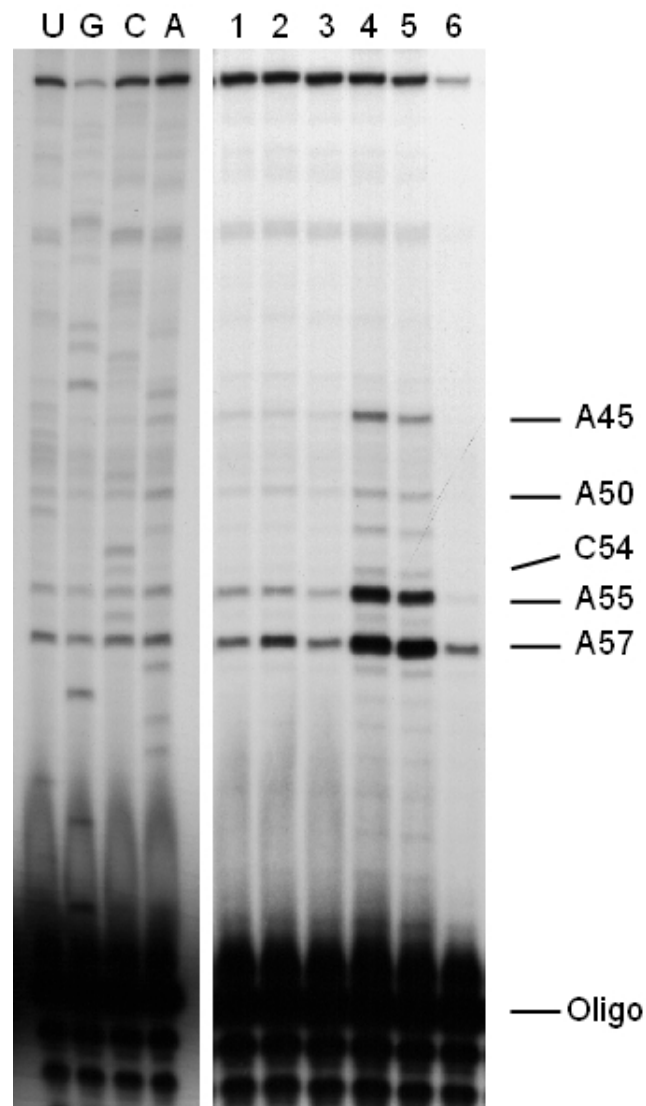


Abbildung 7.1 SHAPE Analysen von 6S RNA und 6S RNA~dnRNA Komplexen in Gegenwart steigender Konzentrationen Hfq. a) zeigt das Autoradiogramm nach der Primer Extension mit dem Primer Oligo 6S-4, dieser bindet an die Positionen 68-89 der reifen 6S RNA. Links ist eine Sequenzierung gezeigt, in Spuren 1-6 wurde 100 ng 6S RNA. Die Spuren 1 bis 6 enthielten 0/0,05(0,1/0,3/0,5 und 1 μ M Hfq. Die angegebenen Nukleotide markieren Positionen erhöhter Zugänglichkeit.

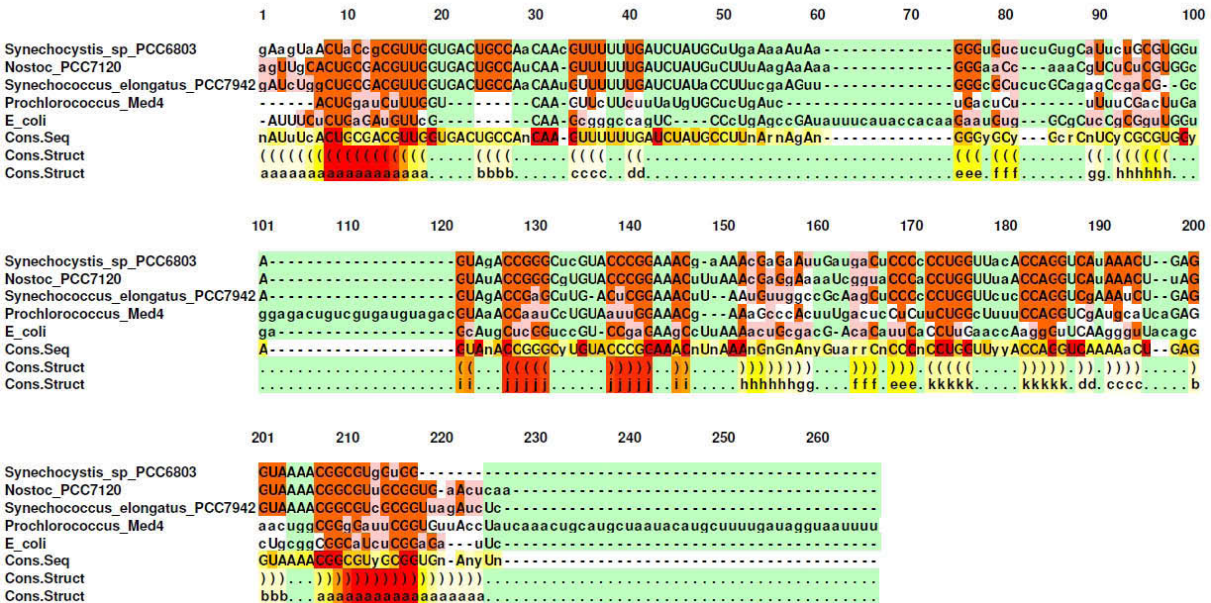


Abbildung 7.2 Sequenz-Alignment der 4 Cyanobakteriellen 6S RNAs und der 6S RNA aus *E. coli*

Das Aligment bildet die Basis für die Strukturalignments aus Abbildung 2.24. Der Farbcode kennzeichnet die Konserviertheit der Nukleotide innerhalb der Sequenz, bzw. Struktur. Orange/Rot: hoch konserviert bis Weiss: nicht konserviert. In Rosa sind kompensatorische Basenaustausche angegeben, die auf Sequenzebene nicht konserviert sind, aber zu konservierten Strukturelementen führen.

7.2 Tabellen

Tabelle 7.1 Quantifizierung von vier *in vitro* Transkriptionen mit pSH666-2 in Gegenwart der 6S RNA, Basis für Abbildung 2.1b

Mittelwerte Promotoraktivität						
nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	100	100	100	100	100	
10	86,2924798	94,4109699	75,9836909	83,1674927	95,1594955	
50	50,3406973	75,2967552	42,969255	35,9138219	67,5197288	
100	43,0094557	67,7069089	26,4693339	21,3897944	56,2212458	
200	24,9536671	39,3346421	13,2838477	6,9548452	28,0436465	
500	20,1806763	39,5599747	14,0378489	4,32608991	25,762367	
Standardabweichung						
nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	0	0	0	0	0	
10	6,80786259	6,57652045	27,5835633	11,4433719	16,4538765	
50	1,40692373	3,75157409	2,878721	5,81277076	11,6534496	
100	1,59068728	13,0595346	3,82569486	4,58792345	16,7533449	
200	4,45520923	2,00614694	5,95497263	2,20626834	7,05867367	
500	4,09569616	5,75786452	2,23028228	1,46935848	7,30743444	

Tabelle 7.2 Vergleich der Transkriptmengen verschiedener Gene für die *E. coli* Stämme MM139 (Mut) und MC4100BW (WT) in der stationären Wachstumsphase, Grundlage für Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.b

mRNA Mut/WT	Primer Extens	Microarray	Stabw	p-Value
rplN	0,74389402	0,65	0,04321427	0,0069
rplJ	0,91397482	0,58	0,00894761	0,101
rpsL	0,74622381	0,64	0,13623348	0,039
rplY	0,8556296	0,65	0,04797376	0,052
thrL	2,33008035	1,73063621	0,30862823	0,0448351
hisL	1,72960074		0,06066046	0

