

**Transkriptionsfaktor- und wachstumsabhängige Regulation
der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons
in *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Annette Hillebrand
aus Solingen

Düsseldorf 2001

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

Referent:	Prof. Dr. R. Wagner
Koreferent:	Prof. Dr. J. H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung:	05. Dezember 2001
-----------------------------	-------------------

für Ralf, Moritz und Tim

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von April 1998 bis Juni 2001.

Danksagung

Mein Dank gilt...

Herrn Prof. Rolf Wagner für die wissenschaftliche Betreuung und seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit;

allen Mitgliedern des Wagner Labors und der Arbeitsgruppe Riesner für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und Unterstützung;

den „Ehemaligen“ der AG Wagner, Dr. Henning Afflerbach und Dr. Oliver Schröder für eine sehr humorvolle und angenehme Zeit;

Herrn Dr. Oliver Zirwes, Herrn Dipl.-Biol. Lars Jöres und Herrn Dipl.-Biol. Marc Meißner für die freundliche und umgehende Unterstützung bei aufgetretenen Rechner-tücken;

Frau Dipl.-Biol. Bianca Komp und Herrn Dipl.-Biol. Marc Meißner für das geduldige Korrekturlesen;

Frau Dipl.-Biol. Sandra Klümper für die ausserordentlich freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit bezüglich der Verantwortung für das Isotopenlabor;

Frau Dipl.-Biol. Nadine Kolonko für jedes erfrischende Lachen zur rechten Zeit;

Frau Greschkowitz und Frau Beckmann für ihre Hilfe im Laboralltag;

der Rechnergruppe für spontane und unkomplizierte Einsatzbereitschaft;

allen, die mich während der gesamten Zeit durch ihre Freundschaft, ihr Verständnis und ihre Hilfe unterstützt haben.

Meinen drei Männern Ralf, Moritz und Tim danke ich für ihre Geduld, ihre Bereitschaft für manche Entbehrung und ihr stetiges Bemühen, diese Arbeit zu ermöglichen und mein Leben außerhalb des Labors spannend und lebenswert zu gestalten.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1 EINLEITUNG

1.1	<i>Escherichia coli</i> und die Anpassung von Bakterien an wechselnde Umweltbedingungen	1
1.2	Genexpression und Regulationsmechanismen	1
1.3	Die Redundanz ribosomaler RNA-Operons in Prokaryonten	4
1.3.1	Die Lage der rRNA-Operons auf dem <i>E. coli</i> Genom	4
1.3.2	Struktur und Aufbau der ribosomalen RNA-Operons	5
1.3.3	Strukturelemente der rRNA-Promotoren	7
1.4	Regulationsmechanismen der ribosomalen RNA-Operons	8
1.4.1	Das Effektormolekül ppGpp und die stringente Kontrolle	9
1.4.2	Die faktorunabhängige Transkriptionsregulation	10
1.4.2.1	Das UP-Element	10
1.4.2.2	DNA-Struktur und Transkriptionsregulation	11
1.4.3	Die faktorabhängige Transkriptionsregulation	13
1.4.3.1	Die Histon-ähnlichen Proteine	13
1.4.3.2	Der Transkriptionsaktivator FIS - ' <i>factor of inversion stimulation</i> '	14
1.4.3.3	H-NS als Repressor der Transkription ribosomaler rRNA-Operons	16
1.4.3.4	StpA - ein molekulares <i>Backup</i> -System für H-NS	19
1.5	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	20

2 ERGEBNISSE

2.1	Die Klonierung der regulatorischen UAS-Fragmente der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons von <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1	Klonierung des UAS-Promotorfragmentes des <i>E. coli</i> <i>rrnE</i> -Operons	21
2.2	<i>In vitro</i> Analysen der sieben verschiedenen UAS-Regionen der ribosomalen RNA-Operons	23
2.2.1	Vergleichende K-Wert-Bestimmungen aller sieben Promotorfragmente	23
2.2.2	Berechnung von DNA-Krümmung mit dem Computerprogramm <i>DIAMOD</i>	25
2.2.3	Gelverzögerungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung aller UAS Fragmente mit den Transkriptionsfaktoren H-NS und FIS	29
2.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Bestimmung der Transkriptionsraten des Chloramphenicolacetyltransferasegens unter Kontrolle der ribosomalen P1-Promotoren	37
2.3.1	Immunologische Analyse der Wildtyp- und Mutantenstämme	38
2.3.2	Plasmidkopienzahlbestimmung aller pH ₂ D Plasmide in den analysierten <i>E. coli</i> Stämmen	40

2.3.3	Einstellung äquivalenter Wachstumsraten der acht untersuchten <i>E. coli</i> Stämme	41
2.3.4	Isolation von Gesamt-RNA bei unterschiedlichen Wachstumsraten	42
2.3.5	Rifampicinkinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit der P1- <i>cat</i> -Fusionstranskripte	42
2.4	Primer Extension-Analysen zur Untersuchung der Transkriptionsraten in Wildtyp- und Mutantenstämmen	44
2.5	Quantifizierung der Primer Extension-Produkte	46
2.6	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen	46
2.6.1	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen in allen getesteten Wildtypstämmen	46
2.6.2	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen im Wildtyp MC4100 und in der <i>hns</i> ⁽⁻⁾ -Mutante PD32	47
2.6.3	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen im Wildtyp BSN26 und in der <i>hns</i> ⁽⁻⁾ <i>stpA</i> ⁽⁻⁾ -Mutante BSN29	52
2.6.4	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen im Wildtyp CSH50 und in der <i>fis</i> ⁽⁻⁾ -Mutante CSH50 <i>fis::kan</i>	53
2.6.5	Die Transkription der P1- <i>cat</i> -Fusionen im Wildtyp C600 und in der <i>fis</i> ⁽⁻⁾ <i>hns</i> ⁽⁻⁾ -Mutante C600 <i>fis::kan hns::tet</i>	60
2.7	Zusammenfassende Bemerkungen	63

3 DISKUSSION

3.1	Die differentielle Expression der ribosomalen Transkriptionseinheiten von <i>Escherichia coli</i>	65
3.1.1	Die Korrelation zwischen intrinsischer Krümmung, Transkriptionsfaktorbindung und Transkriptionsregulation	66
3.1.2	Die Bildung von Operon-Gruppierungen	68
3.1.3	Die P1-abhängige Transkription nach einem 'nutritional upshift'	71
3.2	Konsens und Diskrepanz zu bekannten Daten	71
3.3	Repetitive Gene- eine Frage der Quantität oder Qualität?	74
3.4	Eine mögliche Bedeutung redundanter rRNA-Operons für den prokaryontischen Organismus	76

4 MATERIAL

4.1	Allgemeines	79
4.2	Bakterienstämmen und Plasmide	79
4.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	79
4.2.2	Plasmide	80
4.3	Nukleinsäuren, Nukleotide und Desoxynukleotide	81
4.4	Proteine	82
4.4.1	Enzyme und Transkriptionsfaktoren	82
4.4.2	Restriktionsenzyme	82
4.4.3	Sonstige Proteine	83
4.4.4	Antikörper	83

4.5	Puffer und Medien	83
4.6	Feinchemikalien	85
4.7	Verschiedenes	86

5 METHODEN

5.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden	87
5.1.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten	87
5.1.2	Haltung und Aufbewahrung von Zellstämmen	87
5.1.3	Anzucht von <i>E. coli</i> Flüssigkulturen	87
5.1.3.1	Über Nacht-Kulturen	87
5.1.3.2	Anzucht von Bakterien in diversen Flüssigmedien	88
5.1.3.3	Erstellung von Wachstumskurven und Berechnung von Wachstumsraten	88
5.1.4	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	89
5.1.5	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	89
5.1.6	Alternative Methode zur Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation	90
5.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	90
5.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	91
5.2.2	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	91
5.2.3	Dialyse	92
5.2.3.1	Dialyse von DNA-Lösungen im Dialyseschlauch	92
5.2.3.2	Mikrotropfendialyse	92
5.2.4	Isolation von Nukleinsäuren	92
5.2.4.1	Plasmid isolation im präparativen Maßstab - 'Maxipräp'	92
5.2.4.2	Plasmid isolation im analytischen Maßstab - 'Minipräp'	93
5.2.4.3	Isolation chromosomaler <i>E. coli</i> DNA	94
5.2.4.4	Isolation von <i>E. coli</i> Gesamt-RNA	95
5.2.5	Isolation von <i>E. coli</i> Gesamtprotein	95
5.2.6	UV/VIS-Spektroskopie	96
5.2.6.1	Streumessung	96
5.2.6.2	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren und Nukleotiden	96
5.2.6.3	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	98
5.2.7	Enzymatische Reaktionen	98
5.2.7.1	Restriktionshydrolysen	98
5.2.7.2	Ligation von DNA-Fragmenten	98
5.2.7.3	Radioaktive 5'-Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide	99
5.2.7.4	Radioaktive 5'-Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden über die Klenow Reaktion	99
5.2.8	Gelelektrophorese	100
5.2.8.1	Agarosegelelektrophorese	100
5.2.8.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen	101

5.2.8.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen	101
5.2.8.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	102
5.2.8.5	Standard-Retardierungsgelelektrophorese	103
5.2.9	Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen	104
5.2.9.1	Silberfärbung von Nukleinsäuren	104
5.2.9.2	Coomassiefärbung von Proteinen	105
5.2.9.3	Silberfärbung von Proteinen	105
5.2.9.4	Elektrotransfer von Proteinen für den Immunonachweis (Westernblot)	106
5.2.9.5	Immunonachweis von Proteinen	107
5.2.9.6	Autoradiographie	108
5.2.10	Densitometrie	108
5.2.11	Radioaktivitätsmessung	108
5.2.12	Präparative DNA-Gelelution	108
5.3	Spezielle Methoden	109
5.3.1	Polymerasekettenreaktion	109
5.3.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA	111
5.3.3	Konformationsanalysen von DNA-Restriktionsfragmenten	112
5.3.3.1	K-Wert-Berechnungen	112
5.3.3.2	Berechnung von DNA-Krümmung mit dem Computerprogramm <i>DIAMOD</i>	113
5.3.4	Vergleich der Plasmidkopienzahl in verschiedenen Wirtsstämmen	114
5.3.5	Primer Extension-Analyse	114
5.3.6	Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit von mRNA	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	135
8	ANHANG	
8.1	Sequenzen der sieben analysierten <i>rrn</i> -Fragmente (<i>Eco</i> RI / <i>Pst</i> I-Restriktionsfragmente)	139
8.2	Wachstumsparameter für äquivalente Wachstumsraten	140
8.3	Gesamt-RNA-Ausbeuten bei verschiedenen Wachstumsraten	141
8.4	Quantifizierungsdaten zur Auswertung der Primer Extension-Analysen	142
8.4.1	Hohe Wachstumsraten	142
8.4.2	Niedrige Wachstumsraten	147
8.5	Mittelwertbestimmungen der Quantifizierungen der PE-Wiederholungen mit dem Programm <i>Origin</i>	152
8.6	Expression der P1- <i>cat</i> -Fusionstranskripte in diversen Wildtypen	157

ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese ribosomaler RNAs (rRNAs) in Prokaryonten determiniert die Proteinsynthesekapazität der Zelle und nimmt daher eine Schlüsselfunktion bakteriellen Wachstums ein. Die Synthese der rRNAs unterliegt einem komplexen regulatorischen Netzwerk aus stringenter Kontrolle, Wachstumsratenregulation, faktorabhängiger und faktorunabhängiger Regulation. In *Escherichia coli* sind sieben individuelle Operons (*rrnA* bis *rrnH*) für die Expression von rRNAs verantwortlich. Diese unterscheiden sich erheblich in den regulatorischen *upstream* Regionen.

Die vorliegende Arbeit sollte anhand vergleichender *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Klärung der Frage nach möglicher differentieller Regulation der sieben Operons beitragen. *In vitro* wurden experimentelle und theoretische Konformationsanalysen durchgeführt. Wechselwirkungen von *upstream*-DNA-Fragmenten mit Transkriptionsfaktoren wurden über Gelverzögerungsexperimente untersucht und mit den Resultaten der Konformationsanalysen verglichen.

Die *in vitro* Daten lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Die sieben rRNA-Operons weisen eine intrinsische Krümmung (*curvature*) der UAS-Region in differentiellem Ausmaß auf. Dies konnte experimentell nach der Bestimmung der K-Werte sowie über Strukturvorhersagen anhand der Sequenz ermittelt werden. Die Konformationsanalysen ergaben folgende Reihung nach Krümmung:
$$rrnB \geq rrnD > rrnG > rrnC > rrnH > rrnA \geq rrnE$$
- Alle sieben UAS-Regionen binden den Transkriptionsaktivator FIS und den antagonistisch wirkenden Repressor H-NS. Anhand der Verzögerungsgele können den einzelnen UAS-Regionen 2 (*rrnE*), 3 (*rrnB*, *C*, *G*, *H*) oder 4 (*rrnA*, *D*) FIS-Bindepositionen zugeordnet werden. Alle UAS-Fragmente zeigen einen zumeist stark verzögerten H-NS-Komplex. Abweichungen zeigen das *rrnA*-Fragment mit zwei retardierten Komplexen, das *rrnD*-Fragment mit einem sehr schwachen Komplex hoher Mobilität sowie das *rrnE*-Fragment mit einem schwächeren Komplex.
- H-NS bindet bevorzugt an intrinsisch gekrümmte DNA, eine direkte Korrelation zwischen Krümmungsausmaß und Intensität der H-NS-Bindung kann nicht generell festgestellt werden.

Zur Bestimmung der Transkriptionsraten der ribosomalen P1-Promotoren *in vivo* wurden Fusionstranskripte aller sieben Promotoren mit dem Reportergen für die Chloramphenicolacetyltransferase über Primer Extension-Analysen quantifiziert. Die Untersuchungen wurden bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und in verschiedenen Stammhintergründen (Transkriptionsfaktormutanten) durchgeführt und zeigen zusammengefasst folgende Resultate:

- Alle sieben Operons werden wachstumsratenabhängig differentiell über die P1-Promotoren durch die Transkriptionsfaktoren FIS aktiviert und durch H-NS und StpA reprimiert.
- StpA wirkt als molekulares *Backup*-System für H-NS bei hohen Wachstumsraten.
- Der P1-Promotor allein gewährleistet nicht die erwarteten hohen Transkriptionsraten nach einem 'upshift'.
- Verschiedene 'Wildtyp' Laborstämme mit identischer Ausstattung der für Regulation von rRNA bekannten Gene zeigen nicht zwangsläufig die gleichen rRNA-Regulationseigenschaften.

Eine einfache Korrelation zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten ist nicht direkt ersichtlich. Die Genredundanz der ribosomalen Operons ist die Grundlage einer differentiellen Regulation einzelner Transkriptionseinheiten. Die Ergebnisse weisen allerdings auf eine größere Komplexität der Regulation hin, als bisher angenommen.

1 EINLEITUNG

1.1 *Escherichia coli* und die Anpassung von Bakterien an wechselnde Umweltbedingungen

Das stäbchenförmige Enterobakterium *Escherichia coli* ist seit vielen Jahrzehnten ein Modellorganismus der Molekularbiologie. Grundlegende Mechanismen konnten zunächst an diesem Prokaryonten aufgeklärt werden. 1997 wurde die komplette *Escherichia coli* K-12 Genomsequenz publiziert (Blattner *et al.*, 1997). Die K-12 Stämme gehören zu den nicht pathogenen Arten, denen im Gegensatz zu den virulenten oder pathogenen Stämmen (EHEC = enterohämorrhagische *E. colis*) wichtige Virulenzgene fehlen (Groisman & Ochman, 1994).

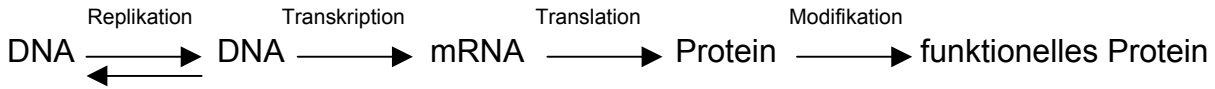
Escherichia coli unterliegt in seinen natürlichen Habitaten einem ständigen Wechsel des Nährstoffangebotes sowie verschiedensten Stresssituationen wie Temperaturschwankungen, wechselnde osmotische Bedingungen und extreme pH-Änderungen. Bakterien sind durch regulatorische Netzwerke der Genexpression hervorragend an Veränderungen der Wachstumsbedingungen adaptiert. Die unverzügliche Anpassung der Wachstumsgeschwindigkeit an das jeweilige Habitat ist Grundlage der Adaptation.

Die Wachstumsrate, definiert als Verdopplungen pro Stunde, ist direkt abhängig von der Proteinsynthesekapazität des Bakteriums. Diese wird durch die Zahl der Ribosomen in einer Zelle bestimmt. Die Kapazität der Proteinsynthese eines Ribosoms ist maximal auf 15-20 Aminosäuren je Sekunde limitiert. Schnelles Wachstum geht einher mit einer hohen Anzahl von Ribosomen, die in Phasen optimaler Wachstumsparameter bis zu 70.000 je Zelle betragen kann (Gourse *et al.*, 1996). Die Synthese der Ribosomen gehört jedoch zu den energieaufwendigsten Zellreaktionen und erfordert eine optimale Anpassung an die Wachstumsrate. Diese wird über die Synthese der ribosomalen RNAs gewährleistet, welche proportional zum Quadrat der Wachstumsrate steigt (Maaloe *et al.*, 1966; Gausing *et al.*, 1977). Die Verfügbarkeit ribosomaler RNAs reguliert die Synthese der ribosomalen Proteine über einen Translationsrückkopplungsmechanismus, wobei einzelne Proteine als Translationsrepressoren agieren, wenn ribosomale RNAs nicht in ausreichender Zahl zur Ribosomenbiogenese zur Verfügung stehen. Die Regulation der Expression der ribosomalen RNA-Operons stellt somit einen zentralen Punkt bakteriellen Wachstums dar, welches unmittelbar an die Proteinsynthesekapazität gekoppelt ist. Die Synthese der ribosomalen Komponenten wird durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Regelkreise kontrolliert. Grundlegende Mechanismen bakterieller Genexpression, von denen eine Vielzahl an der Regulation der Ribosomensynthese beteiligt sind, werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

1.2 Genexpression und Regulationsmechanismen

Francis H. C. Crick bezeichnete den Fluss der genetischen Information von der Nukleinsäure zum funktionellen Protein als das zentrale Dogma der Molekularbiologie.

Mit Ausnahme der Prionen hat diese Aussage für alle Organismen Bestand. Träger der genetischen Information sind die Nukleinsäuren, in der Regel Desoxyribonukleinsäuren, bei Retroviren und Viroiden bilden Ribonukleinsäuren das Genom. Der Weg vom Gen (DNA) zum Protein ist in nachfolgendem Schema skizziert.



Neben der Stabilität der einzelnen Zwischenprodukte, die ebenfalls zur Regulation beiträgt, greifen verschiedene Regulationsmechanismen auf allen Stufen obigen Schemas. Alle Prozesse der Genexpression unterliegen streng ökonomischen Gesichtspunkten, um eine unnötige Verschwendung zellulärer Ressourcen zu vermeiden. Als dem initialen Schritt ist der Transkription und ihrer effizienten Regulation eine besondere Bedeutung zuzumessen.

Daher wird die Regulation der Genexpression auf dieser Stufe relativ ausführlich dargestellt. Die nachfolgend beschriebenen Mechanismen beziehen sich in erster Linie auf regulatorische Prozesse in Prokaryonten, deren Transkriptionsregulation ribosomaler RNAs Thema dieser Arbeit ist.

Der erste Schritt möglicher Regulation erfolgt durch die Zugänglichkeit der Gene. Das zirkuläre Genom von *Escherichia coli* hat eine Länge von 4.6×10^6 Basenpaaren. Die Ausdehnung eines Basenpaares einer B-DNA-Helix beträgt 3.38 Å, das entspricht bei linearer Ausdehnung des gesamten Genoms einer Länge von 1.5 mm. *Escherichia coli* weist mit einer Länge von 2 µm und einem Durchmesser von etwa 0.75 µm (Schmid, 1990) Maße auf, die eine effiziente Kompaktierung des Genoms erfordern. Diese Aufgabe erfüllen unter anderem die analog zu den eukaryontischen Histonen benannten Histon-ähnlichen Proteine der Prokaryonten. Sie werden nachfolgend in Kapitel 1.4.3.1 beschrieben. Mit der Kondensation der DNA ist über die damit verbundene Zugänglichkeit für die RNA-Polymerase die Möglichkeit der Transkriptionsregulation verbunden. Die Histon-ähnlichen Proteine generell übernehmen hierbei Kontrollfunktionen, die Beteiligung der Proteine FIS und H-NS an der Transkriptionsregulation des ribosomalen RNA-Operons *rrnB* ist gezeigt worden (Gourse *et al.*, 1996; Afflerbach, 1998).

Der Weg vom Gen zur Boten-RNA, die Transkription, kann über vielfältige Mechanismen reguliert werden. Transkription beschreibt einen komplexen Vorgang, der wiederum in Initiation, Elongation und Termination unterteilt wird. In Prokaryonten erfolgt die Transkription aller Gene durch eine einzige RNA-Polymerase. Diese setzt sich aus 6 Untereinheiten ($2 \times \alpha$, β , β' , σ und ω) zusammen und hat ein Molekulargewicht von etwa 460 kDa. Das *core*-Enzym der RNA-Polymerase wird aus 2 α -Untereinheiten sowie der β -, β' und ω -Untereinheit gebildet. Das *core*-Enzym bildet mit der σ -Untereinheit das *Holoenzym*. Die Assemblierung des *Holoenzym*s folgt einer geordneten Reihenfolge, *Holoenzym*- und *core*-Enzym-Strukturen sind beschrieben (Finn *et al.*, 2000). Allen Untereinheiten werden spezielle Funktionen zuteil (Ishihama, 1992; Ross *et al.*, 1993; Murakami *et al.*, 1997; Wösten 1998; Mukherjee, 1999)). Die α -UE bindet unter anderem an regulatorische Sequenzen und tritt in

Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren. Die β -UE trägt zur Substratbindung (Ribonukleotide) bei und katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Die β' -UE erfüllt eine Funktion bei der DNA-Bindung. Die beiden größten Untereinheiten β und β' bilden zusammen das aktive Zentrum der RNA-Polymerase. Die Funktion der ω -Untereinheit ist noch nicht vollständig geklärt. *E. coli*-Stämme, die diese Untereinheit nicht synthetisieren können sind lebensfähig, zeigen aber einen langsamer wachsenden Phänotyp. Die ω -Untereinheit könnte zur Stabilisierung der RNA-Polymerase beitragen (Mukherjee *et al.*, 1999).

Die σ -UE ist für die Transkriptionsinitiation und die spezifische Promotorerkennung verantwortlich, darin liegt ihre regulatorische Funktion. In *E. coli* gibt es sieben alternative σ -Faktoren (Maeda *et al.*, 2000), die Promotoren mit spezifischen Sequenzen der -10- und -35-Region erkennen. Hierdurch wird eine Spezifität der RNA-Polymerase erzielt. Spezielle σ -Faktoren sind für die differentielle Transkription einzelner Gene verantwortlich. Der σ^{70} -Faktor, benannt nach seinem Molekulargewicht von etwa 70 kDa transkribiert die sogenannten Haushaltsgene, also Gene, die während des exponentiellen Wachstums exprimiert werden. Die Promotoren der ribosomalen RNA-Operons werden von σ^{70} transkribiert. σ^{38} oder auch σ^S ist Bestandteil der RNA-Polymerase, die speziell Gene transkribiert, deren Produkte während der stationären Phase benötigt werden. σ^{32} - oder σ^H -Holoenzym leistet die Transkription von Genen, die bei Hitzeschock exprimiert werden. Weiterhin gibt es noch σ^{24}/σ^E (extremer Hitzeschock), σ^{28}/σ^F (Flagellensynthese und Chemotaxis), σ^{54}/σ^N (Stickstoffmetabolismus) und $\sigma^{18}/\sigma^{FecI}$ (Eisencitrattransport). Die σ -Faktoren unterliegen selbst einer komplexen Regulation bezüglich Konzentration, Aktivität, Stabilität oder Inhibitoren. Hier wird die Vielfältigkeit der Regulation über alternative σ -Faktoren deutlich. Die Transkriptionskontrolle erfolgt weiterhin über spezielle Transkriptionsfaktoren. In dieser Arbeit wird später insbesondere auf den Aktivator FIS und den Repressor H-NS eingegangen.

Im letzten Schritt der Transkription, der Termination, sind über Terminationsfaktoren, Anti-Termination oder Attenuation (Henkin, 1996; Yarnell & Roberts, 1999; Yanofsky, 2000) ebenfalls regulatorische Abläufe möglich. Die mRNA selbst trägt durch Stabilität, Degradation durch RNasen oder Modifikation zur Regulation der Genexpression bei.

Der Ablauf der Übersetzung der mRNA in Proteine, die Translation, wird in Initiation, Elongation und Termination unterteilt und zeigt ebenfalls eine Vielzahl möglicher Regulationsvorgänge. Da bei Prokaryonten Transkription und Translation nicht wie bei Eukaryonten in unterschiedlichen Kompartimenten erfolgen (Nukleus und Cytosol), sondern unmittelbar miteinander verknüpft sind, ergeben sich Besonderheiten der Regulation. Auf die Mechanismen der Translationsregulation soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden. Die über Translation synthetisierten Proteine können durch Modifikationen Funktionalität erhalten, auch dieser Schritt beinhaltet Regulationsmöglichkeiten der Genexpression.

Die Produkte der Transkription ribosomaler RNA-Gene, die rRNAs, werden nicht translatiert, sondern sind als stabile RNAs Bausteine des bakteriellen Translationsapparates, der Ribosomen. Bakterielle Ribosomen setzen sich aus 3 Ribonuklein-

säuren (rRNAs) und 52 verschiedenen Proteinen (rProteine) angeordnet in einer großen (5S rRNA, 23S rRNA, 31 rProteine) und einer kleinen Untereinheit (16S rRNA, 21 rProteine) zusammen. Die Ribosomen erweisen sich in ihrer Funktion als Translationsapparat ebenfalls als Regulativ der Genexpression, nur über ihre Anzahl kann eine hohe Proteinsynthesekapazität geleistet werden (siehe 1.1). Die Ribosomensynthese erfolgt in Abhängigkeit der regulierten Transkription ribosomaler RNAs, wodurch letztere zu Recht die Beschreibung 'Motor bakteriellen Wachstums' verdienen. Die Transkriptionsregulation ribosomaler RNAs nimmt somit eine Schlüssel-funktion der prokaryontischen Genexpression ein.

1.3 Die Redundanz ribosomaler RNA-Operons in Prokaryonten

Escherichia coli besitzt sieben Operons, die für ribosomale RNAs kodieren. Die Redundanz ribosomaler Transkriptionseinheiten ist sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten zu beobachten. Die Anzahl der Operons ist unterschiedlich, jedoch für den jeweiligen Organismus konserviert. Während bei Eukaryonten bis zu mehreren hundert rRNA-Transkriptionseinheiten vorkommen (Long & David, 1980), variiert diese Anzahl in Bakterien von 1 bis 15 Kopien (Bott *et al.*, 1984; Hui & Dennis, 1985; La Fauci *et al.*, 1986; Schmidt, 1997). Es gibt seit kurzem eine Datenbank, *The Ribosomal RNA Operon Copy Number Database* (rrndb), die Informationen über die Anzahl und Heterogenitäten ribosomaler Operons bei Prokaryonten beinhaltet (Klappenbach *et al.*, 2001). So besitzt *Bacillus subtilis* 10, *Haemophilus influenzae* 6 oder *Vibrio cholerae* 8 ribosomale Operons. Genredundanz ist in prokaryontischen Genomen eher ungewöhnlich, es stellt sich die Frage nach der Ursache. Die Multiplizität der ribosomalen Operons könnte allein der Gewährleistung hoher Transkriptionsraten dienen. Andererseits trägt der Erreger der Malaria, *Plasmodium*, zwei Gene für 18S RNAs, die je nach Wirt (Säuger oder *Anopheles*-Mücke) exprimiert werden (Gunderson *et al.*, 1987). Condon *et al.* zeigten 1995 durch Inaktivierung einzelner ribosomaler *E. coli* RNA Operons, dass 5 Operons notwendig für optimales Zellwachstum sind, allerdings nur alle sieben Operons eine schnelle Adaptation an wechselnde Nährstoff- und Temperaturbedingungen gewährleisten.

1.3.1 Die Lage der rRNA-Operons auf dem *E. coli* Genom

Die Lage der sieben nahezu identischen Transkriptionseinheiten ribosomaler RNAs auf dem *E. coli* Genom ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die RNA-Operons sind in unterschiedlichem Abstand vom bidirektionalen Replikationsursprung *oriC* angeordnet (Ellwood & Nomura, 1982; Lindahl & Zengel, 1986). Ihre Transkriptionsrichtung entspricht der Replikationsrichtung, dies verhindert weitestgehend die Kollision von DNA- und RNA-Polymerase bei Replikation und Transkription (French, 1992). Während hoher Teilungsraten werden nacheinander bis zu vier Replikationsgabeln initiiert (Cooper & Helmstetter, 1968). Dies bewirkt eine partielle Polyploidie der *ori*-nahen

Operons. Es resultiert eine Erhöhung der Gendosis dieser Transkriptionseinheiten und diese kann ebenfalls als Regulationsmechanismus, beziehungsweise als Beitrag zur differentiellen Transkription ribosomaler Operons angesehen werden.

Entsprechende Untersuchungen zur differentiellen Transkription im chromosomalen Kontext wurden 1992 von Condon *et al.* beschrieben. Sie verglichen die Expression von Fusionen der ribosomalen Promotoren mit dem Gen für die Chloramphenicol-acetyltransferase in den jeweiligen Positionen der sieben Operons im *E. coli* Genom in Minimal- und Vollmedium untereinander. Bezogen auf die Expression der *ori*-nahen *rrn*-Operons konnte den Operons *rrnG* und *rrnH* entsprechend ihrer Lage auf dem *E. coli* Genom eine vergleichsweise geringere Expression bei schnellem Wachstum zugeordnet werden. Bei langsamen Wachstum wurde dieser Unterschied nicht festgestellt. Daraus folgerten die Autoren, dass die starke Expression der *ori*-nahen *rrn*-Operons bei schnellem Wachstum auf den Gendosisseffekt durch die dann vorliegende Ploidie dieser Operons zurückzuführen ist.

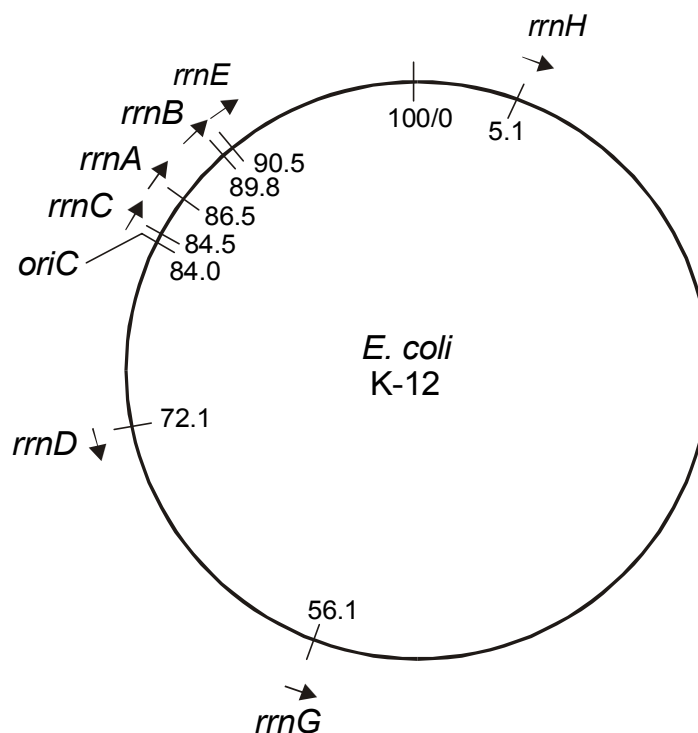


Abb. 1.1 Anordnung der ribosomalen RNA-Operons auf dem zirkulären *E. coli* Genom. Die ribosomalen Operons sind mit Angabe ihrer Position in Minuten dargestellt. Der Replikationsursprung *oriC* ist eingezeichnet. Die Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile markiert.

1.3.2 Struktur und Aufbau der ribosomalen RNA-Operons

Der Aufbau der sieben ribosomalen RNA Transkriptionseinheiten ist bezüglich der Grundstruktur weitgehend identisch. Die Abbildung 1.2 zeigt den schematischen Aufbau der ribosomalen RNA-Transkriptionseinheiten am Beispiel des *rrnB*-Operons.

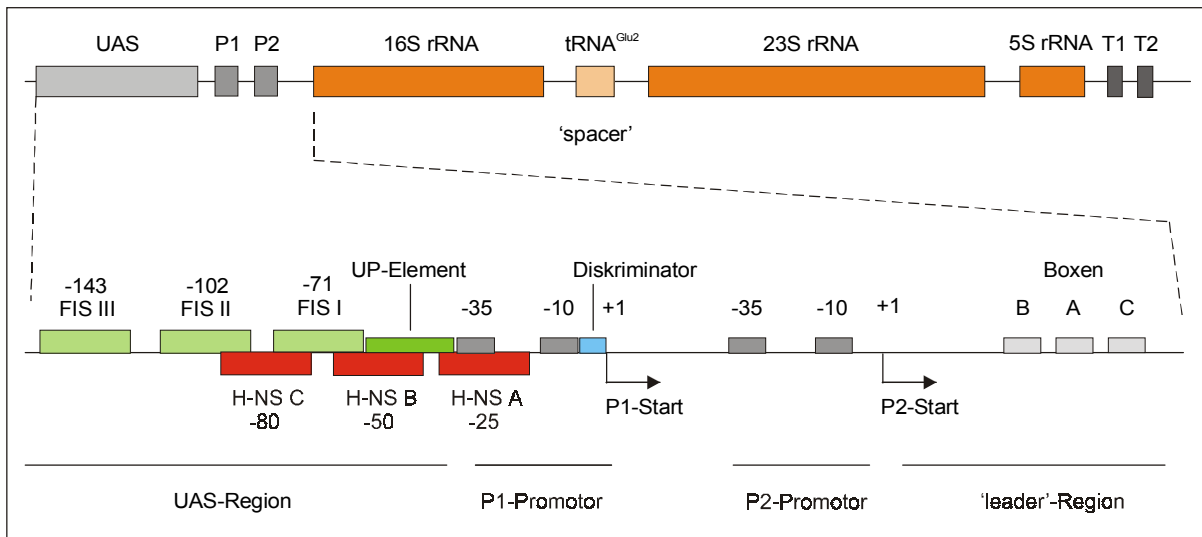


Abb. 1.2 Schematischer Aufbau der ribosomalen Transkriptionseinheiten am Beispiel des *rrnB*-Operons. Im oberen Teil ist die komplette Transkriptionseinheit mit den regulatorischen Regionen (Graustufen) und den Strukturgenen (farbig) bis zu den Terminatoren (dunkelgrau) dargestellt. Der untere Teil zeigt die Promotorregion mit der UAS bis zur 'leader'-Region. Die aktivierenden Sequenzelemente, die FIS-Bindestellen und das UP-Element sind unterschiedlich grün dargestellt. Die Bindestellen für den Transkriptionsrepressor H-NS sind rot markiert. Die Diskriminatorsequenz für die stringente Kontrolle ist blau eingezeichnet. Die Promotor-core-Elemente des P1- und P2-Promotors sind als graue Boxen zu sehen. In der 'leader'-Region sind die Boxen B, A und C markiert.

Dem regulatorischen Sequenzelement *upstream activating sequence* (UAS) folgen die Tandempromotoren P1 und P2, die voneinander etwa 120 Nukleotide entfernt sind. In 3'-Richtung schließen sich die 5'-'leader'-Region und nachfolgend die Strukturgene der 16S rRNA, 23S rRNA und 5S rRNA an. Die 'leader'-Region enthält die Boxen B, A und C. Dies sind 'nut-ähnliche'-Sequenzen (Olson *et al.*, 1982), analog zu den *nut*-Sequenzen der DNA des Phagen λ . Eine klare regulatorische Funktion dieser Boxen wie beim Phagen λ (Antitermination, Adhya & Gottesmann, 1978) konnte für die rRNAs bis heute nicht nachgewiesen werden. Die 16S- und 23S-Strukturgene sind über einen 'spacer', der ein oder zwei tRNA-Gene enthält, verbunden. Der distale 'spacer' verbindet das 5S-Strukturgen und die beiden *rho*-unabhängigen Terminatoren. Einzelne Operons tragen ein oder zwei tRNAs im distalen 'spacer' (Ellwood & Nomura, 1982). Das *rrnD*-Operon enthält zwei 5S-Strukturgene (Duester & Holmes, 1980) und das *rrnC*-Operon beinhaltet die einzige Kopie des Gens für die Tryptophanyl-tRNA im distalen 'spacer' (Condon *et al.*, 1992). Der Bereich der Strukturgene ist bei allen Operons hochkonserviert (Mori *et al.*, 1990). Lediglich sogenannte Mikroheterogenitäten, Abweichungen einzelner Basen, treten in unterschiedlichem Ausmaß bei einigen Operons auf (Carbon *et al.*, Harvey *et al.*, 1987; 1979; Hill, 1999). Die Frage, ob dadurch differentielle Ribosomenstrukturen verursacht werden, ist noch nicht beantwortet. Auffällige Sequenzunterschiede weisen die sieben verschiedenen Operons allerdings in den UAS-Regionen auf. Diese AT-reichen Sequenzelemente zeigen eine starke intrinsische Krümmung und tragen Zielsequenzen vielfältiger Regulationsmechanismen, die nachfolgend genauer beschrieben werden.

1.3.3 Strukturelemente der rRNA-Promotoren

Die ribosomalen Promotoren P1 und P2 werden von der σ^{70} -Polymerase ($E\sigma^{70}$) transkribiert. Es gibt allerdings Untersuchungen, die eine *in vitro*-Transkription von P1 durch die hitzeschockspezifische RNA-Polymerase $E\sigma^{32}$ zeigen (Newlands *et al.*, 1993). Dies ist physiologisch zur Adaptation bei Hitzeschock durchaus vorstellbar, zumal die Flexibilität einiger σ -Faktoren bezüglich der Promotorspezifität trotz grundsätzlich konservierter Erkennungssequenzen möglich ist. Die Transkription der rRNA Promotoren P1 und P2 erfolgt *in vivo* unbestritten vom RNA-Polymerase Holoenzym $E\sigma^{70}$, daher beschränken sich die nachfolgend beschriebenen charakteristischen Merkmale auf Promotoren, die von dem Polymerase-Spezifitätsfaktor σ^{70} erkannt werden.

Strukturmerkmale von σ^{70} -Promotoren sind die sogenannten 'core'-Promotorelemente, die -35-Region und die -10-Region oder *Pribnow-Box*. Aus statistischen Analysen konnten die Konsensussequenzen TTGACA (-35) und TATAAT (-10) abgeleitet werden (Hawley & McClure, 1983; Harley & Reynolds, 1987; Lissner & Margalit, 1992). Die beiden Sequenzelemente werden durch ein weiteres Strukturmerkmal, den 'spacer' getrennt. Die Sequenz dieses Promotorelementes ist nicht konserviert, Sequenzunterschiede haben nur einen geringen Einfluss auf die Promotoraktivität. Allerdings kann eine variable intrinsische Krümmung dieses Bereiches durch Sequenzunterschiede (sogenannte '*A/T-tracts*') unterschiedliche Promotorstärken bewirken (Lozinski *et al.*, 1989). Von großer Bedeutung für die Promotorstärke ist die Länge des 'spacers', die mit 17 Basenpaaren als optimal angesehen wird. Bei diesem Abstand werden die Zentren der -10- und -35-Region genau 23 Nukleotide voneinander getrennt. In einer B-DNA-Helix entspricht dies einer Verdrehung von exakt 68° (Wang & Syvanen, 1992). Da die Polymerase über definierte Bereiche des σ -Faktors sowie der β - und β' -Untereinheit an die DNA bindet (Gross *et al.*, 1996), ist der Einfluss von 'spacer'-Länge und resultierender DNA-Konformation klar zu erkennen. Insgesamt ist die Promotorstärke somit abhängig von der Übereinstimmung der Sequenzen der 'core'-Elemente mit den jeweiligen Konsensussequenzen und der Länge des 'spacers' (Hawley & McClure, 1983; Harley & Reynolds, 1987; Record *et al.*, 1996). Bis heute ist kein natürlicher Promotor gefunden worden, der in allen Einzelkomponenten mit den optimalen Konsensuselementen übereinstimmt.

Die ribosomalen Promotoren gehören *in vivo* zu den stärksten der Zelle, weisen allerdings nur eine 'spacer'-Länge von 16 Nukleotiden auf. Durch Insertionen und Punktmutationen konnten die perfekten Konsensussequenzen und 'spacer' erhalten und die Aktivität noch gesteigert werden. Diese Promotoren waren *in vivo* jedoch nicht mehr wachstumsratenreguliert (Gaal *et al.*, 1989; Dickson *et al.*, 1989). Die Natur bevorzugt offensichtlich die Regulationsfähigkeit der rRNA-Promotoren gegenüber einer absoluten Promotorstärke, die aus perfekten Konsensussequenzen resultieren würde.

Die Transkription ribosomaler rRNA-Gene kann von beiden Promotoren erfolgen. Als Hauptzielsequenz der Transkriptionsregulation wurde zunächst nur der Promotor P1

angesehen, während dem P2-Promotor eine basale Transkription zugeordnet wurde (Glaser *et al.*, 1983; Sarmientos & Cashel, 1983; Sarmientos *et al.*, 1983). Inzwischen wurde jedoch die stringente Regulation des P2-Promotors gezeigt (Gafny *et al.*, 1994; Liebig & Wagner, 1995) und es gibt Hinweise auf eine Transkriptionszunahme von P2 bei einem 'upshift', einer spontanen Anreicherung des Nährmediums (Gourse *et al.*, 1996).