Tabelle 7.3 Quantifizierung der ribosomalen RNA P2 Promotoren in der stationären Phase der Stämme MM139 und MC4100BW. Der Mittelwert von 4 Auswertungen, normiert auf *rhoL* samt Standardabweichung ist angegeben. Grundlage für **Abbildung 2.4b**

MW Mut	MW WT	Stab Mut/rho	StabWT/Rho
0,35172312	0,91515246	0,03669945	0,0845526

Tabelle 7.4 Quantifizierung der relativen ppGpp Mengen der Stämme MM139 (6S Mutante) und MC4100BW (WT) in der stationären Phase. Ausgewertet wurden 4 Experimente von 2 unabhängigen Zellaufschlüssen. Wurde für **Abbildung 2.6 b** verwendet.

ppGpp/ (ppGpp+GTP)	MM139	MC4100BW
MW	0,32619983	0,20887103
Stabw	0,02067292	0,07301551

Tabelle 7.5 Quantifizierung der Promotoraktivität der cat-Fusionsplasmide pHD1-B, pHD1-D und pTK01 in den Stämmen MM139 (6S RNA Mutante) und MC4100BW (WT) in der exponentiellen Phase. Abgeglichen wurde gegen die plasmidkodierte RNAI, der Wildtyp wurde für jedes Plasmid als 1 gesetzt. Ausgewertet wurden 5 Experimente von 3 unabhängigen RNA-Präparationen. Diente für **Abbildung 2.7b**.

	Mittelwert cat/RNAI , WT als 1 gesetzt	Standardabweichung
Mut-pHD1-B	0,949747275	0,110657955
WT-pHD1-B	1	0
Mut-pHD1-D	0,64264219	0,086538032
WT-pHD1-D	1	0
Mut-pTK01	0,956486679	0,142481032
WT-pTK01	1	0

Tabelle 7.6 Quantifizierung der relativen ppGpp Mengen verschiedener Deletionsstämmen im Purinstoffwechsel in der stationären Phase. Ausgewertet wurden 2 Experimente von 2 unabhängigen Zellaufschlüssen. Wurde für **Abbildung 2.9b** verwendet.

relatives ppGpp Level	MW	Stabw
WT	0,12385207	0,02813171
$\Delta purE$	0,20851646	0,00262319
$\Delta purK$	0,14934928	0,06044589
Δadd	0,2019809	0,03947558
$\Delta guaD$	0,16595784	0,01206816

Tabelle 7.7 Quantifizierung der relativen 6S RNA-Mengen diverser Deletionsstämme in der stationären Phase. Der Wildtyp wurde als 1 gesetzt, wurde für Abbildung 2.10b benutzt.

WT	1
$\Delta purE$	0,99079073
$\Delta purK$	1,01337885
Δadd	0,8123008
$\Delta ygfa$	0,78969814
Δrph	0,93707233
Δhfq	0,81250909
$\Delta purE$	0,94131888

Tabelle 7.8 Quantifizierung des ATP-Spiegels in den Stämmen MM139 (6S RNA⁻) und MC4100BW (WT) während eines nutritional *upshift*. Der Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als 1 gesetzt, diente für Abbildung 2.11b.

Zeit in min	6S RNA (-)	WT
0	1	1
1	1,36489289	1,32817864
3	2,19128455	2,15758888
5	2,40525719	2,50242657

Tabelle 7.9 Bestimmung der apparenten Bindekonstante für die Bindung von Hfq an 6S RNA. Die freie Menge 6S RNA wurde bestimmt und der Wert bei 0 Hfq als 100% gesetzt. Wurde für Abbildung 2.12 benutzt.

Hfq in μ M	freie 6S RNA (%)
0	100
1	87,70532337
2	67,63679103
3	39,41246019
4	26,99916392
5	11,41760554

Tabelle 7.10 Komplexdissoziation von 6S RNA~RNAP Komplexen in Gegenwart von Hfq und 100 μ M NTPs. Gemessen wurden die verbliebenen Komplexmengen, der Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt, Grundlage für Abbildung 2.18b.

min	Hfq (-)	Hfq (+)
0	100	100
1	58,3027177	47,2763967
2	52,9630893	37,1113164
3	50,9760314	30,8438091
4	48,8957587	31,7286401
5	41,0631154	29,8709996
10	29,385709	26,1986383

Tabelle 7.11 Gene mit auffälligen Änderungen im Expressionsniveau während des *nutritional upshift*

Synonym	Gen	Verhältnis mRNA Mut/WT						Beschreibung
		Vor upshift	Stabw	3 min nach upshift	Stabw	5 min nach upshift	Stabw	
b2911	<i>ssrS</i>	0,0028	0,0034	0,0076	0,0027	0,0048	0,0030	noncoding 6S RNA
	<i>dnRNA</i>	0,0245	0,0047	0,0445	0,0148	0,1690	0,0745	6S RNA directed dn RNA
b2883	<i>guaD</i>	3,6624	2,6745	3,0752	1,3648	2,2048	0,1484	guanine deaminase
b0529	<i>folD</i>	1,5717	0,3891	1,4308	0,1620	1,6522	0,4618	bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ cyclohydrolase
b0911	<i>rpsA</i>	0,7154	0,0234	1,3813	0,2842	1,6944	0,4017	30S ribosomal protein S1
b0169	<i>rpsB</i>	0,8002	0,1894	1,1997	0,2405	1,4692	0,0902	30S ribosomal protein S2
b3314	<i>rpsC</i>	0,3889	0,0004	0,6110	0,1802	1,5156	0,7390	30S ribosomal protein S3
b3296	<i>rpsD</i>	0,5431	0,0182	1,0401	0,2706	1,2726	0,0794	30S ribosomal protein S4
b3303	<i>rpsE</i>	0,6524	0,1171	0,8288	0,1726	1,8475	1,3953	30S ribosomal protein S5
b3303	<i>rpsE</i>	0,5886	0,1096	0,7949	0,1638	1,1989	0,0105	30S ribosomal protein S5
b4200	<i>rpsF</i>	0,4483	0,0159	1,1839	0,4599	1,6863	0,0888	30S ribosomal protein S6
b3341	<i>rpsG</i>	0,4508	0,0954	1,0944	0,0936	1,5404	1,0305	30S ribosomal protein S7
b3306	<i>rpsH</i>	0,5148	0,0604	1,0881	0,1521	1,8616	0,3905	30S ribosomal protein S8
b3230	<i>rpsI</i>	0,5929	0,1001	1,2058	0,6276	1,9796	0,1475	30S ribosomal protein S9
b3321	<i>rpsJ</i>	0,2772	0,0027	0,8205	0,0778	1,3021	0,9311	30S ribosomal protein S10
b3297	<i>rpsK</i>	0,5254	0,0079	0,9972	0,2652	1,5990	1,3360	30S ribosomal protein S11
b3342	<i>rpsL</i>	0,4191	0,0523	1,2199	0,1071	1,9097	1,5052	30S ribosomal protein S12
b3298	<i>rpsM</i>	0,5403	0,0364	1,0240	0,2838	1,4467	0,8908	30S ribosomal protein S13
b3307	<i>rpsN</i>	0,5052	0,0694	1,0220	0,1104	1,4664	0,6628	30S ribosomal protein S14
b3165	<i>rpsO</i>	0,9891	0,0247	1,2624	0,1962	1,6049	0,6619	30S ribosomal protein S15
b2609	<i>rpsP</i>	0,3167	0,0612	0,9463	0,0972	1,1112	0,4347	30S ribosomal protein S16
b3311	<i>rpsQ</i>	1,5133	0,0909	1,4549	0,7291	2,0466	0,5216	30S ribosomal protein S17
b4202	<i>rpsR</i>	0,4820	0,0511	1,1407	0,2444	1,6972	0,2184	30S ribosomal protein S18
b3316	<i>rpsS</i>	0,4913	0,0188	0,6846	0,1393	2,6631	1,2523	30S ribosomal protein S19
b0023	<i>rpsT</i>	0,6451	0,0142	1,1583	0,7579	0,9399	0,0050	30S ribosomal protein S20
b3065	<i>rpsU</i>	0,4747	0,0109	0,8592	0,0623	1,4540	0,2529	30S ribosomal protein S21
b1480	<i>sra</i>	0,6720	0,2143	0,6417	0,4051	0,9550	0,0719	30S ribosomal subunit S22
b1480	<i>sra</i>	0,9406	0,1858	0,7990	0,6415	1,4028	0,0592	30S ribosomal subunit S22
b3984	<i>rplA</i>	0,3726	0,0694	0,8484	0,1345	1,3666	0,7094	50S ribosomal protein L1
b3317	<i>rplB</i>	0,4119	0,0380	0,6246	0,0649	1,4379	0,3350	50S ribosomal protein L2
b3320	<i>rplC</i>	0,3535	0,0055	0,7633	0,0595	1,1594	0,2894	50S ribosomal protein L3
b3319	<i>rplD</i>	0,3619	0,0415	0,8063	0,0980	1,0642	0,4229	50S ribosomal protein L4
b3308	<i>rplE</i>	0,5342	0,0872	0,9906	0,0212	1,4404	0,9773	50S ribosomal protein L5
b3305	<i>rplF</i>	0,4709	0,0061	0,9820	0,1454	1,4226	1,0053	50S ribosomal protein L6
b3986	<i>rplL</i>	0,5848	0,0539	0,7942	0,1445	1,5571	1,3365	50S ribosomal protein L7/L12
b4203	<i>rplI</i>	0,5477	0,0561	1,1878	0,4881	2,0156	0,1702	50S ribosomal protein L9
b3985	<i>rplJ</i>	0,5839	0,0974	0,8601	0,1506	1,2302	0,6670	50S ribosomal protein L10
b3983	<i>rplK</i>	0,3759	0,0410	0,9337	0,1789	1,1900	0,2967	50S ribosomal protein L11
b3231	<i>rplM</i>	0,4752	0,0744	1,2007	0,4947	1,1095	0,8867	50S ribosomal protein L13

b3310	<i>rplN</i>	0,5352	0,0214	0,8344	0,0217	1,2776	0,0433	50S ribosomal protein L14
b3301	<i>rplO</i>	0,6137	0,0721	0,7319	0,1120	1,3684	0,7914	50S ribosomal protein L15
b3313	<i>rplP</i>	0,5283	0,0660	0,6951	0,1923	1,3395	0,5734	50S ribosomal protein L16
b3294	<i>rplQ</i>	0,6583	0,0362	1,0642	0,2415	1,1169	0,1261	50S ribosomal protein L17
b3304	<i>rplR</i>	0,5100	0,0697	0,8930	0,0071	1,5054	1,0708	50S ribosomal protein L18
b2606	<i>rplS</i>	0,3455	0,0584	0,8847	0,3832	1,3503	0,2908	50S ribosomal protein L19
b1716	<i>rplT</i>	0,8672	0,2412	1,1696	0,6211	1,3449	0,0276	50S ribosomal protein L20
b3186	<i>rplU</i>	0,6324	0,1509	1,4965	0,5786	1,6989	0,3252	50S ribosomal protein L21
b3315	<i>rplV</i>	0,3675	0,0629	0,5623	0,0689	1,9577	1,0817	50S ribosomal protein L22
b3318	<i>rplW</i>	0,3790	0,0385	0,6615	0,0965	1,6803	0,5891	50S ribosomal protein L23
b2185	<i>rplY</i>	0,6753	0,1114	1,1309	0,0913	1,7565	0,0486	50S ribosomal protein L25
b3185	<i>rpmA</i>	0,7126	0,2157	1,4595	0,7713	1,2270	0,5489	50S ribosomal protein L27
b3637	<i>rpmB</i>	0,5647	0,1118	1,1514	0,2656	1,3576	0,0285	50S ribosomal protein L28
b3312	<i>rpmC</i>	0,5456	0,0769	0,7432	0,3684	1,0782	0,7026	50S ribosomal protein L29
b3302	<i>rpmD</i>	0,7073	0,1014	0,7938	0,1718	1,4175	0,4116	50S ribosomal protein L30
b3936	<i>rpmE</i>	0,7277	0,3428	1,1705	0,3828	1,5669	0,5645	50S ribosomal protein L31
b1089	<i>rpmF</i>	0,5634	0,1806	1,1461	0,8868	1,0128	0,4505	50S ribosomal protein L32
b3636	<i>rpmG</i>	0,7995	0,0016	1,2784	0,3300	1,2120	0,2549	50S ribosomal protein L33
b3703	<i>rpmH</i>	0,4528	0,1682	1,4309	0,7989	1,3577	0,5719	50S ribosomal protein L34
b1717	<i>rpmI</i>	1,0320	0,1197	0,8678	0,0604	1,3161	0,6168	50S ribosomal protein L35
b3299	<i>rpmJ</i>	0,6545	0,0006	0,9624	0,2291	1,6006	0,7529	50S ribosomal protein L36
b3295	<i>rpoA</i>	0,5525	0,0187	0,9999	0,2183	1,7019	0,8713	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
b3987	<i>rpoB</i>	0,3577	0,0572	0,7544	0,1254	1,1835	0,4285	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
b3988	<i>rpoC</i>	0,4047	0,0393	0,4067	0,1842	0,9841	0,7086	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
b3649	<i>rpoZ</i>	0,8284	0,0912	1,3804	0,5207	1,3373	0,0113	DNA-directed RNA polymerase subunit omega
b3067	<i>rpoD</i>	0,6263	0,0265	1,1615	0,0121	1,1720	0,2192	RNA polymerase sigma factor D
b2741	<i>rpoS</i>	0,9315	0,1356	1,0096	0,5646	0,8174	0,2871	RNA polymerase sigma factor S
b3461	<i>rpoH</i>	1,5741	0,0651	0,8897	0,4997	1,1762	0,1826	RNA polymerase sigma factor H
b3202	<i>rpoN</i>	0,8620	0,0624	1,2606	0,1820	0,9247	0,0991	RNA polymerase sigma factor N
b2573	<i>rpoE</i>	1,6642	1,1696	1,1804	0,9804	1,3859	0,1254	RNA polymerase sigma factor E
b1922	<i>fliA</i>	0,6222	1,2505	1,0727	0,1284	1,1667	0,3561	RNA polymerase sigma factor F
b4293	<i>fecI</i>	0,7659	0,0478	1,0805	0,3460	0,7560	0,8484	KpLE2 phage-like element; RNA polymerase, sigma 19 factor
b3980	<i>tufB</i>	0,7222	0,0160	1,3584	0,3710	1,7640	0,2536	protein chain elongation factor EF-Tu (duplicate of tufA)
b1718	<i>infC</i>	0,7903	0,0616	1,1220	0,0384	1,2528	0,6728	translation initiation factor IF-3
b3339	<i>tufA</i>	0,6522	0,0134	1,0307	0,1939	1,5846	0,4869	protein chain elongation factor EF-Tu (duplicate of tufB)
b0884	<i>infA</i>	0,6590	0,1667	1,0038	0,1284	1,3064	0,1463	translation initiation factor IF-1
b0852	<i>rimK</i>	0,9581	0,0194	1,3288	0,3884	0,7533	0,0678	ribosomal protein S6 modification protein