Die hochkonservierte Tandemanordnung der Promotoren P1 und P2 ist in ihrer physiologischen Bedeutung noch nicht verstanden. Es gibt jedoch Modellvorstellungen, die zur Erklärung unterschiedlicher Transkriptionsraten beitragen sollen. So beschreibt das 'promoter occlusion'-Modell eine Inhibition von P2 durch die hohe Transkriptionsrate am P1-Promotor (Adhya & Gottesman, 1982; Bateman & Paule, 1988). Das 'turnstile attenuation'-Modell (Kingston & Chamberlin, 1981) schlägt einen entgegengesetzten Mechanismus vor. Hierbei verursacht eine langsamere Initiation am Promotor P2 einen Polymerasestau an P1 und beeinflusst dadurch dessen Transkription. Inwiefern die Modelle den realen Mechanismus wiedergeben, ist bisher noch nicht geklärt.

Die Aktivität der ribosomalen Promotoren ist *in vitro* vergleichsweise gering, die Notwendigkeit zellulärer Faktoren zur Transkriptionsaktivierung liegt daher nahe. In den folgenden Abschnitten werden solche zellulären Faktoren und weitere Regulationsmechanismen der ribosomalen RNA-Operons ausführlicher beschrieben.

1.4 Regulationsmechanismen der ribosomalen RNA-Operons

Die Regulation der Synthese ribosomaler RNAs stellt ein verzweigtes Netzwerk regulatorischer Mechanismen dar. Im Wesentlichen lässt sich die Regulation durch zwei globale Regelkreise beschreiben, die Wachstumsratenkontrolle und die stringente Kontrolle. Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate μ und der Synthese ribosomaler RNAs, die proportional zum Quadrat der Wachstumsrate erfolgt (Gausling 1977 & 1980), wurde bereits mehrfach erwähnt und wird unter dem Begriff der Wachstumsratenregulation zusammengefasst. Während des exponentiellen Wachstums stellen die stabilen RNAs (rRNA und tRNA) 97 % der Gesamt-RNA einer Zelle dar. Bei niedrigen Wachstumsraten nimmt die rRNA-Synthese dagegen drastisch ab. Dies verringert die Zahl der zur Ribosomensynthese zur Verfügung stehenden rRNA-Moleküle, wodurch zusätzlich zu anderen Regulationsmechanismen die Synthese der ribosomalen Proteine über einen autoregulatorischen Rückkopplungs/Inhibierungsmechanismus (Nomura *et al.*, 1984) kontrolliert wird. Diese 'feedback'-Inhibierung verhindert die Bildung überschüssiger rProteine durch Komplexbildung freier, nicht an ribosomale RNAs gebundener Proteine an die eigene mRNA. Dieser Vorgang inhibiert die Translation und gewährleistet somit die Anpassung der Ribosomensynthese an die rRNA-Syntheseraten.

Ein weiterer Rückkopplungsmechanismus reguliert die Ribosomensynthese in Bakterien, deren Gendosis durch rRNA-Operon-tragende Plasmide erhöht (Jinks-Robertson *et al.*, 1983) oder durch Deletion chromosomaler Operons erniedrigt wur-

de (Condon *et al.*, 1993). Die Gesamt rRNA-Syntheserate bleibt weitgehend unverändert, was im ersten Fall auf die Reduktion und im zweiten Fall auf Erhöhung der Expression der individuellen Operons zurückzuführen ist. Diese Regulation wird als ‚*feedback-response*‘ bezeichnet und konnte inzwischen auch bei wachstumsratenunabhängigen Promotormutanten gefunden werden (Voulgaris *et al.*, 2000).

Unter stringenter Kontrolle versteht man die Adaptationsfähigkeit von Bakterien an Aminosäuremangelsituationen. Bei verminderter Verfügbarkeit acylierter tRNAs erfolgt eine schnelle und effiziente Repression der rRNA- und tRNA-Synthese (Gallant, 1979; Cashel & Rudd, 1987).

Cis- und trans-Faktoren sowie Mechanismen, die Elemente der globalen Regulationsnetzwerke ribosomaler RNAs darstellen, werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

1.4.1 Das Effektormolekül ppGpp und die stringente Kontrolle

Den beiden globalen Regulationsnetzwerken Wachstumsratenregulation und stringenter Kontrolle ist als Schlüsselmolekül das Effektornukleotid Guanosintetraphosphat (ppGpp) (Barrachini & Bremer, 1988) gemeinsam. Es wird sowohl über das ribosomenassoziierte RelA-Protein (ppGpp-Synthase I), als auch durch die cytoplasmatische SpoT-Synthetase (ppGpp-Synthase II) aus ATP und GTP über das Guanosinpentaphosphat pppGpp synthetisiert (Pedersen & Kjeldgard, 1977; Richter, 1979). Die zelluläre ppGpp-Konzentration wird durch Synthese über das RelA-Protein bei Aminosäuremangel (stringente Kontrolle) innerhalb von Minuten um eine Größenordnung (mikromolar $\Rightarrow$ millimolar) angehoben (Lund & Kjeldgard, 1972), wodurch die Regulation stringent kontrollierter Promotoren erfolgen kann. Die ribosomalen Promotoren werden durch hohe ppGpp-Konzentrationen bei Aminosäuremangel schnell und effizient reprimiert.

Die intrazelluläre ppGpp-Konzentration ist umgekehrt proportional zur Wachstumsrate (Zacharias *et al.*, 1989). Ansteigende ppGpp-Konzentrationen bei langsamen Wachstum führen ebenfalls zur Transkriptionsrepression der ribosomalen Promotoren. Für diese Wachstumsratenkontrolle wird das *spoT* Genprodukt als Vermittler diskutiert (Hernandez & Bremer, 1991; Xiao *et al.*, 1991), das ebenfalls zur Degradation von ppGpp beiträgt.

Ein notwendiges, allein aber nicht ausreichendes Sequenzelement durch ppGpp negativ regulierter Promotoren ist die Diskriminatorsequenz GCGC im Bereich zwischen -10-Region und Transkriptionsstart (Zacharias *et al.*, 1989; Wagner 1994; Condon *et al.*, 1995a). Am P2-Promotor wurde eine reduzierte ppGpp-Sensitivität gemessen (Liebig & Wagner, 1995; Heinemann & Wagner, 1997). Dessen Diskriminatormotiv trägt die Sequenz GCAC. Neben der negativen Regulation gibt es auch positiv regulierte Promotoren mit A-reichem Diskriminator. Hierzu gehören Promotoren der Aminosäuresynthese (Barker *et al.*, 2000; Barker *et al.*, 2001) oder das *rpoS*-Genprodukt, der RNA-Polymerasespezifitätsfaktor σ^S (Lange *et al.*, 1995; Loewen *et al.*, 1998).

Eine Erklärung des Mechanismus, der die unterschiedliche Regulation stringent- und nicht-stringent-kontrollierter Promotoren ermöglicht, bietet das '*RNA-polymerase partition*'-Modell an. Es geht von zwei ineinanderüberführbaren Polymerasepopulationen aus, die in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von ppGpp als RNA-Polymerasen mit unterschiedlicher Initiationskompetenz vorliegen. Während niedrige ppGpp-Spiegel eine RNA-Polymerase begünstigen, die bevorzugt Promotoren initiiert, die durch ppGpp reprimiert werden, akkumuliert bei steigender ppGpp-Konzentration eine modifizierte RNA-Polymerase-Population mit verändertem Initiationsverhalten. Dieses wird möglicherweise durch die Bindung von ppGpp an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase bewirkt. Hierdurch wird vermutlich die Isomerisation des geschlossenen RNA-Polymerase-Promotor-Komplexes in den offenen, elongationsfähigen Komplex verzögert (Heinemann & Wagner, 1997). Weiterhin verursacht ppGpp ein verändertes Pausierungsverhalten der RNA-Polymerase (Krohn & Wagner, 1996), wodurch die Elongation der Transkription verzögert wird.

Trotz intensiver Forschung zur Klärung molekularer Mechanismen der stringenten Kontrolle sind bis heute viele Fragen offen und werden weiterhin äußerst kontrovers diskutiert.

1.4.2 Die faktorunabhängige Transkriptionsregulation

Neben der Transkriptionsregulation, die auf die Promotorkernstruktur zurückzuführen ist, zeigen die ribosomalen RNA-Operons von *Escherichia coli* eine erhebliche Aktivierung der Expression durch die den P1-Promotoren in 5'-Richtung vorausgehenden Sequenzen, den '*upstream activating sequences*' (UAS). Diese cis-Faktoren oder Sequenzelemente sind charakterisiert durch eine ausgeprägte intrinsische DNA-Krümmung und vermitteln eine starke Transkriptionserhöhung (Gourse *et al.*, 1996). Neben der DNA-Konformation wird der Sequenz zwischen Position -35 und -65, die das sogenannte UP-Element enthält, eine hohe Transkriptionsaktivierung zugeschrieben. Beide Regulationsparameter, die als faktorunabhängige Transkriptionsregulation bezeichnet werden, sollen nachfolgend beschrieben werden.

1.4.2.1 Das UP-Element

Stromaufwärts der -35-Region des P1-Promotors ist an der Position -40 bis -60 ein AT-reiches Sequenzelement, das UP-Element, lokalisiert, das am ribosomalen P1-Promotor eine 30-fache Aktivierung der Transkription verursacht. (Newlands *et al.*, 1991; Zacharias *et al.*, 1992; Gourse *et al.*, 1996). Es interagiert spezifisch mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und trägt damit zur Stabilisierung des Transkriptionsinitiationskomplexes bei (Blatter *et al.*, 1994; Aiyar *et al.*, 1998; Estrem *et al.*, 1999). Das UP-Element wird neben -10- und -35-Region als drittes RNA-Polymerase Erkennungssegment beschrieben, und gemeinsam stellen diese drei Elemente eine basale Promotoraktivität in Abwesenheit von Transkripti-

onsfaktoren sicher (Rao *et al.* 1994; Ross *et al.*, 1998). Für das UP-Element wurde inzwischen folgende Konsensussequenz beschrieben:

(-57)AAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTnnAAAA(-41)

Untersuchte UP-Elemente die zu dieser Konsensussequenz führten, zeigten eine 136- bis 326-fache Transkriptionsaktivierung *in vivo* (Estrem *et al.*, 1998).

1.4.2.2 DNA-Struktur und Transkriptionsregulation

Eine gekrümmte DNA-Sequenz kann die Erkennung und Bindung der RNA-Polymerase erheblich erleichtern, wenn durch die gekrümmte Konformation die Promotorgeometrie dahingehend verändert wird, dass die Polymeraseerkennungselemente -10-, -35-Region und UP-Element für die Polymerasekomplexbildung vorteilhafter positioniert werden. Bei der Transkription ist die DNA um die Polymerase gewickelt, ein Vorgang, der mit dem Begriff '*wrapping*' beschrieben wird. Eine intrinsische Krümmung erleichtert diesen Vorgang erheblich.

Weiterhin kann durch DNA-Biegung die Bindung an Transkriptionsfaktoren verbessert werden. Transkriptionsregulatoren binden häufig als Dimere, eine DNA-Krümmung kann die Zugänglichkeit der DNA für die DNA-bindenden Proteindomänen des Faktors erheblich beeinflussen. Auch für die später noch ausführlicher beschriebenen Transkriptionsfaktoren der ribosomalen Operons, FIS und H-NS wurde die präferentielle Bindung an gekrümmte DNA gezeigt (Zacharias *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1990 & 1991). Die sequenzspezifische Krümmung, im allgemeinen mit dem angelsächsischen Begriff '*curvature*' beschrieben, kann unter anderem anhand zweier Modelle, dem '*ApA wedge*'- und dem '*B-junction*'-Modell beschrieben werden (Harrington, 1993). Beide Modelle sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

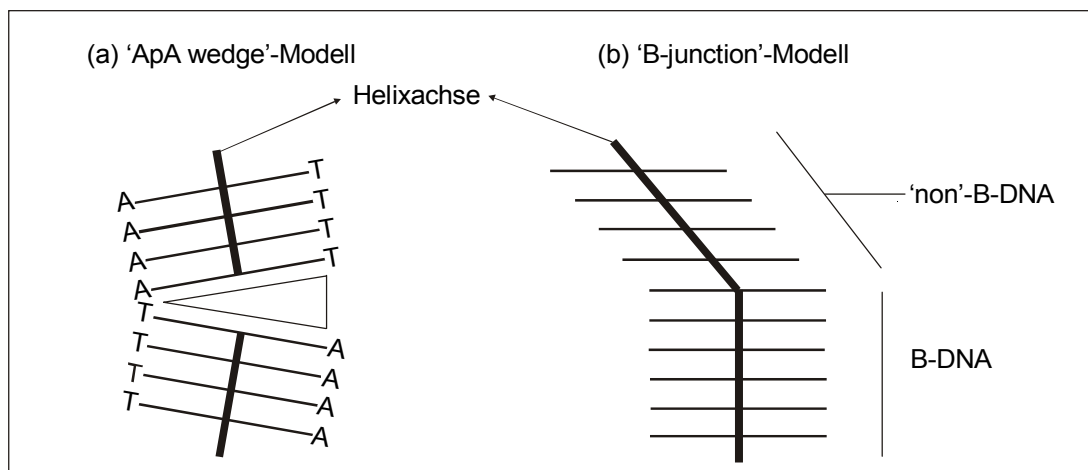


Abb. 1.3 DNA-Krümmung nach dem '*ApA wedge*'- und dem '*B-junction*'-Modell. (a) Im '*ApA wedge*'-Modell stellen die '*AT-cluster*' B-DNA-Helices dar, die Basenpaare stehen senkrecht zur Helixachse. (b) '*B-junction*'-Modell

Nach dem '*ApA wedge*'-Modell wird die Krümmung durch abwechselnde '*AT-cluster*' verursacht. Wie in der Abbildung dargestellt sind die aufeinanderfolgenden AT/TA-

Basenpaare nicht parallel, hierdurch entsteht ein imaginärer Keil (*wedge*), der die Richtung der Helixachse verändert. Je nach Häufigkeit und Abstand solcher Wechsel von 'AT-clustern' nimmt die Krümmungsintensität zu. Das 'B-junction'-Modell führt zur Krümmung durch den Wechsel einer B-DNA-Helix (Standard-Helix) mit einer 'non'-B-DNA-Helix. Auch hier bestimmen Häufigkeit und Abstand das Ausmaß der Krümmung. In beiden Modellen sind Strukturparameter der DNA-Helix verändert. In der nachfolgenden Abbildung sind Begriffe zur Beschreibung von Helices bildlich dargestellt. Abweichungen von einer normalen B-DNA-Helix werden mit Parametern der Rotation um die Helixachse (*twist*, *roll*, *tilt*, *propeller twist*) oder Parametern der Translation aufeinanderfolgender Basenpaare (*rise*, *slide*, *shift*) beschrieben.

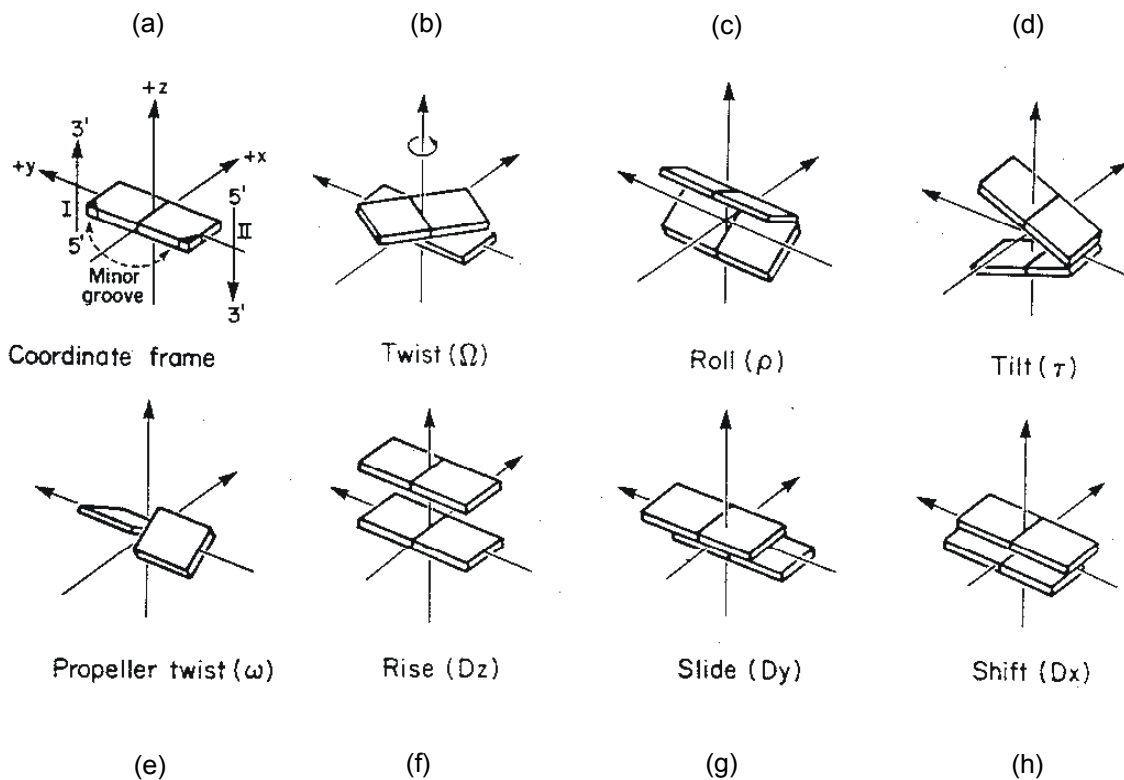


Abb. 1.4 Parameter zur Beschreibung von DNA-Helices. Die abgebildeten Beispiele zeigen wichtige Begriffe zur Beschreibung von DNA-Konformationen. Die Koordinatendefinition ist unter (a) angegeben. Die Definitionen der Rotation erklären koordinierte ((b)Twist, (c) Roll, (d) Tilt) und entgegengesetzte ((e) Propeller Twist) Drehungen eines Basenpaares um Helixkoordinaten. Die Parameter der Translation ((f) Rise, (g) Slide, (h) Shift) beschreiben Verschiebungen aufeinanderfolgender Basenpaare zueinander (Abbildungen aus: Dickerson *et al.*, 1989).

Helixparameter als Funktion der DNA-Sequenz und experimentelle Daten aus Kristallographie, Kernmagnetischer Resonanz (NMR) oder Gelverzögerungsanalysen (Satchwell *et al.*, 1986; De Santis *et al.*, 1990; Bolshoy *et al.*, 1991; Goodsell & Dickerson, 1994; Bansal *et al.*, 1995; Brukner *et al.*, 1995; Gorin *et al.*, 1995; Ulyanov & James, 1995) führten zu Strukturvorhersagemodellen von DNA-Konformationen. Auf solchen Modellen basieren die Computerprogramme, die Strukturen anhand von Sequenzen berechnen. Neben der sequenzbedingten intrinsischen Krümmung gibt es die proteininduzierte Biegung von DNA, die mit dem Begriff '*bending*' beschrieben

wird (Trifonov, 1991; Hagerman, 1992). Häufig sind es Transkriptionsfaktoren, die ein solches 'bending' induzieren und dadurch RNA-Polymerase/DNA-Komplexgeometrien verändern und auf diese Weise regulierend auf den Transkriptionsprozess wirken.

1.4.3 Die faktorabhängige Transkriptionsregulation

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Transkription aktivierend oder reprimierend beeinflussen. Sie binden entweder an die DNA, an die RNA-Polymerase oder an beide Komponenten des Initiationskomplexes. Die Aktivatoren oder Repressoren der prokaryontischen Transkription wirken häufig als Multimere modularen Aufbaus. Sie sind allerdings nicht so komplex wie die eukaryontischen Regulatoren, die ihre volle Aktivität häufig erst in Multienzymkomplexen entfalten. Den Proteinen FIS und H-NS konnten transkriptionsregulatorische Funktionen bei der Expression der ribosomalen RNAs nachgewiesen werden. Beide Proteine werden den Histon-ähnlichen Proteine zugeordnet, die im anschließenden Abschnitt beschrieben werden.

1.4.3.1 Die Histon-ähnlichen Proteine

Im Gegensatz zu den Eukaryonten ist DNA in Bakterien nicht chromosomal in einem Zellkern organisiert. Sie liegt allerdings auch nicht vollkommen frei in der prokaryontischen Zelle vor, sondern ist ebenfalls an Proteine assoziiert und bildet mit diesen das Nukleoid (Drlica & Rouviere-Yaniv, 1987; Pettijohn, 1996). Die Proteine kompaktieren das bakterielle Genom effizient und diese Eigenschaft führte zur Klassifizierung der Histon-ähnlichen Proteine. Zu ihnen zählen CbpA (*curved DNA-binding protein A*), CbpB (*curved DNA-binding protein B*), DnaA (*DNA-binding protein A*), Dps (*DNA-binding protein from starved cells*), FIS (*factor of inversion stimulation*), Hfq (*host factor for phage Q_β*), H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*), HU (*heat-unstable nucleoid protein*), IciA (*inhibitor of chromosome initiation A*), IHF (*integration host factor*), Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) und StpA (*suppressor of *td* phenotype A*). Fünf dieser Proteine binden sequenzspezifisch an DNA (CbpB, DnaA, FIS, IHF und Lrp), während für die restlichen sieben in Gelverzögerungsexperimenten keine Sequenzspezifität nachgewiesen werden konnte (Azam & Ishihama, 1999). Azam & Ishihama zeigten für vier Proteine (CbpA, Hfq, H-NS und IciA) die präferentielle Bindung an gekrümmte DNA. Zacharias *et al.* konnten 1992 die Stabilisierung der FIS-Bindung durch DNA-Biegung nachweisen.

Die Proteinzusammensetzung des Nukleoids variiert in Abhängigkeit von der zellulären Konzentration Histon-ähnlicher Proteine während unterschiedlicher Wachstumsphasen (Azam *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den eukaryontischen Histonen sind die bakteriellen Analoga nicht im gleichen Ausmaß abundant, die Bindung an DNA ist salzsensitiv und nicht alle Histon-ähnlichen Proteine sind basische Proteine (Schmid, 1990). Den Histon-ähnlichen Proteinen können neben der DNA-Kompaktierung re-

gulatorische Funktionen zugeordnet werden (Schmid, 1990). Die Proteine FIS und H-NS fungieren als Regulatoren der Synthese ribosomaler RNAs und werden nachfolgend detaillierter beschrieben.

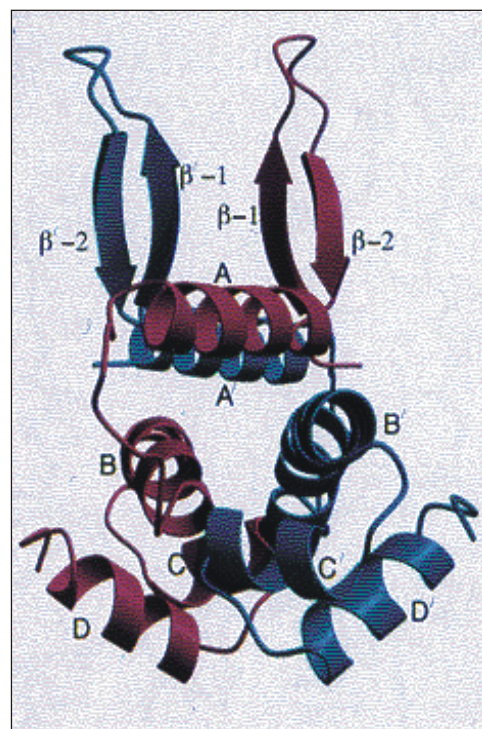
1.4.3.2 Der Transkriptionsaktivator FIS - ‘factor of inversion stimulation’

Das 98 Aminosäuren lange FIS-Protein (11.2 kDa) wurde ursprünglich als Stimulator der Inversion verschiedener Rekombinasen (Kahmann *et al.*, 1985; Johnson & Simon, 1985; Koch & Kahmann, 1986) beschrieben und benannt. FIS ist nicht einzig auf *E. coli* beschränkt, auch in anderen Bakterien wie *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenza*, *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris* und *Klebsiella pneumoniae* konnten *fis*-Operons identifiziert werden (Beach & Osuna, 1998).

Das *E. coli*-FIS Protein ist strukturell und funktionell gut untersucht. Es hat einen basischen pI (9.34) und existiert in Lösung als Homodimer. Seine Synthese ist negativ autoreguliert (Ball *et al.*, 1982) und streng wachstumsphasenreguliert (Ninnemann *et al.*, 1992). Die Zahl der FIS-Moleküle variiert von weniger als 100 Molekülen pro Zelle in der stationären Phase bis zu mehr als 50.000 Molekülen bei exponentiellem Wachstum.

Abb. 1.5 Struktur des FIS-Homodimers.

Gezeigt ist die Struktur einer FIS-Mutante mit einem Aminosäureaustausch (K36E). Die Struktur von K36E ist nahezu mit der Wildtypstruktur identisch. Die aminoterminalen 9 Aminosäuren fehlen in der Darstellung beider Monomere. Ein Monomer (a) ist in pink, das zweite (b) in blau dargestellt. Die vier α -Helices und zwei β -Stränge sind mit A-D, bzw. β -1 und β -2 (a) und mit A'-D' bzw. β -1' und β -2' (b) bezeichnet. Die DNA-Bindung erfolgt über die Helix-Turn-Helix-Motive der α -Helices C und D sowie C' und D' am C-terminalen Ende der Monomere. (Abbildung aus Safo *et al.*, 1997)



FIS bindet über ein Helix-Turn-Helix-Motiv an eine degenerierte Erkennungssequenz von 15 Nukleotiden, die intrinsisch gekrümmt ist ((G/T)NNYRNN(A/T)NNYRNN(C/A); N=beliebiges Nukleotid, Y=Pyrimidin, R=Purin; Hübner & Arber, 1989). FIS induziert eine Biegung der DNA zwischen 40° und 90° (Thompson & Landy, 1988; Bétermier *et al.*, 1994), die die beiden großen Furchen der bindenden DNA-Sequenz dem Protein

räumlich optimal annähert. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde die Transkriptionsaktivierung des ribosomalen *rrnB*-P1-Promotors durch FIS gezeigt (Ross *et al.*, 1990). Der exakte Abstand der FIS-Bindestellen von den *core*-Promotorelementen scheint zur Aktivierung essentiell zu sein. Die Insertion von DNA-Oligonukleotiden (5Bp), die das Zentrum der FIS-Bindestellen relativ zum Transkriptionsstart um eine halbe helikale Drehung verschieben, führen zur signifikanten Reduktion der Transkriptionsaktivierung des *rrnB*-P1-Promotors durch FIS (Zacharias *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse werden durch die Befunde, dass FIS direkt mit der RNA-Polymerase wechselwirkt, in ihrer Relevanz bestätigt. Die Interaktion zwischen FIS und der α -Untereinheit der RNA-Polymerase konnte gezeigt werden (Bokal *et al.*, 1995 und 1997). Weiterhin wurde die Stimulation des FIS-Komplexes durch die σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase beschrieben, wodurch die Autoren auf die mögliche Wechselwirkung von FIS mit dem σ^{70} -Faktor schließen (Muskhelishvili *et al.*, 1995). Für den Ablauf der Transkriptionsaktivierung wurde das '*torsional transmission model*' vorgeschlagen. Demnach fördert FIS den sequentiellen Ablauf von Polymerase Rekrutierung und Bindung, DNA-Aufwindung am Transkriptionsstart und die Promotorfreisetzung von der Polymerase durch Stabilisierung eines sogenannten '*microloops*' der DNA (Muskhelishvili *et al.*, 1997).

Alle sieben Operons zeigen wenigstens drei potentielle FIS-Bindestellen stromaufwärts vom P1-Promotor (Verbeek *et al.*, 1990; Hirvonen *et al.*, 2001). Das *rrnB*-Operon besitzt drei FIS-Bindestellen mit den Zentren -71 (FIS I), -102 (FIS II) und -143 (FIS III) relativ zum Transkriptionsstart. Der FIS-Bindestelle I konnte der größte Einfluss auf die Transkription des *rrnB*-Operons zugeordnet werden (Ross *et al.*, 1990). FIS agiert in erster Linie als Transkriptionsaktivator. Die Transkription des Histonähnlichen-Proteins H-NS wird von FIS positiv reguliert (Falconi *et al.*, 1996). Weiterhin wurde die aktivierende Beteiligung von FIS an der Transkription des *mar*-Promotors ('*multiple antibiotic resistance*', Martin & Rosner, 1997) und der wachstumsphasenabhängigen Regulation des *nuoA-N*-Operons (NADH-Dehydrogenase I, Wackwitz *et al.*, 1999) gezeigt. Die Funktion als Transkriptionsaktivator beschränkt sich nicht nur auf σ^{70} -Polymerase-abhängige Promotoren, sondern wurde auch für den σ^{38} -abhängigen Promotor *proP* P2 (Gen des Membrantransporters für Prolin und Glycin-Betain) beschrieben (Xu & Johnson, 1995a; McLeod *et al.*, 1999). Neben der transkriptions-aktivierenden Funktion kann FIS auch eine negative Regulation zugewiesen werden. Das *fis*-Gen selbst unterliegt der Autoregulation (Ball *et al.*, 1992) und FIS reprimiert ebenfalls die Transkription des σ^{38} -RNA-Polymerase-abhängigen *aldB*-Promotors (Aldehyddehydrogenase von *E. coli*, Xu & Johnson, 1995b). Weiterhin wurde die Beteiligung von FIS am '*silencing*' des *bgl*-Operons (β -Glukosid-Operon) *in vitro* (Caramel & Schnetz, 2000) und die Corepression des *crp*-Gens (codiert CAP-Protein, González-Gil *et al.*, 1998) gezeigt. Sowohl positive als auch negative Regulation von Genen durch FIS erfolgt häufig in antagonistischen Mechanismen mit den Transkriptionsfaktoren H-NS oder CAP (Tippner *et al.*, 1994; Xu & Johnson, 1995a, 1995b, 1997; Claret & Rouvière-Yaniv, 1996; Falconi *et al.*, 1996; González-Gil *et al.*, 1996, 1998; Afflerbach *et al.* 1999). Ein Modell für einen mögli-

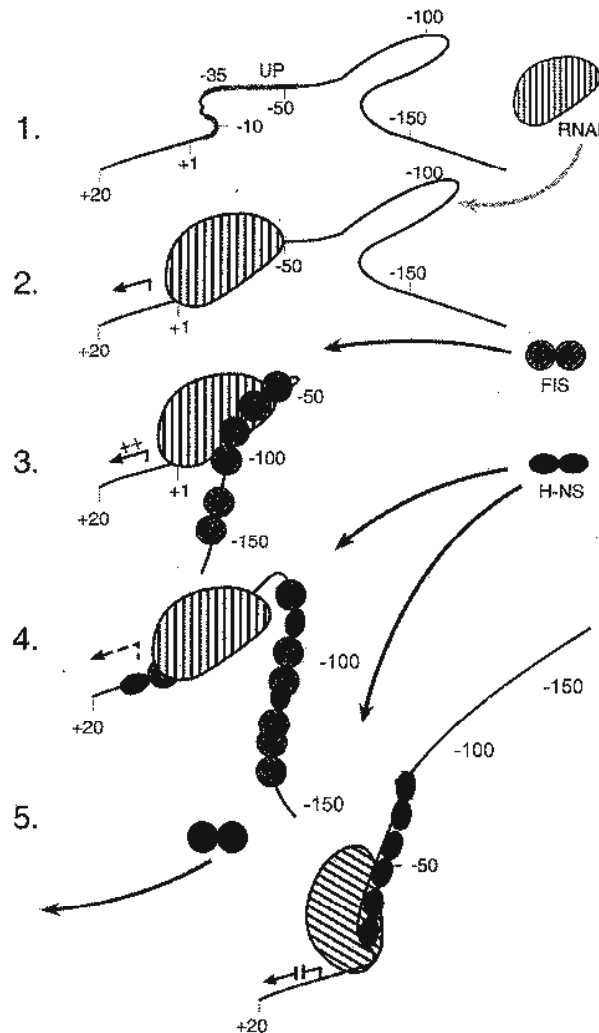
Die C-terminale Domäne trägt zwischen Aminosäure 91 und Aminosäure 136 die Sequenzen, die zur DNA-Bindung beitragen. Heteronukleare 2D- und 3D-NMR-Daten zeigten in jüngster Zeit, dass insbesondere die AS-Sequenzen von A80 bis K96 und T110 bis A117 eine essentielle Funktion bei der DNA-Bindung ausüben (Shindo *et al.*, 1999). Shindo *et al.* erstellten aufgrund ihrer NMR-Daten ein dreidimensionales Strukturmodell, welches die beiden genannten Regionen als flexible 'loops' in räumlicher Nähe darstellt. Eine Ähnlichkeit zu bekannten DNA-Bindedomänen konnte nicht gefunden werden (Shindo *et al.*, 1995, 1999). Der N-terminalen Domäne (AS 1 bis AS 64) konnte anhand von *cross-link*-Untersuchungen die Dimerisierungsfunktion zugeordnet werden (Williams & Rimsky, 1996). Der Oligomeriezustand von H-NS wird kontrovers diskutiert, je nach experimentellen Bedingungen wurden Dimere, Trimere, Tetramere und Hexamere beschrieben (Falconi *et al.*, 1988; Spurio *et al.*, 1997; Ueguchi *et al.*, 1997). Die Bindung von H-NS an die Ziel-DNA als Dimer wurde von Spassky *et al.* (1984) beschrieben. Für H-NS aus *Salmonella typhimurium* wurden Daten ermittelt, die den Aminosäuren 1-89 die Oligomerisierungseigenschaften zuweisen (Smyth *et al.*, 2000). Hierbei bilden die Aminosäuren 1-64 ein Trimer, dominiert von α -Helices in einer *coiled-coil*-Struktur und die Aminosäuren 1-89 generieren höhere Oligomeriezustände. Sowohl die ungewöhnliche DNA-Bindedomäne als auch der variable Oligomeriezustand könnten zur Erklärung der sequenzunabhängigen Bindung von H-NS bevorzugt an intrinsisch gekrümmte DNA beitragen. Ob H-NS entsprechend dem Transkriptionsfaktor FIS an die große Furche der DNA-Helix bindet, ist noch ungeklärt. Ebenso wie FIS induziert die H-NS-Bindung eine zusätzliche Biegung der Ziel-DNA, der eine funktionelle Bedeutung der Repression antagonistisch zur FIS-vermittelten Stimulation zugewiesen wird (Tippner *et al.*, 1994).

H-NS ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. In *hns*⁽⁻⁾-Mutanten ist die Synthese von mehr als 30 Proteinen betroffen und die Mutanten zeigen pleiotrope Effekte (Barth *et al.*, 1995; Laurent-Winter *et al.*, 1997). Insbesondere Proteine, die an der bakteriellen Adaptation an veränderte Wachstumsbedingungen oder Anpassung an Stresssituationen (Osmotischer Stress, Temperaturstress, Sauerstoffstress oder pH-Stress) beteiligt sind, unterliegen einer Regulation durch H-NS (Laurent-Winter *et al.*, 1996; Atlung & Ingmer, 1997). Häufig werden diese Gene positiv durch Proteine wie FIS, CRP oder Lrp reguliert. H-NS funktioniert in der Regel als Transkriptionsrepressor, es gibt aber auch Operons, deren Expression durch H-NS stimuliert wird. Hierzu gehören Gene der Flagellensynthese, z. B. *flhA* (σ^{28}), *fliC* (Flagellin) oder *flhD* (Aktivator der Flagellensynthese) (Bertin *et al.*, 1994; Soutourina *et al.*, 1999) oder das Maltose-Regulon (Johansson *et al.*, 1998).

Die Transkription des *rrnB* P1-Promotors wird durch H-NS sowohl *in vivo* als auch *in vitro* deutlich reprimiert (Afflerbach *et al.*, 1999; Schröder & Wagner, 2000). Am *rrnB*-Operon konnten drei H-NS-Bindestellen in der UAS-Region lokalisiert werden. Deren Zentren befinden sich an den Positionen -20, -50 und -80 relativ zum Transkriptionsstart. Die H-NS-Bindestellen überlappen teilweise die FIS-Bindestellen (siehe Abb. 1.2), dies schließt eine gleichzeitige Bindung allerdings nicht aus, da die Bindungspositionen auf den gegenüberliegenden Helixseiten liegen (Tippner *et al.*, 1994;

Afflerbach *et al.*, 1999). Tippner *et al.* formulierten 1994 ein Modell zur antagonistischen Wirkung der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS am *rrnB*-Operon, das von Afflerbach *et al.* 1999 bestätigt und modifiziert wurde.

Abb. 1.7 Modell zum funktionellen Antagonismus von H-NS und FIS am *rrnB* P1-Promotor. 1. Darstellung der Promotorregion mit den Bindestellen für H-NS und FIS. 2. Nach der Bindung von $E\sigma^{70}$ wird die Transkription faktorunabhängig stimuliert (UP-Element). 3. Die Besetzung aller drei FIS-Bindestellen erlaubt die maximale Transkriptionsaktivierung. Die durch FIS induzierte Konformationsänderung der DNA und die WW zwischen FIS und $E\sigma^{70}$ erhöhen die Bindekonstante der Polymerase am Promotor. 4. Nach Zunahme der intrazellulären H-NS-Konzentration durch Veränderung der Wachstumsbedingungen kommt es zur Konkurrenz der beiden Transkriptionsfaktoren um die Bindung an die UAS-Region des P1-Promotors. Nach Afflerbach *et al.* kommt es zur Ausbildung von Heteromeren, um die transkriptionsstimulierende Konformation aufzuschmelzen und die FIS/Polymerase-Interaktion zu stören. 5. Die strukturellen Veränderungen der UAS-Region ermöglichen die Bindung weiterer H-NS-Moleküle, was zur Abdissoziation der FIS-Moleküle und über weitere kooperative Bindung von H-NS zur Repression der Transkription führt. (aus: Afflerbach *et al.*, 1999)



Der molekulare Mechanismus der H-NS-vermittelten Repression unabhängig von einer FIS-Aktivierung konnte in den letzten Jahren weiter aufgeklärt werden. Sowohl die RNA-Polymerasebindung als auch die offene Komplexbildung wird durch H-NS nicht verhindert, sondern eher noch stimuliert (Schröder & Wagner, 2000). Die Autoren formulierten ein 'trapping'-Modell, nach dem H-NS nicht die Transkription an den initialen zwei Phosphodiesterbindungen inhibiert, sondern die Polymerase in einem ternären Komplex mit H-NS und Promotor 'trapped' und dadurch die Inkorporation der Substrat-NTPs nach Position +3 des Transkriptionsinitiationskomplexes verhindert. Dieser Befund wird durch mikroskopische Aufnahmen, die erstmalig H-NS/DNA-Komplexe sichtbar machen, unterstützt. Untersuchungen über *Atomic Force Microscopy* ermöglichen die anschauliche Darstellung der Bindung von H-NS an DNA und die resultierende Kompaktierung (Dame *et al.*, 2000). Anhand weiterer AFM-Analysen konnte ein Modell zur bevorzugten Bindung von H-NS an gekrümmte DNA erstellt werden (Dame *et al.*, 2001).

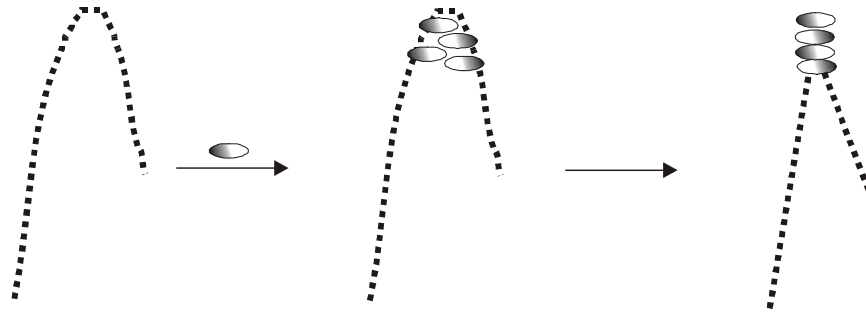


Abb. 1.8 Modell zur präferentiellen Bindung von H-NS an eine intrinsisch gekrümmte DNA. Bei Bindung von H-NS an stark gekrümmte DNA kann eine intramolekulare Brückenbildung zwischen den H-NS-Dimeren, die an gegenüberliegenden Strängen gebunden sind, zur weiteren Oligomerisierung und dadurch zur Kondensation führen. (nach Dame *et al.*, 2001)

Das in Abbildung 1.8 dargestellte Modell unterstützt ebenfalls das Polymerase-*'trapping'*-Modell (s.o.). Während der Initiation sind die DNA-Sequenzen *upstream* und *downstream* der gebundenen Polymerase einander räumlich angenähert. Dies könnte die H-NS-vermittelte Überbrückung (siehe Abb.1.8) der beiden Sequenzabschnitte (*upstream* und *downstream*) begünstigen und somit die Polymerase physisch einschließen, also *trappen*.

1.4.3.4 StpA - ein molekulares *Backup*-System für H-NS

StpA wurde ursprünglich als Suppressor eines *splicing* defekten T4 Phänotyps assoziiert mit einer *RNA-Chaperon*-Aktivität isoliert (Zhang & Belfort, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Das 133 AS lange Protein (15.3 kDa) besitzt eine 58 %ige Identität mit H-NS. Es ist allerdings basischer mit einem berechneten pI von 9.08. Funktionelle Gemeinsamkeiten zu H-NS bestehen in der Repression von Promotoren mit gekrümmten UAS-Regionen und der proteininduzierten Biegung von DNA (Zhang *et al.*, 1996). Eine *RNA-Chaperon*- und *Splicing*-Aktivität konnte ebenfalls für H-NS gezeigt werden, diese ist aber um Größenordnungen geringer. StpA wird in *hns*⁽⁻⁾-Stämmen verstärkt exprimiert, es wird als molekularer *Backup* für H-NS diskutiert. In H-NS-Mutanten, deren DNA-Bindedomäne deletiert wurde, wirkt StpA als molekularer Adapter bei der H-NS vermittelten Repression des *bgl*-Operons (Free *et al.*, 1998). Die Expression von StpA ist temperaturabhängig, bei 37°C doppelt so hoch wie bei 26°C. Die Transkription von *stpA* wird von dem Regulatorprotein Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) stimuliert und von H-NS reprimiert (Sondén & Uhlin, 1996). Bakterien mit funktionellem H-NS zeigen in Vollmedium eine transiente Induktion von StpA in der exponentiellen Phase, und in Minimalmedium ist eine stark Lrp-abhängige Induktion zu beobachten (Free & Dorman, 1997). Osmotischer Stress wirkt ebenfalls induzierend auf die Expression von StpA. Zusammenfassend sind H-NS und StpA sowohl in ihrer Expressionsregulation, als auch in gemeinsamen Funktionen über ein regulatorisches Netzwerk verknüpft. StpA kann durchaus als molekularer *Backup* für H-NS funktionieren, obwohl auch eindeutig getrennte regulatorische Funktionen existieren (Williams & Rimskey, 1997).

1.5 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Genredundanz ist in prokaryontischen Genomen eher ungewöhnlich, daher stellt sich unweigerlich die Frage, warum die ribosomalen Operons in Prokaryonten in unterschiedlichen, für den einzelnen Organismus aber hochkonservierten Anzahl existieren. Die einfachste Erklärung ist die Gewährleistung hoher Transkriptionsraten aufgrund großer Genkopienzahl. Dass die Kapazität der Transkriptionsraten der einzelnen Operons allerdings noch zu steigern ist, zeigen Genotypen, bei denen ein oder mehrere rRNA-Operons deletiert wurden. Hier wird die Gesamttranskription durch Erhöhung der Raten der verbliebenen Operons kompensiert. Vorstellbar ist allerdings auch eine differentielle Regulation der sieben Operons, denn *Escherichia coli* adaptiert sehr schnell und effizient an die unterschiedlichsten Habitate. Die Synthese differentieller Produkte (Ribosomen) wäre daher ebenfalls ein mögliches Szenario.

Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung dieser Fragen beitragen. Bisher wurden die Regulationsmechanismen der ribosomalen RNA-Gene sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in erster Linie am *rrnB*-Operon untersucht. Die *upstream*-Region gilt als Zielsequenz vielfältiger Regulationsmechanismen. Da diese Bereiche in den sieben Operons auffällige Abweichungen voneinander aufweisen, schien die gezielte Analyse möglicher Unterschiede in den regulatorischen Abläufen an diesen Sequenzen sinnvoll.

Zu Beginn der Arbeit standen sechs der sieben zu untersuchenden Testplasmide mit dem Reportergen für die Chloramphenicolacetyltransferase unter Kontrolle des jeweiligen P1-Promotors und seiner UAS-Region zur Verfügung. Zunächst sollte diese Anzahl (Klonierung der *rrnE*-UAS-Region) vervollständigt werden. Die weitere Konzeption war zweigeteilt, es sollten einerseits *in vitro* Konformationsanalysen der UAS-Regionen durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten die Frage nach unterschiedlicher Ausprägung intrinsischer Krümmung beantworten. Ergänzt werden sollten diese Arbeiten durch Bindungsstudien in Form von Gelverzögerungsexperimenten mit den Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS in ähnlicher Form, wie sie bereits am *rrnB*-Operon durchgeführt wurden. Potentielle FIS-Bindestellen waren für alle Operons postuliert, aber weder für FIS noch für H-NS lagen Daten (z. B. Bindekonstanten) aller sieben Operons zur Faktorbindung vor. Detailliertere Informationen über die Bindepositionen sollten anhand von *footprint*-Analysen erhalten werden.

Der zweite Teil der Arbeit war auf Expressionsuntersuchungen *in vivo* ausgerichtet. Hierzu sollten die Testplasmide in isogenen *Escherichia coli* Stämmen mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktormutationen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Die zu analysierenden Transkriptionsfaktormutationen betrafen die Proteine H-NS, FIS und H-NS/FIS und H-NS/StpA als Doppelmutation. Da keine isogenen Stämme aller Mutationen zur Verfügung standen, wurde zu jedem mutanten Stamm der entsprechende Wildtyp parallel untersucht.

Die Transkriptmengen des Reportergens sollten bei hohen und niedrigen Wachstumsraten, sowie nach einem 'upshift' und nach dem Auslösen stringenter Kontrolle gemessen werden. Zur Transkriptmengenbestimmung waren Primer Extension-Analysen mit anschließender Transkriptquantifizierung vorgesehen.

2 ERGEBNISSE

2.1 Die Klonierung der regulatorischen UAS-Fragmente der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons von *Escherichia coli*

Bakterielles Wachstum ist abhängig von der Proteinsynthesekapazität der Zelle. Die maximale Translationsrate eines einzelnen Ribosoms liegt bei 20 Aminosäuren pro Sekunde (Engbaek *et al.*, 1973). Die Steigerung der Proteinsynthesekapazität erfolgt über zunehmende Ribosomensynthese, diese ist über einen Translationsrückkopplungsmechanismus an die Menge verfügbarer rRNAs geknüpft. Die Untersuchung der Transkriptionsregulation ribosomaler RNA-Operons erfordert somit ein Expressionssystem, das von der posttranskriptionellen Regulation weitestgehend entkoppelt ist. Durch die Klonierung der regulationsvermittelnden Sequenzen (UAS) in ein messbares Expressionssystem können die zu untersuchenden Regulationsparameter vergleichbar analysiert werden. Die Transkription des Gens für die Chloramphenicolacetyltransferase unter Kontrolle der ribosomalen P1-Promotoren ermöglicht die Messung der Transkriptionsraten *in vivo*, die durch die regulatorischen Sequenzen bedingt sind. Mit Ausnahme der UAS des *rrnE*-Operons wurden die Klonierungen bereits ausführlich beschrieben (Annette Hillebrand, 1998). Durch PCR (5.3.1) wurden die Zielsequenzen aus genomischer DNA des *E. coli* Stammes HB101 mit spezifischen Primern amplifiziert. Sechs UAS-Fragmente von sieben Operons konnten mit dieser Methode problemlos amplifiziert und kloniert werden, es resultierten die Plasmide pHD1-A bis pHD1-H analog zu den Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnG* und *rrnH*. Für die Klonierung des siebten Fragmentes (pHD1-E, *rrnE*-Operon) wurde eine andere Strategie gewählt.

2.1.1 Klonierung des UAS-Promotorfragmentes des *E. coli rrnE*-Operons

Zur Amplifizierung des UAS-Fragmentes des ribosomalen *rrnE*-Operons über chromosomale *E. coli* DNA wurde die beschriebene Methode geringfügig modifiziert, da eine Vielzahl von PCR-Reaktionen nachweislich nicht zum gewünschten Produkt, sondern zur Amplifikation anderer DNA-Bereiche des *E. coli* Genoms führten. Zunächst wurde mittels der Desoxyoligonukleotide Oligo *rrnE*5/3 und Oligo 3-3 in einer PCR-Reaktion (5.3.1) ein 559 Basenpaar großes Fragment amplifiziert, das ebenfalls die UAS-Sequenz des *rrnE*-Operons enthält, jedoch stromaufwärts vom P1-Promotor einen längeren Abschnitt der *E. coli* DNA wiedergibt. Der PCR-Ansatz wurde mit den Restriktionsenzymen *Fs*pl, *Hae*III, *Dde*I und *Hha*I kartiert (5.2.7.1). Die Sequenz und die Positionen der Erkennungssequenzen der einzelnen Restriktionsenzyme sind in der Abbildung 2.1 dargestellt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das Produkt der ersten PCR als Template eingesetzt um mit den Desoxyoligonukleotiden Oligo 5-E und Oligo 3-3 das ursprünglich konzipierte DNA-Fragment von 290 Basenpaaren zu

amplifizieren. Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein QUIAGEN-Präparationskit geleuliert. Vor der Klonierung des Fragmentes korrekter Länge wurde dies ebenfalls durch Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *HaeIII* und *FspI* analysiert. Das Fragment wurde in einer Ligationsreaktion (5.2.7.2) mit dem *SmaI* restringierten (linearierten) Vektor ligiert (Vektor:Fragment=1:50) und der *E. coli* Stamm HB101 (4.2.1) mit dem Ligationsansatz transformiert. Durch die P1-Promotor vermittelte Expression des Chloramphenicolacetyltransferasegens war die phänotypische Selektion auf Chloramphenicol- und vektorvermittelte Ampicillinresistenz über selektive Agarplatten möglich. Von solchen positiven Kolonien wurde zunächst über 'Minipräp' Plasmid-DNA isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Eco91I* und *FspI* hydrolisiert und auf einem Agarosegel (5.2.8.1) analysiert. Zellen, deren Plasmid-DNA das gewünschte Restriktionsmuster aufwiesen, wurden zur Plasmidpräparation ('Maxipräp', 5.2.4.1) verwendet. Die präparierte Plasmid-DNA wurde mit den Enzymen *BamHI*, *Eco91I*, *EcoRI*, *FspI* und *PstI* restriktionskartiert und anschließend sequenziert (5.3.2). Die Sequenzierung ergab das Fehlen der in der Sequenz angegebenen Nukleotide an Position 287 und 288 des 290 Basenpaar-Fragmentes, was jedoch auf die geplanten Untersuchungen keinen Einfluss hatte.

Der Klonierungsvektor pKK232-8 sowie das Plasmid pHD1-E sind im Abschnitt 'Material' in der Tabelle 4.1 dargestellt.

5'-GGGTCTTCAC Oligo <i>rrnE5/3</i>	GCGTCCATCC	ATCATCTCCG	GGAAACCGGT	GTAATCGGAA	ACTTCGGTTA
CCGGCAGACC	TTTTTCTGCT	AACAGACGGG	CAGTGCCCCC	TGTAGACAGC	AGCTCCACAC
CGCGTGCGGA	AAGTGCTGG	GCGAATTCGA <i>EcoRI</i>	CGATACCGGC	TTTGTGAGAA	ACACTGAGCA <i>DdeI</i>
GAGCGCGGCG <i>HhaI</i>	GACTGGACGA	CGTTGTTGCA	TGGTAAATCC	CCTGGATTG	ACTATTACAG
AGAGCGTTAG	CTGAATTTT	CGCGAAAAAC <i>DdeI</i>	TCAGCTAACG Oligo 5-E	CCCCTAACGG	GGCATCCTTA
TTTTTCGCCC	GCATTGTAAC	GAAAACGTT <i>FspI/HhaI</i>	GCGCAACGCT	CGCGAATTTT	TCTCTTTCAA
TGGTGATCAC	AATTTTGA	GTGGTTACCG	TGGGCAAAAT	ACAGAAATTA	CATTGATGAT
TGTGGATAAC	TCTGTGCGTA	AAAAGGTATA	AAGCGGGCTT	TTGCTGGGGA	ATGCAGCAGT
CAGTCATTTT	TCTGCAATTT	TTCTATTGCG <i>HaeIII</i>	GCGTGC GGAG	AACTCCCTAT	AAT GCGC CTC <i>HhaI</i>
CATCGACACG	GCGGATGTG-3'	Oligo 3-3 bindet hier, <u>TG</u> fehlen im klonierten Fragment			

Abb. 2.1 Sequenz des *rrnE*-UAS-Fragmentes (559 Basenpaare, Nichtmatritzenstrang)

Die Sequenzen der Oligos *rrnE5/3* und Oligo 5-E sowie die komplementäre Sequenz von Oligo 3-3 sind fett gedruckt. Die Erkennungssequenzen der zur Analyse eingesetzten Restriktionsenzyme sind grau hinterlegt dargestellt.

2.2 *In vitro* Analysen der sieben verschiedenen UAS-Regionen der ribosomalen RNA-Operons

Die UAS-Regionen der ribosomalen P1-Promotoren sind Zielsequenzen verschiedener Transkriptionsregulationsmechanismen. Die spezifische Interaktion der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS mit der UAS-Region des *rrnB* P1-Promotors wurde bereits beschrieben (Ross *et al.*, 1990; Tippner *et al.*, 1994). Sowohl FIS als auch H-NS binden bevorzugt intrinsisch gekrümmte DNA. So zeigten z. B. Zacharias *et al.* (1992) die Notwendigkeit der Krümmung für eine stabile FIS-Bindung und die bevorzugte Bindung von H-NS an gekrümmte DNA wurde unter anderem von Yamada *et al.* (1990) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Krümmung der sieben UAS-Regionen vergleichend untersucht. Es wurden K-Wert-Berechnungen (5.3.3.1) durchgeführt, um das jeweilige Ausmaß der Krümmung zu untersuchen. Ergänzend wurden dazu anhand von Computerberechnungen mit dem Programm *DIAMOD* ((Display and modeling of DNA), Dlakic & Harrington, 1998) theoretische Krümmungsberechnungen durchgeführt und mögliche Strukturen visualisiert (Programm *POV Ray*).

Darüberhinaus wurde die Wechselwirkung der histonähnlichen Proteine FIS und H-NS mit den UAS-Regionen aller sieben P1-Promotoren in Gelshift-Experimenten untersucht und Bindekonstanten der Regulatorproteine an die verschiedenen DNA-Fragmente bestimmt.

2.2.1 Vergleichende K-Wert-Bestimmungen aller sieben Promotorfragmente

Der K-Wert (Diekmann & McLaughlin, 1988) ist ein Anhaltspunkt für intrinsische Krümmung eines DNA-Fragmentes und ermöglicht eine vergleichende Analyse differentieller Krümmungsausmaße. Über Position und Anzahl der Krümmungszentren auf dem untersuchten Fragment gibt er keinen Hinweis.

Ein unterschiedliches Krümmungsausmaß wurde bereits von D. Tippner (1994) für die *rrn*-Fragmente der Operons *rrnA*, *rrnB* und *rrnD* gezeigt. Diese Ergebnisse konnten bereits bestätigt werden (A. Hillebrand, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden die K-Werte aller sieben Operons erneut bestimmt, um einen direkten Vergleich mit dem neu klonierten Fragment des *rrnE*-Operons zu ermöglichen. Zur Untersuchung der sieben Promotorfragmente bezüglich der Migration in Polyacrylamidgelen bei unterschiedlichen Temperaturen (5.3.3.1) wurden *EcoRI*/*PstI*-Restriktionsfragmente der pH₈-Plasmide isoliert. Da die *SmaI* Schnittstelle durch die Ligation nicht regeneriert wurde, mussten periphere Restriktionsschnittstellen des Vektors gefunden werden. Es wurden die Enzyme *EcoRI* und *PstI* (siehe hierzu die Plasmidkarten, S.80) gewählt und die Fragmente wie bereits beschrieben (Annette Hillebrand, 1998) restringiert und über Elektroelution aufgereinigt (5.2.12). Zur Ermittlung der K-Werte wurden die gereinigten DNA-Fragmente bei zwei verschiedenen Temperaturen auf nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (5.3.3.1) und die K-Werte berechnet. Die

beiden Gele sind in der Abbildung 2.2 dargestellt und die K-Werte in der Tabelle angegeben. Die Daten aus der Diplomarbeit (A. Hillebrand, 1998) konnten bestätigt und für das *rrnE*-Fragment der niedrigste K-Wert ermittelt werden. Das Gel bei 2°C zeigt eine Verteilung thermodynamisch möglicher Strukturen um eine Hauptkonformation.

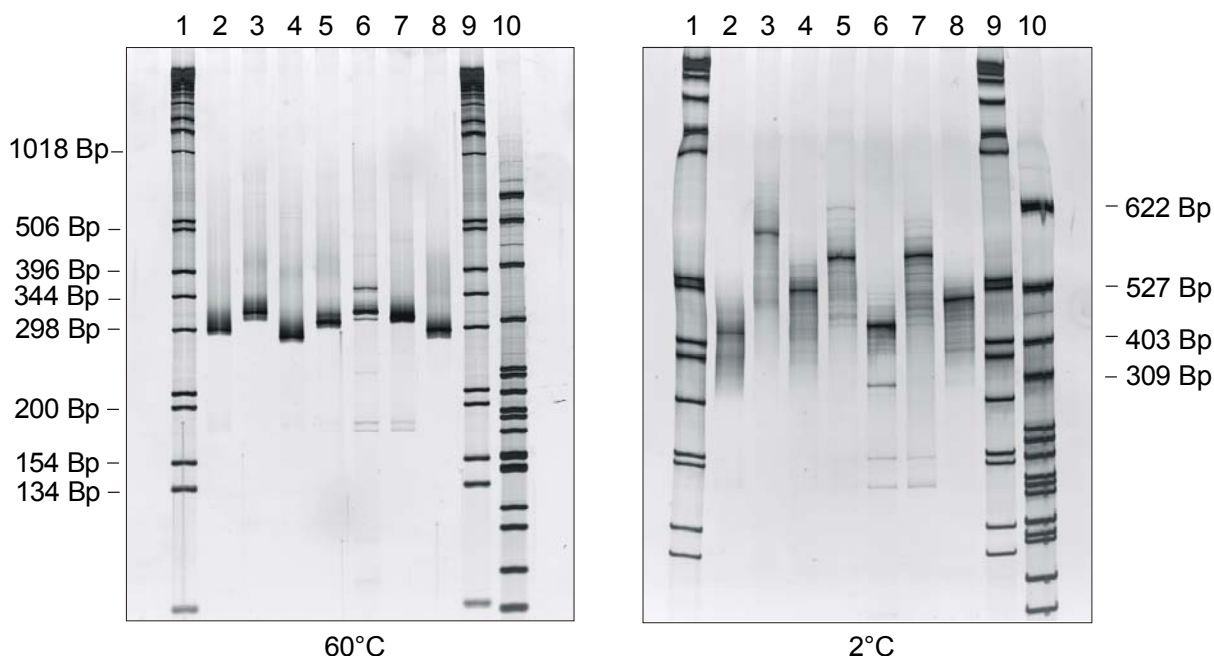


Abb. 2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese zur K-Wert Bestimmung

Links: Auftrennung der Fragmente bei 60°C. Spur 1 zeigt einen Molekulargewichtsmarker (kB-Leiter), die Fragmentlängen der relevanten Fragmente sind angegeben. Die Spuren 2-8 zeigen die UAS-Fragmente in der Reihenfolge *rrnA-rrnH*. Spur 9 enthält die kB-Leiter und in Spur 10 wurde ein Restriktionsansatz des Plasmids pBR322 mit den Enzym *HpaI* aufgetrennt.

Rechts: Auftrennung der Fragmente bei 2°C. Die Auftragsreihenfolge entspricht der auf dem linken Gel. Aus diesem Gel wurden die apparenten Fragmentlängen zur K-Wert Bestimmung ermittelt. Aus früheren Daten (Diplomarbeit A. Hillebrand, 1998) ist bekannt, dass einzelne Restriktionsfragmente des Plasmids pBR322 ebenfalls gekrümmt sind, daher wurden zur Erstellung der Eichgeraden nur die Laufstrecken der Fragmente der kB-Leiter (1018 bis 134 Bp) berücksichtigt.

Die Mobilitätsunterschiede bei den experimentellen Temperaturen 2°C und 60°C sind deutlich sichtbar. Bei der hohen Temperatur entsprechen die apparenten Fragmentlängen nahezu den tatsächlichen, es gibt lediglich eine Abweichung von 3-5 % zu einer größeren Fragmentlänge. Bis auf das *rrnB*-Fragment entspricht die Reihenfolge der apparenten Fragmentlängen (60°C) der Reihenfolge der Fragmentgrößen. Alle sieben Fragmente zeigen bei der niedrigen Temperatur eine geringere Mobilität als bei 60°C. Auffällig ist besonders die starke Verzögerung des *rrnB*-Fragmentes und die geringe Verzögerung der Fragmente *rrnA* und *rrnE* bei 2°C. Für die Eichgerade ($y = a + bx$) wurden folgende Geradengleichungen ermittelt (5.3.3.1):

$$60^{\circ}\text{C}: y = 3.091 - 0.085 x$$

$$2^{\circ}\text{C}: y = 3.234 - 0.086 x$$

Anhand dieser Gleichungen konnte jeder Laufstrecke x der *rrn*-Fragmente eine appa-

rente Fragmentlänge zugeordnet werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Fragmentlängen, die apparenten Fragmentlängen bei den Temperaturen 2°C und 60°C sowie die experimentell ermittelten K-Werte (2°C) dargestellt.

UAS-Fragment	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	<i>rrnC</i>	<i>rrnD</i>	<i>rrnE</i>	<i>rrnG</i>	<i>rrnH</i>
Fragmentlänge [Bp]	288	308	277	293	316	301	279
app. " 60°C [Bp]	299	326	287	311	323	314	293
app. " 2°C [Bp]	407	738	501	593	419	599	482
K-Wert (2°C)	1.41	2.40	1.81	2.02	1.33	1.99	1.73

Tab. 2.1 Apparente Fragmentlängen und K-Werte der UAS-Fragmente

Das *rrnB*-Fragment zeigt anhand des höchsten K-Wertes die stärkste Krümmung, es folgen *rrnD* und *rrnG*, weiter in abnehmender Reihung *rrnC*, *rrnH*, *rrnA* und *rrnE*.

2.2.2 Die Berechnung von DNA-Krümmung mit dem Computerprogramm *DIAMOD*

Zur Berechnung und Darstellung von DNA-Krümmung sind verschiedene PC-Programme erhältlich (Shpigelman *et al.*, 1993; Tung & Carter, 1994; Jursa, 1994; Bansal *et al.*, 1995; Dlakic & Harrington, 1998). Für diese Arbeit wurde mit dem Programm *DIAMOD* von Mensur Dlakic gearbeitet. Das Programm ist für akademische Forschungszwecke frei erhältlich (<http://www-personal.umich.edu/~mensur/software.html>). Es basiert auf verschiedenen Strukturvorhersagemodellen, die über kristallographische Arbeiten, NMR-Daten, Gelshift-Daten oder der Herleitung theoretischer Daten erstellt wurden (Satchwell *et al.*, 1986; De Santis *et al.*, 1990; Bolshoy *et al.*, 1991; Goodsell & Dickerson, 1994; Bansal *et al.*, 1995; Brukner *et al.*, 1995; Gorin *et al.*, 1995; Ulyanov & James, 1995). *DIAMOD* ermöglicht die Anwendung verschiedener Modelle auf zu untersuchende DNA-Sequenzen. Es wird zwischen repetitiven und nicht-repetitiven Sequenzen unterschieden und man kann diverse Di-, Tri- oder Tetranukleotidmodelle für die Strukturvorhersage einer beliebigen Sequenz auswählen. Weiterhin berechnet das Programm die End- zu End-Abstände eines theoretisch völlig ungekrümmten Fragmentes (*IDEAL*). Die erhaltenen Daten sind als unterschiedliche Ausgabedateien zu speichern und diese ermöglichen die Bearbeitung mit diversen Programmen zur Visualisation. Das Abspeichern als 'PDB Datei' erlaubt die weitere Bearbeitung im frei erhältlichen Programm *RasMol* (Sayle & Milner-White, 1995). 'Postscript Dateien' (ps) können direkt mit Postscript-Druckern ausgedruckt werden. 'Persistence of Vision Dateien' (PoV) können mit dem ebenfalls frei erhältlichen Programm *POV-Ray* (<http://www.povray.org>) dargestellt werden. Die hier untersuchten ribosomalen UAS-Fragmente wurden mit den vier Trinukleotidmodellen nach Brukner, Goodsell, Gabriel und *IDEAL* untersucht. Die jeweils erhaltenen End- zu End-Abstände wurden zum theoretischen End- zu End Abstand eines ungekrümmten Fragmentes gleicher Sequenz ins Verhältnis gesetzt. In der Abbildung 2.3 sind die berechneten Strukturen nach Gabriel (visualisiert in *POV-Ray*) dargestellt.

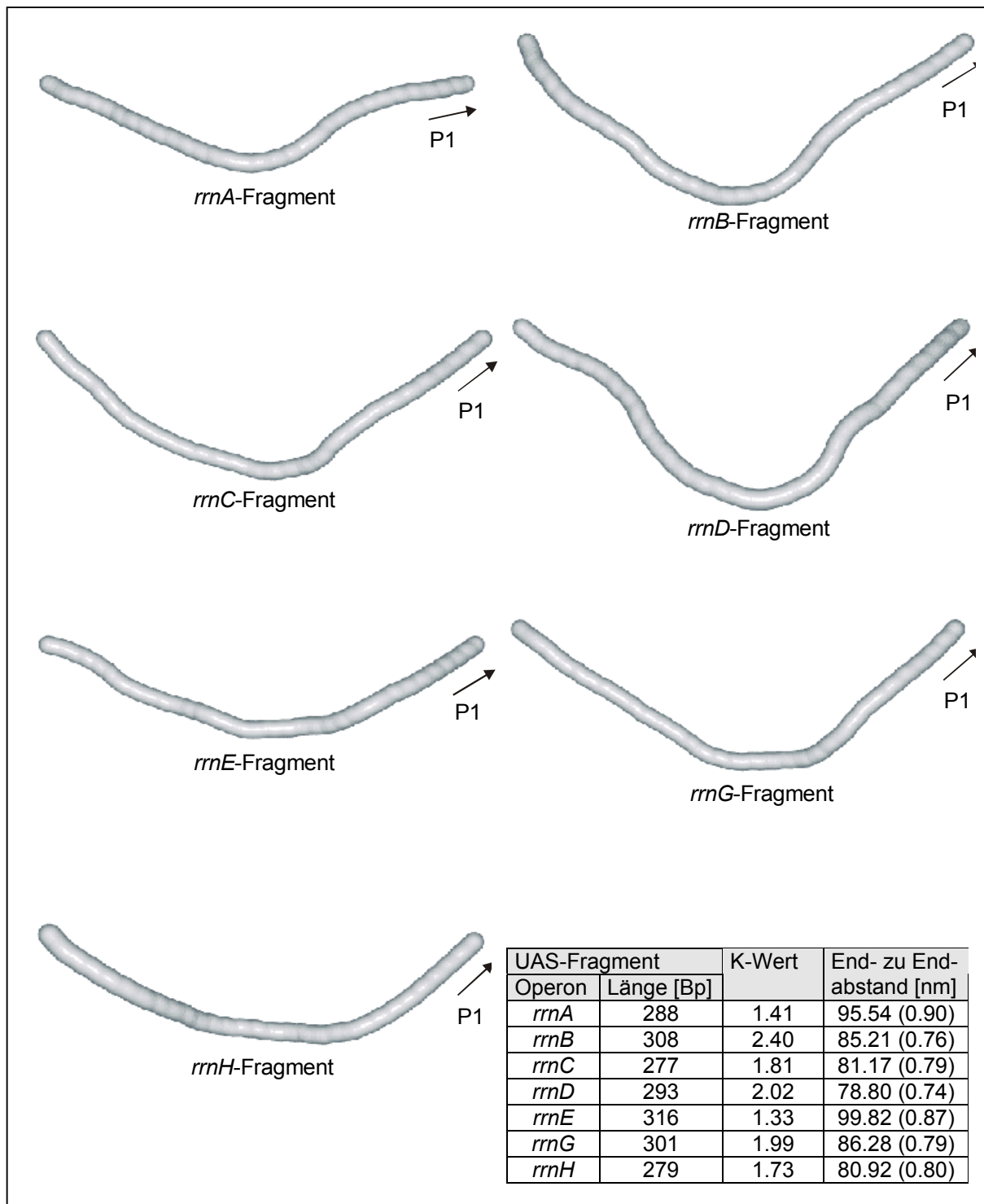


Abb. 2.3 Darstellung der gekrümmten UAS-Fragmente

Nach Berechnung der Krümmung mit dem Programm *DIAMOD* wurden die berechneten Strukturen im Programm *POV-Ray* visualisiert. In dieser Abbildung wurden die gleichen Darstellungsebenen und Blickwinkel für alle sieben Fragmente gewählt. Die Transkriptionsstartstellen der P1-Promotoren sind durch Pfeile markiert. In der Tabelle sind die Fragmentgrößen, die experimentell bestimmten K-Werte sowie die im Programm *DIAMOD* ermittelten End- zu End-Abstände angegeben. Die berechneten Verhältnisse der End- zu End-Abstände der gekrümmten Fragmente zu theoretisch ungekrümmten Strukturen gleicher Sequenz sind in Klammern angegeben. Diese Parameter korrelieren bei Übereinstimmung experimenteller und berechneter Daten invers zum K-Wert.

Die berechneten Strukturen zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte Krümmung im Bereich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart. In der Abbildung wurde die Darstellung in der Ebene der stärksten Krümmung gewählt, die durch das Programm bestimmt wird, um einen objektiven Vergleich zu gewährleisten. Sehr deutlich zu erkennen ist auch hier eine vergleichsweise geringe Krümmung im *rrnE*-Fragment. Die starke Krümmung in den Fragmenten *rrnB*, *rrnD* und *rrnG* ist ebenfalls klar zu beobachten. Deutlich werden bei genauer Betrachtung jedoch Unterschiede in der räumlichen Ausrichtung der Krümmung, insbesondere beim *rrnD*-Fragment im Vergleich zu *rrnB* und *rrnG*. *DIAMOD* ermöglicht zur Darstellung auch die Drehung um die x-, y- und z-Achse. In der folgenden Abbildung sind die Fragmente *rrnB* und *rrnD* exemplarisch in Varianten der Drehung um x- und y-Achse abgebildet.

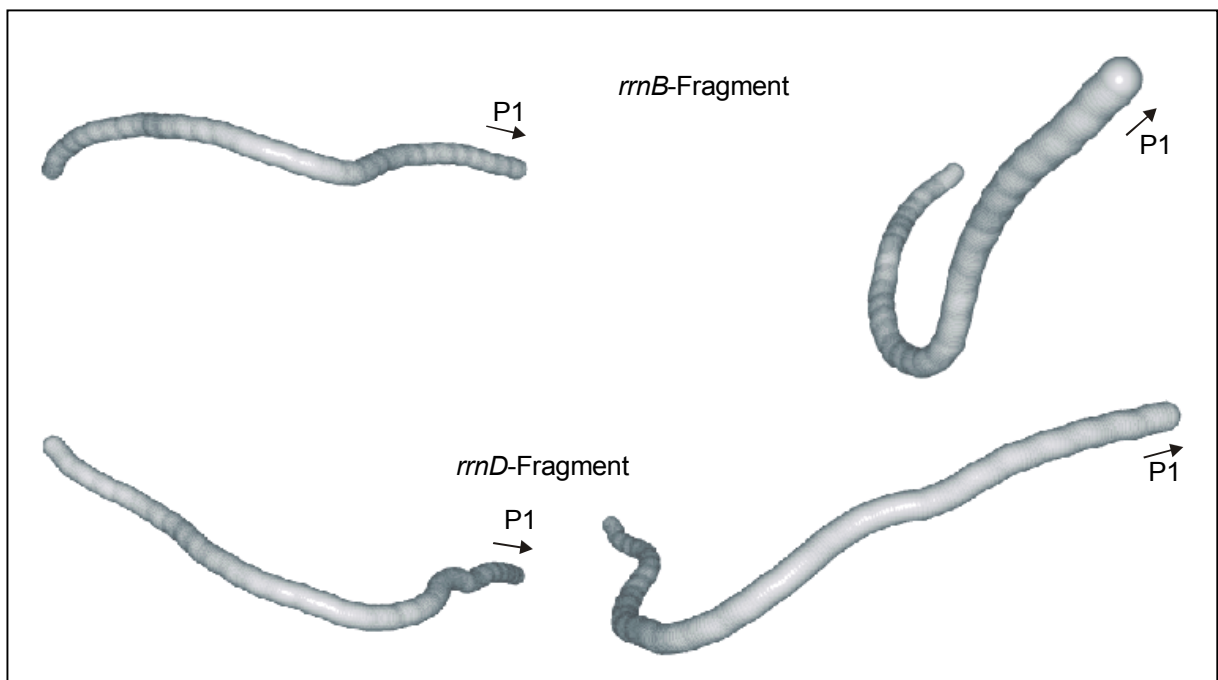


Abb. 2.4 Darstellungsvarianten der Fragmente *rrnB* und *rrnD* aus dem Programm *DIAMOD*

Im oberen Teil der Abbildung wird das *rrnB*-Fragment, im unteren Teil das *rrnD*-Fragment gezeigt. Die Transkriptionsstartstellen der P1-Promotoren sind durch Pfeile markiert. Die unterschiedliche Darstellungsebene wurde durch Drehung um die x- und y-Achse erhalten (*DIAMOD*).

Durch Drehung in der Ebene wird die Krümmung der DNA-Fragmente noch eindeutiger dargestellt. Die beiden Fragmente *rrnB* und *rrnD* weisen nach den K-Wert-Analysen (2.2.1) die höchsten K-Werte auf. Aus Abbildung 2.4 ist die starke Krümmung klar zu ersehen, deutlich wird aber auch die differentielle Ausrichtung der einzelnen Krümmungszentren. Neben den unterschiedlichen Abbildungsebenen können wie bereits erwähnt verschiedene Strukturberechnungsmodelle eingesetzt werden. Hier wurden die Sequenzen nach vier Trinukleotidmodellen berechnet. Die einzelnen Modelle geben leicht variierende End- zu End-Abstände der sieben Fragmente an. In Tabelle 2.2 sind alle Werte der verschiedenen Berechnungsmodelle sowie die jeweils resultierenden Verhältnisse zum End- zu End- Abstand des theoretisch ungekrümmten Fragmentes aufgelistet.

			Berechnungsmodell End- zu End-Abstand in nm				Verhältnisse der End- zu End-Abstände		
Fragment	Bp	K-Wert	<i>IDEAL</i>	<i>Brukner</i>	<i>Gabriel</i>	<i>Goodsell</i>	<i>Brukner/</i> <i>IDEAL</i>	<i>Gabriel/</i> <i>IDEAL</i>	<i>Goodsell/</i> <i>IDEAL</i>
<i>rrnA</i>	288	1.41	106.18	96.65	95.54	89.95	0.91	0.90	0.85
<i>rrnB</i>	308	2.40	112.25	93.34	85.21	70.27	0.83	0.76	0.63
<i>rrnC</i>	277	1.81	102.11	91.80	81.17	64.85	0.90	0.79	0.64
<i>rrnD</i>	293	2.02	106.86	77.21	78.80	79.78	0.72	0.74	0.75
<i>rrnE</i>	316	1.33	114.62	103.28	99.82	91.39	0.90	0.87	0.80
<i>rrnG</i>	301	1.99	109.55	73.55	86.28	93.36	0.67	0.79	0.85
<i>rrnH</i>	279	1.73	101.43	80.99	80.92	80.24	0.80	0.80	0.79

Tab. 2.2 End- zu End-Abstände der UAS-Fragmente nach vier Berechnungsmodellen

Mit Ausnahme der Fragmente *rrnD* und *rrnG* berechnet das Modell nach *Goodsell* die kürzesten End- zu End-Abstände und das Modell nach *Brukner* jeweils die längsten, während das Modell nach *Gabriel* bei allen Fragmenten einen mittleren Wert angibt.

Das Verhältnis der End- zu End- Abstände gekrümmter zu ungekrümmter Fragmente gleicher Länge und Sequenz korreliert invers zum K-Wert. Anhand der berechneten Abstandsverhältnisse aus Tabelle 2.2 lassen sich für alle drei Berechnungsmodelle Reihungen über das Krümmungsausmaß aufstellen. Diese Reihenfolge ist im Vergleich zur K-Wert erstellten Reihung in Tabelle 2.3 dargestellt.

Reihung nach <i>Modell</i> bzw. K-Wert	Krümmungsausmaß der UAS-Fragmente
K-Wert	<i>rrnB</i> > <i>rrnD</i> > <i>rrnG</i> > <i>rrnC</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnA</i> > <i>rrnE</i>
<i>Brukner</i>	<i>rrnG</i> > <i>rrnD</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnC</i> = <i>rrnE</i> > <i>rrnA</i>
<i>Gabriel</i>	<i>rrnD</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnG</i> = <i>rrnC</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnE</i> > <i>rrnA</i>
<i>Goodsell</i>	<i>rrnB</i> > <i>rrnC</i> > <i>rrnD</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnE</i> > <i>rrnG</i> = <i>rrnA</i>

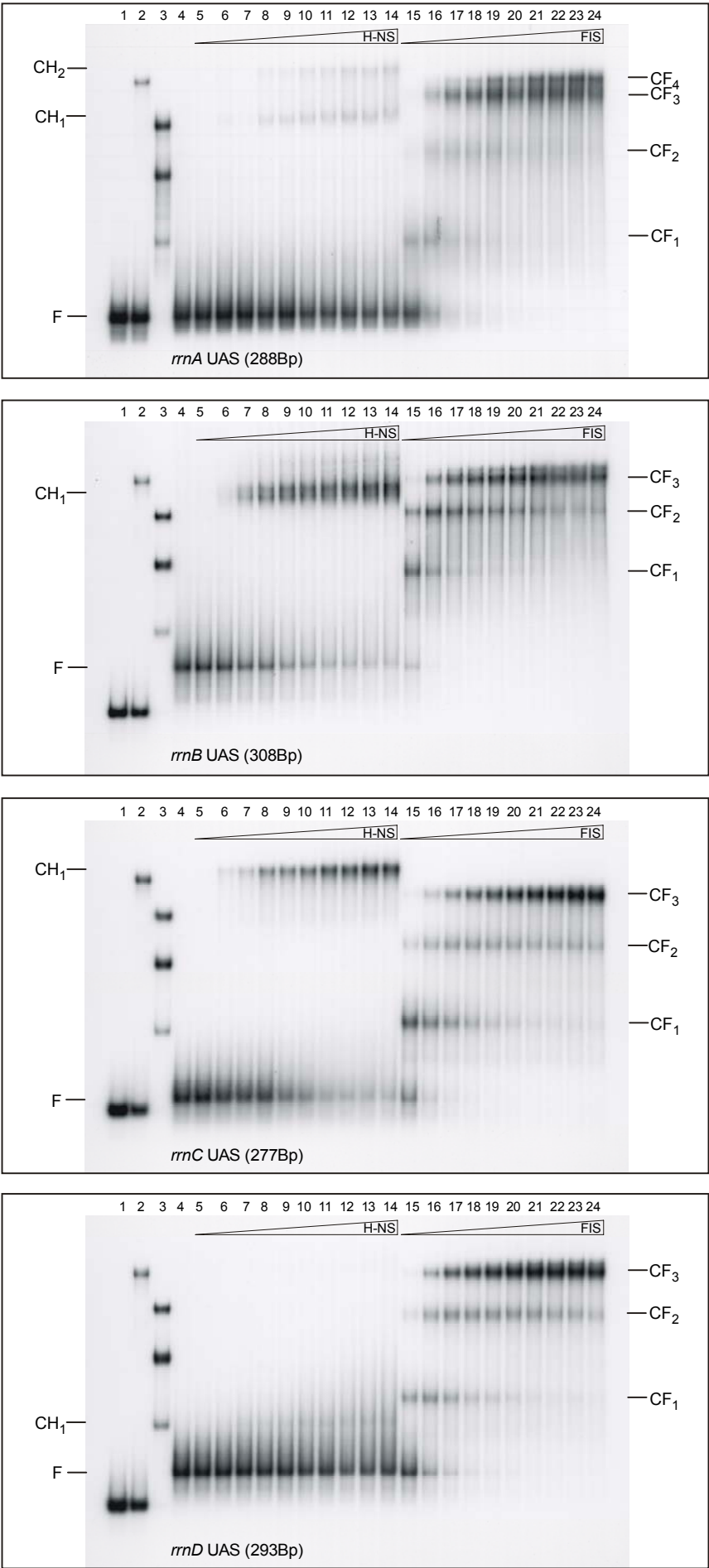
Tab. 2.3 Reihenfolge nach Krümmungsausmaß anhand verschiedener Berechnungsmodelle

Die drei Trinukleotidmodelle nach *Brukner*, *Gabriel* und *Goodsell* führen zu unterschiedlichen Reihenfolgen, allerdings muss hierbei der absolute Abstand der Werte zueinander berücksichtigt werden. Die Berechnung nach dem Modell *Gabriel* führt zu einer relativ guten Übereinstimmung mit der Reihung anhand des experimentell bestimmten K-Wertes. Aus diesem Grunde wurde für die vergleichende Abbildung 2.3 der visualisierten Fragmente die Darstellung nach diesem Modell gewählt.

Die Daten der experimentellen K-Wert-Bestimmungen und der computergestützten Konformationsanalyse der ribosomalen UAS-Fragmente zeigen eine differentielle Krümmung aller sieben Fragmente. Die berechneten Strukturen weisen auf mögliche Unterschiede in der Ausrichtung der Krümmung von Fragmenten mit ähnlichen K-Werten hin (Abb. 2.4). Diese theoretischen Daten bieten in jedem Fall eine Grundlage zu Diskussion der weiteren experimentellen Ergebnisse der Gelshiftuntersuchungen oder der später beschriebenen *in vivo* Experimente.

2.2.3 Gelverzögerungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung aller UAS-Fragmente mit den Transkriptionsfaktoren H-NS und FIS

Einleitend wurde bereits die Affinität der Transkriptionsfaktoren H-NS und FIS zu gekrümmter DNA beschrieben. Beide Proteine besitzen neben ihrer transkriptionsregulatorischen Eigenschaften die Fähigkeit, Krümmung zu induzieren (Afflerbach *et al.*, 1999; Tippner *et al.*, 1994; Thompson & Landy, 1988; Finkel & Johnson, 1992). In Gelverzögerungsexperimenten wurde die Bindung beider Proteine an die ribosomalen RNA Operons *rrnA*, *rrnB* und *rrnD* in unterschiedlicher Affinität gezeigt (Tippner *et al.*, 1994). Für die FIS-Bindung wird zusätzlich zur bevorzugten Bindung an gekrümmte DNA eine Konsensussequenz für die DNA-Erkennung beschrieben (Hübner & Arber, 1989; Verbeek *et al.*, 1990; Finkel & Johnson, 1992). Anhand dieser Konsensussequenz wurden drei potentielle FIS-Bindestellen in allen Operons an nahezu identischen Positionen relativ zum Transkriptionsstart gefunden (Condon *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von FIS und H-NS an alle sieben Operons durch Verzögerungsgelelektrophorese untersucht. Für diese Analysen wurden die gleichen Restriktionsfragmente eingesetzt, die in den K-Wert-Untersuchungen und Computerberechnungen Verwendung fanden. Die *EcoRI/PstI*-Fragmente wurden mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP über die Klenow-Reaktion endmarkiert (5.2.7.4) und in Standard-Retardierungsansätzen mit ansteigenden Mengen H-NS (0.9-9 μM) oder FIS (70-700 nM) inkubiert. Zur Kontrolle wurden Fragmente ohne Protein nur mit PG-Puffer (Lösungspuffer H-NS, 4.5) inkubiert. Zusätzlich wurde als Standard ein Restriktionsfragment (*EcoRI/BamHI*, 260 Bp) aus pUC18-1 eingesetzt. Dieses Fragment trägt die UAS-Region des *rrnB*-Operons mit dem P1-Promotor (-201 bis +59 relativ zum Transkriptionsstart) und entspricht dem Fragment, das in den Arbeiten von Afflerbach *et al.* (1999) und Schröder & Wagner (2000) in Gelshiftexperimenten eingesetzt wurde. Die 'upstream'-Region des *rrnB*-Operons besitzt drei FIS-Bindestellen, mit den Zentren an den Positionen -71, -102 und -143 relativ zum Transkriptionsstart (Tippner *et al.*, 1994). Diese drei Bindestellen werden in sukzessiver Folge durch Homodimere besetzt (Afflerbach *et al.*, 1999), im Verzögerungsgel sind abhängig von den eingesetzten Protein und DNA-Mengen drei Komplexe zu sehen. Diese zeigen die einzelnen Besetzungszustände, je nach Besetzung einer oder mehrerer FIS-Bindestellen. Im *rrnB*-Operon wurden ebenfalls drei Bindestellen für das H-NS-Protein nachgewiesen (Tippner *et al.*, 1994), deren Zentren sich an den Positionen -25, -50 und -80 relativ zum P1-Transkriptionsstart befinden. H-NS bindet ebenfalls als Homodimer, im Gegensatz zu FIS jedoch hoch kooperativ (Afflerbach *et al.*, 1999). Im Verzögerungsgel ist nur ein Komplex aufzulösen, bei dem alle drei Bindestellen besetzt sind. In den Konformationsanalysen konnte ein differentielles Krümmungsausmaß für die sieben UAS-Fragmente gezeigt werden, in den Gelshiftexperimenten sollte nun untersucht werden, ob eine differentielle Affinität zu den Regulatorproteinen festgestellt werden kann und diese mit den unterschiedlichen Krümmungen korreliert.