b1066	<i>rimJ</i>	0,9693	0,0306	1,0745	0,3921	0,8893	0,0112	ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase
b4373	<i>rimI</i>	1,1023	0,1691	1,0080	0,1223	1,0573	0,1657	ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase
b4371	<i>rsmC</i>	1,0788	0,0453	0,9533	0,0969	0,8949	0,2948	16S ribosomal RNA m2G1207 methyltransferase
b4371	<i>rsmC</i>	1,1039	0,1488	0,9382	0,0441	1,0428	0,2268	16S ribosomal RNA m2G1207 methyltransferase
b1427	<i>rimL</i>	0,6160	0,0525	0,6262	0,1981	0,6113	0,3769	ribosomal-protein-L7/L12-serine acetyltransferase
b3259	<i>prmA</i>	0,9243	0,2550	1,2530	0,0990	1,4721	0,1221	ribosomal protein L11 methyltransferase
b2607	<i>trmD</i>	0,3732	0,0390	0,8368	0,1983	1,2156	0,5558	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase
b3651	<i>trmH</i>	0,6037	0,1215	1,0987	0,1065	1,2083	0,2959	tRNA (Guanosine-2'-O)-methyltransferase
b3261	<i>fis</i>	0,6004	0,0118	1,3982	0,1460	1,3747	0,0520	DNA-binding protein Fis

Tabelle 7.12 Quantifizierung der IVT mit pSH666-2 und cyanobakteriellen 6S RNAs als Inhibitor. Für jeden Promotor und Inhibitor-RNA wurde der Wert ohne 6S RNA als 100% gesetzt, aus den Daten wurden Inhibierungskurven angefertigt und daraus die I_{50} -Werte für jeden Promotor und RNA ermittelt. Wurde für Abbildung 2.27 verwendet.

<i>Synechocystis</i>				Promotoraktivität		
nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	100	100	100	100	100	
10	83,9807783	81,42625291	89,2745612	78,7431093	96,84658993	
50	74,7506296	71,97505447	0,51360002	49,6167178	64,4057209	
100	54,7296766	66,14546547	0,26420898	21,9944416	47,53454248	
200	43,6270363	52,56953941		11,1991693	26,19398107	
500	26,2070119	34,97933729		5,75534075	14,35076798	

Med 4

nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	100	100	100	100	100	
10	89,0831248	99,68668681	87,4866611	89,4258784	94,53068631	
50	71,1544806	93,08383673	36,8434313	66,2566734	76,54601921	
100	59,1741266	86,49567776	22,8806023	48,1000152	50,45125156	
200	52,5571309	70,86885501		20,1910932	30,89637382	
500	31,0966546	42,90965264		11,4818703	9,468078175	

Nostoc

nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	100	100	100	100	100	
10	83,9688399	85,2358861	89,6806833	88,8331188	87,32261285	
50	50,1370564	63,9847695	27,8964603	40,1690262	48,084953	
100	42,6441181	48,05399176	17,1509261	31,7649078	27,00171027	
200	24,8090348	34,77682656		20,1784642	14,79602054	
500	21,1301801	15,41224334		11,2089232	6,746904671	

Synechococcus

nM 6S RNA	rrnBP1	ptac	bolA	RNA I	hisG	
0	100	100	100	100	100	
10	93,391112	83,97719147	90,9276375	79,2822254	85,72441979	
50	81,5309912	93,06348318	59,8360801	66,3434421	80,2661473	
100	87,0448217	90,85054309	39,601554	46,5929411	62,89563409	
200	43,9618747	56,25357013		14,0770699	24,2122468	
500	2,80428369	2,802002294		-4,83936779	7,118138215	

I50 6S RNA	<i>E. coli</i>	<i>Synechocystis</i>	<i>Med4</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Synechococcus</i>
rrnBP1	52 nM	126 nM	231 nM	53 nM	177 nM
ptac	150 nM	231 nM	417 nM	86 nM	231 nM
bolA	40 nM	26 nM	35 nM	33 nM	71 nM
RNA I	35 nM	51 nM	93 nM	40 nM	91 nM
hisL	118 nM	88 nM	102 nM	46 nM	124 nM

Tabelle 7.13 Übersicht über mögliche Zielgene für dnRNA, erstellt mittels des Webserververs sRNATarget(Cao, Zhao et al. 2009)

sRNA	mRNA	Score	mRNA function
dnRNA	yfeO	1	predicted ion channel protein
dnRNA	gntT	1	gluconate transporter, high-affinity GNT I system
dnRNA	ybdF	0,999	conserved protein
dnRNA	queA	0,987	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase
dnRNA	wzzE	0,974	Enterobacterial Common Antigen (ECA) polysaccharide chain length mod
dnRNA	accA	0,95	acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit
dnRNA	fimA	0,906	major type 1 subunit fimbriae (pilin)
dnRNA	yegT	0,878	predicted nucleoside transporter
dnRNA	yjiG	0,875	conserved protein
dnRNA	obgE	0,861	GTPase involved in cell partitioning and DNA repair
dnRNA	ycjT	0,842	predicted hydrolase
dnRNA	ybaA	0,822	conserved protein
dnRNA	envY	0,777	DNA-binding transcriptional activator of porin biosynthesis
dnRNA	ycdD	0,763	predicted transporter
dnRNA	hrpB	0,722	predicted ATP-dependent helicase
dnRNA	tgt	0,686	tRNA-guanine transglycosylase
dnRNA	yccX	0,635	predicted acylphosphatase
dnRNA	ycgG	0,632	conserved inner membrane protein
dnRNA	pepT	0,608	peptidase T
dnRNA	yheU	0,574	conserved protein
dnRNA	lptC	0,535	conserved protein
dnRNA	otsB	0,515	trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic
dnRNA	yffQ	0,507	CPZ-55 prophage; predicted protein
dnRNA	yjdK	0,505	predicted protein
dnRNA	lptA	0,481	periplasmic LPS-binding protein
dnRNA	pps	0,455	phosphoenolpyruvate synthase
dnRNA	ispD	0,446	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase
dnRNA	helD	0,435	DNA helicase IV
dnRNA	ybhD	0,409	predicted DNA-binding transcriptional regulator
dnRNA	fsr	0,396	predicted fosmidomycin efflux system
dnRNA	rscF	0,379	predicted outer membrane protein, signal
dnRNA	flgB	0,376	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod
dnRNA	blr	0,375	beta-lactam resistance membrane protein
dnRNA	rumB	0,353	23S rRNA m(5)U747 methyltransferase
dnRNA	ygiP	0,31	predicted metal dependent hydrolase
dnRNA	ydcQ	0,257	predicted DNA-binding transcriptional regulator
dnRNA	edd	0,255	6-phosphogluconate dehydratase
dnRNA	ycgJ	0,237	predicted protein
dnRNA	yohF	0,237	predicted oxidoreductase with NAD(P)-binding Rossmann-fold domain
dnRNA	leuA	0,236	2-isopropylmalate synthase
dnRNA	nikB	0,233	nickel transporter subunit
dnRNA	dctR	0,232	predicted DNA-binding transcriptional regulator
dnRNA	nepl	0,228	predicted transporter
dnRNA	atoA	0,225	acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase, beta subunit
dnRNA	araB	0,211	L-ribulokinase
dnRNA	yhaH	0,204	predicted inner membrane protein
dnRNA	hycG	0,189	hydrogenase 3 and formate hydrogenase complex, HycG subunit
dnRNA	yidC	0,179	cytoplasmic insertase into membrane protein, Sec system
dnRNA	msbA	0,17	fused lipid transporter subunits of ABC superfamily: membrane compo
dnRNA	yedZ	0,161	predicted inner membrane protein
dnRNA	stpA	0,138	DNA binding protein, nucleoid-associated
dnRNA	ackA	0,137	acetate kinase A and propionate kinase 2
dnRNA	cusF	0,132	periplasmic copper-binding protein
dnRNA	alkB	0,13	oxidative demethylase of N1-methyladenine or N3-methylcytosine DNA
dnRNA	purH	0,116	fused IMP cyclohydrolase/phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide
dnRNA	hokC	0,115	toxic membrane protein, small
dnRNA	ssuC	0,112	alkanesulfonate transporter subunit
dnRNA	betB	0,111	betaine aldehyde dehydrogenase, NAD-dependent
dnRNA	fbaB	0,11	fructose-bisphosphate aldolase class I
dnRNA	yfbQ	0,109	predicted aminotransferase
dnRNA	mltC	0,108	membrane-bound lytic murein transglycosylase C
dnRNA	ycbU	0,104	predicted fimbrial-like adhesin protein