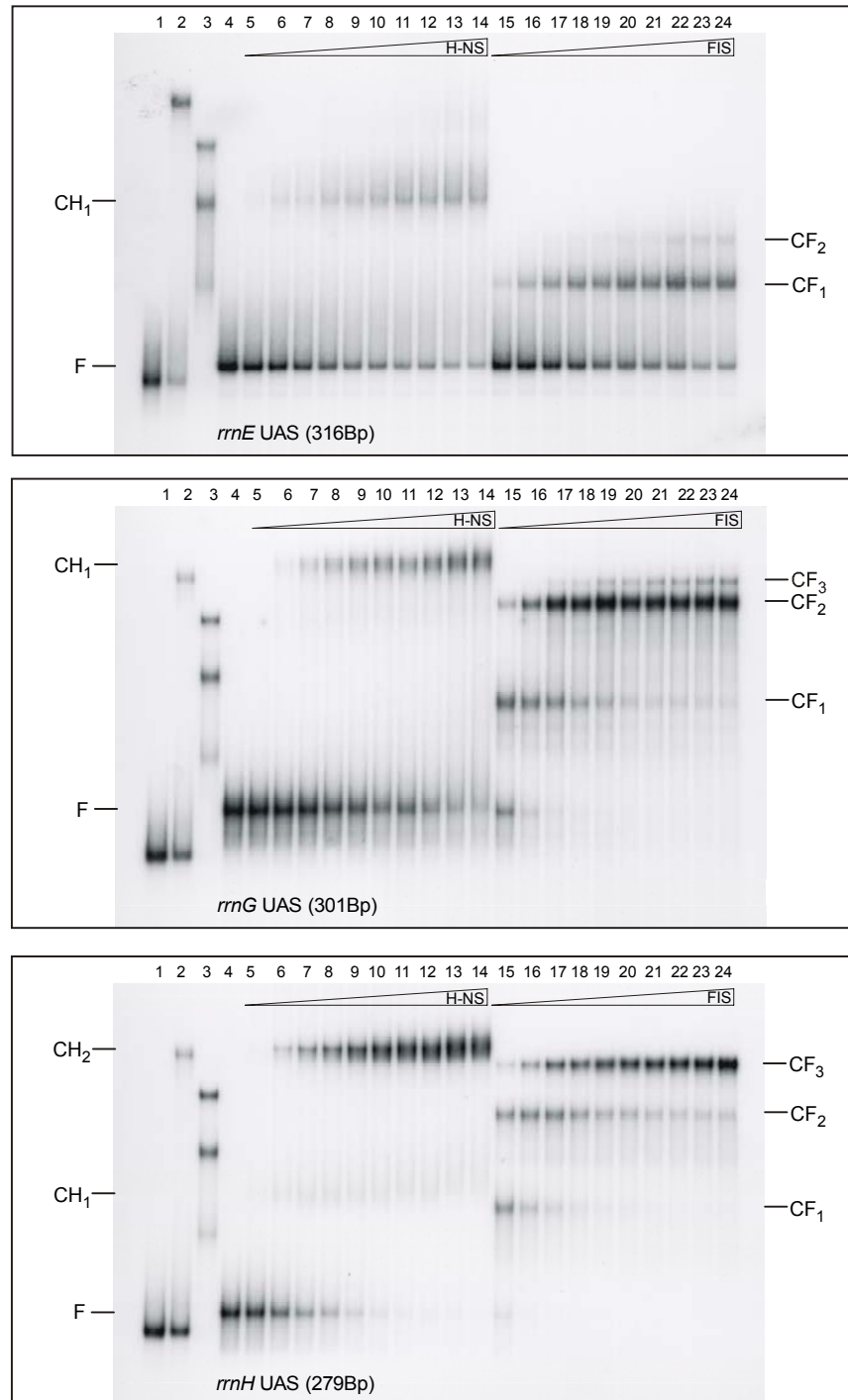


Abb. 2.5 Retardierungsanalysen aller sieben UAS-Fragmente

Die sieben einzelnen Bilder zeigen eine identische Probenanordnung, die untersuchten UAS-Fragmente (*EcoRI/PstI* Restriktionsfragmente) sind jeweils in der Abbildung angegeben. Die Spuren 1-3 zeigen das Kontrollfragment (*EcoRI/BamHI* Restriktionsfragment aus pUC18-1). DNA ohne Protein (Spur 1), DNA/H-NS (Spur 2, 2.7 µM H-NS), DNA/FIS (Spur 3, 210 nM FIS). Die Spur 4 zeigt jeweils das untersuchte UAS-Fragment ohne Protein. Die folgenden Spuren enthalten zunehmende Mengen H-NS (Spuren 5-14, 0.9-9 µM) und FIS (Spuren 15-24, 0.07-0.7 µM). Alle Bindeassays enthielten 150 ng/µl poly [d(IC)] als Kompetitor. Die Fragment-DNA (ebenso Kontrollfragment) wurde in einer Konzentration von 2 nM (4 ng/10 µl) im Assay eingesetzt. Die DNA/H-NS-Komplexe der untersuchten Fragmente sind mit CH_n und die DNA/ FIS-Komplexe mit CF_n bezeichnet. Das unkomplexierte Fragment ist mit F markiert.

In den Gelshift-Experimenten konnte erstmalig die Wechselwirkung aller sieben Operons mit den Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS nachgewiesen werden. Die Verzögerungsgele zeigen die Komplexierung aller sieben UAS-Fragmente mit den Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS, allerdings mit unterschiedlicher Affinität. Das Kontrollfragment weist die erwarteten Gelshiftmuster von einer H-NS-Komplexbande und den drei FIS-Komplexen auf. Die Proteinkonzentration der Kontrollspuren entsprechen jeweils den Spuren 7 und 17 der analysierten Fragmente. Die Ergebnisse der sieben untersuchten Fragmente werden nachfolgend operonweise aufgeführt.

1. *rrnA*-UAS-Fragment

Das *rrnA*-Fragment zeigt zwei stark verzögerte H-NS-Komplexbanden, die nahezu mit gleicher Intensität zu detektieren sind. Bezüglich der FIS-Bindung können vier Komplexe unterschieden werden, deren Intensitäten auf eine leichte Kooperativität bei der Bindung hinweisen.

2. *rrnB*-UAS-Fragment

Das *rrnB*-Fragment trägt Sequenzen der gleichen 'upstream'-Region wie das Kontrollfragment, zeigt jedoch einen leicht veränderten 'shift'. H-NS führt zu einer Komplexbande, die im Proteinkonzentrationsbereich von 1.8-7.2 μM fast wie eine Doppelbande erscheint. Weiterhin ist eine schwache Komplexbande geringerer Mobilität ab etwa 5.4 μM H-NS zu sehen. Diese erscheint allerdings im Originalfilm schwächer als im Druck. Der unterschiedliche 'shift' zum Kontrollfragment kann auf die veränderte Fragmentlänge und unterschiedliche Positionierung der UAS-Region auf dem Gesamtfragment zurückzuführen sein. Das Kontrollfragment trägt einen höheren Anteil der 'downstream'-Sequenz des *rrnB*-Operons und einen geringeren Anteil der 'upstream'-Sequenz verglichen mit dem hier untersuchten *rrnB*-Fragment. Dies kann zum veränderten 'shift' führen, da der starke H-NS-'shift' primär durch konformationelle Änderungen hervorgerufen wird. Die Verzögerung durch FIS führt zu 3 Komplexen (evt. auch 4, wenn CF_3 als Doppelbande gesehen wird), deren höherer 'shift' im Vergleich zum Kontrollfragment auf die größere Gesamtfragmentlänge (vgl. freie Fragmentbande, 260 versus 308 Bp) zurückgeführt werden kann.

3. *rrnC*-UAS-Fragment

Das *rrnC*-Operon zeigt nahezu gleiche Komplexbanden wie das Kontrollfragment, einen H-NS-Komplex sowie drei FIS-Komplexe. Das untersuchte *rrnC*-Fragment entspricht von der Fragmentlänge nahezu dem Kontrollfragment, vermutlich führen gleiche Bindungseigenschaften zum Gelshiftmuster.

4. *rrnD*-UAS-Fragment

Wie bereits von Tippner *et al.* 1994 beschrieben zeigt das *rrnD*-Operon nur eine ganz schwache H-NS-Komplexbande, obwohl anhand der Konformationsanalysen eine sehr starke Krümmung vorliegen muss. Der einzig vorliegende Komplex ist sowohl in der Intensität als auch in der Mobilität verglichen mit den anderen H-NS-Komplexen sehr stark verändert. Weiterhin ist keine Kooperativität zu beobachten. Das H-NS-Verzögerungsmuster kann einerseits auf veränderte Bindeeigenschaften (z.B. Lage des Krümmungszentrums auf dem Fragment) zurückzuführen sein, andererseits

könnte die geringe Bandenintensität aber auch auf eine beeinträchtigte Komplexstabilität hinweisen. Die FIS-Komplexe gleichen in Intensität und 'shift' den bisher beschriebenen Fragmenten *rrnB* und *rrnC*.

5. *rrnE*-UAS-Fragment

Das *rrnE*-Operon zeigt sowohl veränderte H-NS- als FIS-Bindung. Die H-NS-Bindung ist schwach und die Komplexmobilität zwar noch geringer als die des *rrnD*-Komplexes aber größer als die elektrophoretische Mobilität aller anderen Operons. Das *rrnE*-Fragment zeigt nur zwei schwache FIS-Komplexe, auch bei hohen FIS-Konzentrationen liegt noch freies, ungebundenes Fragment vor.

6. *rrnG*-UAS-Fragment

Die H-NS-Komplexierung des *rrnG*-Fragmentes entspricht in der Mobilität dem Kontrollfragment sowie *rrnC* und *rrnH*. Die Intensität ist *rrnC* vergleichbar. Die FIS-Komplexierung zeigt drei Komplexbanden, im Gegensatz zu allen anderen Operons ist der dritte Komplex CF₃ jedoch relativ schwach, die Besetzung der dritten Bindestelle zeigt keine Kooperativität.

7. *rrnH*-UAS-Fragment

Das *rrnH*-Operon zeigt den H-NS-Komplex der höchsten Intensität. Bei einer Konzentration von 7.3 µM H-NS liegen nur noch ca. 3 % ungebundenes Fragment vor, während es beim *rrnB*-Fragment bei dieser Konzentration immerhin noch 22 % sind. FIS zeigt das gleiche kooperative Bindeverhalten und ähnliche Mobilität wie bei den Fragmenten *rrnB*, *rrnC* und *rrnD*.

Eine Wertung der einzelnen Komplexe bezüglich Intensität und Mobilität wurde vorgenommen, um die Korrelation der Bindeeigenschaften zu den differentiellen Krümmungsausmaßen zu untersuchen. Hierzu wurde folgender Bewertungsschlüssel angewandt:

Intensität: XXX > XXx >> X > x
 Shift: **X/x fett**: hoch (Mobilität gering)
 X/x nicht fett: niedrig (Mobilität größer)

Operon	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	<i>rrnC</i>	<i>rrnD</i>	<i>rrnE</i>	<i>rrnG</i>	<i>rrnH</i>
H-NS-Komplex	X	XXx	XXx	x	X	XXx	XXX
FIS-Komplex	XXX	XXx	XXx	XXx	X	XXx	XXX

Tab. 2.4 Komplexintensitäten H-NS- und FIS-Bindung

Anhand der Komplexintensität und Mobilität lässt sich eine Reihenfolge bezüglich der H-NS-Bindung wie folgt aufstellen:

$$rrnH > rrnB / rrnC / rrnG > rrnA > rrnE > rrnD$$

Eine Übereinstimmung mit den Konformationsanalysen kann weitestgehend für die Operons *rrnB*, *rrnC*, *rrnG*, *rrnA* und *rrnE* festgestellt werden. Völlig konträr sind die Ergebnisse für die Operons *rrnD* und *rrnH*. Das *rrnD*-Operon zeigt anhand der Kon-

formationsanalysen eine sehr starke Krümmung, die Bindung zum Transkriptionsfaktor H-NS erscheint jedoch äußerst schwach. Dies könnte das Ergebnis einer schwachen Bindung oder aber sehr unstabilen Komplexes sein.

Mit Ausnahme des *rrnE*-Operons zeigen alle ribosomalen RNA-Operons eine sehr starke Affinität zum FIS-Protein. Die eindeutige Korrelation der FIS-Bindung zum Krümmungsmaß ist nicht erkennbar. Die sequenzspezifische Bindung des FIS-Proteins ermöglicht jedoch zusätzlich zur Betrachtung der Krümmung die Übereinstimmung der bindenden Sequenzen mit der Konsensussequenz. Die 15 Nukleotid lange Konsensussequenz wurde zunächst von Hübner & Arber (1989) publiziert und nachfolgend von verschiedenen Autoren modifiziert beschrieben (Verbeek *et al.*, 1990; Finkel & Johnson, 1992; A. Travers, pers. Mitteilung, Texel 2000). Die Sequenzen zeigen alle ein zentrales Adenin oder Thymin sowie ein Guanin am 5'-Ende und ein Cytosin am 3'-Ende. Andrew Travers beschreibt zusätzlich ein Pyrimidin am 5'-Ende und ein Purin am 3'-Ende als bindungsfördernd. Diese Sequenzen sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 2.5).

Autoren	Konsensussequenz	A = Adenin C = Cytosin G = Guanin T = Thymin R = Purin Y = Pyrimidin N = beliebiges Nukleotid Großbuchstabe = sehr wichtig
Hübner & Arber, 1989	GnnYRnnAnnYRnnC T T A	
Verbeek <i>et al.</i> , 1990	GnnYRaaAaaYRnnC t ttTtt a	
Finkel & Johnson, 1992	GNtcAaaAttTgaNC tgttTaaca	
A. Travers, 2000	YGnnYRnnAnnYRnnCR T	

Tab. 2.5 FIS-Konsensussequenzen (5'→3', Nichtmatritzenstrang)

Condon *et al.* haben 1992 alle potentiellen FIS-Bindestellen der sieben ribosomalen RNA-Operons nach der Sequenz von Hübner und Arber beschrieben und Abweichungen von dieser Sequenz markiert. Diese Daten sind in Tabelle 2.6 aufgeführt, die Abweichungen von der Konsensussequenz sind grau hinterlegt. Zusätzlich sind in der Tabelle weitere mögliche FIS-Bindestellen, die mit dem Programm *Clonemanager* in der klonierten UAS-Region (sowie flankierende Nukleotide) bestimmt wurden, eingetragen. Die Übereinstimmung mit der von A.Travers postulierten Konsensussequenz wurde überprüft und gegebenenfalls mit den flankierenden Nukleotiden in der entsprechenden Spalte kursiv eingetragen. Die Positionen der zentralen Nukleotide bezogen auf den Transkriptionsstart am P1-Promotor sind jeweils unter der Sequenz eingetragen. Die Positionen der potentiellen FIS-Bindestellen nach Condon *et al.* sind in den UAS so plaziert, dass sie bei einem Sequenzalignement der sieben UAS-Regionen an entsprechenden Positionen relativ vom P1-Transkriptionsstart liegen. Zusätzlich zu diesen Positionen können im Bereich der zweiten und dritten (bzw. vierten) potentiellen Bindestelle Konsensussequenzen gefunden werden, deren Zentren etwas verschoben positioniert sind. Diese zusätzlichen Sequenzen sind in der Tabelle in Klammern angegeben.

Operon	FIS I	FIS II	FIS III	FIS IV (aus dem Programm <i>Clo-nemanager</i>)
<i>rrnA</i>	GAATAAAAAATGCGC -71	AACCGACAAACCGAC -103	GAGCAGGIGGCGAA -141 (TGGCGAAITTCGCCC -134)	GACCGTTTATGATC -222 CGACCGTTTATGATCA
<i>rrnB</i>	GGTTGAATGTTGCGC -71	GCTCGAAAAATGGC -102	GAACAATATTGCCC -143 TGAACAATTATTGCCCCG	CCTGGTTGTTAGAAC -226
<i>rrnC</i>	GCTGAAAAAATGCGC -72	GCTTGTTTATGGCA -103	CACCAGGAAGTGTA -142	
<i>rrnD</i>	GGTGA AAAACAACA -70	CACCGTTTGTGTGC -100	TTATTGGCTTGTGC -138 (TTTTAGTATGCAAAA -118)	GACCGATTGTGGAA -230 (GGGCGTAAACATCA -201)
<i>rrnE</i>	CTGCGGAATGCAGCA -71	GTGCGTAAAAAGGTA -101	GGGCAAAATACAGAA -143	
<i>rrnG</i>	GCCTGAAAAGTGAGC -71 TGCCTGAAAAGTGAGCG	AGACGGAAAAGACTA -101	TGATAAAACGAGCCC -143 (GTCCAGTAAATGATA -153)	
<i>rrnH</i>	GATTA AAAGATGAGC -71 TGATTA AAAGATGAGCG	GATAAAAAAGCAGCA -100	GCGGATTGGGTGTTA -141 (GGGTGTTAAATAGCC -134)	CCCGATATGCAGGCA -231 CCC aus Vektor

Tab. 2.6 Sequenzen und Positionen der potentiellen FIS-Bindestellen in den sieben UAS-Regionen (nach Condon *et al.*, 1992; 5'→3', Nichtmatritzenstrang)

Nach Tabelle 2.4 kann die FIS-Komplexierung nicht entsprechend der H-NS-Komplexierung in eine Reihenfolge gestellt werden, da zwischen den Operons kaum deutliche Unterschiede bestimmt werden können. Schwache Unterschiede können zwischen *rrnA* und *rrnH* zu den Operons *rrnB*, *rrnC*, *rrnG* und *rrnD* beobachtet werden. Lediglich das *rrnE*-Operon zeigt einen signifikant schwächeren Komplex als alle anderen Operons. Bezogen auf die Konsensussequenz liegt einzig in der *rrnE*-UAS ein zweifaches Abweichen in der FIS I-Bindestelle vor. In den Operons *rrnC*, *rrnD* und *rrnE* befindet sich an Position 4 von FIS I ein Purin statt eines Pyrimidins. Am 3'-Ende der FIS I-Bindestelle des *rrnE*-Operons zeigt die Sequenz ein Cytosin statt eines in allen Konsensussequenzen geforderten Guanins. In allen anderen potentiellen Bindestellen sind ein oder zwei Abweichungen zu beobachten. Lediglich das *rrnG*-Operon zeigt keinerlei Abweichungen von der Konsensussequenz und das *rrnB*-Operon nur eine Abweichung in der FIS II-Bindestelle. Ross *et al.* beschrieben 1990 über Deletionsmutanten und Bindungsstudien am *rrnB* P1-Promotor, dass die FIS I-Bindestelle den größten Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung ausübt. Dies könnte ein Hinweis auf die schwache Bindung von FIS an die *rrnE*-Sequenz mit der geringsten Übereinstimmung zur Konsensussequenz sein und wird nach dem Ergebnisteil der *in vivo*-Daten erneut betrachtet.

Aus den Verzögerungsgelen wurden Bindekonstanten der Transkriptionsfaktoren zu den UAS-Fragmenten ermittelt. Da zwischen den Komplexen nicht deutlich aufgelöst werden kann, wurden die Bindekonstanten als 'Über-Alles-Bindekonstante' errechnet. Hierzu wurden die Gele eingescannt und im Programm *Scion Image* quantifiziert (5.2.10). Die Einzelspuren wurden jeweils komplett quantifiziert und die Intensität der

einzelnen Komplexe summiert und als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität einer Spur dargestellt. Mit dem Programm *Origin* wurden Bindekurven erstellt und die Bindekonstanten als die Proteinkonzentration ermittelt, bei der 50 % des maximal möglichen Komplexes (maximale Proteinkonzentration, Plateau der Kurve) gebildet waren. Die Kurven sind in der Abbildung 2.6 dargestellt.

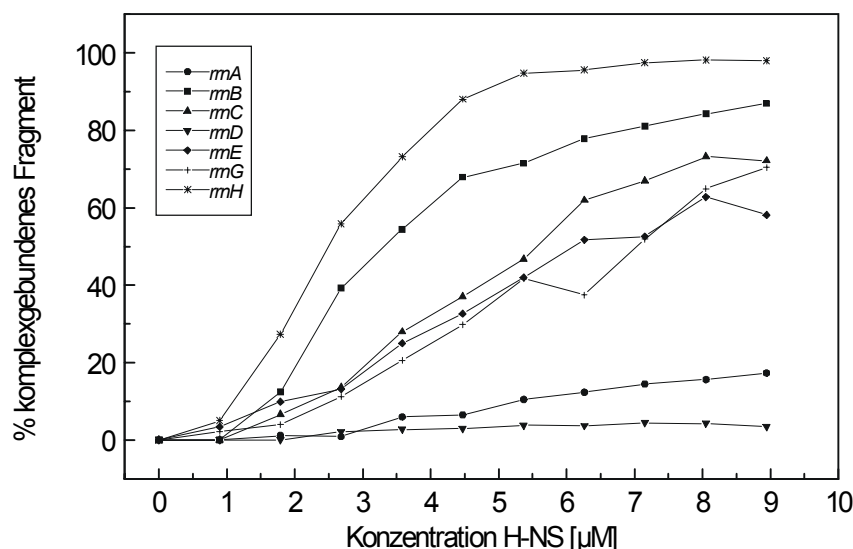
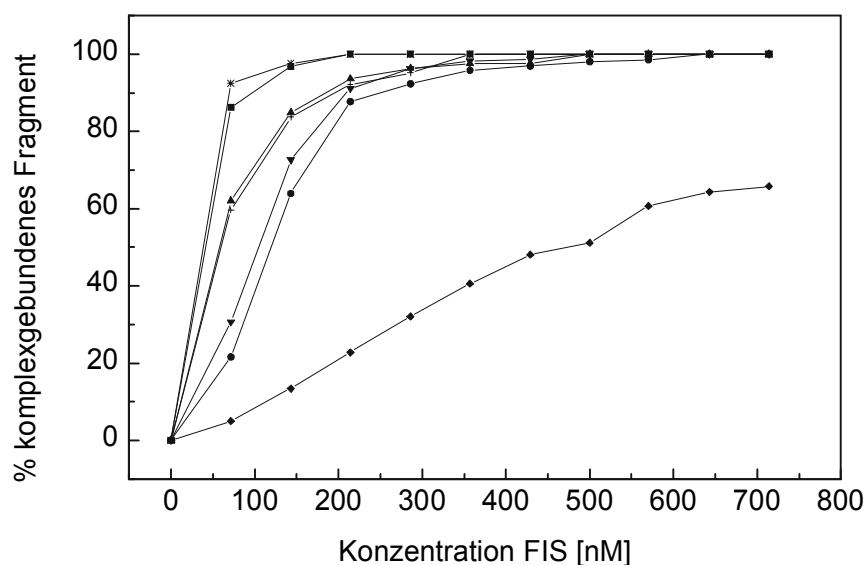


Abb. 2.6 Bestimmung der Bindekonstanten

Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der Verzögerungsgele. Die Kurvenlegende für den unteren Teil entspricht der Legende des oberen Teils. Die Bindekonstanten sind nachfolgend für die einzelnen UAS angegeben.



Operon	Bindekonstanten	
	H-NS [µM]	FIS [nM]
<i>rrnA</i>	5.0	120
<i>rrnB</i>	3.0	40
<i>rrnC</i>	4.4	60
<i>rrnD</i>	3.2	105
<i>rrnE</i>	4.2	300
<i>rrnG</i>	4.9	60
<i>rrnH</i>	2.5	40

Anhand der Kurven wird die differentiell ausgeprägte Bindung des Transkriptionsfaktors H-NS an die sieben verschiedenen regulatorischen Sequenzen der ribosomalen RNA-Operons deutlich. Im Gegensatz dazu ist die weniger differenzierte Bindung zu FIS mit Ausnahme des *rrnE*-Operons ebenso klar zu erkennen. Die Bindekonstanten für H-NS liegen um den Faktor 14-80 höher als die entsprechenden Werte für die FIS-Bindung. Zusammenfassend lassen die Daten der Bindungsanalysen eine differentielle Transkriptionsregulation der sieben ribosomalen RNA-Operons erwarten.

2.3 *In vivo* Untersuchungen zur Bestimmung der Transkriptionsraten des Chloramphenicolacetyltransferasegens unter Kontrolle der ribosomalen P1-Promotoren

Untersuchungen zur Transkriptionsregulation fordern eine Analysemethode, die messbare und eindeutig zu charakterisierende Parameter liefert. Hierbei sollten methodische Fehler durch entsprechende Kontrollen auszuschließen oder zumindest bestimmbar sein. Die Mechanismen, die zur Regulation beisteuern, sollten ein- und auszuschalten sein. Die Klonierung der regulatorischen Sequenzen der sieben ribosomalen P1-Promotoren in der durchgeführten Form ermöglicht die Analyse der Regulation durch UAS-vermittelte Wege. Alle weiteren Steuerungsmechanismen, wie postranskriptionelle Regulation oder Prozessierungsreaktionen bleiben bei dieser Art der Untersuchung unberücksichtigt. Zum besseren Verständnis der Transkriptionsregulation ist das Eingrenzen der besteuernden Prozesse allerdings erforderlich. Regulationsmechanismen der Synthese ribosomaler rRNAs, deren Zielsequenzen in den UAS liegen, sind die Regulation durch Transkriptionsfaktoren, auch als faktorabhängige Regulation beschrieben, sowie die faktorunabhängige Regulation durch einzelne Sequenzbereiche und deren Konformation (siehe Einleitung). Es wurden bereits eine Reihe vergleichender Analysen durch *in vitro* Experimente vorgestellt, in diesem Abschnitt sollen nun Daten präsentiert werden, die unter *in vivo*-Bedingungen ermittelt wurden. Hierzu wurden verschiedene Wildtyp- und Mutantenstämme mit den pH-D-Plasmiden transformiert und die Expression des Reportergens unter variierenden Wachstumsbedingungen durch Primer Extension-Analysen gemessen. Die Transformationen wurden nach Standardmethoden (5.1.4 und 5.1.5) bzw. (5.1.6) für die Stämme BSN26 und BSN29 durchgeführt. Da keine isogenen Stämme für unterschiedliche Transkriptionsfaktormutanten zur Verfügung standen, wurden vier verschiedene Wildtypstämme zur Kontrolle untersucht. Vergleichend dazu wurden *hns*⁽⁻⁾-Mutanten, *fis*⁽⁻⁾-Mutanten, *hns*⁽⁻⁾*fis*⁽⁻⁾-Doppelmutanten und *hns*⁽⁻⁾*stpA*⁽⁻⁾-Doppelmutanten bezüglich der Transkription des Chloramphenicolacetyltransferasegens untersucht. Die *E. coli* Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst, die exakten Genotypen in 4.2.1 beschrieben.

Stamm	Beschreibung
MC4100	Wildtyp
PD32	<i>hns</i> ⁽⁻⁾ -Mutante
CSH50	Wildtyp
CSH50 <i>fis::kan</i>	<i>fis</i> ⁽⁻⁾ -Mutante
C600	Wildtyp
C600 <i>fis::kan hns::tet</i>	<i>hns</i> ⁽⁻⁾ <i>fis</i> ⁽⁻⁾ -Doppelmutante
BSN26	Wildtyp
BSN29	<i>hns</i> ⁽⁻⁾ <i>stpA</i> ⁽⁻⁾ -Doppelmutante

Tab. 2.7 Kurzbeschreibung der untersuchten *E. coli* Stämme

Die Wachstumsphasenabhängigkeit der Expression des CAT-Gens unter Kontrolle der sieben ribosomalen P1-Promotoren wurde durch PE-Analysen bereits untersucht (A. Hillebrand, Diplomarbeit 1998). Es wurde gezeigt, dass die CAT-Expression im Wildtypstamm HB101 in der stationären Phase deutlich verringert ist, allerdings in differentielltem Ausmaß. Die Plasmide pHD1-A, B, D und G zeigten eine Reduktion der Transkription in der stationären Phase auf 8-14 % des Transkriptionsniveaus der logarithmischen Wachstumsphase. Die CAT-Transkripte der Plasmide pHD1-C (31 %) und pHD1-H (71 %) wurden nur auf die in Klammern angegebenen Expressionsniveaus reduziert. Bei der Untersuchung der Wachstumsphasenabhängigkeit wurden die Wachstumsraten nicht berücksichtigt. In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Transkriptmengen zunächst alle Wachstumsraten einander angeglichen, es wurden hohe Wachstumsraten im Bereich von $\mu=1.7$ bis 2.0 [Verdopplungen/Stunde] und niedrige Wachstumsraten im Bereich von $\mu=0.7$ bis 0.9 eingestellt (5.1.3.3 und 2.3.3). Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden vor den PE-Analysen immunologisch auf Korrektheit der Genotypen bezüglich FIS und H-NS untersucht (2.3.1). Weiterhin wurde die Plasmidkopienzahl in den Wildtyp- und Mutantenstämmen bestimmt (2.3.2), um mögliche Transkriptmengenunterschiede durch variierende Plasmidkopienzahl auszuschließen. Zur Bestimmung der Halbwertszeit der CAT-Transkripte wurde eine Rifampicinkinetik erstellt (2.3.5). Die Ergebnisse werden nachfolgend im Einzelnen vorgestellt.

2.3.1 Immunologische Analyse der Wildtyp- und Mutantenstämmen

Die immunologische Analyse (5.2.9.5) der verwendeten *E. coli* Stämme wurde anhand von Westernblots (5.2.9.4) mit H-NS- und FIS-Antikörpern (4.4.4) durchgeführt. Aus verschiedenen Stämmen wurde Gesamtprotein isoliert (5.2.5) und die Proteinkonzentration nach einem Bradford-Microassay (5.2.6.3) bestimmt. 10 μ g Gesamtprotein wurden je Spur auf einem SDS-Gel (5.2.8.4) aufgetrennt und die gemessenen Konzentrationen überprüft. Anschließend wurde ein zweites SDS-Gel elektrophoretisiert und die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran transferiert. Auf dieser Membran konnte dann der Immunonachweis mit den entsprechenden Antikörpern (5.2.9.5) erfolgen. Zur Kontrolle wurden aufgereinigte Proteine und Gesamtprotein anderer Stämme parallel analysiert. In der Abbildung 2.7 sind nicht alle Stämme gezeigt, die in dieser Arbeit in Primer Extension-Analysen untersucht wurden. Es sind nur einzelne Wildtypen und Mutanten dargestellt. Zur Kontrolle sind zusätzlich die Stämme YK4122 als Wildtypstamm und YK4124 als *hns*⁽⁻⁾-Stamm gezeigt. Es wurden jedoch alle Stämme in ähnlicher Form von Praktikanten (Daten nicht gezeigt) mit vergleichbaren Ergebnissen getestet. Zur Bestätigung der Daten sind weiterhin Retardierungsanalysen mit Gesamtprotein aller verwendeten Stämme und markiertem *rrnB*-P1-Fragment aus pUC18-1 durchgeführt worden (Daten nicht gezeigt).

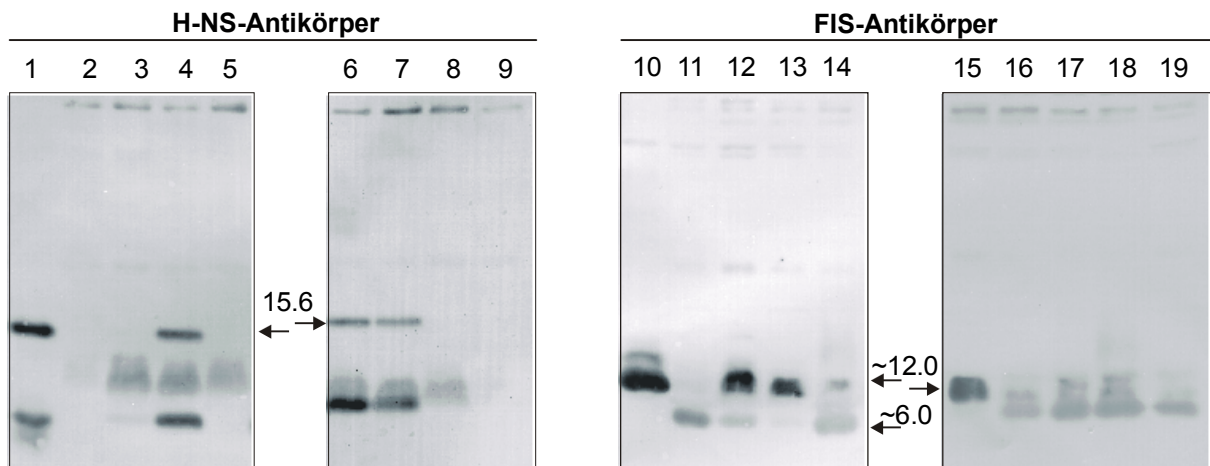


Abb. 2.7 Immunologische Analysen der verwendeten *E. coli* Stämme

Die Abbildung zeigt exemplarisch immunologische Analysen. Die Pfeile geben die aus einer separat gefärbten Molekulargewichtsmarkerspura zugeordneten Molekulargewichte in kDa an. Die zwei linken Blotausschnitte zeigen Westernblots mit H-NS-Antikörpern (Spuren 1-9) und die beiden rechten Blotausschnitte äquivalente Experimente mit FIS-Antikörpern (Spuren 10-19). Vom Gesamtprotein wurden jeweils 10 µg auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf die Membran transferiert. Spur 1: aufgereinigtes H-NS (1 µg); Spur 2: PD32(*hns*⁽⁻⁾); Spur 3: C600 *fis*::*kan hns*::*tet*; Spur 4: CSH50 *fis*::*kan*; Spur 5: YK2124(*hns*⁽⁻⁾); Spur 6: CSH50 (WT); Spur 7: YK4122 (WT); Spur 8: YK4124(*hns*⁽⁻⁾); Spur 9: PD32(*hns*⁽⁻⁾); Spur 10: aufgereinigtes FIS (1 µg); Spur 11: PD32(*hns*⁽⁻⁾); Spur 12: C600 *fis*::*kan hns*::*tet*; Spur 13: CSH50 *fis*::*kan*; Spur 14: YK4124(*hns*⁽⁻⁾); Spur 15: CSH50 *fis*::*kan*; Spur 16: CSH50 (WT); Spur 17: YK4122 (WT); Spur 18: YK4124(*hns*⁽⁻⁾); Spur 19: PD32(*hns*⁽⁻⁾).

Die Westernblots sind in Bezug auf die H-NS-Immunoreaktion eindeutig, alle Wildtyp oder Mutantenstämme, die H-NS synthetisieren können, zeigen ein eindeutiges Antikörpersignal. Die Molekulargewichtszuordnung erfolgte über log-Plots einer amidoschwärzgefärbten Molekulargewichtsmarkerspura (5.2.9.4). Diese ist hier nicht gezeigt. Die H-NS-Bande mit einem Molekulargewicht 15.6 kDalton ist durch Pfeile markiert. Weniger klar ist das Resultat für die FIS-Antikörperreaktion, dies kann auf die Qualität der FIS-Antikörper zurückgeführt werden (pers. Mitteilung von G. Muskhelishvili). Das Molekulargewicht für das gereinigte FIS-Protein konnte eindeutig zugeordnet werden. Alle *fis*⁽⁻⁾ -Stämme sowie alle *fis*⁽⁺⁾ -Stämme zeigen jeweils deutlich einander entsprechende Signale. Die in allen *fis*⁽⁺⁾ -Stämmen auftretende Bande weist allerdings ein Molekulargewicht von nur etwa 6 kDalton auf, ist aber in allen *fis*⁽⁻⁾ -Stämmen nicht zu detektieren. Aufgrund dieser Resultate wurden Gelschiftexperimente mit den gleichen Gesamtproteinfraktionen und endmarkiertem P1-Fragment aus pUC18-1 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hier zeigten alle *fis*⁽⁺⁾ -Stämme das typische Bandenmuster der drei FIS-Besetzungszustände (siehe 2.2.3). Zusammenfassend belegen die Daten, dass die getesteten Genotypen ihrer Beschreibung bezüglich der Proteine FIS und H-NS entsprechen. Weiterhin wurden alle Stämme mehrfach auf selektiven Agarplatten auf die angegebenen Antibiotikaresistenzen überprüft.

2.3.2 Plasmidkopienzahlbestimmung aller pH-D-Plasmide in den analysierten *E. coli* Stämmen

Differentielle Transkriptmengen in unterschiedlichen Stämmen oder von unterschiedlichen Plasmiden können durch variierende Plasmidkopienzahlen beeinflusst werden. Um die Gendosis als Ursache differentieller Transkription auszuschließen, wurden von den Plasmiden pH-D1-A bis pH-D1-H in den Stämmen MC4100, PD32, CSH50, CSH50 *fis::kan*, C600 und C600 *fis::kan hns::tet* Plasmidkopienzahlbestimmungen (5.3.4) durchgeführt. Die Abbildung 2.8 zeigt eine invertierte Abbildung des 0.6 % Agarosegels zur Plasmidkopienzahlbestimmung am Beispiel pH-D1-B.

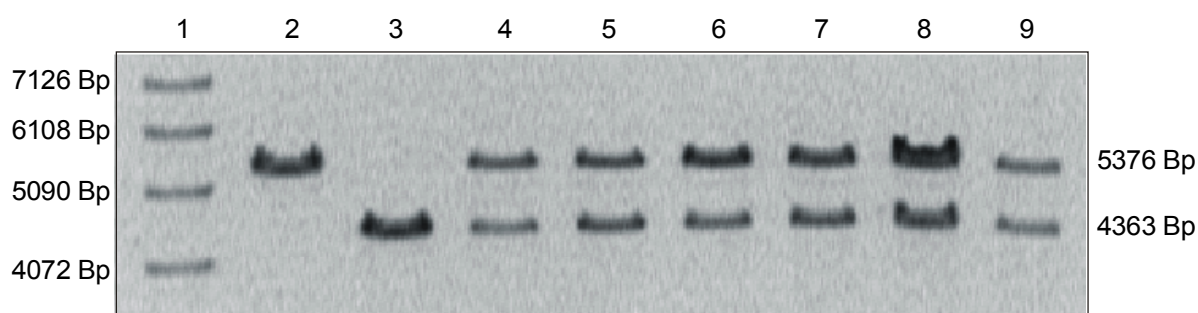


Abb. 2.8 Invertierte Darstellung eines 0.6 % Agarosegels zur Plasmidkopienzahlbestimmung

Zur Quantifizierung wurde das Gel mit einer SW-Digitalkamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Modell VC 25 - 12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und in digitalisierter Form gespeichert. Vor der Auswertung mit dem Programm *Scion Image* wurde die Abbildung invertiert. Die Spur 1 zeigt Banden des Molekulargewichtsmarkers (kB-Leiter, 4.3), die Fragmentlängen sind angegeben. Die Spur 2 enthält 100 ng pH-D1-B Plasmid-DNA, hydrolysiert mit *Hind*III (5.2.7.1), analog dazu 100 ng pBR322 DNA in Spur 3. Die folgenden Spuren zeigen die pH-D1-B/pBR322 DNA Mixe, jeweils 2 µl aus 100 µl Gesamtisolat (5.3.4) aus sechs verschiedenen Stämmen hydrolysiert mit *Hind*III. Spur 4: MC4100; Spur 5: PD32; Spur 6: CSH50; Spur 7: CSH50 *fis::kan*; Spur 8: C600; Spur 9: C600 *fis::kan hns::tet*. Die Fragmentlängen der linearisierten Plasmide (pH-D1-B=5376Bp und pBR322=4363 Bp) sind ebenfalls angegeben.

Entsprechende Gele wurden für alle sieben pH-D-Plasmide in den sechs Stämmen analysiert. Für die Stämme BSN26 und BSN29 wurden keine Plasmidkopienzahlen bestimmt. Nach der Quantifizierung und Berechnung der Verhältnisse von Testplasmid zu Referenzplasmid konnte folgende Tabelle erstellt werden, die für die sieben Plasmide in den jeweiligen Stämmen keine signifikanten Unterschiede zeigt.

Stamm	MC4100	PD32	CSH50	CSH50 <i>fis</i> ⁽⁻⁾	C600	C600 <i>fis</i> ⁽⁻⁾ <i>hns</i> ⁽⁻⁾
Test DNA/Referenz						
pHD1-A/pBR322	1.4	1.1	2.0	1.6	1.4	1.1
pHD1-B/pBR322	1.2	1.1	1.6	1.2	1.6	1.1
pHD1-C/pBR322	1.3	1.0	1.3	1.4	1.5	0.8
pHD1-D/pBR322	1.2	0.8	1.7	1.3	1.7	1.0
pHD1-E/pBR322	0.8	0.8	1.5	1.3	1.1	1.0
pHD1-G/pBR322	0.9	0.9	1.3	1.3	1.8	1.2
pHD1-H/pBR322	1.4	1.0	1.7	1.5	1.4	1.1

Tab. 2.8 Bestimmung der Plasmidkopienzahlen der verwendeten *E. coli* Stämme

2.3.3 Einstellung äquivalenter Wachstumsraten der acht untersuchten *E. coli* Stämme

Die Synthese der ribosomalen RNAs erfolgt wachstumsratenreguliert und zwar proportional zum Quadrat der Wachstumsrate μ (Gausing 1977 und 1980). Untersuchungen zur Transkriptionsregulation auf vergleichender Basis der sieben Operons sollten daher unter Berücksichtigung der Wachstumsraten erfolgen. Vergleichende Analysen zur Feststellung möglicher differentieller Regulation führen nur unter äquivalenten Wachstumsgeschwindigkeiten zu eindeutigen Ergebnissen. Aus diesem Grunde wurden alle Wachstumsraten der acht verschiedenen Stämme transformiert mit den sieben unterschiedlichen Plasmiden vor den Transkriptmengenanalysen auf einheitliche Werte eingestellt. Die Primer Extension-Analysen sollten unter Bedingungen schnellen Wachstums, also hoher Syntheseraten und entsprechend bei langsamerem Wachstum durchgeführt werden. Daher wurden hohe Wachstumsraten im Bereich von $\mu=1.7$ bis 2.0 und niedrige Wachstumsraten $\mu=0.7$ bis 0.9 eingestellt. Höhere bzw. niedrigere Werte konnten nicht erreicht werden, da einzelne Stämme bzw. Plasmide nach oben oder nach unten limitierten. Die Einstellung der Raten erfolgte wie unter 5.1.3.3 beschrieben. Alle Daten bezüglich Raten, Stämmen und Medien sind im Anhang tabellarisch (Tab. 8.1 und 8.2) aufgeführt.

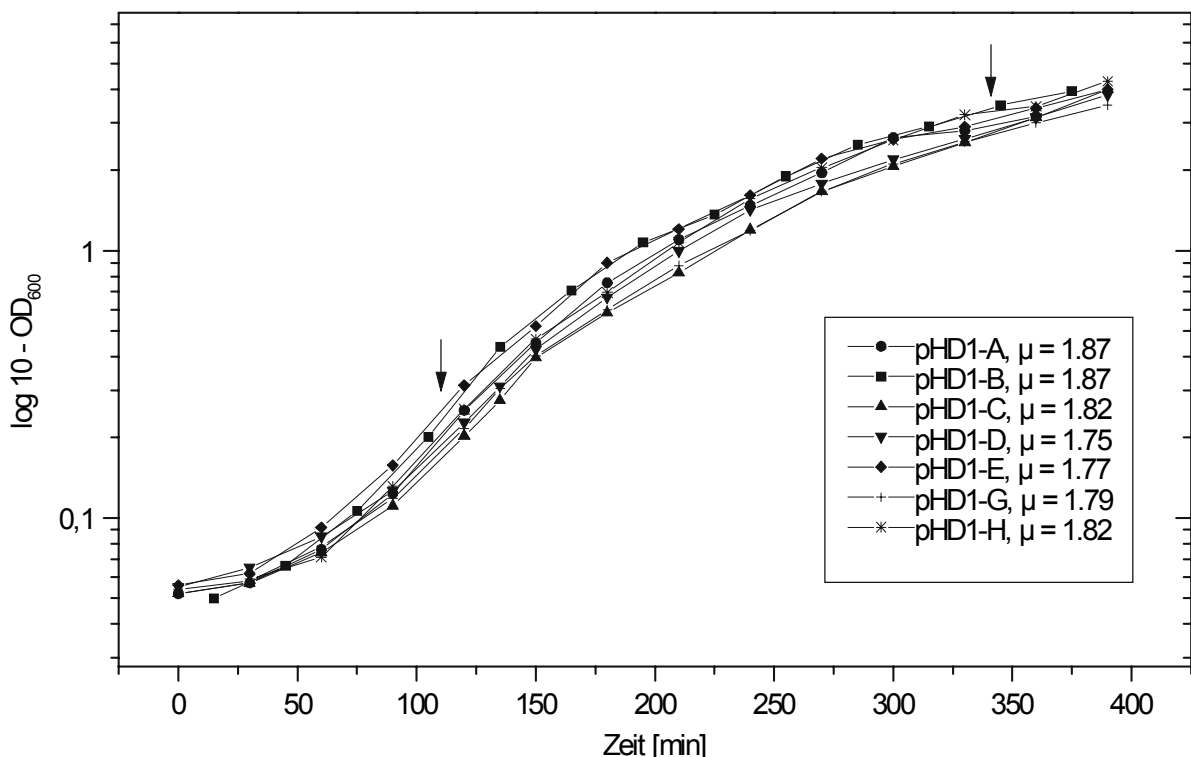


Abb. 2.9 Wachstumskurven aller Plasmide in C600 nach Einstellung hoher Raten in YT

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Wachstumskurven nach der Einstellung hoher Wachstumsraten im Bereich zwischen $\mu=1.7$ bis 1.9 . Dargestellt sind alle sieben pH1-Plasmide im Wildtypstamm C600. Die Pfeile markieren Zeitpunkte (± 10 min) der Probenentnahme zur RNA-Isolation. In der Bildlegende sind die jeweiligen Wachstumsraten angegeben.

2.3.4 Isolation von Gesamt-RNA bei unterschiedlichen Wachstumsraten

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte wie unter 5.2.4.4 beschrieben. Zum Zeitpunkt der frühen bis mittleren Phase logarithmischen Wachstums und zu Beginn der stationären Phase wurden der wachsenden Kultur jeweils Proben entnommen. Die Zeitpunkte der Probenentnahme wurden in Anlehnung an die höchsten zellulären Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS gewählt, da der Einfluss dieser beiden Proteine auf die Transkription *in vivo* untersucht werden sollte. Die Synthese von FIS ist streng wachstumsphasenreguliert (Ninnemann *et al.*, 1992) und die zelluläre Konzentration in der frühen bis mittleren exponentiellen Phase am größten (Nilsson *et al.*, 1992). Die Konzentration von H-NS ist in der stationären Phase am größten, unter anderem führt negative Autoregulation der Expression in der exponentiellen Phase zur Konzentrationsabnahme (Wagner, 1994). Die gewählten Zeitpunkte der Probenentnahmen wurden zusätzlich experimentell durch Primer Extension-Analysen von Gesamt-RNA-Isolaten zu verschiedenen Zeiten der einzelnen Wachstumsphasen getestet und bestätigt (Daten siehe 2.6.4). Bei hohen Raten wurden während der exponentiellen Phase 10 ml Bakteriensuspension zur RNA Isolation abgenommen, zu Beginn der stationären Phase wurden 5 ml Kultur geerntet. Bei niedrigen Raten war aufgrund niedrigerer Syntheseraten ein größerer Probenumfang erforderlich. In diesen Fällen wurden während der exponentiellen Phase 25 ml und zu Beginn der stationären Phase 10 ml der Bakteriensuspension aufgearbeitet. Da nicht alle Kulturen zum gleichen Zeitpunkt die erforderliche optische Dichte während einer definierten Rate erreichten, wurden die Proben kalt abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert, um dann gleichzeitig weiterverarbeitet zu werden (heiße Phenollyse). Wie unter 5.2.4.4 beschrieben wurde die isolierte RNA spektroskopisch auf Konzentration und Reinheit untersucht (5.2.6.2). Alle Isolate wurden auf einem 2.5 % Agarosegel bezüglich der stöchiometrischen Zusammensetzung ribosomaler RNAs und der gemessenen Konzentration überprüft. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass in allen nachfolgenden Primer Extension-Analysen äquivalente RNA-Mengen eingesetzt wurden. Die Tabelle 8.3 im Anhang zeigt durchschnittliche Ausbeuten bei der Gesamt-RNA-Isolation während hoher und niedriger Wachstumsraten bezogen auf die Zellmenge entsprechend einer OD₆₀₀.

2.3.5 Rifampicinkinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit der P1-cat-Fusionstranskripte

Die Messung von Syntheseraten über die Primer Extension-Analyse führt nur dann zu verlässlichen Aussagen, wenn die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der zu analysierenden Transkripte klein sind. Ansonsten liefern die erhaltenen Daten Informationen über akkumulierte Transkripte, nicht jedoch über Häufigkeit oder Geschwindigkeit der Synthese. Zur Bestimmung der Halbwertszeit der P1-cat-Fusionstranskripte wurden

Rifampicinkinetiken (5.3.6) durchgeführt. Das Antibiotikum Rifampicin inhibiert die Transkriptionsinitiation. Es bindet an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase im RNAP/Promotor Komplex und inhibiert die Bildung der zweiten Phosphodiesterbindung. Hierdurch wird spezifisch die Initiation der RNA-Synthese gehemmt, die Elongation bereits initiiert Transkripte bleibt unbeeinflusst (Mustaev *et al.*, 1994). Durch Quantifizierung der über eine nachfolgende Primer Extension-Reaktion erhaltenen cDNAs konnte eine Zerfallskurve dargestellt und die Halbwertszeit errechnet werden. Die gleichzeitig verlängerten RNAI -Transkripte zeigten erst zwischen 100 und 150 Sekunden nach Rifampicinzugabe eine langsame Abnahme der Transkripte, sodass zur Erstellung der Kurve für die Zeit bis 80 Sekunden nach Rifampicinzugabe die Verhältnisse von CAT-/RNAI-Abbruchprodukten grafisch dargestellt werden konnten. Weiterhin wurden partiell auftretende Abbruchprodukte der *cat*-Transkripte ebenso quantifiziert und zum Endprodukt addiert.

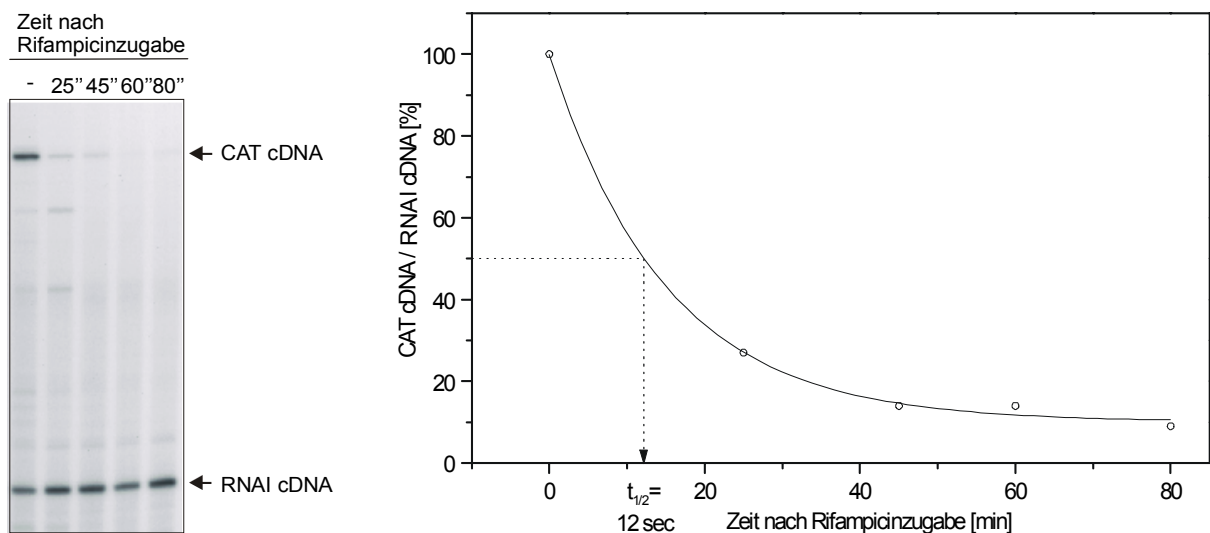


Abb. 2.10 Rifampicinkinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit der P1-*cat*-Transkripte

Die Rifampicinkinetik wurde mit dem Plasmid pHD1-A im Wildtypstamm CSH50 durchgeführt. Das Gel (16 % PAA/7 M Harnstoff) zeigt die PE-Produkte einer Gesamt-RNA-Isolation, alle Daten konnten mit RNA Proben einer zweiten Isolation in mehreren Primer Extension-Analysen bestätigt werden. Die gemessene Halbwertszeit von 12 sec wurde in anderen Experimenten mit 11 bis 14 sec bestätigt.

Die Halbwertszeit der *cat*-Transkripte unter Kontrolle des ribosomalen RNA P1-Promotors liegt unter 15 Sekunden. Das entspricht annähernd den Halbwertszeiten ribosomaler '*leader*'-Transkripte, die von mehreren Arbeitsgruppen im Bereich von 30 Sekunden bestimmt wurden (Gafny *et al.*, 1994; Liebig & Wagner, 1995). Somit ist sichergestellt, dass die Primer Extension-Analysen zu Informationen über Transkript-raten und nicht über Transkriptakkumulation führen.

2.4 Primer Extension-Analysen zur Untersuchung der Transkriptionsraten in Wildtyp- und Mutantenstämmen

Differentielle Expression der ribosomalen RNA-Operons von *Escherichia coli* wurde bisher im Wesentlichen im chromosomalen Kontext oder als Reportergenfusion in λ -Lysogenen (ebenfalls chromosomal) untersucht (Condon *et al.*, 1992; Liebig & Wagner, 1995). Der Einfluss von Transkriptionsfaktoren über deren Zielsequenzen in der UAS sowie unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Transkription der ribosomalen RNA-Operons wurde in dieser Arbeit an einem Expressionssystem untersucht, das auf die 'upstream'-Regulation des P1-Promotors beschränkt ist. Alle weiteren Regulationsmechanismen sind bei dieser Form der Analyse ausgeschlossen. Die Untersuchung eines Reportergens verhindert zusätzlich eine mögliche Regulation durch das native Endprodukt. Zur Untersuchung der Transkriptionsraten *in vivo* wurden Primer Extension-Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten nach der von Liebig & Wagner (1995) in Anlehnung an die ursprünglich von Sigmund *et al.* (1988) beschriebene Methode durchgeführten Art und Weise. Durch Verlängerung eines an die *cat*-mRNA hybridisierenden radioaktiv markierten Oligonukleotides durch Reverse Transkriptase können die Transkripte als cDNA auf einem Sequenziergel aufgetrennt und quantifiziert werden. Bei gleichzeitiger Hybridisierung und Verlängerung eines Primeroligonukleotides, das an das Transkript der RNAI (ebenfalls plasmidkodiert, siehe Abb. 4.1) bindet, wird eine weitere cDNA synthetisiert, die als interner Standard dient. Die RNAI ist eine anti-sense RNA, die als Repressor der Replikation bei Plasmiden vom ColE1 Typ agiert (Lacatena & Cesarini, 1981). Ihre Expression gilt als konstitutiv (Appleman *et al.*, 1998) und wird nicht durch die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren reguliert. Ihre Transkription ist allerdings von der Superhelikalität des Templates abhängig (Wood & Lebowitz, 1984). Die Anwesenheit eines internen Standards bietet die Möglichkeit, nach der Quantifizierung relative Transkriptraten zu berechnen (CAT cDNA/RNAI cDNA). Hierdurch werden einerseits mögliche Unterschiede durch veränderte Plasmidkopienzahlen nivelliert, andererseits werden methodische Fehler reduziert. Das Desoxyoligonukleotid # 220196 bindet an die mRNA der P1-*cat*-Fusionstranskripte. Die Positionen variieren bei einzelnen Operons. Oligo # 220196 (nachfolgend meist CAT Oligo genannt) hybridisiert an den Fusionstranskripten an folgenden Positionen:

pHD1-A, pHD1-B, pHD1-C, pHD1-G, pHD1-H:	+53 bis +36
pHD1-D:	+50 bis +33
pHD1-E:	+51 bis +34

Diese unterschiedlichen Hybridisierungspositionen führen zu verschieden langen cDNAs von 50 Nukleotiden (pHD1-D), 51 Nukleotiden (pHD1-E) und 53 Nukleotiden (alle anderen). Neben leichter Zuordnung der cDNAs haben die differentiellen cDNA-Längen den Vorteil einer Kontrolle zur Vermeidung von Verwechslungen, sowohl beim Aufarbeiten der Gesamt-RNA als auch bei späteren Analysen. Das Oligo RNAI bindet an die Position +28 bis +9 des RNAI Transkriptes und wird in einer Primer Extension-Reaktion um 8 Nukleotide verlängert. Neben der resultierenden cDNA von

28 Nukleotiden tritt ein weiteres Hauptprodukt von 23 Nukleotiden auf, dieses entsteht über die Prozessierung der RNAI durch RNase E, welche das Transkript zwischen Position +5 und +6 schneidet (Xu *et al.*, 1993). Eine weitere cDNA von 30 Nukleotiden trat in allen Primer Extension-Reaktionen bei Verlängerung durch das Oligo RNAI auf. Bei einem quantitativen Abgleich aller drei RNAI cDNAs wurde in verschiedenen Proben ein konstantes Verhältnis aller drei Produkte zueinander festgestellt. Dies ermöglichte die Quantifizierung gegen alle drei cDNAs. Generell wurde gegen die 28 Nukleotid lange cDNA quantifiziert. Die Quantifizierung der 30er Bande wurde insbesondere bei den Analysen der niedrigen Wachstumsraten erforderlich, da dort die *cat*-Transkriptmengen relativ gering waren, sodass häufig nicht gegen die intensiven Banden von 28 oder 23 Nukleotiden quantifiziert werden konnte. In diesen Fällen wurde in kurzzeitig exponierten Filmen zunächst das Verhältnis des 30er Produktes gegen das 28er Produkt berechnet. Mittels dieser Berechnung konnten längere Exponate dann anhand der 30er Bande quantifiziert werden. Zur Auswertung wurde bei allen Primer Extension-Experimenten das Verhältnis von CAT cDNA zu RNAI cDNA berechnet. Die Abb. 2.11 zeigt exemplarisch das Gel eines Primer Extension-Experimentes, das die beschriebenen cDNAs wiedergibt.

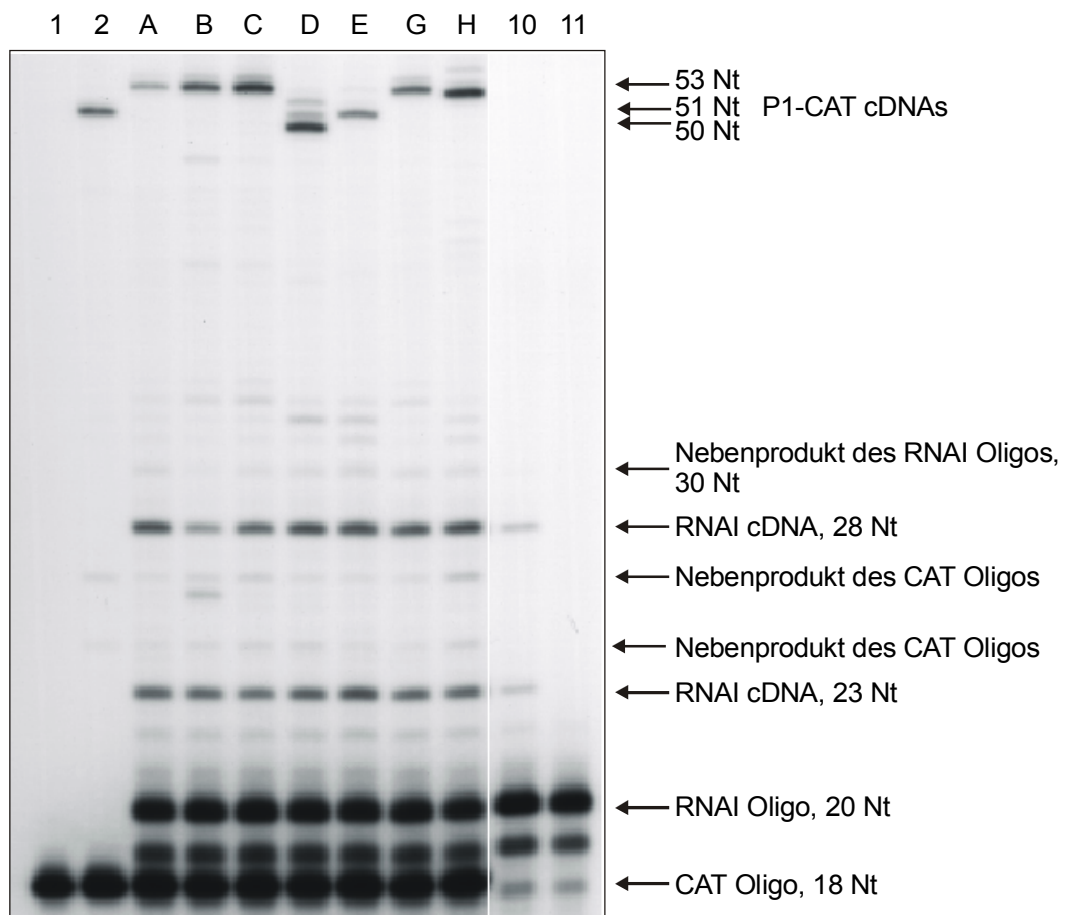


Abb. 2.11 Primer Extension-Analyse

Das Gel zeigt die Produkte einer Primer Extension-Analyse des Stammes C600 *fis::kan hns::tet* aus Gesamt-RNA der exponentiellen Wachstumsphase (hohe μ). In Spur 1 ist nur markiertes CAT Oligo aufgetragen, Spur 2 zeigt eine PE von pH1-E nur mit CAT Oligo. Die Spuren 3 bis 9 (A – H) zeigen die PE-Produkte der Plasmide pH1-A bis H mit den beiden Oligos (CAT Oligo und RNAI Oligo). Spur 10 zeigt eine PE von pH1-E nur mit RNAI Oligo und Spur 11 nur das markierte RNAI Oligo.

2.5 Quantifizierung der Primer Extension-Produkte

Die Quantifizierung der Primer Extension-Produkte mit dem PC-Programm *Scion Image* erfolgte wie unter 5.2.10 beschrieben. Zur Auswertung wurden mindestens zwei unabhängige Primer Extension-Analysen herangezogen, allerdings in der Regel von einer Gesamt-RNA Präparation. Die erhaltenen Werte der P1-*cat*-Fusionstranskripte wurden zu den Werten für die zugehörige RNAI cDNA ins Verhältnis gesetzt (im weiteren Verlauf als CAT/RNAI bezeichnet). Um alle Operons im Wildtyp und den zugehörigen Mutantenstämmen bei gleichen Wachstumsraten in verschiedenen Primer Extension-Analysen vergleichen zu können, wurde das Verhältnis von CAT/RNAI des jeweiligen pHD1-A (*rrnA*-UAS) enthaltenden Wildtyps aus der exponentiellen Phase gleich 100 % gesetzt. Alle Daten sind im Anhang unter 8.3 aufgelistet.

2.6 Die Transkription der P1-*cat*-Fusionen

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation ribosomaler RNAs wurde mit den P1-*cat*-Fusionen ein System etabliert, dass eine vergleichende Analyse der sieben verschiedenen UAS *in vivo* ermöglicht. Analysen in verschiedenen Mutantenstämmen liefern Informationen über die Regulation durch Transkriptionsfaktoren. Die Primer Extension-Analyse stellt eine Methode zur Untersuchung von Transkriptionsraten dar. In dieser Arbeit wurden Mutantenstämmen verschiedener *E. coli* K12 Stämme zur Analyse eingesetzt, deshalb wurden alle zugehörigen Wildtypen immer parallel untersucht. In den nachfolgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse aller Wildtypen vergleichend vorgestellt. Es folgen dann paarweise die jeweiligen Transkriptionsfaktormutanten mit den entsprechenden Wildtypen.

2.6.1 Die Transkription der P1-*cat*-Fusionen in allen getesteten Wildtypstämmen

Der Begriff 'Wildtyp' des grampositiven Darmbakteriums *Escherichia coli* K-12 führt leicht zur Fehleinschätzung, geht man von einer vollständigen Homogenität aus. In dieser Arbeit wurden vier Stämme untersucht, die alle als K-12 Wildtypen bezeichnet werden. Alle diese Stämme zeigen leicht unterschiedliche Wachstumseigenschaften in gleichen Medien und weisen Differenzen in der Transformierbarkeit auf. Deutlich wird dies im Hinblick auf die jeweils vorhandenen genetischen Marker, diese sind in Tabelle 4.1 aufgelistet und variieren auch unter den Wildtypen. Nur hierdurch sind die Ergebnisse der Primer Extension-Analysen aller pHD-Plasmide in den verschiedenen Wildtypen zu erklären, sie zeigen durchaus stammabhängige Varianzen. In der Abbildung 2.12 sind die gemittelten Werte der relativen P1-*cat*-Fusionstranskripte (cDNAs) der verschiedenen Wildtypstämmen bei hohen Wachstumsraten grafisch dargestellt. Die entsprechende Abbildung bei niedrigen Raten und stationären Phasen ist im Anhang unter Abbildung 8.5 angefügt.

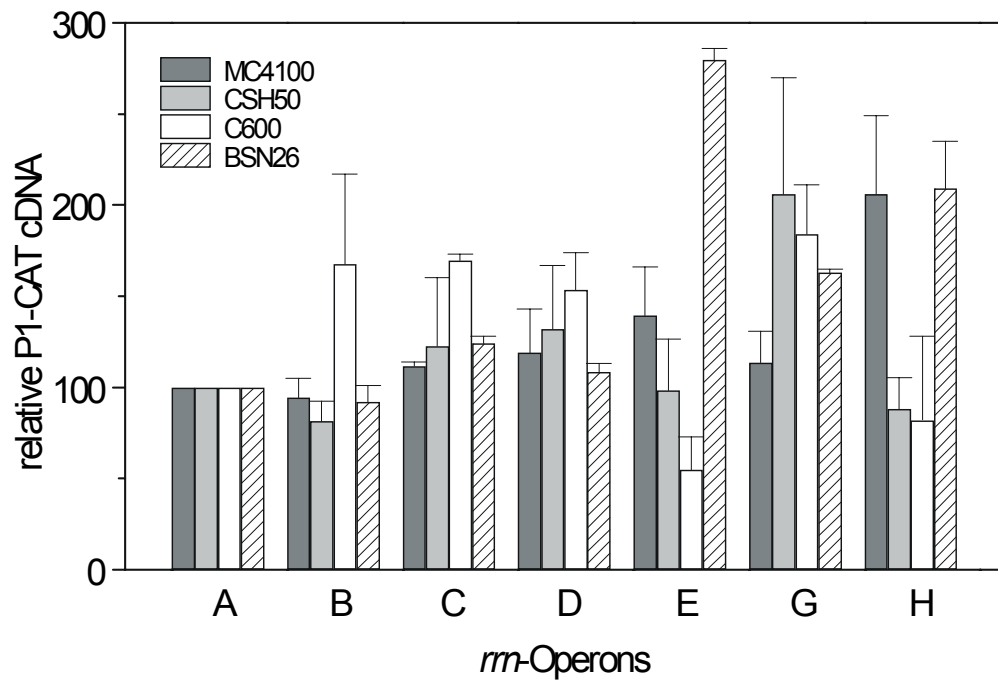


Abb. 2.12 Grafische Darstellung der relativen Transkriptionsraten der P1-cat-Fusionstranskripte in vier Wildtypstämmen während der exponentiellen Phase bei hohen Wachstumsraten

Die Plasmide pHD1-E und pHD1-H zeigen auch unter Berücksichtigung der Fehler signifikante Unterschiede in der Expression des Fusionstranskriptes in wechselndem Stammhintergrund. Die Werte für das Plasmid pHD1-A sind für alle Stämme gleich 100 % gesetzt.

Anhand der grafischen Darstellung der relativen Transkriptionsraten der sieben Fusionstranskripte in unterschiedlichem Wildtypstammhintergrund wird die Notwendigkeit deutlich, zu jedem Mutantenstamm den isogenen Wildtypstamm parallel zu untersuchen. Noch größere Variationen zwischen den einzelnen Stämmen treten vor allem während der stationären Phase und bei niedrigen Wachstumsraten auf (siehe Anhang 8.5). Der Stamm BSN26 wurde nicht bei niedrigen Raten analysiert.

2.6.2 Die Transkription der P1-cat-Fusionen im Wildtyp MC4100 und in der *hns*⁽⁻⁾-Mutante PD32

Die DNA/Proteinwechselwirkung zwischen den sieben verschiedenen UAS und dem Transkriptionsfaktor H-NS wurde anhand von Gelshiftexperimenten gezeigt (2.2.3). Die Bindung von H-NS schließt allerdings nicht die gleichzeitige Transkriptionsregulation ein. H-NS bindet beispielsweise auch an den β -Lactamase-Promotor (Goyard & Bertin, 1997), dessen Expression wird jedoch als konstitutiv beschrieben (Klotzky & Schwartz, 1987). Die Messung der Transkriptionsraten *in vivo* über Primer Extension-Analysen einer H-NS-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sollte daher zu Informationen über die Regulation der ribosomalen Operons durch H-NS führen. Am *rrnB*-Operon wurde eine reprimierende Wirkung des Proteins H-NS auf die Expression schon gezeigt (Afflerbach *et al.*, 1998).

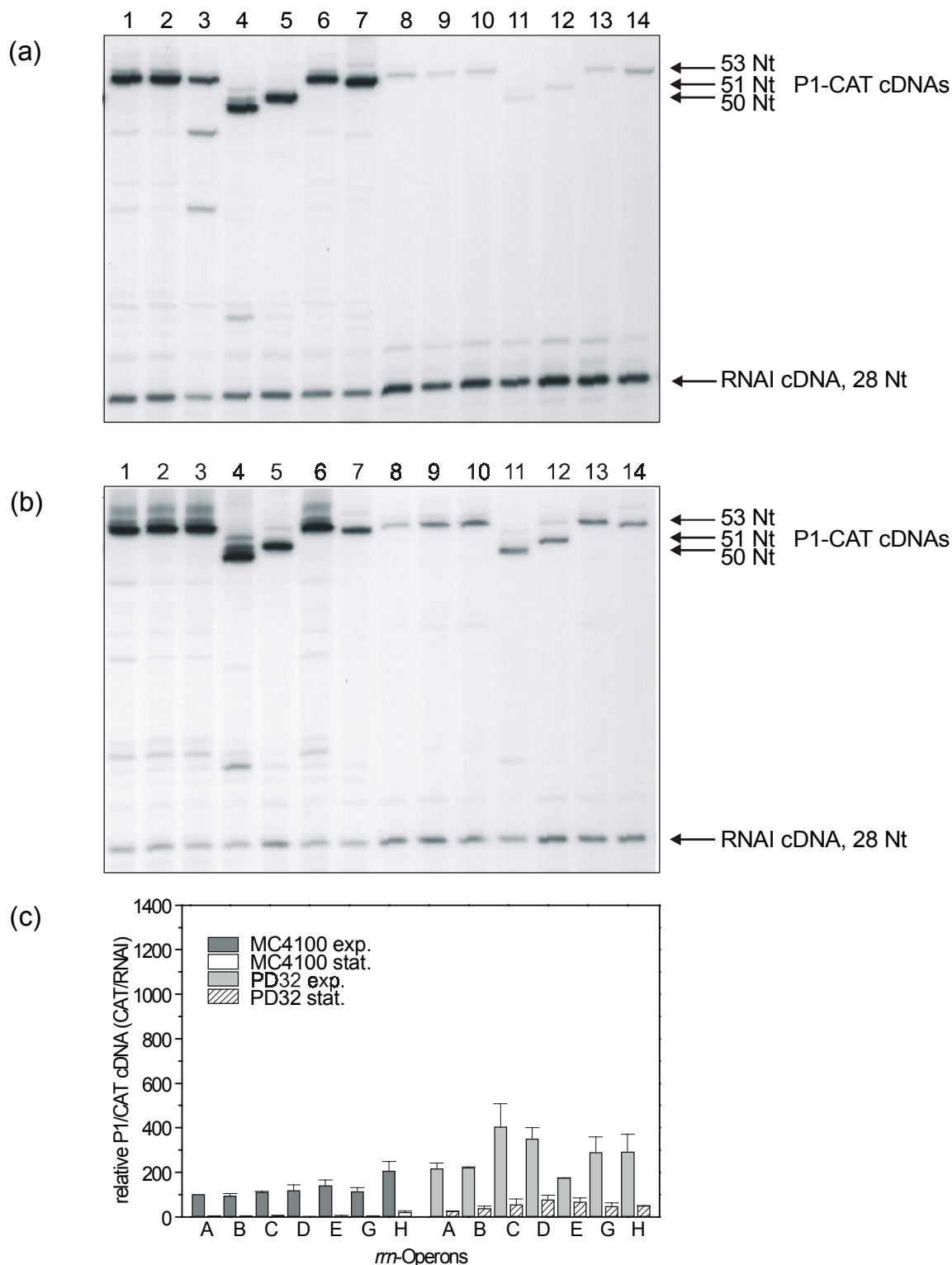


Abb. 2.13 Primer Extension-Analysen des Wildtyps MC4100 und der HNS-Mutante PD32 bei hohen Wachstumsraten. Der Teil (a) der Abbildung zeigt die Gelanalyse der Primer Extension-Reaktion des Wildtyps MC4100. Gezeigt sind die P1-CAT cDNAs und die RNAI cDNA von 28 Nukleotiden. Die Spuren 1 bis 7 enthalten die Produkte der Plasmide pHD1-A bis H zur exponentiellen Wachstumsphase, die Spuren 8 bis 14 analog die cDNAs aus der stationären Phase. Der Teil (b) zeigt die entsprechenden Resultate der Analysen der HNS-Mutante PD32. Der dritte Teil der Abbildung, Teil (c) enthält die grafische Darstellung der Auswertung wiederholter Experimente beider Analysen. Die relative Transkriptionsrate der P1-cat-Fusion des Plasmids pHD1-A während des logarithmischen Wachstums wurde gleich 100 % gesetzt. Alle weiteren relativen Transkriptionsraten (aus dem Verhältnis P1-CAT zum internen Standard RNAI) wurden dann entsprechend berechnet, sodass Raten größer oder kleiner 100 % ermittelt wurden (y-Achsenskalierung siehe Legende zu Abb. 2.14)

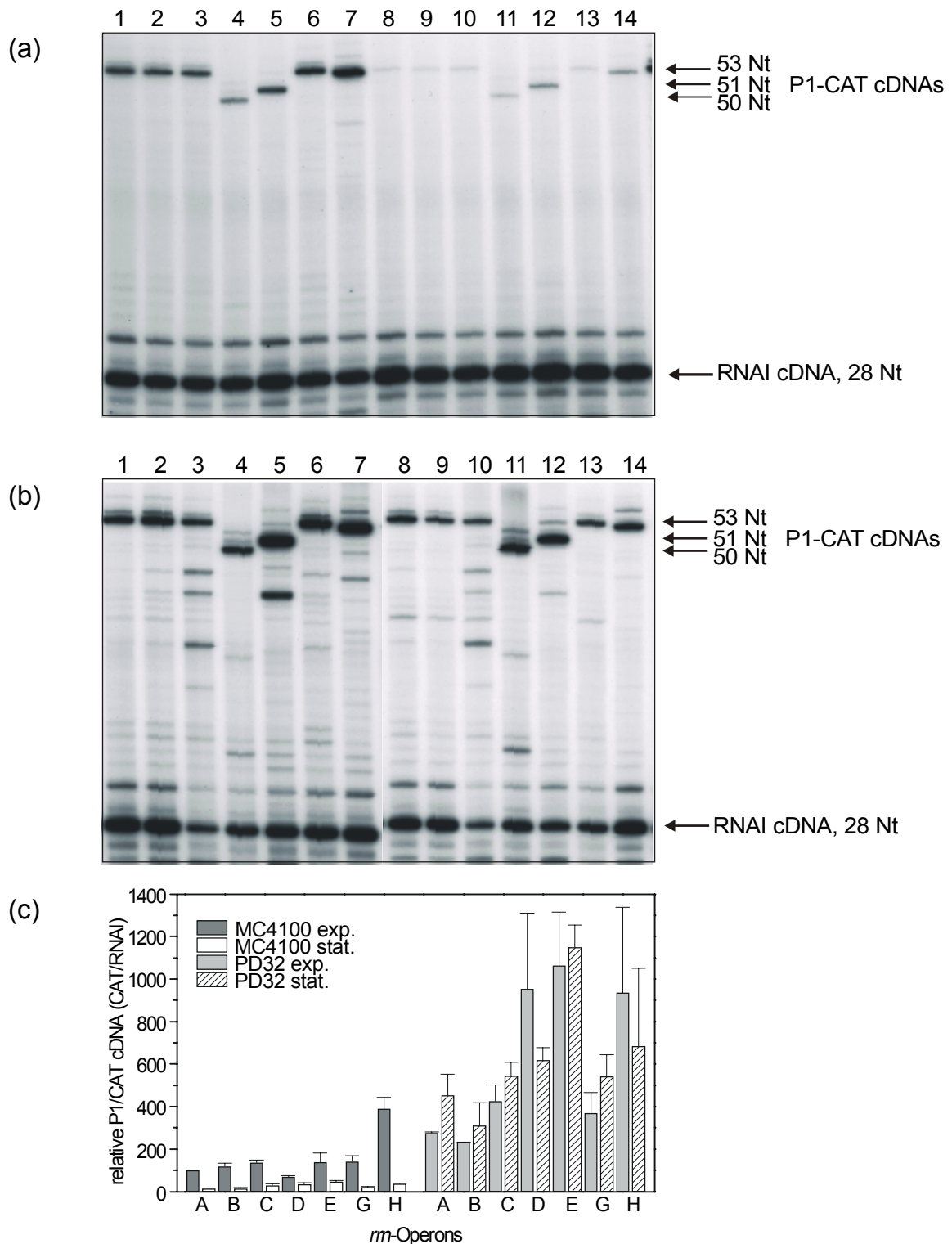


Abb. 2.14 Primer Extension-Analysen des Wildtyps MC4100 und der HNS-Mutante PD32 bei niedrigen Wachstumsraten. Die Abbildung entspricht in der Darstellung und Unterteilung (a), (b) und (c) vollkommen der Abbildung 2.13. Anhand der grafischen Auswertung (c) wird die suboptimale Achsenskalierung in Abb. 2.13 verständlich, die relativen Transkriptionsraten aller sieben Plasmide in beiden untersuchten Stämmen sind bei Festlegung der Expressionsrate des Plasmides pHd1-A im Wildtyp auf 100 % deutlich höher als bei hohen Wachstumsraten. Die 'absolute' Expression ist bei niedrigen Wachstumsraten jedoch eindeutig geringer als bei hohen Raten. Dies wird in den Teilen (a) und (b) der Abbildungen klar, Abb. 2.13 zeigt Exponate von 14 bzw. 16 Stunden, während die Röntgenfilme in Abb. 2.14 mehrere Tage (3 bzw. 5) exponiert wurden. Die Verhältnisse von P1-CAT cDNA zu RNAI cDNA lagen bei hohen Raten zumindest in den Wildtypen immer über 1, während das Verhältnis bei niedrigen Wachstumsraten meist kleiner 1 war (siehe Daten im Anhang unter 8.3).

Bei hohen und besonders bei niedrigen Wachstumsraten ist die Derepression der Expression des Fusionstranskriptes aus allen Operons in der H-NS-Mutante PD32 sehr deutlich zu beobachten. Die Skalierung der y-Achse in Teil (c) der Abbildung 2.13 wurde zum besseren Vergleich der grafischen Darstellung der Daten aus Abbildung 2.14 derartig hoch gewählt. Trotzdem sind die Phasenabhängigkeit und auch die Wachstumsratenabhängigkeit in den Abbildungen klar dargestellt. Die grafischen Darstellungen zeigen die relativen Transkriptionsraten der Fusionstranskripte. Durch die Normierung auf die Expression der Fusionstranskripte des *rrnA*-P1-Promotors sind Vergleiche zwischen den einzelnen Operons aus verschiedenen Experimenten möglich. Die geringere Gesamtexpression während niedriger Wachstumsraten geht nicht aus den Grafiken, jedoch eindeutig aus den Gelabbildungen hervor (siehe auch Legende zu Abbildung 2.14). Die 'absoluten' Verhältnisse *rrnA*-P1-CAT cDNA zur RNAI cDNA gemittelt aus den wiederholten Experimenten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Stamm	hohe Raten		niedrige Raten	
	exp. Phase	stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase
MC4100	1.36	0.10	0.15	0.02
PD32	2.88	0.34	0.36	0.55

Tab. 2.9 'Absolute' Transkriptverhältnisse *rrnA*-P1-CAT zu RNAI (Mittelwerte)

Anhand der bisherigen Daten geht eindeutig die H-NS-abhängige Repression aller sieben Operons hervor. Für alle UAS-Fragmente konnte die Bindung von H-NS gezeigt werden (2.2.3), allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Eine Betrachtung der H-NS-abhängigen Repression unter dem Aspekt eines potentiell differentiellen Einflusses auf die verschiedenen Operons soll über die Reduktion der Fusionstranskripte in den stationären Phasen erfolgen. Für jedes Operon wurde die Reduktion in der stationären Phase bei hohen und niedrigen Raten im MC4100 und im PD32 errechnet und die Daten sind in den Tabellen 2.10.1 und 2.10.2 dargestellt. Über eine Reihung der Reduktionswerte soll eine mögliche Korrelation mit der Bindungsintensität zu H-NS bzw. den ermittelten Krümmungsdaten untersucht werden.

Operon	Relative Transkriptraten in MC4100					
	hohe Wachstumsraten		Reduktion auf %	niedrige Wachstumsraten		Reduktion auf %
	exp. Phase	stat. Phase		exp. Phase	stat. Phase	
<i>rrnA</i>	100	7	7	100	13	13
<i>rrnB</i>	95	6	6	118	14	12
<i>rrnC</i>	112	8	7	136	30	22
<i>rrnD</i>	119	5	4	68	34	50
<i>rrnE</i>	140	5	4	137	46	34
<i>rrnG</i>	114	6	5	141	20	14
<i>rrnH</i>	206	20	10	388	36	9

Tab. 2.10.1 Reduktion der Transkription der P1-cat-Fusion im Wildtyp MC4100

Operon	Relative Transkriptraten in PD32					
	hohe Wachstumsraten			niedrige Wachstumsraten		
	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf %	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf %
<i>rrnA</i>	217	25	12	275	453	165
<i>rrnB</i>	223	39	17	232	311	134
<i>rrnC</i>	404	56	14	426	545	128
<i>rrnD</i>	352	77	22	955	618	65
<i>rrnE</i>	175	67	38	1062	1150	108
<i>rrnG</i>	290	47	16	371	543	146
<i>rrnH</i>	293	50	17	936	685	73

Tab. 2.10.2 Reduktion der Transkription der P1-cat-Fusion in der H-NS-Mutante PD32

Zur Bestimmung der Reduktion in den stationären Phasen wurden die relativen Transkriptionsraten der sieben Testplasmide in den exponentiellen Phasen jeweils als 100 %-Wert bestimmt. Die Reduktion (auf x %) in den stationären Phasen führte dann zu den in Tab. 2.11 dargestellten Reihenfolgen. Die Reihenfolge ist im Wildtyp von stärkerer zu schwächerer Reduktion dargestellt, in der Mutante allerdings entgegengesetzt, da sich bei H-NS-Abhängigkeit der Reduktion die Reihenfolge in einem Stamm, der kein H-NS synthetisiert, umkehren muss.