8 Literaturverzeichnis

- Afflerbach, H., O. Schröder, et al. (1999). "Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli rrnB* P1 promoter activity." J. Mol. Biol. **286**(2): 339-53.
- Aiba, A. and K. Mizobuchi (1989). "Nucleotide sequence analysis of genes *purH* and *purD* involved in the de novo purine nucleotide biosynthesis of *Escherichia coli*." J Biol Chem **264**(35): 21239-46.
- Allen, T. A., S. Von Kaenel, et al. (2004). "The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock." Nat Struct Mol Biol **11**(9): 816-21.
- Altuvia, S. (2007). "Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches." Curr Opin Microbiol **10**(3): 257-61.
- Arluison, V., S. Hohng, et al. (2007). "Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA." Nucleic Acids Res **35**(3): 999-1006.
- Aviv, M., H. Giladi, et al. (1996). "Analysis of the shut-off of ribosomal RNA promoters in *Escherichia coli* upon entering the stationary phase of growth." FEMS Microbiol Lett **140**(1): 71-6.
- Axmann, I. M., J. Holtzendorff, et al. (2007). "Two distinct types of 6S RNA in *Prochlorococcus*." Gene **406**(1-2): 69-78.
- Axmann, I. M., P. Kensche, et al. (2005). "Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis." Genome Biol **6**(9): R73.
- Baba, T., T. Ara, et al. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.
- Baracchini, E. and H. Bremer (1988). "Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp." J. Biol. Chem. **263**: 2597-2602.
- Barker, M. M., T. Gaal, et al. (2001). "Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*." J. Mol. Biol. **305**: 673-688.
- Barrick, J. E., N. Sudarsan, et al. (2005). "6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter." RNA **11**(5): 774-84.
- Barron, A., G. May, et al. (1986). "Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*." J Bacteriol **167**(2): 433-8.
- Battesti, A. and E. Bouveret (2006). "Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism." Mol Microbiol **62**(4): 1048-63.

- Becker, G. and R. Hengge-Aronis (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.
- Beckmann, B. M., A. Grunweller, et al. (2010). "Northern blot detection of endogenous small RNAs (approximately 14 nt) in bacterial total RNA extracts." Nucleic Acids Res **38**(14): e147.
- Beidler, J. L., P. R. Hillard, et al. (1982). "Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver." Analytical. Biochem. **126**: 374-380.
- Beutel, B. A. and M. T. Record, Jr. (1990). "E. coli promoter spacer regions contain nonrandom sequences which correlate to spacer length." Nucleic Acids Res **18**(12): 3597-603.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, et al. (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**: 1453-1462.
- Block, R. and A. W. Haseltine (1975). "Purification and properties of stringent factor." J Biol Chem **250**(4): 1212-7.
- Boes, N., K. Schreiber, et al. (2008). "SpoT-triggered stringent response controls usp gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **190**(21): 7189-99.
- Bohn, C., C. Rigoulay, et al. (2010). "Experimental discovery of small RNAs in *Staphylococcus aureus* reveals a riboregulator of central metabolism." Nucleic Acids Res **38**(19): 6620-36.
- Bolotin, A., B. Quinquis, et al. (2005). "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." Microbiology **151**(Pt 8): 2551-61.
- Bown, J. A., K. A. Barne, et al. (1997). Extended -10 promoters. Berlin-Heidelberg, Springer.
- Brennan, R. G. and T. M. Link (2007). "Hfq structure, function and ligand binding." Curr Opin Microbiol **10**(2): 125-33.
- Brescia, C. C., P. J. Mikulecky, et al. (2003). "Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure." Rna **9**(1): 33-43.
- Brown, J. W. and J. C. Ellis (2005). Comparative analysis of RNA secondary structures: 6S RNA. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Brownlee, G. G. (1971). "Sequence of 6S RNA of *E. coli*." Nat New Biol **229**(5): 147-9.
- Burgess, R. R. and J. J. Jendrisak (1975). "A procedure for the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography." Biochemistry **14**: 4636-4638.
- Cao, Y., Y. Zhao, et al. (2009). "sRNATarget: a web server for prediction of bacterial sRNA targets." Bioinformatics **3**(8): 364-6.

- Cashel, M., D. R. Gentry, et al., Eds. (1996). The Stringent Response. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Washington, D. C., ASM Press.
- Cavanagh, A. T., P. Chandrangsu, et al. (2010). "6S RNA regulation of relA alters ppGpp levels in early stationary phase." Microbiology.
- Cavanagh, A. T., A. D. Klocko, et al. (2008). "Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma(70)." Mol. Microbiol. **67**(6): 1242-1256.
- Cech, T. R. (1993). "Catalytic RNA - Structure and mechanism." Biochemical Society Transactions **21**: 229-234.
- Chae, H., K. Han, et al. "Rho-dependent termination of ssrS (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream ygfA (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase)." J Biol Chem **286**(1): 114-22.
- Chae, H., K. Han, et al. (2010). "Rho-dependent termination of ssrS (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream ygfA (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase)." J Biol Chem **286**(1): 114-22.
- Chamberlin, M. J., W. C. Nierman, et al. (1979). "A quantitative assay for bacterial RNA polymerases." J. Biol. Chem. **254**: 10061-10069.
- Cook, V. M. and P. L. Dehaseth (2007). "Strand opening-deficient *Escherichia coli* RNA polymerase facilitates investigation of closed complexes with promoter DNA: effects of DNA sequence and temperature." J Biol Chem **282**(29): 21319-26.
- Da Costa, X. J. and S. W. Artz (1997). "Mutations that render the promoter of the histidine operon of *Salmonella typhimurium* insensitive to nutrient-rich medium repression and amino acid downshift." J Bacteriol **179**(16): 5211-7.
- Dagert, M. and S. D. Ehrlich (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells." Gene **6**(1): 23-8.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.
- de Haseth, P. L. and O. C. Uhlenbeck (1980). "Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with oligoriboadenylates." Biochemistry **19**(26): 6138-46.
- de Haseth, P. L. and O. C. Uhlenbeck (1980). "Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with Q beta ribonucleic acid." Biochemistry **19**(26): 6146-51.
- Ditty, J. L., S. B. Williams, et al. (2003). "A cyanobacterial circadian timing mechanism." Annu Rev Genet **37**: 513-43.
- Dombroski, A. J., W. A. Walter, et al. (1993). "Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity." Genes & Development **7**: 2446-2455.