Stamm bzw. Wachstumsrate	Reihung nach Reduktion
MC4100, hohe Raten	<i>rrnD</i> = <i>rrnE</i> > <i>rrnG</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnA</i> = <i>rrnC</i> > <i>rrnH</i>
MC4100, niedrige Raten	<i>rrnH</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnA</i> > <i>rrnG</i> > <i>rrnC</i> > <i>rrnE</i> > <i>rrnD</i>
PD32, hohe Raten	<i>rrnE</i> < <i>rrnD</i> < <i>rrnB</i> = <i>rrnH</i> < <i>rrnG</i> < <i>rrnC</i> < <i>rrnA</i>
PD32, niedrige Raten	<i>rrnA</i> < <i>rrnG</i> < <i>rrnB</i> < <i>rrnC</i> < <i>rrnE</i> < <i>rrnH</i> < <i>rrnD</i>

Tab. 2.11 Reihung der verschiedenen Operons nach Reduktionsausmaß

Einfache Korrelationen zwischen Reduktionsausmaß im Wildtyp und Derepression in der Mutante sind anhand der vorliegenden Daten nicht darzustellen. Schon bei unterschiedlichen Wachstumsraten im gleichen *E. coli* Stamm wechseln die Extremwerte, siehe *rrnD* und *rrnH* im Wildtyp sowie *rrnA* in der Mutante.

Reihung nach K-Wert bzw. Modell oder H-NS-Bindung	Krümmungsausmaß der UAS-Fragmente
K-Wert	<i>rrnB</i> > <i>rrnD</i> > <i>rrnG</i> > <i>rrnC</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnA</i> > <i>rrnE</i>
<i>Gabriel</i>	<i>rrnD</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnG</i> = <i>rrnC</i> > <i>rrnH</i> > <i>rrnE</i> > <i>rrnA</i>
H-NS-Bindung	<i>rrnH</i> > <i>rrnB</i> > <i>rrnC</i> > <i>rrnG</i> > <i>rrnE</i> > <i>rrnA</i> > <i>rrnD</i>

Tab. 2.12 Reihung der verschiedenen Operons nach Krümmung und H-NS-Bindung

Alle Operons zeigen eine H-NS-abhängige Repression in der stationären Phase. Bei hohen Wachstumsraten ist die Expression im H-NS-defizienten Stamm 2- bis 10-fach (*rrnE*) verglichen mit dem Wildtyp erhöht. Bei niedrigen Raten ist die Expression in PD32 in der stationären Phase 1.3 (*rrnD*)- bis 13-fach höher als in MC4100. Beson-

ders auffällig sind die Operons *rrnD*, *E* und *H*. Diese Operons zeigen eine veränderte Regulation in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit.

Wie bereits in Teil 2.2.3 beschrieben, kann keine Korrelation zwischen Krümmung und H-NS-Bindung bei den Operons *rrnD* und *rrnH* festgestellt werden. Auch anhand der *in vivo* Daten muss ein sehr komplexer Zusammenhang festgestellt werden, der nachfolgender Diskussion vorbehalten bleibt.

2.6.2 Die Transkription der P1-*cat*-Fusionen im Wildtyp BSN26 und in der *stpA*⁽⁻⁾*hns*⁽⁻⁾-Mutante BSN29

Das *Escherichia coli* Gen *stpA* codiert ein 15.3 kDa Protein (Zhang *et al.*, 1995), dass eine 58 %ige Homologie zum Transkriptionsfaktor H-NS aufweist (Sondén & Uhlin, 1996). *StpA* wird aufgrund mechanistischer Parallelen in der Regulation von Promotoren mit gekrümmten DNA Sequenzen und der großen Homologie mit H-NS auch als molekularer Back-up für H-NS bezeichnet (Zhang *et al.*, 1996). Die Untersuchung der Transkriptionsraten der P1-*cat*-Fusionen in einem Stamm, der weder H-NS noch *StpA* synthetisiert, schien daher notwendig. Die Daten für den Wildtyp BSN26 und die Doppelmutante BSN29 wurden aus Primer Extension-Reaktionen mit Gesamt-RNA-Isolaten aus hohen Wachstumsraten durchgeführt und sind in der Abbildung 2.15 im Vergleich mit MC4100 und PD32 grafisch dargestellt.

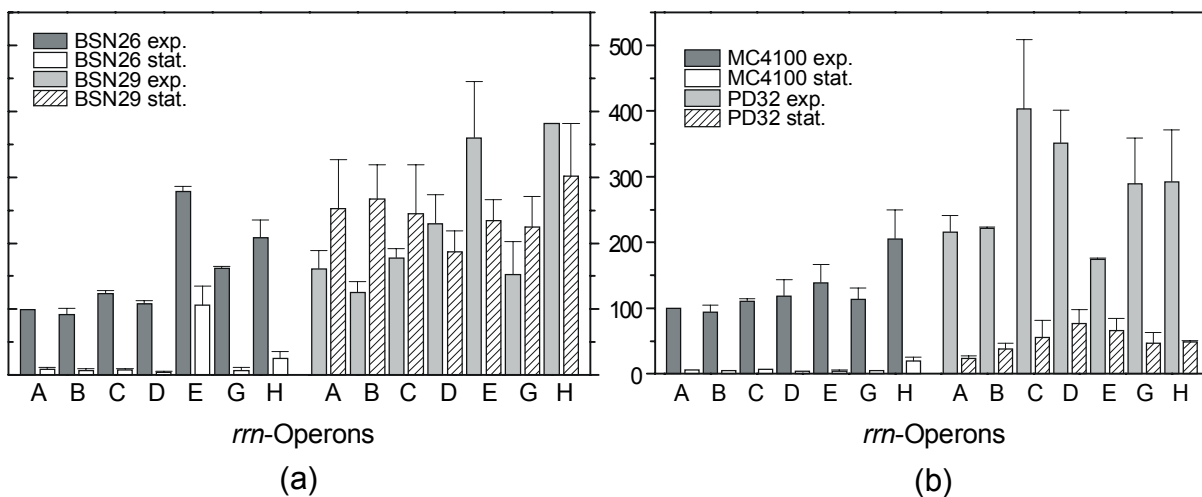


Abb. 2.15 Relative Transkriptraten im Wildtyp BSN26 und der H-NS/StpA-Doppelmutante sowie im Wildtyp MC4100 und der H-NS-Mutante PD32 bei hohen Wachstumsraten. Die Säulen stellen die relativen Transkriptraten der einzelnen Plasmide in den verschiedenen Stämmen während exponentieller und stationärer Phase dar. Der y-Achsen-Maßstab trägt für beide Stammpaare die gleiche Skalierung. Signifikant unterschiedlich ist die Expression des Plasmides pHD1-E in beiden Wildtypstämmen. Diese unterscheiden sich nur durch eine Tn10 Insertion (BSN26 = MC4100 *trp*::Tn10). Die Doppelmutante BSN29 zeigt bei hohen Wachstumsraten eine ähnlich ausgeprägte Derepression der *rrnE*-P1-*cat*-Fusion wie die H-NS-Mutante PD32 bei niedrigen Wachstumsraten (siehe Abbildung 2.14). Bei hoher Wachstumsrate ist die Expression im PD32 zwar ebenfalls dereprimiert, jedoch nicht in gleicher Ausprägung wie bei niedrigen Raten oder in der Doppelmutante.

Die grafische Auswertung der Primer Extension-Analysen mit Gesamt-RNA aus den Stämmen BSN26 und BSN29 im Vergleich mit den Daten des Wildtyps MC4100 und der Mutante PD32 lässt die Schlussfolgerung zu, dass StpA bei hohen Wachstumsraten als molekularer Back-Up für H-NS fungiert. Bei niedrigen Wachstumsraten erfolgt die Expression in MC4100 ähnlich wie in der Doppelmutante (BSN29), einige Operons (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC* und *rrnG* sowie in PD32 zusätzlich *rrnE*) werden in der stationären Phase sogar stärker transkribiert als während des exponentiellen Wachstums. Die Transkription der P1-*cat*-Fusion im Plasmid pHD1-E ist in der Doppelmutante sowohl im exponentiellen als auch im stationären Wachstum deutlich stärker als im PD32.

2.6.4 Die Transkription der P1-*cat*-Fusionen im Wildtyp CSH50 und in der *fis*⁽⁻⁾-Mutante CSH50 *fis::kan*

Mit Ausnahme des *rrnE*-Fragmentes zeigen alle UAS-Fragmente der ribosomalen RNA-Operons von *E. coli* eine starke FIS-Bindung mit einem hohen Shift im Verzögerungsgel. Da FIS neben einer bevorzugten Bindung an gekrümmte DNA auch sequenzspezifisch bindet, liegt die Vermutung einer Regulation aller Operons durch FIS nahe. In dieser Arbeit wurde die Expression in der *fis*⁽⁻⁾-Mutante CSH50 *fis::kan* sowohl bei hohen Wachstumsraten als auch bei niedrigen Wachstumsraten sowie nach einem 'nutritional upshift' untersucht. Um die Phase maximaler FIS-Aktivierung sicher zu bestimmen, wurden PE-Analysen mit RNA-Isolaten der Plasmide pHD1-B und pHD1-E zu verschiedenen Zeitpunkten exponentiellen Wachstums durchgeführt. Zur Bestimmung der maximalen FIS-Aktivierung wurde RNA zu vier verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase isoliert.

- | | | |
|----|------------------------------|------------------------------------|
| 1. | OD ₆₀₀ = 0.1 | frühe exponentielle Phase |
| 2. | OD ₆₀₀ = 0.25/0.3 | frühe mittlere exponentielle Phase |
| 3. | OD ₆₀₀ = 0.5/0.6 | späte mittlere exponentielle Phase |
| 4. | OD ₆₀₀ = 0.8 | späte exponentielle Phase |

Nach Auswertung der Primer Extension-Analysen wurden die P1-CAT cDNA/RNAI cDNA Verhältnisse grafisch ausgewertet. Der Maximalwert (*rrnB*, OD₆₀₀ = 0.3) wurde gleich 100 % gesetzt. Die Wachstumskurven, das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Primer Extension-Produkten sowie die grafische Auswertung werden in Abbildung 2.16 gezeigt.

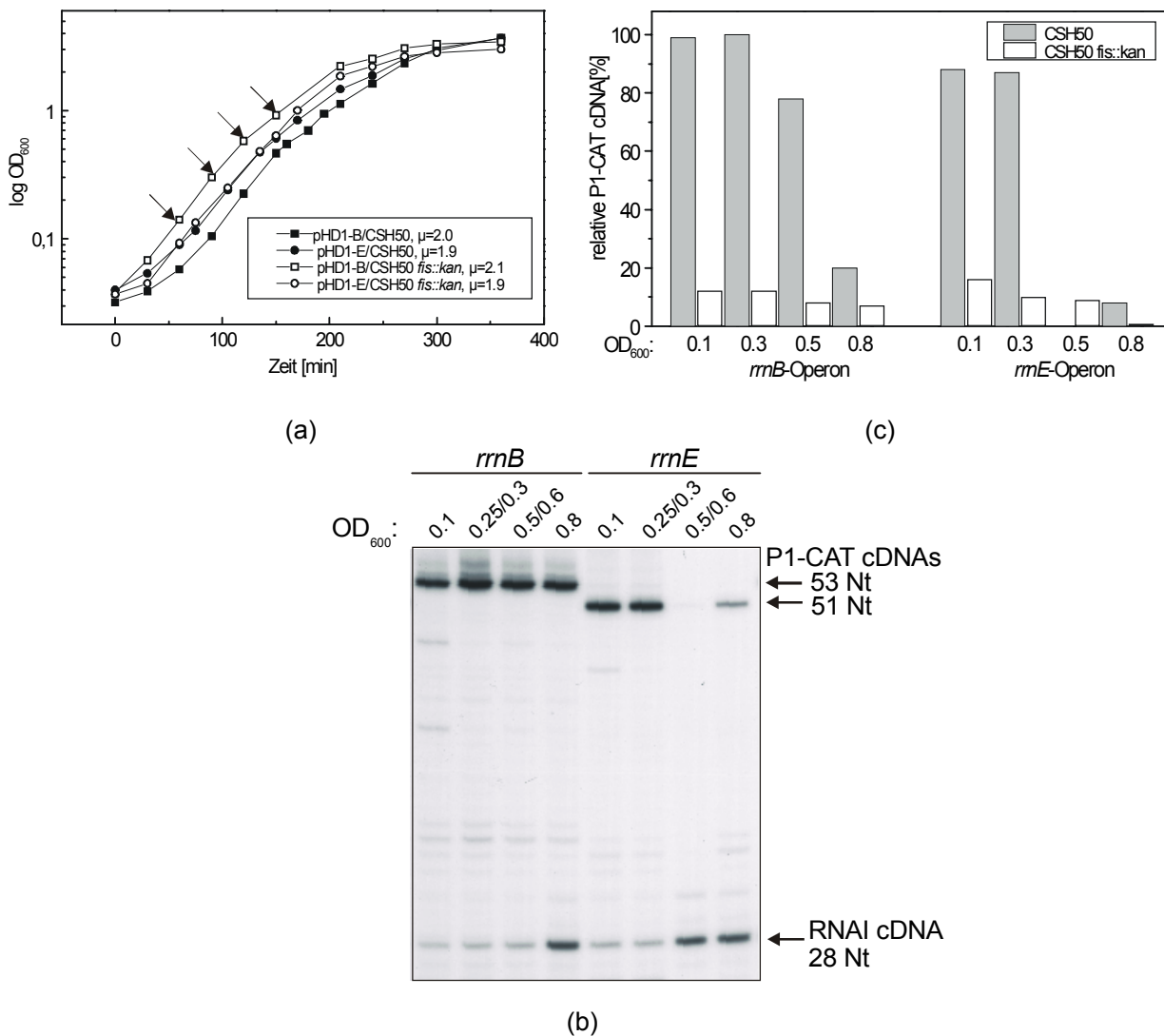


Abb. 2.16 Test der maximalen Aktivierung der Operons *rrnB* und *rrnE* durch FIS

Teil (a) der Abbildung zeigt die vier Wachstumskurven, die Wachstumsraten sind in der Legende angegeben. Die Pfeile markieren die OD_{600} -Bereiche der RNA-Isolation. (b) 16 % PAA-Gel zur Analyse der Primer Extension-Produkte. P1-CAT cDNAs und die RNAI cDNA sind markiert. (c) Die grafische Darstellung der quantifizierten Produkte aus (b). Der OD_{600} -Wert 0.5/0.6 von pHD1-E (*rrnE*) in CSH50 wurde nicht ausgewertet.

Die Primer Extension-Analysen zeigen klar die maximale Transkriptionsaktivität der P1-*cat*-Fusion zu Beginn des exponentiellen Wachstums. Die Untersuchungen der FIS-abhängigen Transkription erfolgte daher mit RNA-Isolaten der frühen exponentiellen Wachstumsphase.

Die Resultate der PE-Analysen mit RNA-Isolaten aus CSH50 und CSH50 *fis::kan* aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase während hoher und niedriger Wachstumsraten sind in Abbildung 2.17 dargestellt.

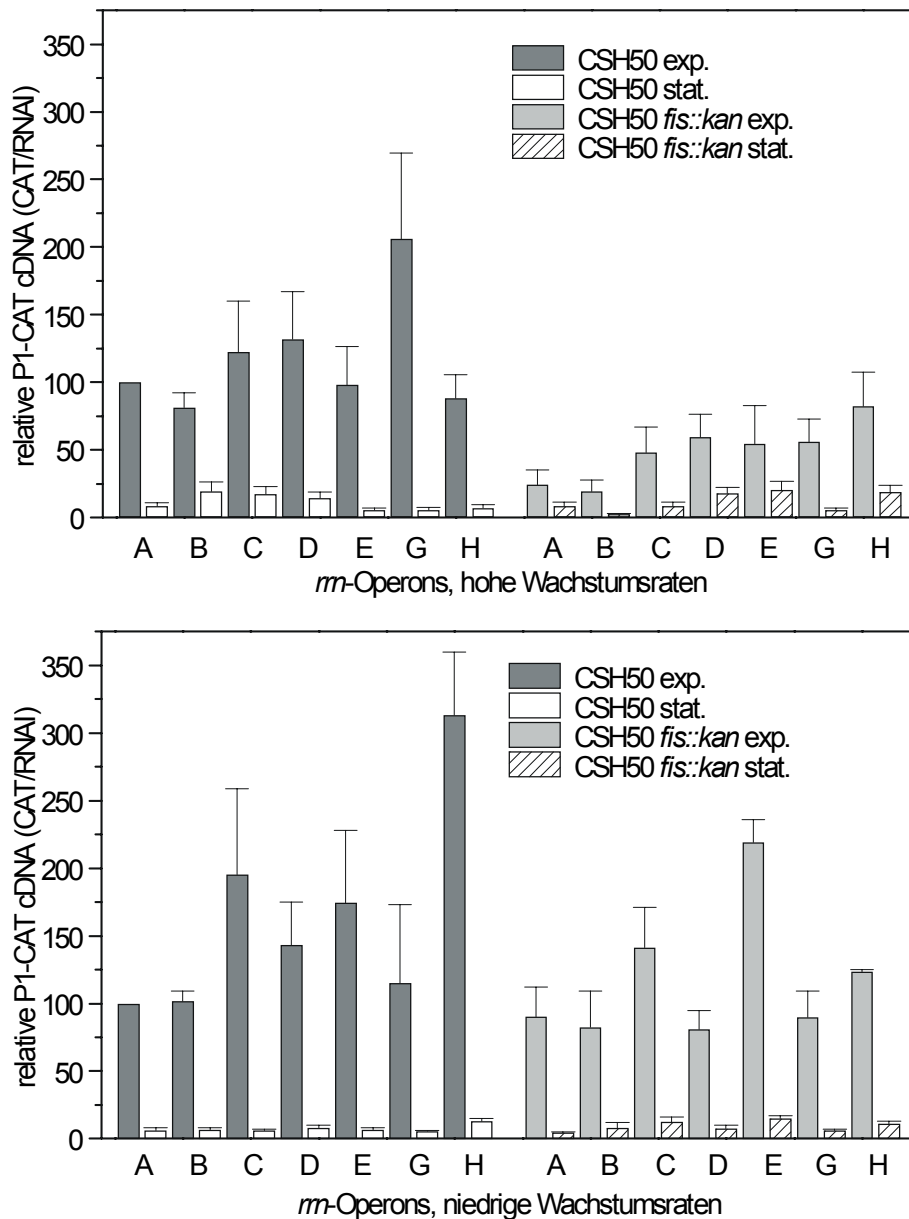


Abb. 2.17 Transkriptionsraten im Wildtyp CSH50 und in der *fis*⁽⁻⁾-Mutante CSH50 *fis::kan*

Dargestellt sind im Vergleich hohe und niedrige Wachstumsraten. Die relativen Raten sind bezogen auf die Expression des P1-*cat*-Fusionstranskriptes aus pHD1-A in der exponentiellen Phase des Wildtyps CSH50 (=100%). Die 'absolute' Expression der Fusionstranskripte lag bei hohen Wachstumsraten durchschnittlich 12 mal höher als bei niedrigen Raten.

Mit Ausnahme des von der *rrnH*-UAS regulierten Reportertranskriptes zeigen alle P1-*cat*-Fusionen eine reduzierte Expression in der *fis*⁽⁻⁾-Mutante CSH50 *fis::kan* bei hohen Wachstumsraten. Die Transkription der Operons *rrnA-rrnG* ist maximal auf ein Fünftel reduziert, die Expression des Transkripts aus pHD1-H bleibt nahezu unverändert. Die Transkripraten von sechs Operons sind bei niedrigen Wachstumsraten im FIS-defizienten Stamm CSH50 *fis::kan* geringer als im isogenen Wildtyp. Lediglich das *rrnE*-Operon wird unter diesen Bedingungen stärker exprimiert als im CSH50. Im Gegensatz zu schnellem Wachstum ist bei niedrigen Wachstumsraten ein FIS-Effekt am *rrnH*-Operon zu beobachten, die Transkription im *fis*⁽⁻⁾-Stamm ist auf ein Drittel reduziert. Die Reduktion der Transkription in der stationären Phase erfolgt in allen Stämmen zu allen Wachstumsphasen in vergleichbarem Ausmaß. Zur detail-

lierten Übersicht sind in Tabelle 2.13 die relativen Transkriptraten während der exponentiellen Wachstumsphasen in beiden Stämmen und die prozentuale Expression (bezogen auf jeweils 100 % Expression des einzelnen Operons im Wildtyp) der Plasmide in CSH50 *fis::kan* aufgelistet.

Operon	Relative Transkriptraten					
	hohe Raten			niedr. Raten		
	CSH50 (100 %)	CSH50 <i>fis::kan</i>	prozentuale Expression in CSH50 <i>fis::kan</i>	CSH50 (100%)	CSH50 <i>fis::kan</i>	prozentuale Expression in CSH50 <i>fis::kan</i>
<i>rrnA</i>	100	25	25	100	91	91
<i>rrnB</i>	81	20	25	102	83	81
<i>rrnC</i>	123	48	39	196	142	72
<i>rrnD</i>	132	59	45	144	81	56
<i>rrnE</i>	98	54	55	175	219	125
<i>rrnG</i>	206	56	27	115	90	78
<i>rrnH</i>	88	82	93	314	124	39

Tab. 2.13 Relative Transkriptraten während des exponentiellem Wachstums

Die Messung der Transkriptraten kann mit den Gelshiftanalysen weitestgehend korreliert werden. Eine signifikant schwächere Komplexbildung mit FIS wird beim *rrnE*-Operon festgestellt. Die Transkription der P1-*cat*-Fusion aus pHD1-E wird gemäß der Primer Extension-Analysen bei hohen Wachstumsraten am geringsten und bei niedrigen Wachstumsraten in FIS-Mutanten gar nicht reduziert. Ursache könnte die schwache FIS-Komplexierung durch die bereits dargestellte zweifache Abweichung der Konsensussequenz der FIS I-Bindestelle sein (2.2.3, S.35). Die anderen UAS-Fragmente zeigten alle eine starke FIS-Bindung im Verzögerungsgel. Unterschiede treten jedoch auch hier in den Konsensussequenzen auf. Die Sequenzen der Operons *rrnC* und *rrnD* zeigen eine Abweichung in der FIS I-Bindestelle an einer Position. Die *in vivo*-Daten belegen in beiden Fällen eine gemäßigte Reduktion der Expression bei hohen Wachstumsraten in CSH50 *fis::kan*. Die Plasmide pHD1-A, B und G enthalten UAS-Fragmente, deren Sequenzen eine völlige Übereinstimmung mit der FIS-Konsensussequenz in der FIS I-Bindestelle aufweisen, die Transkription dieser P1-*cat*-Fusionen zeigt die stärkste Reduktion in CSH50 *fis::kan*. Das *rrnH*-Fragment enthält ebenfalls eine hundertprozentige Konsensussequenz der FIS I-Bindestelle. Während hoher Raten bleibt die Expression in CSH50 *fis::kan* jedoch unverändert zum Wildtyp. Bei langsamen Wachstum ist die Expression der *rrnH*-P1-*cat*-Fusion im Wildtyp allerdings drastisch erhöht. Hier scheint die starke Aktivierung durch das FIS Protein zu erfolgen, die Expression in CSH50 *fis::kan* ist im Gegensatz zu allen anderen Operons stark reduziert. Zusammenfassend kann die transkriptionsaktivierende Wirkung des Proteins FIS auf alle sieben ribosomalen P1-Promotoren festgestellt werden. Die Operons *rrnA* bis *rrnG* werden durch FIS primär bei hohen Wachstumsraten aktiviert, während dies am *rrnH*-Operon ausschließlich bei niedrigen Wachstumsraten erfolgt. Das Ausmaß der FIS-abhängigen Aktivierung ist in der Abbildung 2.18 nochmals grafisch dargestellt. Die Expression im FIS-defizienten Stamm wird als basale Expression, beispielsweise durch die Aktivierung über das UP-Element, angenommen.

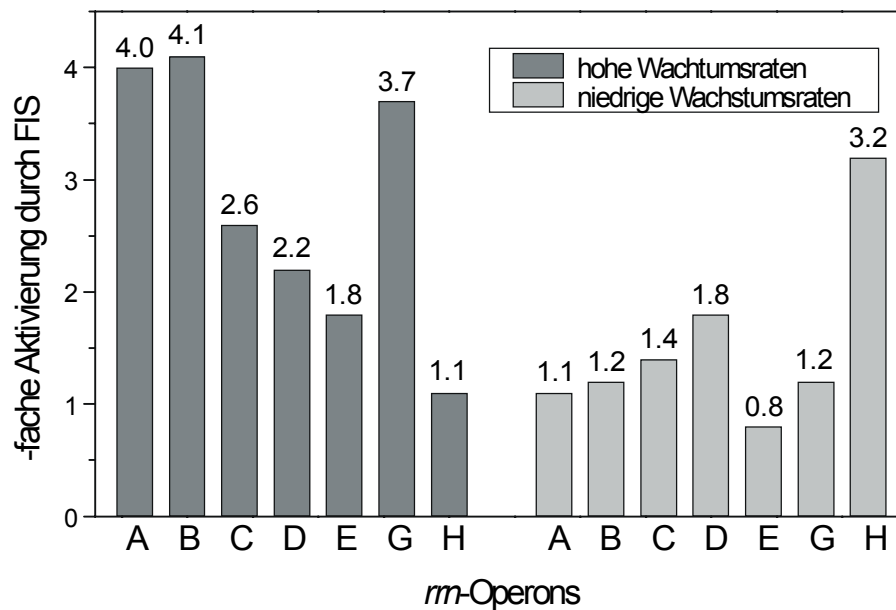


Abb. 2.18 Die FIS-abhängige Aktivierung der P1-cat-Transkription. Das Diagramm zeigt die Aktivierung der einzelnen Operons durch das FIS-Protein zu hohen und niedrigen Wachstumsraten. Die Transkriptraten im *fis*⁽⁻⁾-Stamm wurden als basale Expression gleich 1 gesetzt, die Säulen geben die x-fache Aktivierung durch FIS an.

Aus Abbildung 2.18 geht eindeutig die differentielle Aktivierung der sieben ribosomalen RNA-Operons durch das FIS-Protein hervor. Ebenso klar ist die Wachstumsratenabhängigkeit der Regulation durch FIS bei allen Operons.

Zusätzlich zu den Daten aus Primer Extension-Analysen von Transkripten aus hohen und niedrigen Wachstumsraten sollte die Transkriptionsregulation durch den Faktor FIS über 'nutritional upshifts' untersucht werden. Bei derartigen Versuchen werden Bakteriensuspensionen zunächst unter Bedingungen langsamen Wachstums kultiviert, und zu einem bestimmten Zeitpunkt wird konzentriertes Vollmedium zugefügt, was die sofortige Erhöhung der Wachstumsrate zur Folge hat. In vergleichbaren Experimenten war gezeigt worden, dass die FIS-Konzentration nach einem 'nutritional upshift' stark ansteigt und etwa 60 Minuten später ihr Maximum erreicht (Nilsson *et al.*, 1992). Die Untersuchung der Transkriptraten in CSH50 (WT) und CSH50 *fis::kan* zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach einem 'upshift' sollte erwartungsgemäß Unterschiede in beiden Stämmen zeigen. Zur experimentellen Durchführung wurden alle sieben Plasmide in den beiden Stämmen unter gleichen Bedingungen wie zur Isolation von Gesamt-RNA zu niedrigen Wachstumsraten kultiviert. Bei Erreichen der frühen bis mittleren exponentiellen Phase wurden 20 ml Kultur zur RNA-Isolation entnommen und gleichzeitig 1/10 Volumen 10-fach konzentriertes LB-Medium mit 2 % Glukose zugegeben. Jeweils 60 Minuten und 120 Minuten nach 'upshift' wurden 10 ml der Kultur zur RNA-Isolation entnommen. Das Wachstum wurde durch Streumessungen während der gesamten Zeit verfolgt und Wachstumskurven erstellt. Abbildung 2.19 zeigt exemplarisch die Wachstumskurven von pHD1-H in beiden Stämmen.

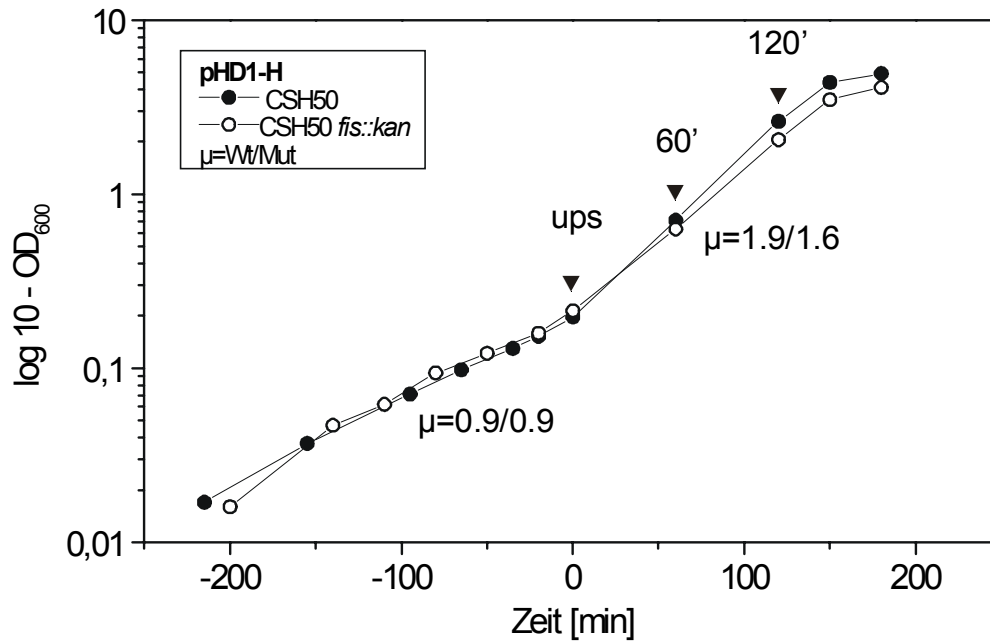


Abb. 2.19 Wachstumskurven während eines 'upshifts', exemplarisch pHD1-H

Der 'upshift' erfolgte zum Zeitpunkt 0, nach 60 und 120 Minuten (Pfeile) wurden Proben zur RNA-Isolation entnommen. Die Wachstumsraten sind in der Abbildung eingetragen.

Unmittelbar nach Zugabe des Vollmediums (f.c. LB/0.2 % Glukose) ist die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit festzustellen. Im Wildtyp wird die Verdopplung erreicht, in CSH50 erreicht die Rate das 1.8-fache. Die Auswertungen der Primer Extension-Analysen der isolierten Gesamt-RNAs werden in der Abbildung 2.20 gezeigt. Auch diese Daten zeigen eindeutig die Aktivierung aller Operons durch den Transkriptionsfaktor FIS. Die weitere Transkriptionszunahme nach einem 'upshift' kann nicht festgestellt werden. Eine differentielle Regulation der Operons *rrnD* und besonders *rrnE* und *rrnH* zu den Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* und *rrnG* nach Anreicherung des Nährmediums ist offensichtlich. Weiterreichende Aussagen können aus dem Experiment in dieser Form nicht getroffen werden.

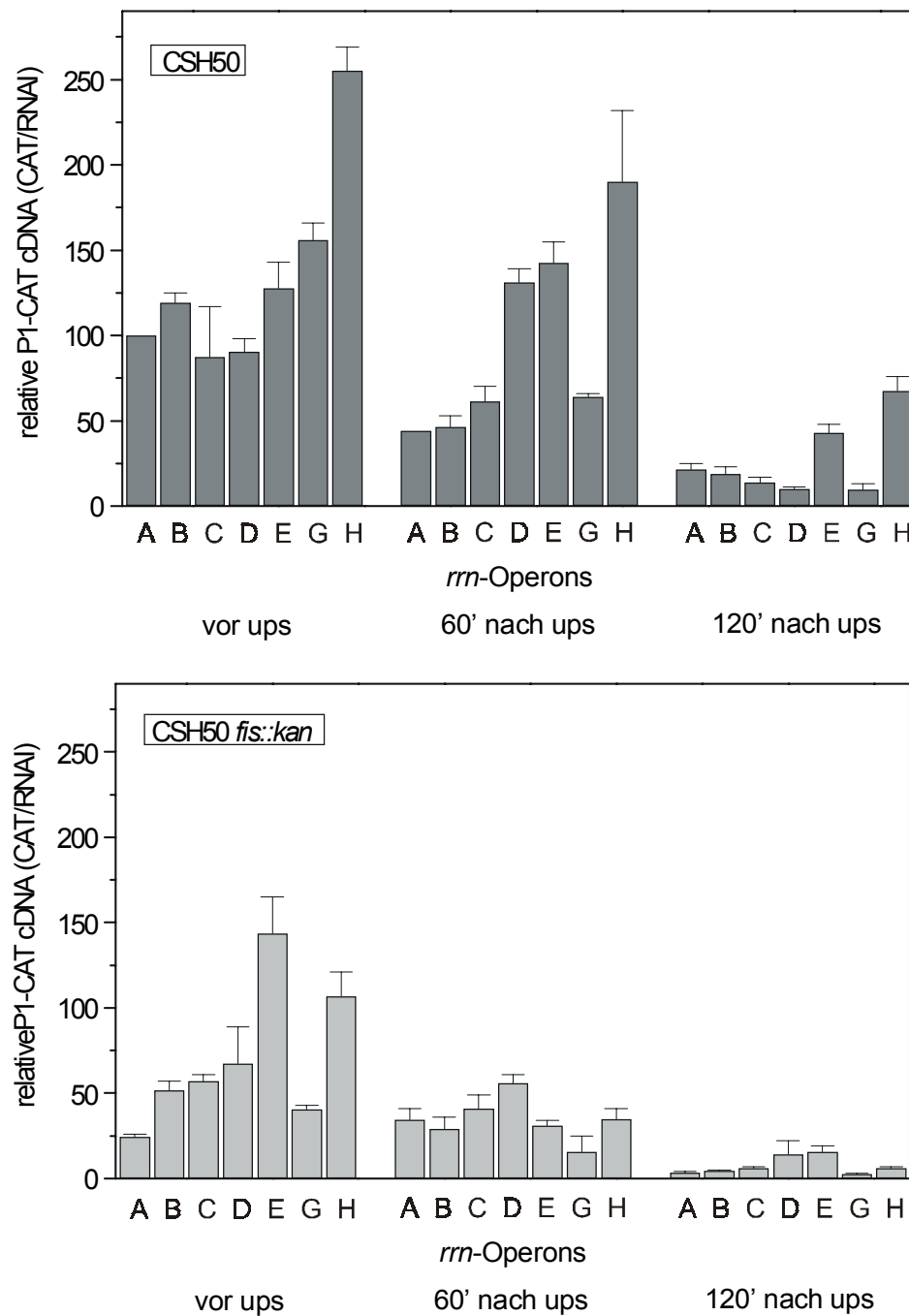


Abb. 2.20 Relative Transkriptraten vor und nach einem 'nutritional upshift'

Der Teil (a) der Abbildung zeigt die relativen Transkriptraten im Wildtyp CSH50 vor sowie 60' und 120' nach Zugabe des Vollmediums. Teil (b) enthält die entsprechenden Daten für CSH50 *fis::kan*.

2.6.5 Die Transkription der P1-*cat*-Fusionen im Wildtyp C600 und in der *fis*⁽⁻⁾ *hns*⁽⁻⁾-Mutante C600 *fis::kan hns::tet*

Tippner *et al.* beschrieben 1994 ein Modell zur Transkriptionsregulation ribosomaler RNA-Operons (siehe Einleitung). Grundlage dieses Modells ist die antagonistische Wirkungsweise der beiden Transkriptionsfaktoren am *rrnB*-Operon, dem Aktivator FIS und dem Repressor H-NS. Die Fragestellung zur Analyse der Transkriptionsraten des Fusionstranskriptes P1-*cat* in einem Stamm, der weder FIS noch H-NS synthetisieren kann, war dahingehend, ob nach Eliminierung der bekannten Transkriptionsfaktoren weiterhin eine regulierte Transkriptionsaktivität durch zusätzliche regulatorische Mechanismen gemessen werden kann. Anhand der grafischen Auswertung der Primer Extension-Analysen von RNAs aus dem Wildtyp C600 und H-NS/FIS-Doppelmutanten (C600 *fis::kan hns::tet*), die in den Abbildungen 2.21.1 und 2.21.2 gezeigt werden, ist eine phasenabhängige und wachstumsratenabhängige Regulation trotz Abwesenheit von FIS und H-NS festzustellen.

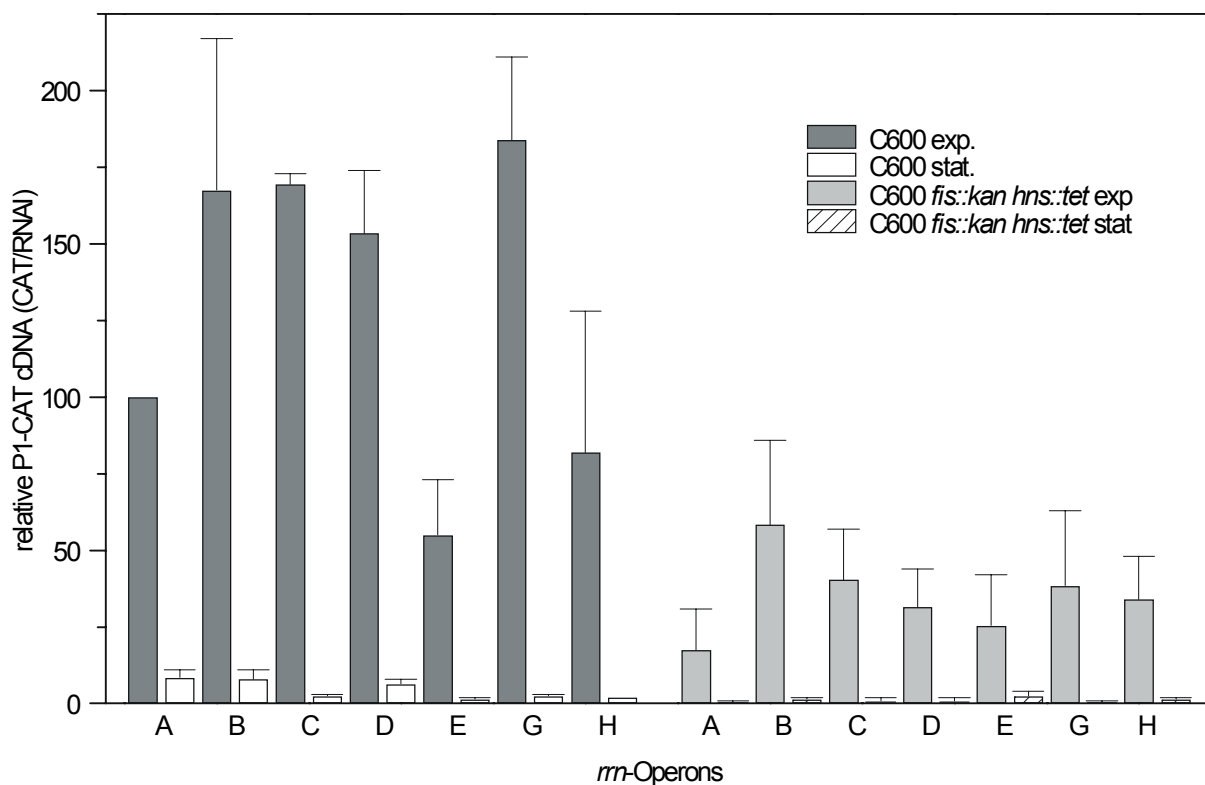


Abb. 2.21.1 Relative P1-*cat*-Transkriptionen der *rrn*-Operons in C600 und C600 *fis::kan hns::tet* bei hohen Wachstumsraten. Die Expression des Fusionstranskriptes aller sieben Plasmide ist in C600 *fis::kan hns::tet* gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Die grafische Darstellung zeigt große Ähnlichkeit mit der Auswertung der PE-Analysen aus CSH50/CSH50 *fis::kan* (Abb. 2.17) bei hohen Wachstumsraten. In beiden Stammpaaren zeigt pH1-G die stärkste Expression der P1-*cat*-Fusion. Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Reduktion des Transkriptes in der stationären Phase ist bei hohen Raten anhand dieser Darstellung nicht zu beobachten. In Tabelle 2.14 sind die quantifizierten Transkriptionsraten nochmals gegenübergestellt.