- Dudoit, S., and Yang, Y.H. (2002). Bioconductor R packages for exploratory analysis and normalization of cDNA microarray data., Springer, New York.
- Ebright, R. H. and S. Busby (1995). "The Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit: structure and function." Curr Opin Genet Dev **5**(2): 197-203.
- Eddy, S. R. (1999). "Noncoding RNA genes." Curr Opin Genet Dev **9**(6): 695-9.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, et al. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14863-8.
- Espinoza, C. A., T. A. Allen, et al. (2004). "B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis." Nat Struct Mol Biol **11**(9): 822-9.
- Feklistov, A., N. Barinova, et al. (2006). "A basal promoter element recognized by free RNA polymerase sigma subunit determines promoter recognition by RNA polymerase holoenzyme." Mol Cell **23**(1): 97-107.
- Folichon, M., V. Arluison, et al. (2003). "The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation." Nucleic Acids Res **31**(24): 7302-10.
- Franze de Fernandez, M. T., L. Eoyang, et al. (1968). "Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA." Nature **219**(5154): 588-90.
- Gaal, T., M. S. Bartlett, et al. (1997). "Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria." Science **278**: 2092-2097.
- Geißen, R. (2007). Analyse des Einfluss der 6S RNA aus Escherichia Coli auf die Transkription unterschiedlicher Promotoren in vivo. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Geissmann, T. A. and D. Touati (2004). "Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator." Embo J **23**(2): 396-405.
- Gildehaus, N. (2001). "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der 6S RNA aus E. coli und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines Transkriptionskomplexes." Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Gildehaus, N. (2005). Analysen zur Funktion und Interaktion der phasenabhängig exprimierten E. coli 6S RNA. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Gildehaus, N., T. Neusser, et al. (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 transcripts." Nucleic Acids Res **35**(6): 1885-96.
- Gonzales, N., J. Wiggs, et al. (1977). "A simple procedure for resolution of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase." Arch. Biochem. Biophys. **182**: 404-408.
- Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." Trends Genet **21**(7): 399-404.

- Gourse, R. L. (1988). "Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*." Nucleic Acids Research **16**: 9789-9809.
- Gourse, R. L., T. Gaal, et al. (1996). "rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*." Annual Reviews of Microbiology **50**: 645-677.
- Gross, C. A., C. L. Chan, et al. (1996). "A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase." Philosophical Transactions of the Royal Society London **351**: 475-482.
- Gruber, T. M., B. A. Young, et al. (2001). "Binding of the initiation factor σ^{70} to core RNA polymerase is a multistep process." Molecular Cell **8**: 21-31.
- Gupta, R. S. and D. W. Mathews "Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria." BMC Evol Biol **10**: 24.
- Hajnsdorf, E. and P. Regnier (2000). "Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1501-5.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Oxford, Washington DC, IRL Press.
- Hansen, S., K. Lewis, et al. (2008). "The Role of Global Regulators and Nucleotide Metabolism in Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **52**: 2718-26.
- Harshman, R. B. and H. Yamazaki (1971). "Formation of ppGpp in a relaxed and stringent strain of *Escherichia coli* during diauxie lag." Biochemistry **10**(21): 3980-2.
- Haugen, S. P., M. B. Berkmen, et al. (2006). "rRNA Promoter Regulation by Nonoptimal Binding of sigma Region 1.2: An Additional Recognition Element for RNA Polymerase." Cell **125**(6): 1069-82.
- Haugen, S. P., W. Ross, et al. (2008). "Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA." Nat Rev Microbiol **6**(7): 507-19.
- Heinemann, M. and R. Wagner (1997). "Guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase." Eur. J. Biochem. **247**: 990-999.
- Helmann, J. D. and P. L. deHaseth (1999). "Protein-nucleic acid interactions during open complex formation investigated by systematic alteration of protein and DNA binding partners." Biochemistry **38**: 5959-5967.
- Hermann, H., P. Fabrizio, et al. (1995). "snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions." Embo J **14**(9): 2076-88.

- Hernandez, J. V. and H. Bremer (1990). "Guanosine tetraphosphate (ppGpp) dependence of the growth rate control of *rrnB* P1 promoter activity in *Escherichia coli*." The Journal of Biological Chemistry **265**: 11605-11614.
- Hillebrand, A., R. Wurm, et al. (2005). "The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies." Biol. Chem. **386**: 523-534.
- Hindley, J. (1967). "Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting." J Mol Biol **30**(1): 125-36.
- Hopkins, J. F., S. Panja, et al. (2009). "Effect of salt and RNA structure on annealing and strand displacement by Hfq." Nucleic Acids Res **37**(18): 6205-13.
- Hsu, L. M., J. Zagorski, et al. (1985). "*Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit." J Bacteriol **161**(3): 1162-70.
- Igarashi, K. and I. 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.
- Imamura, S., M. Asayama, et al. (2003). "Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria." FEBS Lett **554**(3): 357-62.
- Irnov, I., C. M. Sharma, et al. (2010). "Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*." Nucleic Acids Res **38**(19): 6637-6651.
- Ishihama, A. (1997). Promoter selectivity control of RNA polymerase. Nucleic Acids and Molecular Biology. D. M. J. Eckstein. F and Lilley. Berlin Heidelberg, Springer Verlag. **11**: 53-70.
- Izutsu, K., A. Wada, et al. (2001). "Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp." Genes to Cell **6**: 665-676.
- Jeanguenin, L., A. Lara-Nunez, et al. (2010). "Moonlighting glutamate formiminotransferases can functionally replace 5-formyltetrahydrofolate cycloligase." J Biol Chem **285**(53): 41557-66.
- Jensen, K. F., U. Houlberg, et al. (1979). "Thin-layer chromatographic methods to isolate ³²P-labeled 5-phosphoribosyl-alpha-1-pyrophosphate (PRPP): determination of cellular PRPP pools and assay of PRPP synthetase activity." Anal Biochem **98**(2): 254-63.
- Jeon, Y. H., T. Yamazaki, et al. (1997). "Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain." Journal of Molecular Biology **267**: 953-962.
- Jiang, M., S. M. Sullivan, et al. (2007). "G-protein control of the ribosome-associated stress response protein SpoT." J Bacteriol **189**(17): 6140-7.

- Joung, J. K., L. U. Le, et al. (1993). "Synergistic Activation of Transcription by Escherichia-Coli cAMP Receptor Protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**: 3083-3087.
- Kabata, H., O. Kurosawa, et al. (1993). "Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA." Science **262**: 1561-1563.
- Kaczanowska, M. and M. Ryden-Aulin (2007). "Ribosome Biogenesis and the Translation Process in Escherichia coli." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 477-94.
- Kajitani, M. and A. Ishihama (1991). "Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q beta." Nucleic Acids Res **19**(5): 1063-6.
- Kajitani, M., A. Kato, et al. (1994). "Regulation of the Escherichia coli hfq gene encoding the host factor for phage Q beta." J Bacteriol **176**(2): 531-4.
- Kim, E. Y., M. S. Shin, et al. (2004). "Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*." J Microbiol **42**(2): 103-10.
- Kim, K. S. and Y. Lee (2004). "Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases." Nucleic Acids Res **32**(20): 6057-68.
- Kim, Y. and T. K. Wood (2009). "Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun.
- Kim, Y. and T. K. Wood (2010). "Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun **391**(1): 209-13.
- Klocko, A. D. and K. M. Wassarman (2009). "6S RNA binding to Esigma(70) requires a positively charged surface of sigma(70) region 4.2." Mol Microbiol **73**(2): 152-64.
- Kolmsee, T. (2005). Welche Rolle spielen die Startnukleotide für den Mechanismus der Transkriptionsregulation unter den Bedingungen der Stringenten Kontrolle. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität. -: -.
- Korzheva, N., A. Mustaev, et al. (2000). "A structural model of transcription elongation." Science **289**: 619-625.
- Kusano, S., Q. Ding, et al. (1996). "Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E σ^{70} and E σ^{38} holoenzymes." Journal of Biological Chemistry **271**: 1989-2004.
- Landick, R. (2005). "NTP-entry routes in multi-subunit RNA polymerases." Trends Biochem Sci **30**(12): 651-4.
- Langert, W., M. Meuthen, et al. (1991). "Functional characteristics of the *rrnD* promoters of *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **266**: 21608-21615.
- Le Derout, J., M. Folichon, et al. (2003). "Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of Escherichia coli rpsO mRNAs." Nucleic Acids Res **31**(14): 4017-23.