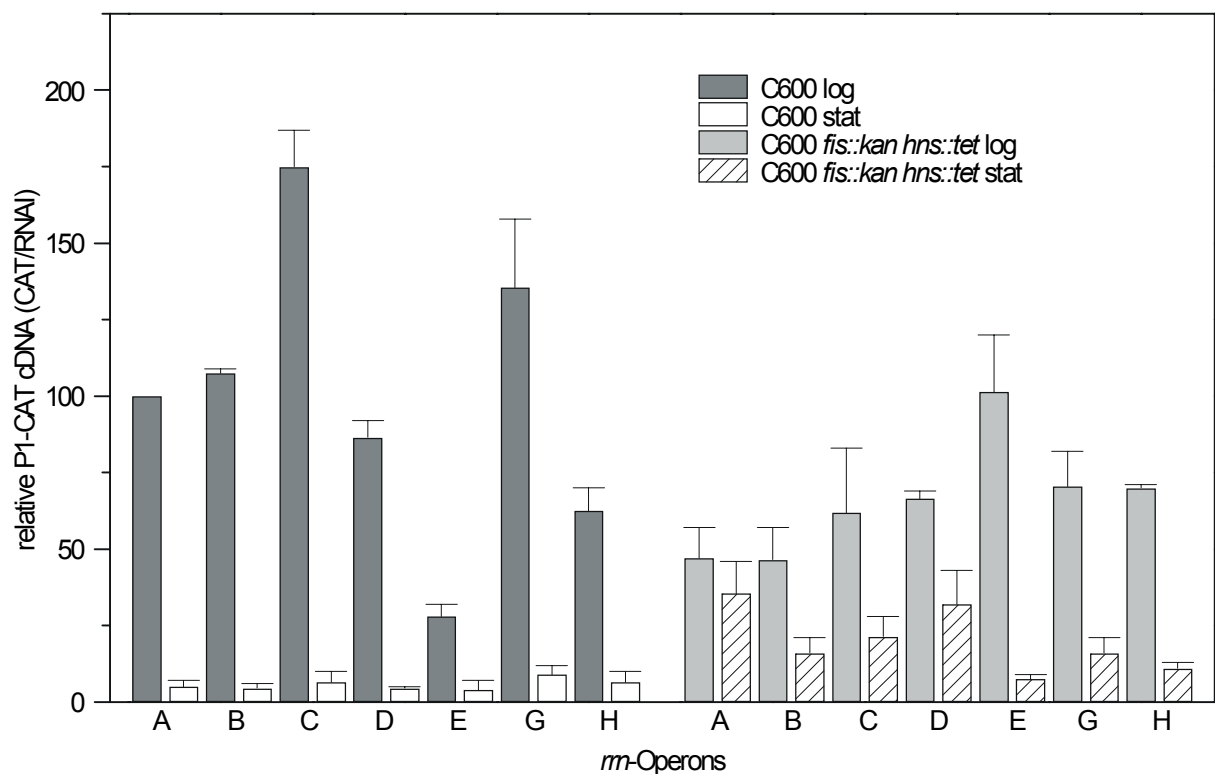


Abb. 2.21.2 Relative P1-cat-Transkriptraten der *rrn*-Operons in C600 und C600 *fis::kan hns::tet* bei niedrigen Wachstumsraten. Bei niedrigen Wachstumsraten ist die Transkription der P1-cat-Fusionen der Plasmide pHD1-A, B, C, D und G in der Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp ebenfalls reduziert. Die Plasmide pHD1-E und pHD1-H zeigen allerdings eine Verdreifachung der Transkription (pHD1-E) bzw. eine gleichbleibende Transkriptionsrate (pHD1-H) in C600 *fis::kan hns::tet*. Klar zu erkennen ist die Derepression der Transkription in der stationären Phase bei niedrigen Wachstumsraten in allen sieben Plasmiden. Auch diese Daten sind in Tabelle 2.14 zusammengefasst.

Die Primer Extension-Analysen der Stämme C600 und C600 *fis::kan hns::tet* weisen erneut auf die veränderte Transkriptionsregulation durch die Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS bei hohen und niedrigen Wachstumsraten hin. Wachsen die Bakterien mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 Verdopplungen pro Stunde, wird zunächst nur die geringere Transkription während der exponentiellen Phase deutlich. Hier scheint sich in erster Linie das Fehlen des Transkriptionsaktivators FIS auszuwirken. Bei langsamen Wachstum mit einer Generationszeit von mehr als einer Stunde ist zusätzlich eine Derepression der Transkription in der stationären Wachstumsphase zu beobachten. Die Abwesenheit von H-NS scheint sich ebenso wie bei den Analysen in der HNS-Mutante PD32 bei niedrigen Wachstumsraten stärker auszuwirken. In der Tabelle 2.14 sind die Transkriptraten bei verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten und Wachstumsphasen aufgeführt.

(a) Relative P1- <i>cat</i> -Transkriptraten bei hohen Wachstumsraten							
Operon	C600			C600 <i>fis::kan hns::tet</i>			
	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf % in der stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf % in der stat. Phase	Reduktion auf % (WT exp. = 100 %) in der exp. Phase
<i>rrnA</i>	100	9	9	18	1	6	18
<i>rrnB</i>	168	8	5	59	2	3	35
<i>rrnC</i>	170	3	2	41	1	2	24
<i>rrnD</i>	154	7	5	32	1	3	21
<i>rrnE</i>	55	2	4	26	3	12	47
<i>rrnG</i>	184	3	2	39	1	3	21
<i>rrnH</i>	82	2	2	34	2	6	41

(b) Relative P1- <i>cat</i> -Transkriptraten bei niedrigen Wachstumsraten							
Operon	C600			C600 <i>fis::kan hns::tet</i>			
	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf % in der stat. Phase	exp. Phase	stat. Phase	Reduktion auf % in der stat. Phase	Reduktion auf % (WT exp. = 100 %) in der exp. Phase
<i>rrnA</i>	100	5	5	47	36	77	47
<i>rrnB</i>	108	5	5	47	16	34	44
<i>rrnC</i>	175	7	4	62	22	35	35
<i>rrnD</i>	87	5	6	67	32	48	77
<i>rrnE</i>	28	4	14	102	8	8	364
<i>rrnG</i>	136	9	7	71	16	23	52
<i>rrnH</i>	63	7	11	70	11	16	111

Tab. 2.14 Prozentuale Angaben zur Transkription in C600 und C600 *fis::kan hns::tet* zu unterschiedlichen Wachstumsphasen und Raten. Teil (a) der Tabelle zeigt die Daten aus hohen Wachstumsraten, Teil (b) die entsprechenden Angaben aus niedrigen Wachstumsraten. Es sind immer relative Transkriptraten angegeben, bezogen auf die Transkription von pH1-A im Wildtyp, dessen Wert gleich 100 % gesetzt wurde. Die 'absoluten' Transkriptraten (Verhältnis von CAT cDNA zu RNAi cDNA) bei hohen und niedrigen Raten variierten bei diesem Stammpaar je nach Phase unterschiedlich. In C600 lagen die Werte bei hohen Raten in exponentieller und stationärer Phase 3 bis 5 mal höher als bei niedrigen Raten. Die Verhältnisse der Fusionstranskripte zur RNAi cDNA aus C600 *fis::kan hns::tet* während des exponentiellen Wachstums waren bei schnellem Wachstum etwa doppelt so hoch wie bei niedrigen Wachstumsraten. In der stationären Phase kehrte sich das Verhältnis um, die Transkriptverhältnisse von P1-CAT cDNA zu RNAi cDNA erreichten bei hohen Raten nur etwa ein Fünftel der Transkriptverhältnisse bei niedrigen Raten. (siehe hierzu auch die Quantifizierungsdaten im Anhang, 8.3.1 und 8.3.2).

Die Reduktion der Transkription des P1-*cat*-Fusionstranskriptes in C600 *fis::kan hns::tet* erfolgt bei hohen Wachstumsraten mit Ausnahme der *rrnH*-UAS/CAT-Fusion annähernd vergleichbar wie im *fis*⁽⁻⁾-Stamm CSH50 (unter Berücksichtigung des Fehlers). Verglichen mit dem Wildtyp ist die Expression des *rrnE* P1-*cat*-Gens in der Doppelmutante am geringsten reduziert. Das *rrnH*-Transkript, welches bei hohen Wachstumsgeschwindigkeiten in CSH50 *fis::kan* kaum reduziert transkribiert wird, zeigt unter vergleichbaren Wachstumsbedingungen in C600 *fis::kan hns::tet* eine Reduktion auf 41 % der Expression im Wildtyp. Bei niedrigen Wachstumsraten fallen ebenfalls die Fusionen der Operons *rrnE* und *rrnH* auf. Das *rrnE*-Produkt wird in

C600 *fis::kan hns::tet* 3.5fach stärker gebildet als in C600. Die P1-*cat*-Fusion des *rrnH*-Operons wird in C600 *fis::kan hns::tet* ebenso stark transkribiert wie im Wildtyp. Eine Derepression der Transkription in der stationären Phase erfolgt nur bei niedrigen Wachstumsraten, hierbei fallen ebenfalls die Operons *rrnE* und *rrnH* durch sehr starke (auf 8 bzw. 16 %) und *rrnA* durch sehr geringe Reduktion (77 %) in der stationären Phase auf. Für die Fusionsprodukte einiger Operons in C600 *fis::kan hns::tet* lassen sich durchaus Übereinstimmungen mit den Ergebnissen aus den mutanten *E. coli* Stämmen PD32 (*hns*⁽⁻⁾) und CSH50 *fis::kan* (*fis*⁽⁻⁾) finden, vereinzelt treten aber auch besonders auffällige Abweichungen auf. Die Transkriptionsaktivität aller Operons wird in der stationären Phase, sowohl bei hohen Wachstumsraten, als auch bei niedrigen Wachstumsraten reduziert, ein klarer Hinweis auf zusätzliche regulatorische Mechanismen.

2.7 Zusammenfassende Bemerkungen

Aus den Resultaten der Transkriptionsratenuntersuchungen in verschiedenen *E. coli* K12 Wildtyp- und Mutantenstämmen anhand von Primer Extension-Analysen ist eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS an der Regulation aller ribosomalen RNA-Operons festzustellen. Diese erfolgt bei den sieben verschiedenen Operons in differentiellem Ausmaß in starker Abhängigkeit von der Wachstumsrate. Beide Proteine sind an der Regulation einer Vielzahl voneinander unabhängigen Genen beteiligt. Folglich kann der regulatorische Einfluss auch indirekter Art sein, hierdurch könnten konträre Ergebnisse zwischen den Bindungs- und/oder Konformationsstudien und/oder den Expressionsdaten erklärt werden.

3 DISKUSSION

3.1 Die differentielle Expression der ribosomalen Transkriptionseinheiten von *Escherichia coli*

Die Klonierung der regulatorischen Sequenzen der ribosomalen RNA-Operons in einen Promotortestvektor ermöglicht die Untersuchung differentieller Regulation unabhängig von der Gendosis und einer posttranskriptionellen Regulation. Die gewählte Klonierungsstrategie beschränkt die Analysen weiterhin auf die Regulation durch den Promotor P1. Ein möglicher Gendosisseffekt aufgrund unterschiedlicher Plasmidkopienzahlen kann durch relative Bestimmungen (2.3.2) ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung eines internen Standards (RNAI-Transkript) gewährleistet zusätzlich die Unabhängigkeit von der Plasmidkopienzahl. Die Bestimmung der Halbwertszeit der P1-Fusionstranskripte von weniger als 30 Sekunden (2.3.4) erlaubt die Annahme, dass die hier gemessenen Daten Transkriptraten und nicht RNA-Akkumulationen wiedergeben.

In allen Stämmen wurde wachstumsraten- und stammabhängig die differentielle Transkriptionsregulation der sieben ribosomalen P1-Promotoren gemessen. Alle Transkriptionseinheiten zeigen in Abhängigkeit von der Wachstumsrate FIS- und H-NS- bzw. StpA-Regulation. FIS-Effekte treten stärker bei hohen und H-NS-Effekte eher bei niedrigen Wachstumsraten auf. In einem H-NS/StpA-defizienten Stamm ist eine starke Derepression bereits bei schnellem Wachstum zu messen, dies zeigt deutlich die 'Backup'-Funktion von StpA bei hohen Wachstumsraten. Die Transkription der CAT-Fusion in einem *fis*⁽⁻⁾*hns*⁽⁻⁾-Stamm (C600*fis*⁻*hns*⁻) zeigt abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit Effekte entsprechend eines FIS-defizienten Stammes (hohe Raten) oder Effekte ähnlich des HNS-defizienten Stammes (niedrige Raten) sowie eine phasenabhängige Regulation bei Abwesenheit der jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Ausnahmen sind die P1-Promotoren der Operons *rrnE* und *rrnH*, die bei allen Raten signifikant schwächer exprimiert werden als die P1-Promotoren der anderen fünf Operons.

Ein weitere auffällige Beobachtung ist die Varianz zwischen den vier getesteten Wildtypen. Es stellt sich die Frage, in welcher Form *Escherichia coli* Laborstämme untereinander vergleichbar sind. Trotz der Bezeichnung Wildtyp tragen alle Stämme unterschiedliche genetische Marker (siehe Tabelle 4.1). Hinzu kommt die Möglichkeit unbemerkter Mutationen im Laufe jahrelanger Kultivierung. Alle Stämme wurden zu Beginn der vergleichenden Analysen über Antikörper und Proteinbindung bezüglich der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS getestet. Im Verlauf der Experimente wurden die vorhandenen chromosomalen und plasmidären Resistenzmarker regelmäßig überprüft. Trotzdem sind genetische Veränderungen, die möglicherweise relevant sind, nicht auszuschließen. Der erforderliche Einsatz verschiedener Wildtypen mangels isogener Stämme ließ diese Problematik erkennbar werden.

3.1.1 Die Korrelation zwischen intrinsischer Krümmung, Transkriptionsfaktorbindung und Transkriptionsregulation

Die transkriptionsregulierende Funktion der Proteine FIS und H-NS wurde am *rrnB*-Operon ausführlich beschrieben (Gourse *et al.*, 1996; Afflerbach *et al.*, 1998). Die bevorzugte Bindung von H-NS an gekrümmte DNA und die Stabilisierung des DNA/FIS-Komplexes durch DNA-Biegung ist ebenfalls gezeigt worden (Yamada *et al.*, 1990; Zacharias *et al.*, 1992). Dabei lässt die Annahme differentieller Regulation der sieben ribosomalen Operons hinsichtlich der beiden Transkriptionsfaktoren die Vermutung der Korrelation zwischen dem Ausmaß intrinsischer Krümmung und der faktorvermittelten Regulation zu. Unterschiedlich ausgeprägte Krümmung wurde bereits für die UAS-Regionen der Operons *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnG* und *rrnH* gezeigt (Tippner *et al.*, 1994; Hillebrand, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichend alle UAS-Regionen bezüglich ihrer intrinsischen Krümmung untersucht und ein differentielles Krümmungsausmaß festgestellt. Sowohl die experimentelle K-Wert-Bestimmung als auch theoretische Krümmungsanalysen anhand der Sequenz über Strukturvorhersagemodelle ergaben folgende Reihung von starker zu geringerer Krümmung:

$$rrnB / rrnD > rrnG \geq rrnC > rrnH > rrnA / rrnE$$

In Gelverzögerungsexperimenten wurde die Bindung der Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS an alle sieben UAS-Regionen analysiert. Anhand der erhaltenen Daten konnte eine quantitative Bewertung der Komplexe erfolgen, die zu folgender Reihung bezüglich der H-NS-Bindung führte:

$$rrnH > rrnB / rrnC / rrnG > rrnA > rrnE > rrnD$$

Mit Ausnahme der Operons *rrnD* und *rrnH* kann eine Korrelation zwischen Krümmungsausmaß und H-NS-Bindung festgestellt werden. Das *rrnD*-Operon zeigt trotz der ausgeprägten Krümmung nur einen sehr schwachen H-NS-Komplex. Ursache könnte einerseits ein sehr instabiler Komplex sein, der im Verzögerungsgel auseinanderfällt. Aus den Konformationsanalysen resultiert zwar eine ausgeprägte Krümmung, aber es kann keine Aussage zu Anzahl und Lage eines oder mehrerer Krümmungszentren getroffen werden. Auch über die Flexibilität der gekrümmten DNA sind keine Angaben möglich. Einen Hinweis auf die Möglichkeit differentiell ausgeprägter Krümmung zwischen den Operons *rrnB* und *rrnD* gibt die Darstellung der Fragmente nach den Berechnungen im Programm *DIAMOD*, die im Ergebnisteil als Abbildung 2.4 (S.27) gezeigt wird. Beide Fragmente weisen einen vergleichbar hohen K-Wert auf, dieser bezieht sich aber nur auf die krümmungsbedingte Mobilität im Polyacrylamidgel (Marini *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1993). Die Darstellungsvarianten zeigen dagegen mögliche Unterschiede bezüglich der Krümmungszentren und der resultierenden Ausrichtung des DNA-Stranges. Die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren ist jedoch in erheblichem Maße von diesen Parametern ab-

hängig. Diese Erklärung könnte auch bezüglich der Bindung des *rrnH*-Fragmentes an H-NS gelten. Die *rrnH*-DNA zeigt trotz moderatem Krümmungsausmaß eine sehr starke Faktorbindung. Ursache könnte die optimale Lage des Krümmungszentrums oder die bindungsfördernde Flexibilität der DNA sein. Eine Korrelation der Bindungsstudien mit den *in vivo* Daten zur Transkriptionsregulation ist bei einzelnen Operons in Abhängigkeit von der Wachstumsrate zu erkennen, generell aber kann vom Ausmaß der intrinsischen Krümmung nicht auf die Stärke der H-NS-abhängige Repression geschlossen werden. Hier kann ein zusätzlicher wachstumsratenabhängiger Regulationsmechanismus nicht ausgeschlossen werden.

Die Beurteilung des Zusammenhanges zwischen FIS-Bindung und FIS-abhängiger Transkriptionsaktivierung kann nicht allein anhand der Daten zur Konformationsanalyse erfolgen, sondern muss die Sequenzen der Fragmente in die Diskussion einbeziehen. FIS bindet sequenzspezifisch an eine degenerierte Konsensussequenz von fünfzehn Nukleotiden, die intrinsisch gekrümmt ist ((G/T)NNYRNN(A/T)NNYRNN(C/A); N=beliebiges Nukleotid, Y=Pyrimidin, R=Purin; Hübner & Arber, 1989). Alle sieben Operons weisen mindestens drei potentielle FIS-Bindestellen stromaufwärts vom P1-Promotor auf (Verbeek *et al.*, 1990; Condon *et al.*, 1992), die in Tabelle 2.6 auf Seite 35 dargestellt sind. Die Korrelation zwischen den Konsensussequenzen und der FIS-abhängigen Aktivierung wurde in 2.6.4 bereits beschrieben. So zeigen die P1-Promotoren der Operons mit übereinstimmender Konsensussequenz der FIS I-Bindestelle die größte FIS-abhängige Aktivierung, allerdings auch hier wieder wachstumsratenabhängig. Der P1-Promotor des *rrnH*-Operons zeigt bei hoher Wachstumsrate die geringste FIS-Abhängigkeit, bei langsamen Wachstum genau gegenteilig die stärkste FIS-abhängige Aktivierung. Auch hier ist die Notwendigkeit eines zusätzlichen wachstumsratenabhängigen regulatorischen Elementes anzunehmen. Der P1-Promotor des *rrnE*-Operons weist sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Raten geringe FIS-abhängige Aktivierung auf. Hier könnte möglicherweise ein anderer Transkriptionsaktivator zur Regulation beitragen. Vorstellbar ist aber auch, dass sich die basalen rRNA-Mengen der einzelnen Operons unterscheiden und für das *rrnE*-Operon ein geringerer Regulationsumfang existiert.

Reihungen nach Krümmung, FIS-Bindung und FIS-abhängiger Transkriptionsaktivierung lassen sich folgendermaßen aufstellen:

Krümmung: $rrnB / rrnD > rrnG \geq rrnC > rrnH > rrnA / rrnE$

FIS-Bindung: $rrnA / rrnH > rrnB / rrnC / rrnD / rrnG \gg rrnE$ (s. Tab. 2.4, S.33)

FIS-abhängige Transkriptionsaktivierung:

hohe μ : $rrnA / rrnB \geq rrnG > rrnC > rrnD > rrnE > rrnH$

niedrige μ : $rrnH > rrnD > rrnC > rrnG > rrnB > rrnA > rrnE$

Anhand der aufgestellten Reihung wird der im Einzelfall drastische Unterschied der FIS-abhängigen Transkriptionsaktivierung bei hohen und niedrigen Wachstumsraten

deutlich. Dem streng wachstumsphasenregulierten FIS-Protein (Ninnemann *et al.* 1992) kann daher im Zusammenhang mit der Wachstumsratenregulation ribosomaler RNA-Operons sicher eine wichtige Bedeutung zugemessen werden. Die Aktivierungsunterschiede bei veränderten Wachstumsraten weisen auf eine differentielle Wachstumsratenregulation einzelner Operons hin.

Die direkte Korrelation zwischen Krümmungsausmaß, Faktorbindung und Transkriptionsregulation ist hinsichtlich der FIS-abhängigen Aktivierung lediglich für das *rrnE*-Operon zu erkennen. Für alle anderen Operons gilt ebenso wie für die H-NS-abhängige Repression, dass eine direkte Korrelation zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Daten nicht ersichtlich ist. Die Ergebnisse lassen eher eine sehr komplexe Regulation vermuten.

3.1.2 Die Bildung von Operon-Gruppierungen

Aufgrund von Sequenzvergleichen der Nukleotidabfolgen stromaufwärts der Position +30 relativ zum Transkriptionsstart des P2-Promotors gruppierten Lindahl & Zengel (1986) die ribosomalen RNA-Operons in 'Operon-Familien'. Sie stellten die Operons *rrnA*, *B*, *C*, und *G* sowie die Operons *rrnD*, *E* und *H* in jeweils einer 'Familie' zusammen. Die *rrnABCG*-Familie zeichnet sich durch Sequenzhomologie zwischen Position -35 relativ zum P1-Transkriptionsstart und + 30 zum P2-Transkriptionsstart aus. Die *rrnDEH*-Familie zeigt diese Homologie *upstream* erst ab Position -10 (relativ zum P1-Transkriptionsstart). Nachfolgend sollen anhand der Daten dieser Arbeit und weiterer Betrachtungen diese Gruppierungen diskutiert werden. Die Einteilung von Lindahl & Zengel erfolgte ausschließlich anhand von Sequenzhomologien im Promotorkernbereich der beiden Promotoren P1 und P2. Eine naheliegende funktionelle Bedeutung der ribosomalen Operons liegt in der jeweiligen Lage relativ zum Replikationsursprung *oriC*. Aus Abbildung 1.1 geht eindeutig hervor, dass es *ori*-nahe und *ori*-ferne Transkriptionseinheiten gibt. Die Abstände der Operons vom *oriC* auf dem zirkulären *E. coli* Genom sind in der Tabelle 3.1 (in Minuten) aufgelistet.

Operon	Abstand von <i>oriC</i> [Minuten]
<i>rrnC</i>	0.5
<i>rrnA</i>	2.5
<i>rrnB</i>	5.8
<i>rrnE</i>	6.5
<i>rrnD</i>	11.9
<i>rrnH</i>	21.1
<i>rrnG</i>	27.9

Tab. 3.1 Abstände der ribosomalen RNA-Transkriptionseinheiten vom Replikationsursprung *oriC*. Die Auflistung ist in zunehmender Entfernung dargestellt. Eine Gruppierung entsprechend Lindahl & Zengel ist nicht zu erkennen.

Abb. 3.1 Alignment der UAS-Sequenzen der sieben ribosomalen RNA-Operons (Sequenzen des Nichtmatrixstranges in 5'→3'-Orientierung). Die Reihenfolge der Operons ist angelehnt an die Gruppierung nach Lindahl & Zengel (1986). Die Konsensussequenzen sind wie angegeben farbig markiert und die potentiellen FIS-Bindestellen nach Condon *et al.* grau hinterlegt.

Der in Abbildung 3.1 dargestellte Sequenzvergleich zeigt deutlich die Sequenzunterschiede der Gruppen *rrnABCG* und *rrnDEH*. Der Begriff 'Familie' wird anschließend durch die Bezeichnung *Gruppe* ersetzt, da alle Operons einer Genfamilie zuzuordnen sind. Alle sieben Operons weisen die perfekte Konsensussequenz der -10-Region auf. Die 'spacer' zwischen -35- und -10-Region besitzen alle die gleiche Länge von 16 Nukleotiden, allerdings weichen die Sequenzen der *rrnDEH*-Gruppe sowohl untereinander als auch erheblich von denen der *rrnABCG*-Gruppe ab. Letztere zeichnet sich durch zentrale A/T-Basenpaare aus, die von G/C-Sequenzen flankiert werden. Die verstärkte intrinsische Krümmung des 'spacers' der *rrnA,B,C,G*-Gruppe durch 'A/T-tracts' (siehe Einleitung, 1.3.3 und 1.4.2.2) könnte ein hohes basales Transkriptniveau sicherstellen. Die *rrnDEH*-Gruppe lässt im 'spacer' keine Gemeinsamkeiten erkennen.

Die Sequenzen der -35-Region der *rrnABCG*-Gruppe zeigen bis auf eine Abweichung die optimale Konsensussequenz für die σ^{70} -Polymerase (TTGTCA). Die entsprechenden Regionen der *rrnDEH*-Gruppe tragen die Sequenzen

rrnD: TTGTGC
rrnE: TTGCGG
rrnH: TTGTCT

In Abschnitt 1.2 wurden bereits die sieben alternativen σ -Faktoren erwähnt, die die Promotorspezifität des RNA-Polymerase-Holoenzym generieren. Promotoren, die von σ^{38} , der RNA-Polymerase mit dem Spezifitätsfaktor für stationäre Phase-Expression bzw. generelle Stressantwort transkribiert werden, zeigen keine klar definierte Konsensussequenz der -35-Region. Neben einer konservierten Nukleotidabfolge der -10-Region mit der Sequenz CTATACT (Wösten, 1998) zeigen σ^{38} -Promotoren häufig intrinsisch gekrümmte DNA stromaufwärts der -10-Region (Espinosa-Urgel & Tormo, 1993). Einige Promotoren, die von σ^{38} erkannt werden, sind gleichzeitig σ^{70} kontrolliert (Tanaka *et al.*, 1993). Die *rrnE*-P1 und *rrnH*-P1 regulierten Fusionstranskripte weisen in den Wildtypstämmen MC4100 (niedrige Wachstumsrate) und BSN26 (hohe Wachstumsrate) relativ hohe Transkriptionen in der stationären Phase auf. In Korrelation mit diesen *in vivo*-Daten ist eine wachstumsratenabhängige kompetitive Regulation der P1-Promotoren von *rrnE* und *rrnH* über die alternativen σ -Faktoren σ^{70} und σ^{38} vorstellbar.

In der Abbildung 3.1 sind neben den Promotorkernelementen auch die Konsensussequenzen des UP-Elementes und die potentiellen Bindestellen des FIS-Proteins markiert. In Hinsicht auf das UP-Element ist eine Differenzierung der Operons *rrnA*, *B*, *C* zu den vier anderen Operons möglich, da deutliche Sequenzunterschiede im Konsensus auftreten. Anhand der Expressionsdaten im FIS-defizienten Stamm, der eine durch das UP-Element vermittelte basale Expression wiedergibt, grenzt sich das *rrnC*-Operon von dieser Gruppe ab. Dies könnte allerdings auch auf die Position der FIS-Bindestelle I relativ zum Transkriptionsstart zurückzuführen sein. Die Expressionsdaten nach einem 'nutritional upshift' unterstützen ebenfalls die Gruppierung *rrnABCG* und *rrnDEH*. Letztere zeigen nach einem *upshift* signifikant höhere Transkriptionsraten als die anderen vier Operons. Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Operons *rrnE* und *rrnH* ist die Abgrenzung gegenüber den verbleibenden Transkriptionseinheiten im Hinblick auf die Anzahl auftretender Mikroheterogenitäten im

Bereich der Strukturgene. Derartige Sequenzunterschiede sind im *rrnE*-Operon kaum existent, während das *rrnH*-Operon die höchste Zahl solcher Abweichungen im Vergleich zu den anderen Operons aufweist (Marc Meißner, pers. Mitteilung). Diese Merkmale könnten einerseits dem Erhalt eines basalen Transkriptionslevels (*rrnE*) und andererseits einer größtmöglichen Variabilität (*rrnH*) dienen. Zusammenfassend kann die Gruppierung nach Lindahl & Zengel prinzipiell bestätigt werden, wobei die Merkmale der *rrnABCG*-Gruppe auf Gemeinsamkeiten basieren, während die gemeinsame Eigenschaft der *rrnDEH*-Gruppe in der Differenzierung von den anderen Operons und der Unterschiedlichkeit untereinander besteht. Eine mögliche funktionelle Erklärung kann in einer differentiellen Regulation aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen und damit optimaler Anpassung an wechselnde Habitate bestehen.

3.1.3 Die P1-abhängige Transkription nach einem '*nutritional upshift*'

Die Messungen der Transkriptraten nach einem '*nutritional upshift*' ergaben im FIS-defizienten Stamm (CSH50 *fis::kan*) geringere Transkriptmengen als im isogenen Wildtyp (CSH50). Jedoch konnte ein erwarteter Anstieg aufgrund vergleichbarer Experimente am tRNA-Operon *thrU* (*tufB*), (Nilsson *et al.*, 1992) nach Anreicherung des Mediums nicht gemessen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass der Promotor P2 eine wichtige Funktion nach einem *upshift* erfüllt und für die Adaptation durch hohe Transkriptionslevel verantwortlich ist (Gourse *et al.*, 1996). Die Messung transienter H-NS-Expression unmittelbar nach einem *upshift* (Laurent-Winter *et al.*, 1995) bestärkt diese Vermutung ebenfalls. Vorstellbar ist, dass H-NS den P1-Promotor reprimiert und so hohe Syntheseraten vom P2-Promotor ermöglicht. Hierdurch wird weiterhin das '*promoter occlusion*'-Modell (siehe 1.3.3, S.8) unterstützt, das eine Inhibition des P2-Promotors durch hohe Transkriptraten am P1-Promotor beschreibt.

Zusätzlich zur Erklärung über die funktionelle Bedeutung des P2-Promotors kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Anpassung einem anderen Zeitverlauf folgt, der durch die Kinetik dieser Untersuchung nicht erfasst wird.

3.2 Konsens und Diskrepanz zu bekannten Daten

Vergleichende Untersuchungen zur Expression der ribosomalen RNA-Operons wurden von Condon *et al.* (1992) beschrieben. Sie untersuchten die Promotorstärken der ribosomalen Operons an P1P2-CAT-Fusionen im chromosomalen Kontext und als λ -Lysogene über CAT-Assays. Im chromosomalen Kontext stellten sie eine gendosisabhängige Expression der *rrnH* P1-*cat*-Fusion fest. Dem *rrnE*-Operon ordneten sie eine abnorme Wachstumsratenregulation aufgrund reduzierter Promotoraktivität in Minimalmedium zu. Im FIS-defizienten Stamm fanden sie eine signifikant geringere

Transkription des *rrnG*-Operons. Weiterhin lösten sie stringente Kontrolle aus und untersuchten die Fusionen nach Hitzeschock. Derartige Experimente wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, daher ist ein Datenvergleich nicht möglich. Effekte von H-NS wurden von Condon *et al.* nicht untersucht. Zusätzliche Regulationsmechanismen zu den Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS wie die stringente Kontrolle über das Effektormolekül ppGpp sind anhand der hier vorliegenden Daten aber zu vermuten und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Eine Korrelation der von Condon *et al.* beschriebenen Daten und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann nicht festgestellt werden. Dies kann einerseits in der Analytik begründet sein. Condon *et al.* führten CAT-Assays durch, eine Methode, die auf Produktmessung und nicht auf Transkriptmessung basiert. Posttranskriptionelle Effekte können das Ergebnis beeinflussen. Weiterhin untersuchten sie P1P2-Fusionen, die mit reinen P1-Fusionen nicht zu vergleichen sind, da der P2-Promotor ebenfalls regulatorischen Mechanismen unterliegt (Gafny *et al.*, 1994; Liebig & Wagner, 1995). Die *upshift*-Daten dieser Arbeit weisen zusätzlich auf regulierte Funktionen des Promotors P2 hin.

Experimente mit einer analogen Konstruktion des *rrnB*-Operons als P1-*cat*-Fusion und Messung der Promotoraktivität über CAT-ELISA Assays zeigten in der *fis*⁽⁻⁾-Mutante CSH50 *fis::kan* und in der *hns*⁽⁻⁾-Mutante PD32 vergleichbare Werte mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten für die Expression des *rrnB*-Operons (Afflerbach *et al.*, 1998). In CAT-ELISA Assays wird ebenfalls nicht die Transkriptionsrate, sondern die Proteinaktivität gemessen. Da sowohl über Primer Extension-Analysen dieser Arbeit als auch die CAT-ELISA Assays vergleichbare Resultate der Expression des *rrnB*-Operons erhalten wurden, ist die Diskrepanz zu den Daten von Condon *et al.* vermutlich eher auf die unterschiedlichen Promotorfusionen als auf die experimentelle Analytik zurückzuführen.

Untersuchungen zur differentiellen Transkriptionsregulation der ribosomalen P1-Promotoren wurden in jüngster Zeit von Hirvonen *et al.* (2001, im Druck) an P1-Promotor-*lacZ*-Fusionen in λ -Lysogenen sowie über *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Sie untersuchten verschiedene Promotor-Hybridkonstruktionen und stellten für alle sieben P1-Promotoren eine FIS- und UP-Element-abhängige Transkriptionsaktivierung fest. Differentielle Unterschiede basieren nach diesen Analysen auf unterschiedlich starken Einfluss der jeweiligen *core*-Promotor-Sequenzen, der verschiedenen FIS-Bindestellen und der UP-Elemente in modularer Form. Sowohl die FIS-Bindestellen als auch die UP-Elemente zeigen in Verbindung mit *core*-Promotoren anderer Operons nicht das gleiche Aktivierungsniveau wie in ihrem natürlichen Konsens.

Am *rrnB*-Operon wurde schon früher gezeigt, dass die FIS I-Bindestelle den größten Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung ausübt (Ross *et al.*, 1990). Diese Daten wurden erneut bestätigt und ebenso für das *rrnG*-Operon festgestellt. Alle anderen Operons zeigen nach Hirvonen *et al.* einen differentiellen Einfluss aller weiteren FIS-Bindestellen. Ebenso tragen die UP-Elemente und die *core*-Promotorsequenzen in verschiedenem Ausmaß zur Transkriptionsaktivierung bei. Die durch die *core*-Promotorelemente bestimmte basale Transkription der P1-Promotoren der Operons *rrnA*, *B* und *C* ist 1.5 bis 2 fach höher als die der Operons *rrnD*, *E*, *G* und *H*. Das UP-Element bewirkt eine 17- bis 29-fache Transkriptionsaktivierung von sechs Operons,

während der P1-Promotor des *rrnD*-Operons 54-fach aktiviert wird. Eine weitere Aktivitätssteigerung wird durch FIS gemessen. Diese erfolgt bei sechs Operons um den Faktor 5.8 bis 8.2, lediglich der P1-Promotor des *rrnD*-Operons zeigt eine geringere FIS-Aktivierung um den Faktor 2.6. In Hinsicht auf das *rrnD*-Operon und die Operons *rrnA*, *B*, und *C* sind die Daten mit den P1-*cat*-Fusionen annähernd vergleichbar. Zusammenfassend beschreiben die Autoren eine insgesamt ähnliche Transkriptionsaktivität der sieben P1-Promotoren, die jedoch auf unterschiedlichen Beitrag der einzelnen aktivierenden Komponenten zurückzuführen ist.

Grundsätzliche Unterschiede der Ergebnisse zu den Daten dieser Arbeit können in geringem Maße auf experimentelle Vorgehensweise und die Sequenzen der Fusionen zurückzuführen sein. Die P1-*cat*-Fusionen entsprechen in der *upstream*-Region als auch im Bereich des Transkriptionsstarts vollkommen den Originalsequenzen, während in den P1-*lacZ*-Fusionen konstruktionsbedingte Sequenzabweichungen bestehen. Weiterhin sind die Daten der P1-*cat*-Fusionen dieser Arbeit aus RNA-Isolaten bei gleichen Wachstumsraten ermittelt worden. Hierin liegt vermutlich eine wichtige Ursache für unterschiedliche Ergebnisse. Mehrfach konnte stammabhängig ein Einfluss der *rrnE*- und *rrnH*-Plasmide auf die Wachstumsrate beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten aller hier untersuchten Kombinationen (Plasmid/Stamm) in den Wachstumsraten angeglichen. Die differentielle Transkription wurde insbesondere in Abhängigkeit von der jeweiligen Rate ermittelt.

Anhand von DNase I-Footprints untersuchten Hirvonen *et al.* FIS-Bindestellen in den *upstream*-Regionen der sieben Operons. Abweichend von den bereits beschriebenen potentiellen Bindestellen (Condon *et al.*, 1992) fanden sie je nach Operon drei bis fünf FIS-Bindepositionen *upstream* -61 relativ zum Transkriptionsstart. In der folgenden Tabelle sind deren Anzahl und Position (Zentren) angegeben. Zum Vergleich ist die Zahl der Bindestellen angegeben, die in dieser Arbeit über Gelverzögerung ermittelt wurden.

Operon	Anzahl d. Bindestellen		Position der FIS-Bindestellen (Zentrum) n . Hirvonen				
	n. Hirvonen	diese Arbeit	FIS I	FIS II	FIS III	FIS IV	FIS V
<i>rrnA</i>	4	4	-71	-91	-111	-133	
<i>rrnB</i>	3	3	-71	-102	-143		
<i>rrnC</i>	3	3	-71	-102	-122	-144	
<i>rrnD</i>	5	3-4	-71	-91	-126	-143	-174
<i>rrnE</i>	5	2	-72	-101	-117	-143	-170
<i>rrnG</i>	3	3	-71	-91	-112		
<i>rrnH</i>	4	3	-71	-91	-134	-181	

Tab. 3.2 Anzahl und Position der FIS-Bindestellen in den ribosomalen RNA-Operons von *Escherichia coli*. Die Bindepositionen sind durch die Angabe der zentralen Base der 15 Nukleotid langen Erkennungssequenz angegeben. Abweichungen zur Anzahl der aus den Gelverzögerungsexperimenten ermittelten Komplexe sind hellgrau schattiert.

Entsprechend der Gelverzögerungsexperimente wurden durch die Footprint-Analysen FIS-Bindestellen in allen Operons nachgewiesen, ebenfalls in differentieller Anzahl. Diese unterscheidet sich in beiden Versuchsanordnungen bezüglich der

Operons *rrnD*, *E* und *H*. Die Gelretardierung zeigt zwar deutlich eine Komplexierung, kann aber zwischen den einzelnen Komplexen nicht immer auflösen. Ein Beispiel sind die H-NS-*rrnUAS*-Komplexe, die aufgrund hoher Kooperativität im Verzögerungsgel nicht zu trennen sind. Footprintanalysen hingegen zeigen alle geschützten Bereiche. Hierdurch könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklärbar sein, allerdings sind die Unterschiede bezüglich des *rrnE*-Operons sehr drastisch. Das Verzögerungsgel zeigt nur zwei sehr schwache Komplexe bei maximaler FIS-Konzentration von 800 nM, die sich sowohl in der Intensität als auch im *shift* von den anderen Operons deutlich unterscheiden. Die von Hirvonen *et al.* beschriebene Anzahl von fünf FIS-Bindestellen im *rrnE*-Operon kann möglicherweise auf unspezifische Bindestellen zurückzuführen sein.

Über die Positionierung der Bindestellen kann anhand der Retardierungen keine Aussage getroffen werden. Interessant ist, dass die nach Hirvonen *et al.* experimentell gefundenen Bindestellen bezüglich ihrer Position von den vorhergesagten potentiellen Bindestellen zum Teil erheblich abweichen. Die Position der FIS I-Bindestelle am *rrnE* bzw. *rrnD*-Operon verändert die Anzahl der Abweichungen von der Konsensussequenz im *rrnD* Operon zu 2 Abweichungen und weist am *rrnE*-Operon ebenfalls zwei Abweichungen auf. Über *in vitro*-Transkriptionen ermittelten die Autoren die Aktivierbarkeit der P1-Promotoren durch FIS. Bis auf das *rrnE*-Operon zeigen alle Transkriptionseinheiten eine halbmaximale Transkriptionsaktivierung zwischen 15 und 48 nM FIS, *rrnE* benötigt hierzu eine weit höhere FIS-Konzentration von 145 nM. Die maximale Transkriptionsaktivierung durch FIS variiert von 3-fach (*rrnD*) bis 12-fach (*rrnE*). Die starke Transkriptionsaktivierung *in vitro* im Gegensatz zur Aktivierung *in vivo* begründen die Autoren mit hohen FIS-Konzentrationen in der *in vitro*-Transkription, die in dieser Höhe in den getesteten *in vivo*-Bedingungen nicht erreicht wurden. Die Transkriptraten der *rrnE*-P1-*cat*-Fusionen zeigen weder bei hohen noch bei niedrigen Raten eine derartig starke FIS-abhängige Aktivierung, sondern korrelieren eher mit der schwachen Proteinbindung aus den Gelverzögerungsanalysen.

Hirvonen *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit die differentielle Regulation der ribosomalen Operons in Abhängigkeit der Sequenzelemente des *core*-Promotors, des UP-Elementes und der FIS-Bindestellen. Der Beitrag der Regulatoren H-NS oder StpA, der am *rrnB*-Operon (Afflerbach *et al.*, 1998) sowie in der vorliegenden Arbeit klar für alle Operons gezeigt wurde, wird nicht berücksichtigt. Insbesondere die operonweise völlig konträren Resultate lassen auf eine Beteiligung weiterer wachstumsratenabhängiger Faktoren schließen.