- Lease, R. A. and M. Belfort (2001). "Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy." Molecular Microbiology **38**: 667-672.
- Lee, C. A., M. J. Fournier, et al. (1985). "Escherichia coli 6S RNA is not essential for growth or protein secretion." J Bacteriol **161**(3): 1156-61.
- Lee, S., C. Ahn, et al. (2002). "Biochemical characterization of oligomerization of Escherichia coli GTP cyclohydrolase I." J Biochem Mol Biol **35**(3): 255-61.
- Lee, S. Y., S. C. Bailey, et al. (1978). "Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA." J Bacteriol **133**(2): 1015-23.
- 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.
- Lisser, S. and H. Margalit (1993). "Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences." Nucleic Acids Research **21**: 1507-1516.
- Liu, M. Y., G. Gui, et al. (1997). "The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*." J Biol Chem **272**(28): 17502-10.
- Luirink, J., S. High, et al. (1992). "Signal-sequence recognition by an *Escherichia coli* ribonucleoprotein complex." Nature **359**(6397): 741-3.
- Majdalani, N., C. Cuning, et al. (1998). "DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12462-7.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Mariner, P. D., R. D. Walters, et al. (2008). "Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock." Mol Cell **29**(4): 499-509.
- Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer (2009). "Invasive DNA, chopped and in the CRISPR." Structure **17**(6): 786-8.
- Martin, F. H. and I. J. Tinoco (1980). "DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription." Nucleic Acids Research **8**: 2295-2299.
- Mikulecky, P. J., M. K. Kaw, et al. (2004). "Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1206-14.
- Minakhin, L., S. Bhagat, et al. (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 U S A **98**(3): 892-7.

- Miranda, G., D. Schuppli, et al. (1997). "Recognition of bacteriophage Qbeta plus strand RNA as a template by Qbeta replicase: role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor." J Mol Biol **267**(5): 1089-103.
- Mitchell, J. E., D. Zheng, et al. (2003). "Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **31**(16): 4689-95.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, et al. (2009). "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system." Microbiology **155**(Pt 3): 733-40.
- Moll, I., T. Afonyushkin, et al. (2003). "Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs." Rna **9**(11): 1308-14.
- Mortimer, S. A. and K. M. Weeks (2008). "Time-resolved RNA SHAPE chemistry." J Am Chem Soc **130**(48): 16178-80.
- Muffler, A., D. Fischer, et al. (1996). "The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in *Escherichia coli*." Genes Dev **10**(9): 1143-51.
- Murakami, K. S., S. Masuda, et al. (2002). "Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex." Science **296**: 12185-1290.
- Murray, H. D., D. A. Schneider, et al. (2003). "Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant." Molecular Cell **12**: 125-134.
- Nair, U., J. L. Ditty, et al. (2002). "Roles for sigma factors in global circadian regulation of the cyanobacterial genome." J Bacteriol **184**(13): 3530-8.
- Narberhaus, F., T. Waldminghaus, et al. (2006). "RNA thermometers." FEMS Microbiol Rev **30**(1): 3-16.
- Negishi, T., N. Fujita, et al. (1995). "Structural map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage." Journal of Molecular Biology **248**: 723-728.
- Nègre, D., C. Bonod-Bidaud, et al. (1997). "DNA flexibility of the UP elements is a major determinant for transcriptional activation at the *Escherichia coli* acetate promoter." Nucleic Acids Research **25**: 713-718.
- Neußer, T. (2008). Untersuchungen zur Expression, Stabilität und Funktion der regulatorischen 6S RNA von *E. coli*. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Neußer, T., N. Gildehaus, et al. (2008). "Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators important for stress and growth adaptation." Biol Chem **389**(3): 285-97.
- Neußer, T., T. Polen, et al. (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**: 165-178.

- Noeske, J., C. Richter, et al. (2005). "An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1372-7.
- Nudler, E. and A. S. Mironov (2004). "The riboswitch control of bacterial metabolism." Trends Biochem Sci **29**(1): 11-7.
- Panek, J., L. Krasny, et al. (2010). "The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures." Nucleic Acids Res **39**(8): 3418-26.
- Papenfert, K., M. Bouvier, et al. (2010). "Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20435-40.
- Paul, B. J., M. M. Barker, et al. (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.
- Paul, B. J., M. B. Berkmen, et al. (2005). "DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7823-8.
- Peters, J. E., T. E. Thate, et al. (2003). "Definition of the Escherichia coli MC4100 genome by use of a DNA array." J Bacteriol **185**(6): 2017-21.
- Platis, A. (2010). Isolierung einer omega-Untereinheiten-defizienten RNA-Polymerase aus Escherichia coli und Charakterisierung dieses Enzyms unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Platt, T. (1994). "Rho and RNA: models for recognition and response." Molecular Microbiology **11**: 983-990.
- Polen, T. and V. F. Wendisch (2004). "Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays." Appl Biochem Biotechnol **118**(1-3): 215-32.
- Pul, Ü. and R. Wagner (2007). "DNA-binding proteins: nucleoid associated proteins in microorganisms." BioSpektrum **13**(5): 495-497.
- Pul, U., R. Wurm, et al. (2010). "Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS." Mol Microbiol **75**(6): 1495-1512.
- Ravcheev, D. A., M. S. Gel'fand, et al. (2002). "[Purine regulon of gamma-proteobacteria: a detailed description]." Genetika **38**(9): 1203-14.
- Record, M. T., W. S. Reznikoff, et al. (1996). Escherichia coli RNA polymerase (E σ^{70}), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. Washington, D. C., ASM Press.

- Richter, D., S. Fehr, et al. (1979). "The guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp) cycle. Comparison of synthesis and degradation of guanosine 3',5'-bis(diphosphate) in various bacterial systems." Eur. J. biochem. **99**: 57-64.
- Ritchie, M. E., J. Silver, et al. (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." Bioinformatics **23**(20): 2700-7.
- 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.
- Saecker, R. M., O. V. Tsodikov, et al. (2002). "Kinetic studies and structural models of the association of E. coli sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates." J Mol Biol **319**(3): 649-71.
- Sarubbi, E., K. E. Rudd, et al. (1988). "Basal ppGpp level adjustment shown by new *spoT* mutants affect steady state growth rates and *rrnA* ribosomal promoter regulation in *Escherichia coli*." Mol. Gen. Genet. **213**: 214-222.
- Sarubbi, E., K. E. Rudd, et al. (1989). "Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*." J Biol Chem **264**(25): 15074-82.
- Schäferkordt, J. and R. Wagner (2001). "Effects of base change mutations within an *Escherichia coli* ribosomal RNA leader region on rRNA maturation and ribosome formation." Nucleic Acids Res. **29**: 3394-3403.
- Schmitz, A. and D. Riesner (2006). "Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000." Anal Biochem **354**(2): 311-3.
- Schneider, D. A., T. Gaal, et al. (2002). "NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8602-7.
- Schneider, S. (2011). Einfluss der Konzentration des Effektormoleküls ppGpp auf die Expression der 6S RNA von *Escherichia coli*. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Schoengraf, P. (2008). Einfluss des Transkriptionsfaktors DksA auf stringent und nicht stringent regulierte Promotoren. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Schyns, G., L. Jia, et al. (1998). "Promoter recognition by a cyanobacterial RNA polymerase: in vitro studies with the *Calothrix* sp. PCC 7601 transcriptional factors RcaA and RcaD." Plant Mol Biol **36**(5): 649-59.
- Senear, A. W. and J. A. Steitz (1976). "Site-specific interaction of Qbeta host factor and ribosomal protein S1 with Qbeta and R17 bacteriophage RNAs." J Biol Chem **251**(7): 1902-12.
- Seraphin, B. (1995). "Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs." Embo J **14**(9): 2089-98.

- Severinova, E., K. Severinov, et al. (1996). "Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit." Journal of Molecular Biology **263**: 637-647.
- Shalon, D., S. J. Smith, et al. (1996). "A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization." Genome Res **6**(7): 639-45.
- Sharma, C. M., S. Hoffmann, et al. (2010). "The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*." Nature **464**(7286): 250-5.
- Shephard, L., N. Dobson, et al. (2010). "Binding and release of the 6S transcriptional control RNA." Rna **16**(5): 885-92.
- Sledjeski, D. D., C. Whitman, et al. (2001). "Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA." J Bacteriol **183**(6): 1997-2005.
- Stern, S., D. Moazed, et al. (1988). "Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension." Methods Enzymol. **164**: 481-489.
- Steuten, B. (2009). Klonierung und funktionelle Analyse von Plasmiden zur Expression und Mutagenese der 6S RNA aus *Escherichia coli*. Institut für Physikalische Biologie. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.
- Storz, G. (2002). "An expanding universe of noncoding RNAs." Science **296**: 1260-1263.
- Storz, G., S. Altuvia, et al. (2005). "An Abundance of RNA Regulators." Annu Rev Biochem **74**: 199-217.
- Sukhodolets, M. V. and S. Garges (2003). "Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq." Biochemistry **42**(26): 8022-34.
- Sun, X. and R. M. Wartell (2006). "*Escherichia coli* Hfq binds A18 and DsrA domain II with similar 2:1 Hfq6/RNA stoichiometry using different surface sites." Biochemistry **45**(15): 4875-87.
- Sun, X., I. Zhulin, et al. (2002). "Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq." Nucleic Acids Res **30**(17): 3662-71.
- Suzuki, Y. and G. M. Brown (1974). "The biosynthesis of folic acid. XII. Purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase." J Biol Chem **249**(8): 2405-10.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2004). "6S RNA function enhances long-term cell survival." J Bacteriol **186**(15): 4978-85.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2005). "A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription." Nature Structural Biol. **12**: 313-319.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2006). "6S RNA Regulation of *pspF* Transcription Leads to Altered Cell Survival at High pH." J Bacteriol **188**(11): 3936-43.

- Updegrove, T. B., J. J. Correia, et al. (2011). "The stoichiometry of the Escherichia coli Hfq protein bound to RNA." Rna **17**(3): 489-500.
- Updegrove, T. B., J. J. Correia, et al. (2010). "E. coli DNA associated with isolated Hfq interacts with Hfq's distal surface and C-terminal domain." Biochim Biophys Acta **1799**(8): 588-96.
- Valentin-Hansen, P., M. Eriksen, et al. (2004). "The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions." Mol Microbiol **51**(6): 1525-33.
- Vassilieva, I. M., M. V. Rouzanov, et al. (2002). "Cloning, purification, and crystallization of a bacterial gene expression regulator--Hfq protein from Escherichia coli." Biochemistry (Mosc) **67**(11): 1293-7.
- Vassilieva Iu, M. and M. B. Garber (2002). "[The regulatory role of the Hfq protein in bacterial cells]." Mol Biol (Mosk) **36**(6): 970-7.
- Vassylyev, D. G., S. I. Sekine, et al. (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." Nature **417**: 712-719.
- Vogel, J., I. M. Axmann, et al. (2003). "Experimental and computational analysis of transcriptional start sites in the cyanobacterium Prochlorococcus MED4." Nucleic Acids Res **31**(11): 2890-9.
- Vrentas, C. E., T. Gaal, et al. (2005). "Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the ω subunit and relief of this requirement by DksA." Genes & Development **19**: 2378-2387.
- Vytvytska, O., J. S. Jakobsen, et al. (1998). "Host factor I, Hfq, binds to Escherichia coli ompA mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14118-23.
- Vytvytska, O., I. Moll, et al. (2000). "Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding." Genes Dev **14**(9): 1109-18.
- Wagner, R. (2000). Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford, Oxford University Press.
- Wagner, R. (2001). Translational components in prokaryotes: genetics and regulation. Encyclopedia of Life Sciences. N. P. Group. London, Macmillan Publishers Ltd.: 1-8.
- Wagner, R. (2010). ppGpp Signalling. Weinheim, Wiley-VCH Verlag.
- Wassarman, K. M. and R. M. Saecker (2006). "Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase." Science **314**(5805): 1601-3.
- Wassarman, K. M. and G. Storz (2000). "6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity." Cell **101**: 613-623.
- Watanabe, T., M. Sugiura, et al. (1997). "A novel small stable RNA, 6Sa RNA, from the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC6301." FEBS Lett **416**(3): 302-6.

- Wendrich, T. M., G. Blaha, et al. (2002). "Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA." Mol Cell **10**(4): 779-88.
- Wilkinson, K. A., S. M. Vasa, et al. (2009). "Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA." Rna **15**(7): 1314-21.
- Will, C. L. and R. Luhrmann (2001). "Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 290-301.
- Willkomm, D. K., J. Minnerup, et al. (2005). "Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog." Nucleic Acids Res **33**(6): 1949-60.
- Windbichler, N., F. von Pelchrzim, et al. (2008). "Isolation of small RNA-binding proteins from *E. coli*: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase." RNA Biol **5**(1): 30-40.
- Wurm, R., T. Neußer, et al. (2010). "6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products." Biol. Chem. **39**: 187-196.
- Yakovchuk, P., J. A. Goodrich, et al. (2009). "B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5569-74.
- Yamagishi, M., H. Matsushima, et al. (1993). "Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* Gene Encoding the Ribosome Modulation Factor - Growth Phase-Dependent and Growth Rate-Dependent Control." EMBO Journal **12**: 625-630.
- Yates, J. L. and M. Nomura (1981). "Feedback regulation of ribosomal protein synthesis in *E. coli*: localization of the mRNA target sites for repressor action of ribosomal protein L1." Cell **24**(1): 243-9.
- Yoshida, H., Y. Maki, et al. (2002). "The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*." J Biochem (Tokyo) **132**(6): 983-9.
- Zacharias, M., H. U. Göringer, et al. (1989). "Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and *tac* promoter on growth rate control and stringent sensitivity." EMBO J. **11**: 3357-3363.
- Zacharias, M., G. Theissen, et al. (1991). "Analysis of sequence elements important for the synthesis and control of ribosomal RNA in *E. coli*." Biochimie **73**(6): 699-712.
- Zhang, A., S. Altuvia, et al. (1998). "The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein." Embo J **17**(20): 6061-8.
- Zhang, A., K. M. Wassarman, et al. (2002). "The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs." Mol Cell **9**(1): 11-22.

9 Veröffentlichungen

Mit Bezug zur vorliegenden Arbeit:

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**: 165-178.

Geißen, R., B. Steuten, T. Polen and R. Wagner (2010). "E. coli 6SRNA: a universal transcriptional regulator within the centre of growth adaptation." *RNA Biology* 7(5).

R. Geißen and A. Rediger, R. Wagner, I. M. Axmann. "6S RNA – an old issue became blue-green" (In Vorbereitung).

Ohne direkten Bezug zur vorliegenden Arbeit:

Pul, U., R. Wurm, Z. Arslan, R. Geissen, N. Hofmann and R. Wagner (2010). "Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS." *Mol Microbiol* 75(6): 1495-1512.

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

Düsseldorf, Mai 2011