3.3 Repetitive Gene – eine Frage der Quantität oder Qualität?

Genmultiplizität ist in prokaryontischen Genomen eher selten, im Gegensatz dazu sind Genfamilien in Eukaryonten sehr verbreitet. Beispiele sind zahlreich, genannt seien hier Globingene, Histongene, rRNA-Gene, Immunoglobulingene oder Hitzeschockgene (Long & Dawid, 1980). Für alle Genfamilien gilt die Frage, ob die Redundanz der Gewährleistung hoher Transkriptraten dient, ob alle Gene über die glei-

chen Regulationsmechanismen koreguliert sind oder ob eine differentielle Regulation oder Funktion der einzelnen Genprodukte vorliegt. Unterschiedliche Genprodukte gleicher Funktion, jedoch zu verschiedenen Entwicklungsstadien generieren die Globingene. Das humane Hämoglobin variiert vom fötalen über das embryonale zum adulten Stadium in der qualitativen Zusammensetzung einzelner Globinketten. Die Familie der pflanzlichen Gene für die kleine Untereinheit der *Rubisco* (*Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/oxygenase*) codiert fast identische Proteine mit unterschiedlicher Expressionsspezifität als Folge differentieller Regulation (Deonder *et al.*, 1993). Die Gene für ribosomale RNAs sind sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten redundant, allerdings in unterschiedlicher, aber für jeden Organismus hochkonservierter Anzahl. Während die Zahl der rRNA-Operons in Prokaryonten von 1 bis 15 variiert (Klappenbach *et al.*, 2001), erreicht ihre Anzahl in Eukaryonten mehrere Hundert bis Tausende (Long & Dawid, 1980). In Prokaryonten und einigen niederen Eukaryonten (Hefen) sind die Gene für die ribosomalen RNAs (5S, 16S und 23S bzw. 5S, 5.8S, 18S und 28S bei den Eukaryonten) in einer Transkriptionseinheit lokalisiert. Bei höheren Eukaryonten sind die Gene für die 5S rRNA getrennt angeordnet und ihre Anzahl kann die Anzahl der beiden großen rRNAs übersteigen (Long & Dawid, 1980). Das *rrnD*-Operon von *Escherichia coli* enthält zwei Gene für die 5S rRNA (Duester & Holmes, 1980), sodass die Anzahl der 5S rRNA die Anzahl der anderen rRNAs ebenfalls übersteigt. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Interesse, deren Autoren einen unerwartet hohen Fitnessverlust durch Deletionen in den 5S rRNA-Genen beschreiben. Deletionen in den 16S- und 23S-Strukturgenen führen bei je 4 verbleibenden Genen zur Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit um 25 %, während vier verbleibende 5S-Gene in einer Verringerung der Wachstumsrate um 60 % resultieren (Ammons *et al.*, 1999). Die Funktion der 5S rRNA ist noch nicht bekannt. Allerdings scheint ihre relative Anzahl zu den anderen rRNAs von essentieller Bedeutung. Möglicherweise spielen gefundene Mikroheterogenitäten in den 5S-Strukturgenen (Morgan & Kaplan, 1976) ebenfalls eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die P1-Promotoren der sieben verschiedenen RNA-Operons von *Escherichia coli* in starker Abhängigkeit von der Wachstumsrate differentiell reguliert werden. Unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten wurden durch Veränderung der Medienzusammensetzung erreicht, letztlich also eine Veränderung der 'Umweltbedingungen'. In seinen natürlichen Habitaten unterliegt *E. coli* vielfältigen Veränderungen der Wachstumsbedingungen. Die differentielle Regulation einzelner Operons erlaubt eine maximale Transkription der ribosomalen Transkriptionseinheiten unter den jeweiligen Habitaterfordernissen. Vorstellbar ist weiterhin die Bildung unterschiedlicher Genprodukte einzelner Operons. Eine differentielle Regulation erlaubt in diesem Zusammenhang variierende Produktspiegel der einzelnen Operons. Die Möglichkeit, funktionell unterschiedliche Ribosomen zu generieren, kann der *E. coli* Zelle möglicherweise zu einem Wachstumsvorteil unter spezifischen Habitaterfordernissen verhelfen. Als Beispiel sei hier eine Punktmutation der 16S RNA (C1192U) erwähnt, die zur Spectinomycinresistenz führt. Spectinomycin bindet an die kleine Untereinheit der Ribosomen und verhindert die Translokation der wachsenden Peptidkette. Durch die Punktmutation wird die

Bindung von Spectinomycin verhindert und die Proteinsynthese kann ungehindert stattfinden. Andererseits könnte ein zu hoher Anteil solcher funktionell differenten Ribosomenpopulationen unter nicht selektiven Wachstumsbedingungen wiederum nachteilig sein. Hier wird die Notwendigkeit einer abgestimmten Regulation deutlich. In Abschnitt 3.2.2 wurden bereits die Mikroheterogenitäten erwähnt, die im *rrnE*-Operon kaum und im *rrnH*-Operon relativ häufig auftreten. Bezüglich des *rrnE*-Operons weisen die Daten dieser Arbeit auf eine allgemein niedrige Transkription spezifischer rRNA hin, die nur unter ganz bestimmten Wachstumserfordernissen vergleichsweise stark exprimiert wird. Konserviert geringe Abweichungen unterstützen die Vermutung der Transkription spezifisch notwendiger rRNA. Im Gegensatz dazu lassen häufig auftretende Sequenzunterschiede des *rrnH*-Operons eine vorteilhafte Variabilität vermuten.

Zusammengenommen ist die Redundanz einzelner Operons sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht von Bedeutung.

3.4 Eine mögliche Bedeutung redundanter rRNA-Operons für den prokaryontischen Organismus

Prokaryonten verfügen über eine unterschiedliche, für den jeweiligen Organismus allerdings streng konservierte Anzahl ribosomaler RNA-Operons. Die Frage, warum gerade die Zahl der Operons so konstant erhalten bleibt, ist naheliegend. Das Darmbakterium *Escherichia coli* besitzt sieben Transkriptionseinheiten, die für ribosomale RNAs codieren. Diese Anzahl ist hochkonserviert, sowohl in den nicht-pathogenen K-12 Stämmen, zu denen die üblichen Laborstämme zählen, als auch in den pathogenen O157:H7 Stämmen. Beide Organismen sind auf einen gemeinsamen Vorfahren vor 4.5 Millionen Jahren zurückzuführen (Reid *et al.*, 2000). Bemerkenswert ist die nahezu vollständige Identität der Promotorregionen der ribosomalen RNA-Operons in K-12 und O157:H7. Die Promotor-core-Elemente, das UP-Element, die drei FIS-Bindestellen sind in den entsprechenden Operons beider Stämme sequenzhomolog. Die hohe Konserviertheit weist auf essentielle Funktionen dieser Regionen hin und lässt eine sehr ähnliche Regulation über die UAS-Region vermuten. Die Entstehung der sieben Operons, vermutlich durch Genduplikation, muss schon in den gemeinsamen Vorfahren der beiden *E. coli* Formen stattgefunden haben. Die nahezu unveränderte Ausprägung der ribosomalen Operons in Anbetracht einer divergenten Entwicklung über unzählige Generationen ist beachtlich.

Trotzdem stellt sich die Frage nach Rekombinationen, denn die Vielzahl homologer Sequenzen erhöht die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen. Tatsächlich sind in Laborstämmen Duplikationen, Deletionen, Inversionen und Transpositionen mit hoher Frequenz beschrieben worden (Hill, 1999). So gab es eine Inversion zwischen *rrnD* und *rrnE* in einer Linie des Laborstammes W3110 (Hill & Harnish, 1981). Diese Inversion betraf 18 % des Genoms und war nahezu symmetrisch am Replikationsursprung *oriC* lokalisiert. Diese Inversion zeigte keine offensichtlichen Effekte auf das Zellwachstum und blieb nahezu zwei Jahrzehnte unbemerkt. Erst bei

intensiver Kultivierung zeigte sich, dass die Zellen, die die Inversion trugen, allmählich durch Reversionsmutanten überwachsen wurden. Diese zeigten partielle oder komplette Reversion (Hill & Gray, 1988). Inversionen am Replikationsursprung können einen Fitnessverlust durch Veränderung des Gendosisgradienten schnell wachsender Zellen verursachen. Eine weitere Erklärung für den Wachstumsvorteil revertierter Zellen wäre die Veränderung der relativen Positionen von Replikationsursprung und Terminus durch die Inversion, was zur Veränderung der Synchronisation der Replikation führen könnte (Hill, 1999). Die Ursache dieser hohen Reversionsrate ist somit die absolute Genomstabilität.

Das Auftreten von Rekombinationsereignissen mag möglicherweise weit häufiger sein, als es bemerkt wird. Unter diesem Aspekt ist auch die Variabilität der verschiedenen Wildtypen zu sehen, die bei den Analysen dieser Arbeit offensichtlich wurde. In den natürlichen Habitaten scheint allerdings die konservierte Anzahl ribosomaler RNA-Operons und deren Anordnung auf dem *Escherichia coli* Genom von essentieller Bedeutung für den Organismus.

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust einzelner Operons über die Erhöhung der Expression der verbleibenden Transkriptionseinheiten weitgehend kompensiert werden kann (Condon *et al.*, 1995). Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Transkriptionsaktivität der einzelnen Operons durchaus zu steigern ist. Die absolute Produktmenge scheint folglich nicht allein der Selektionsdruck zum Erhalt der konservierten Anzahl sein. Vorstellbar ist daher einerseits die Bildung funktionell unterschiedlicher Genprodukte, sowie andererseits eine differentielle Regulation, die zur spezifischen Expression unter verschiedenen Habitatbedingungen führen kann. Die unterschiedliche Regulation einzelner Operons unter den Bedingungen von Fülle und Hunger konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Die Analyse unter weiteren Stress- und Mangelsituationen bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten, ebenso die Untersuchungen differentieller Produkte.

Die Beobachtung von Rekombinationen in Laborstämmen und die extreme Konservierung von Anzahl und Position der ribosomalen Operons unter ‚natürlichen‘ Wachstumsbedingungen führen zu dem Gedanken, dass die Habitatvielfalt eine vorstellbare Ursache des Erhalts der rRNA-Operon-Multiplizität sein könnte. Um diese Vermutung zu stützen, sollen andere prokaryontische Organismen hinsichtlich der Zahl ihrer rRNA-Operons betrachtet werden.

Die Anzahl ribosomaler Operons in Prokaryonten ist in der rrndb-Datenbank (Klappenbach *et al.*, 2001) übersichtlich aufgelistet. Sie führt zum derzeitigen Zeitpunkt (Stand: September 2001) 287 Organismen auf. Die Zahl der rRNA-Operons zeigt folgende Verteilung:

Operonzahl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15
Häufigkeit	46	99	25	42	17	26	19	2	4	3	1	1	1	1

Tab. 3.3 Die Anzahl ribosomaler Operons in Prokaryonten. (Nach Klappenbach *et al.*, 2001)

Die Datenbank zeigt nur einen Teil der prokaryontischen Organismen und erfüllt sicher nicht den Anspruch der Vollständigkeit oder der Repräsentativität. Sie erlaubt jedoch einen Überblick und die Vermutung, dass Operonhäufigkeiten in der Anzahl von 1 bis 8 vermutlich öfter vorkommen, als zwischen 8 und 15. Beispielhaft werden nachfolgend einige Organismen aufgeführt und die jeweilige Zahl der ribosomalen RNA-Operons ist in Klammern angegeben.

Bacillus subtilis (10), *Vibrio cholerae* (9), *Salmonella spec.* (7), *Shigella spec.* (7), *Streptomyces spec.* (6), *Corynebacterium glutamicum* (5), *Pseudomonas spec.* (4), *Rhizobium meliloti* (3), *Agrobacterium tumefaciens* (2), *Methanococcus jannaschii* (2), *Mycoplasma spec.* (2 bzw. 1), *Halobacterium spec.* (1), *Thermoplasma acidophilum* (1).

Eventuell liegt die Ursache der konservierten Redundanz ribosomaler Operons in der Notwendigkeit der Fitness in vielen verschiedenen Lebensräumen und der gleichzeitigen Konkurrenz mit anderen Organismen. Prokaryonten, die eine ökologische Nische besiedeln, entweder als Symbiont (Rhizobien oder Agrobakterien), Parasit (Mycoplasmen) oder in extremen Habitaten (Halobakterien, Thermophile Bakterien) sind möglicherweise seltener wechselnden Veränderungen von Nahrungsressourcen oder Stressbedingungen ausgesetzt als solche Bakterien, die Wirts- und Habitatwechseln unterliegen. Vorstellbar ist eine differentiell regulierte Expression einzelner Operons, die unter bestimmten Umweltbedingungen eine definierte Ribosomenpopulation generiert, die den jeweiligen Erfordernissen gerecht werden. Der Selektionsdruck über die Habitatveränderung hält somit die zur optimalen Anpassung notwendige Zahl von RNA-Operons aufrecht.

Redundanz und differentielle Regulation der ribosomalen Operons stellen somit eine von zahlreichen Möglichkeiten dar, biologische Vielfalt zu gewährleisten.

4 MATERIAL

4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis'. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem 'water purification system EPA Est. 41237-MA-1', Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet, nachfolgend als '*Aqua dest.*' bezeichnet, welches in regelmäßigen Abständen bezüglich pH-Wert und Konduktivität überprüft wurde.

Das während der Arbeit verwendete Phenol wurde vor der Benutzung destilliert, für DNA-Extraktionen mehrfach mit TE-Puffer ausgeschüttelt und anschließend auf 0.1% 8-Hydroxychinolin eingestellt (Maniatis *et al.*, 1982).

Für RNA-Extraktionen wurde destilliertes Phenol jeweils zweimal mit 0.5 M NaOAc (pH 5.5) und 20 mM NaOAc (pH 5.5) ausgeschüttelt und wie bereits beschrieben mit Hydroxychinolin versetzt.

4.2 Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Alle im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in der folgenden **Tabelle 4.1** zusammengefasst.

Stamm	Genotyp	Referenz
HB101	F ⁻ , <i>pro</i> A2, <i>rec</i> A13, <i>ara</i> -14, <i>lac</i> Y1, <i>gal</i> K2, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>rps</i> L20(<i>Str</i> ^r), <i>sup</i> E44, <i>hsd</i> S20 (<i>r</i> ⁻ <i>B</i> <i>m</i> ⁻ <i>B</i>), λ ⁻	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
MC4100	F ⁺ , <i>ara</i> D139, Δ (<i>argF-lac</i>) U169, <i>deo</i> C1, <i>flb</i> 5301, <i>rel</i> A1, <i>rps</i> L150, <i>pts</i> F25, <i>rbs</i> R	Casadaban (1976) <i>J. Mol. Biol.</i> 104 :541-555
PD32	MC4100 <i>hns</i> -206:: <i>Amp</i> ^r	Dersch <i>et al.</i> (1993)
CSH50	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ (<i>lac pro</i>), <i>str</i> A, <i>thi</i>	Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. NY
CSH50 <i>fis</i> :: <i>kan</i>	CSH50 <i>fis</i> ⁻ (Kan ^r)	Labor R. Kahmann, Berlin (Gonzales)
C600	F ⁻ , <i>thi</i> ⁻ , <i>thr</i> ⁻ , <i>leu</i> B6, <i>lac</i> Y1, <i>ton</i> A21, <i>sup</i> E44, <i>lam</i> ⁻ , <i>rec</i> ⁺	Dr. Wöskemeyer, FU Berlin über Christof Weigel
C600 <i>fis</i> :: <i>kan hns</i> :: <i>tet</i>	<i>fis</i> ⁻ (Cm ^r), <i>hns</i> ⁻ (Tet ^r)	Josette Rouvière-Yaniv, Paris
BSN26	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10	Johansson <i>et al.</i> , <i>J. Bact.</i> 180 : 6117-6125
BSN29	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 Δ <i>hns stpA60</i> ::Km ^r	
YK4122	<i>trp</i> ⁺ (<i>hns</i> ⁺)	Yasuzawa <i>et al.</i> (1992)
YK4124	<i>trp</i> ⁺ <i>hns</i> -2	

4.2.2 Plasmide

- pHD1-A Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnA* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5356 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pHD1-B Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnB* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5376 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pHD1-C Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnC* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5345 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pHD1-D Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnD* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5361 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pHD1-E Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnE* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5382 Bp (diese Arbeit)
- pHD1-G Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnG* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5369 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pHD1-H Derivat des Plasmides pKK232-8, trägt das P1-Fragment des *rrnH* Operons in der *Sma*I-Schnittstelle der MCS des pKK232-8, 5347 Bp (Diplomarbeit Annette Hillebrand)
- pBR322 Klonierungsvektor, Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz, 4363 Bp, Bolivar *et al.* (1977),
- pKK232-8 Derivat des pBR322 mit Amp-Resistenz und promotorlosem *cat*-Gen stromabwärts einer MCS mit Terminatorregion des *rrnB* Operons (5S-Anteil, T1 und T2) in Tandemanordnung als doppeltes *Alu*I-Fragment aus pKK3535, 5094 Bp, (Brosius, 1984)

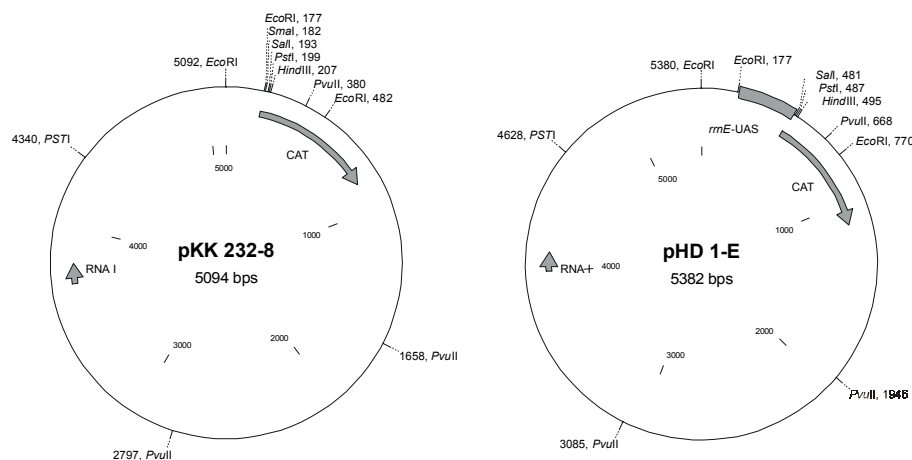


Abb. 4.1

Plasmide pKK232-8 und pHD1-E

pKK232-8 als Klonierungsvektor zur Klonierung der UAS-Sequenzen der sieben ribosomalen Operons; pHD1-E exemplarisch für alle sieben Plasmide, deren CAT-Expression in dieser Arbeit untersucht wurde.

pUC18-1 Derivat des pUC18 (Vieira und Messing, 1982; Yanish-Perron *et al.*, 1985), trägt das P1-Fragment des *rrnB* Operons aus pKK3535 (*SspI/DdeI*, 235 Bp) der *SmaI*-Schnittstelle des pUC18, 2921 Bp, (Zacharias *et al.*, 1992)

4.3 Nukleinsäuren, Nukleotide und Desoxyoligonukleotide

Nukleinsäuren

Molekulargewichtsmarker/kB-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Smart Ladder, Molekulargewichtsmarker	EUROGENTEC; Belgien
Poly [d(I-C)]	Boehringer, Mannheim

Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer Mannheim
Adenosin-5'-[γ ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-[α ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim

Desoxyoligonukleotide

Oligo <i>rrnE</i> 5/3	5'-GGGTCTTCACGCGTCCATCC-3' komplementär von -541 bis -522 relativ zum P1-Start zum (-)-Strang des <i>rrnE</i> Operons, INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
Oligo 5-E	5'-CTCAGCTAACGCCCCTAACG-3' komplementär von -272 bis -253 relativ zum P1-Start zum (-)-Strang des <i>rrnE</i> Operons, INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
Oligo 3-3	5'-CACATCCGCCGTGTCGATGG-3' komplementär von +18 bis -2 relativ zum P1-Start zum (+)-Strang des <i>rrnE</i> und <i>rrnH</i> Operons, INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm

# 220196	5'-CCTACTCAAGCTTGGCTG-3'
	komplementär von +30 bis +13 zum (+)-Strang des CAT-Gens des Vektors pKK 232-8, dies entspricht der Position +53 bis +36 relativ zum P1-Start in den Plasmiden pHD 1-A, 1-B, 1-C, 1-E, 1-G und 1-H sowie der Position +50 bis +33 relativ zum P1-Start im Plasmid pHD 1-D (aus Laborbestand sowie INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm)
Oligo RNAI	5'-TCAGCAGAGCGCAGATACCA-3'
	bindet an die RNAI von Position +28 bis +9 und wird in einer Primer Extension-Reaktion um 8 Nukleotide verlängert. INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm

4.4 Proteine

4.4.1 Enzyme und Transkriptionsfaktoren

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
FIS	nach Koch & Kahmann (1986) präpariert von Bettina Scholle 1996
H-NS	nach Tippner <i>et al.</i> (1994), präpariert von Reinhild Wurm 1998
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Ribonuklease A	Boehringer, Mannheim
Ribonuklease T1	Sankyo, Japan
T4 DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
T7 DNA-Polymerase (Sequenase 2.0)	United States Biochemical, USA

4.4.2 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Dde</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Eco</i> RI	Boehringer, Mannheim
<i>Eco</i> 91I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Fsp</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Hae</i> III	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Hha</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Beverly, USA

<i>Hpa</i> II	Boehringer, Mannheim
<i>Pst</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Pvu</i> II	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Sma</i> I	New England Biolabs, Beverly, USA

4.4.3 Sonstige Proteine

Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly, USA
Mark12 (Proteinstandard)	Novex, San Diego, USA
See Blue (Proteinstandard, gefärbt)	Novex, San Diego, USA

4.4.4 Antikörper

H-NS-Antikörper	polyklonales Antikörper-Lyophilisat Kaninchen- <i>anti</i> -H-NS-Serum (Lucht <i>et al.</i> , 1994), freundliche Gabe von E. Bremer
FIS-Antikörper	polyklonales Antikörper-Lyophilisat Kaninchen- <i>anti</i> -FIS-Serum, frdl. Gabe von G. Muskhelishvili
Zweitantikörper (Ziege- <i>anti</i> -Kaninchen)	Anti-Rabbit IgG-AP, Boehringer bzw. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

4.5 Puffer und Medien

BSCE-Puffer:	50 mM Tris/Borat pH 7.2 150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA, pH 8.0 1 % SDS
PG-Puffer:	40.1 mM K ₂ HPO ₄ 9.9 mM KH ₂ PO ₄ 10 % (v/v) Glycerin 50 mM KCl 10 mM EGTA, pH 7.4, sterilfiltrieren, 10mM β-Mercaptoethanol 23 µg/ml PMSF

1x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 7.5 2.5 mM EDTA
1x TBE-Puffer:	89 mM Tris-Borat, pH 8.3 2.5 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
5 x TAE-Probenpuffer:	0.25 % (w/v) Bromphenolblau 0.25 % (w/v) Xylencyanol 50 % Glycerin (v/v) in 5 x TAE-Puffer
Formamid-Probenpuffer:	0.05 % (w/v) Bromphenolblau 0.05 % (w/v) Xylencyanol 20 mM EDTA 95 % (v/v) deionisiertes Formamid
5 x TBE-Probenpuffer:	2.5 x TBE 0.4 % (w/v) Bromphenolblau 0.4 % (w/v) Xylencyanol 50 % (v/v) Glycerin
Probenpuffer für SDS-Gele:	125 mM Tris/HCl, pH 6.8 2 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin Bromphenolblau (Spatelspitze)
YT-Medium:	8 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest</i> , pH 7.4 mit NaOH
YT-Agar:	YT-Medium mit 20 g/l Agar
M9-Minimalmedium:	6 g/l Na ₂ HPO ₄ 3 g/l KH ₂ PO ₄ 0.5 g/l NaCl 1 g/l NH ₄ Cl nach dem Autoklavieren aus steriler Stammlösung Thiamin (f.c. 1mg/l) zugeben; vor Gebrauch MgSO ₄ (f.c. 1mM), CaCl ₂ (f.c. 0.1 mM) sowie Casaminoacids und Kohlenstoffquelle in erforderlicher Konzentration (0.1-0.2 %) zugeben.
B-Broth-Medium:	10 g/l Trypton 8 g/l NaCl

LB-Medium:

10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 10 ml 1M Tris/HCl, pH 7.5 /l
 1 ml 1 M MgSO₄ /l

Antibiotikum	<u>Agarplatten</u> Konzentration [µg/ml]	<u>Flüssigmedium</u> Konzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	50
Chloramphenicol	30	20
Kanamycin	50	50
Tetracyclin	12.5	12.5

Tab. 4.2 Standardmäßige Konzentrationen verschiedener Antibiotika

4.6 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, St.Louis, USA
Agarose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose (ultrapur)	Seakem, Rockland, USA
Amberlite MB-1 (Ionenaustauscher)	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Amidoschwarz 10B	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, St.Louis, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
5-Bromo-4Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casaminoacids	Difco, Detroit, USA
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dichlordimethylsilan	ACROS Organics, Belgien
Dithiothreitol (DTT)	Janssen, Beerse, Belgien
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St.Louis, USA
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	J.T.Baker, Groß-Gerau
Glukose	CAESAR & LORETZ GmbH, Hilden
Glycerin, ultrapure	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Glykogen	Boehringer, Mannheim

Harnstoff	Sigma, St.Louis, USA
Hefeextrakt	GIBCO BRL, Eggenstein
Hydroxychinolin	Janssen, Beerse, Belgien
Hygromycin	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Boehringer, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Paraffinöl, für IR-Spektroskopie	Fluka Chemie AG, CH-Buchs
Phenol (Roti-Phenol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG6000)	Sigma, St.Louis, USA
Rifampicin	Boehringer, Mannheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tetracyclin	Boehringer, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.7 Verschiedenes

Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
Dialysemembran, VS 0.025 μ m, $\varnothing$ 2.5 cm	Millipore, Bedford, USA
Dialyseschläuche, Spectra/Por	Spectrum Medical Industries Houston, Texas
DE 52-Papier	Whatman, England
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MN Faltenfilter	Machery-Nagel, Düren
PVDF Membran, Immobilon-P (0.45 μ m)	Millipore, Bedford, USA
QIAquick, Gel Extraction Kit	QUIAGEN, Hilden
Röntgenfilme RX	Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan
Röntgenfilme, X-Omat R	Kodak, New Haven, USA
Sterilfilter FB 030/3 (0.2 μ m)	Schleicher & Schüll, Dassel
Tetenal, Roentogen liquid, Röntgen-Rapid-Entwickler	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetenal Roentogen, Superfix Röntgenfixierer	Tetenal Photowerk, Norderstedt

5 METHODEN

5.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

Beim Umgang mit den verschiedenen Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Bei allen Arbeitsgängen wurden die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit GvOs (S1) eingehalten. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert oder durch Einwirkung von 70 % Ethanol inaktiviert.

5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2-3 bar) autoklaviert. Die temperaturinstabilen Lösungen wurden mittels einer 0.2 µm Membran (FB030/3) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

5.1.2 Haltung und Aufbewahrung von Zellstämmen

Alle benutzten Bakterienstämme wurden aus tiefgefrorenen Glycerinkulturen auf YT-Platten (4.5), die gegebenenfalls mit dem erforderlichen Antibiotikum zur Selektion supplementiert waren, mit einer sterilen Platinimpföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Kurzfristige Haltung der bearbeiteten Stämme erfolgte über solche Agarplatten, die im Turnus von ca. 4 Wochen frisch ausgestrichen und bei 4°C gelagert wurden. Alternativ wurden 'Stepkulturen' zur mittelfristigen Aufbewahrung angelegt. In sterilen Schraubgläsern wurde mit Antibiotikum supplementierte Agarlösung eingefüllt. Der erstarrte Agar konnte mittels einer Platinöse durch Einstechen angeimpft werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C waren die Stepkulturen verschraubt über mehrere Monate bei 4°C haltbar. Zur langfristigen Sicherung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer üN-Kultur (5.1.3.1) in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl autoklaviertem Glycerin versetzt, 30-60 min bei RT inkubiert, dabei mehrfach invertiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

5.1.3 Anzucht von *E. coli* Flüssigkulturen

5.1.3.1 Über Nacht-Kulturen

Zur Anzucht von üN-Kulturen wurde eine Einzelkolonie entweder mit einer sterilen Platinöse oder mittels eines sterilen Zahnstochers von einer YT-Platte (4.5) in 3 ml

Medium überimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 220 rpm) bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.1.3.2 Anzucht von Bakterien in diversen Flüssigmedien

Zur Aufzucht von Bakterien, zur Herstellung kompetenter Zellen oder zur Präparation von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurden YT-Flüssigkulturen supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer üN-Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zur gewünschten optischen Dichte (5.2.6.1) auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 150 rpm) inkubiert.

5.1.3.3 Erstellung von Wachstumskurven und Berechnung von Wachstumsraten

Zur Erstellung von Wachstumskurven und der Berechnung von Wachstumsraten wurden 50 ml steriles Medium (auf 37°C vorgewärmt) in 250 ml Erlenmeyerkolben 1:25, 1:50 oder 1:100 angeimpft mit einer üN-Kultur (5.1.3.1) angeimpft. Die erforderliche Menge zum Animpfen war Resultat der optischen Dichte der üN-Kultur. Je nach Stamm oder Medium erreichten die Vorkulturen unterschiedliche Zelldichten. Von den Suspensionskulturen wurden sofort nach der Inokkulation ($t = 0$ min) und dann im Abstand von 30 min Proben zur Streumessung (5.2.6.1) entnommen. Die Messwerte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumsrate (hier: μ = Verdopplungen pro H) errechnet sich aus der Geradengleichung der linearisierten Steigung der Wachstumskurve während des exponentiellen Wachstums (maximale Teilungsrate der Zelle) nach der Formel:

$$\mu = \lg(M_2) - \lg(M_1) / \lg 2 (t_2 - t_1)$$

M_1 = OD₆₀₀ zu Beginn des exponentiellen Wachstumstums

M_2 = OD₆₀₀ zum Ende des exponentiellen Wachstums

t_1 = Zeitpunkt zu M_1

t_2 = Zeitpunkt zu M_2

Die Wachstumskurven wurden mit dem Programm *ORIGIN* erstellt, aus der angegebenen allgemeinen Geradengleichung

$$y = bx + a$$

wurde aus der Steigung (B) mittels der Formel

$$\mu = b \times 60 / \lg 2$$

die Wachstumsrate errechnet.

Hohe Wachstumsraten wurden in diversen Vollmedien erreicht, mit niedrigen Wachstumsraten wuchsen die Zellen im differentiell supplementierten Minimalmedium M9 (4.5). Grundsätzlich wurden alle Wachstumskurven in Medien ohne Antibiotikum erstellt, um etwaigen Selektionsdruck auf das Wachstum und die Transkriptionsrate zu vermeiden. Durch Ausplattieren äquivalenter Volumina auf antibiotikumshaltige und -freie Agarplatten nach 48-stündigem Wachstum ohne Antibiotika wurde kontrolliert, dass die Zellen ohne den Selektionsdruck keine Plasmide eliminierten.

5.1.4 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte routinemäßig nach der von Dagert und Ehrlich (1979) publizierten Methode. Dazu wurden 100 ml YT-Medium (4.5) mit 1 ml einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.5 – 0.6 angezogen. Die weitere Behandlung wurde im Kühlraum bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt. Die Kulturen wurden in sterile 50 ml Corex Zentrifugengläser gefüllt und für 20 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm, 4°C in einer Heraeus Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R) im Ausschwingrotor. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in $1/2$ Volumen 0.1 M $CaCl_2$ aufgenommen, vorsichtig durch Invertieren resuspendiert, 60 min auf Eis inkubiert und erneut wie oben zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in $1/25$ Volumen 0.085 M $CaCl_2$ mit 15 % Glycerin vorsichtig resuspendiert und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße zu 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden minimal 1 h, maximal 24 h bei 4°C inkubiert, dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert oder sofort zur Transformation eingesetzt.

5.1.5 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1985) angewandt. 200 µl transformationskompetenter *E. coli* Zellen (3.1.4) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5-10 ng Plasmid-DNA oder Ligationsansätze (Teilmengen oder komplett) in einem Volumen von 20 µl vorsichtig hinzupipettiert, leicht durchmischt und 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 3 min bei 42°C und im Anschluss wurde der Ansatz mit 800 µl vorgewärmten YT-Medium (37°C) versetzt und 60-90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50 oder 100 µl (Transformation von Plasmid-DNA) oder 200 µl (Transformation von Ligationsansätzen) auf selektive YT-Platten (4.5) ausplattiert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen pro µg DNA konnte nach üN-Inkubation bei 37°C durch Auszählen der Kolonien unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA Menge und des ausplattierten Volumens errechnet werden. Die Transformationseffi

zienz lag je nach Präparation und Art der transformierten DNA bei 1×10^4 bis 6×10^5 Transformanden pro μg DNA. Kolonien aus Transformationen von Ligationsansätzen wurden entweder erneut vereinzelt oder parallel auf Platten mit verschiedenen Antibiotika weiter getestet.

5.1.6 Alternative Methode zur Herstellung kompetenter Zellen und deren Transformation

Zur Transformation einiger *E. coli*-Stämme erwies sich die oben beschriebene Methode als ungeeignet. In Einzelfällen wurden die kompetenten Zellen daher nach Cohen *et al.* (1972) präpariert. 100 ml YT-Medium (4.5) wurden mit 1 ml einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes angeimpft und in einem Wasserbad-schüttler (New Brunswick Scientific Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.3-0.5 angezogen. Die weitere Behandlung wurde im Kühlraum bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt. Die Kulturen wurden in sterile 50 ml Corex Zentrifugengläser gefüllt und 5 min bei 4000 rpm, 4°C in einer Heraeus Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R) im Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in $\frac{1}{2}$ Volumen 0.01 M CaCl_2 aufgenommen, vorsichtig durch Invertieren resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in $\frac{1}{2}$ Volumen 0.03 M CaCl_2 vorsichtig resuspendiert und 20 min auf Eis gehalten. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in $\frac{1}{10}$ Volumen 0.03 M CaCl_2 resuspendiert und anschließend sofort in eine Transformation eingesetzt. Hierzu wurden 50-60 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 30 μl TE-Puffer (4.5) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 150 μl kompetenten Zellen versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2.5 min bei 42°C, im Anschluss wurde der Ansatz mit 800 μl vorgewärmten YT-Medium (37°C) versetzt und 90 min bei 37°C inkubiert. Entweder wurden dann je 200 μl auf selektiven Agarplatten ausplattiert oder die Kulturen mit 3 ml YT-Medium, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, als üN-Kultur angezogen und am Folgetag ausplattiert. Da die Transformationseffizienz bestimmter Mutantenstämme geringer als 1×10^2 Transformanden pro μg DNA war, erwies sich diese Vermehrung als erforderlich.

5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Grundsätzlich wurde bei allen Arbeiten mit sterilen Lösungen und Materialien gearbeitet. Sämtliche Methoden, bei denen radioaktives Material eingesetzt wurde, wurden im Isotopenlabor unter den vorgeschriebenen gesetzlichen Bedingungen durchgeführt, der Abfall ordnungsgemäß entsorgt.

5.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Hierzu wurde die zu reinigende Nukleinsäurelösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1 gemischt, Phenol wie unter 4.1 beschrieben) versetzt und durch mindestens einminütiges Mixen auf dem Vortex gemischt. Phenolextraktionen kleiner Volumina (bis ca. 600 µl) wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt und zur schnellen Phasen-trennung in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge 1.5) 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Größere Volumina, z. B. bei Plasmidisolationen im präparativen Maßstab, wurden in 12 ml Greiner-Röhrchen phenolextrahiert und zur Phasen-trennung im Ausschwingrotor einer großen Tischzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R) 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der wässrige Überstand ohne die proteinhaltige Interphase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion wurde je nach Notwendigkeit solange wiederholt, bis keine sichtbare Interphase mehr vorhanden war.

Zur Entfernung organischer Rückstände wurden kleine Volumina ein bis dreimal mit Ether extrahiert. Dazu wurden 1-2 Volumen Diethylether zugegeben, wiederum gut gemischt, die Phasentrennung erfolgte ohne Zentrifugation. Die organische Phase wurde abgehoben und verworfen. Etherrückstände in der Lösung wurden abgedampft. Größere Volumina wurden nach der Phenolextraktion entweder im Dialyseschlauch dialysiert (5.2.3.1) und dann ethanolpräzipitiert (5.2.2) oder nach zweimaliger Chloroformextraktion, die technisch genau wie die Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt wurde, direkt gefällt.

5.2.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren wurde die Lösung mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.5) versetzt, gemischt und 2-3 Volumen absoluter Ethanol (-20°C) zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff oder durch Inkubation für 30 min bei -20°C oder -70°C. Längere Fällungszeiten wurden wegen des hohen Anteils ausfallenden Salzes nach Möglichkeit vermieden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30-60 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Beckmann Microspin, Heraeus Biofuge 1.5 oder Hettich EBA 12, größere Volumina in der Heraeus Megafuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (4.5) oder *Aqua dest.* aufgenommen.

5.2.3 Dialyse

5.2.3.1 Dialyse von Nukleinsäurelösungen im Dialyseschlauch

Zur Entfernung von Phenolresten oder zur Entsalzung wurden größere Volumina im Dialyseschlauch (4.7) dialysiert. Die Dialyseschläuche wurden in passende Stücke von 15-20 cm geschnitten, in 1 % Natriumhydrogencarbonat 15 min ausgekocht, zweimal mit *Aqua dest.* gespült und darin erneut aufgekocht, abgekühlt und mit der Kochlösung, der ein bis zwei Tropfen Chloroform zugesetzt wurden in eine Schraubflasche gefüllt. So konnten die Schläuche mehrere Wochen aufbewahrt werden. Die Dialyse erfolgte unter mäßigem Rühren gegen mindestens 1 l TE-Puffer (4.5) bei 4°C (mehrmaliger Pufferwechsel nach durchschnittlich 2 h).

5.2.3.2 Mikrotropfendialyse

Kleine Volumina wurden auf VS Millipore Membranfiltern (Porengröße 0.025 µm) dialysiert. Hierzu wurden sterile Petrischalen mit 20-30 ml des jeweiligen Dialysepuffers gefüllt und ein Membranfilter mit der glänzenden Seite nach oben auf die Flüssigkeitsoberfläche gesetzt. Nach 5 min wurden die Proben, maximal 100 µl in mehreren Tropfen pro Filter auf die Oberfläche pipettiert und mit geschlossenem Deckel 30-60 min dialysiert, anschließend mit der Pipette abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

5.2.4 Isolation von Nukleinsäuren

5.2.4.1 Plasmidisolation im präparativen Maßstab - 'Maxipräp'

Die präparative Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen *et al.* (1981) beschriebenen Methode. Hierzu wurde mit einer Einzelkolonie eine üN-Kultur (5.1.3.1) inokuliert, am nächsten Tag eine Vorkultur (25ml) 1:100 angeimpft, bei 37°C mehrere Stunden geschüttelt (New Brunswick Gio Gyrotory) und mit dieser Vorkultur am Abend eine Hauptkultur, 800 ml in einem 2000 ml-Erlenmeyerkolben angesetzt (1:100 verdünnt) und über Nacht bei 37°C geschüttelt (New Brunswick Gio Gyrotory). Alle Kulturen wurden in YT-Medium (4.5) mit dem entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Die Kultur wurde am folgenden Morgen durch 5-minütige Zentrifugation (8.000 rpm, 4°C, Beckmann Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor) sedimentiert, das Zell-pellet in 8 ml Saccharose-Puffer sorgfältig resuspendiert und in ein Ti 55.2-Polycarbonatröhrchen (Beckmann) überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) und 3 ml Lysozymlösung wurde die Suspension durch Invertieren durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser 10 min wurden die Zentrifugenröhrchen austariert und dann 30 min bei 44.000 rpm bei 4°C zentrifugiert

(Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti 55.2). Der klare Überstand wurde in einen Messzylinder dekantiert und 30 min bei 37°C mit 50 µg RNase A / ml inkubiert. Nach Zugabe von 50 µg Proteinase K / ml Überstand wurde nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Volumen PEG-Lösung 30 min bei -20°C gefällt und 30 min bei 10.000 rpm und 4°C sedimentiert (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14). Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml TE-Puffer (4.5) aufgenommen, auf Eis gelöst und zweimal mit 5 ml Phenol/Chloroform und einmal mit 5 ml Chloroform (5.2.1) extrahiert. Es folgte eine Ethanolpräzipitation wie unter 5.2.2 beschrieben. Das getrocknete Sediment wurde letztlich in 1 ml TE-Puffer (4.5) aufgenommen, gelöst und gegen TE-Puffer im Dialyseschlauch dialysiert. Die Konzentration und Reinheit wurde spektroskopisch untersucht (5.2.6.2) und auf einem Agarosegel (5.2.8.1) überprüft.

Saccharose-Puffer:	25 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris/HCl, pH 8.0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 <i>immer frisch angesetzt</i>
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumenteile 10 % (w/v) Brij 35 1 Volumenteil 10 % (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest.</i> , pH 8.0 mit NaOH eingestellt, Lösung erfolgt nach NaOH-Zugabe
RNase A:	200 µg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 (die RNase wurde vor der Benutzung nach Maniatis <i>et al.</i> (1982) von DNase-Aktivität befreit))
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG-Lösung:	30 % (w/v) PEG ₆₀₀₀ in 1.5 M NaCl

5.2.4.2 Plasmidisolation im analytischen Maßstab - 'Minipräp'

Zur schnellen Isolation analytischer Mengen Plasmid-DNA wurde nach der erstmals von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode vorgegangen. 2 ml einer üN-Kultur wurden in zwei Schritten in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm, Beckmann Microspin), das Sediment in 100 µl Lyselösung I aufgenommen, resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe frisch angesetzter denaturierender Lyselösung II und Mischen durch kurzes Vortexen folgten 5 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden nach Zusatz von 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4.8) chromosomale DNA und Zelltrümmer während 5 minütiger Inkubation

auf Eis ausgefällt und durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, Beckmann Microspin) sedimentiert. Die renaturierte Plasmid-DNA verblieb im Überstand, der in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Diese DNA-Lösung wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.1) und dann durch Zugabe von 3 Volumen absolutem Ethanol und Inkubation von 30 min bei -70°C ausgefällt und zentrifugiert (30 min 13.000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl H₂O aufgenommen und gelöst. Für eine Restriktionsanalyse (5.2.7.1) wurden 5 µl eingesetzt und mit 20 µg/ml RNase A im Ansatz hydrolysiert und auf einem Agarosegel (5.2.8.1) analysiert.

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

Lyselösung II: 0.2 N NaOH
 1 % (w/v) SDS

Alternativ zur beschriebenen Methode wurde in Einzelfällen ein Plasmid-Isolationskit der Firma Boehringer verwendet. Es wurden 2.5-3 ml Bakterienkultur (üN-Kultur, siehe 5.1.3.1) zur Isolation eingesetzt und genau nach Herstellerangaben gearbeitet. Mittels dieser Methode konnten etwa 10 µg Plasmid-DNA aus etwa 16 OD Zellen (5.2.6.1) isoliert werden.

5.2.4.3 Isolation chromosomaler *E. coli* DNA

Zur Isolation chromosomaler *E. coli* DNA wurde eine von Beate Liebig (1991) beschriebene Methode geringfügig modifiziert angewandt. Eine 25 ml YT-Kultur wurde mit 250 µl einer üN-Kultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0.8 bis 0.9 schüttelnd inkubiert. 2 ml wurden nacheinander in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge 1.5), das Sediment mit 200 µl Lösung 1 und 22 µl Proteinase K-Lösung versetzt, resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde 10 min bei RT inkubiert. Es folgten vier Phenol/Chloroform-Extraktionen (5.2.1). Aufgrund der Viskosität der wässrigen Phase und der ausgeprägten Interphase wurde mindestens 30 min zentrifugiert. Die Probe wurde dreimal mit Ether extrahiert (5.2.1) und anschließend nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2 Volumen absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Das DNA Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (4.5) aufgenommen und nach Zugabe von 2.5 µl RNase A (200 µg/ml 10 mM Tris/HCl pH 8.0) 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine erneute Phenol/Chloroform-Extraktion und ein zweimaliges Ausschütteln mit Ether. Anschließend wurde die DNA-Lösung mikrodialysiert (5.2.3.2) und danach sowohl spektroskopisch (5.2.6.2)

als auch elektrophoretisch (0.8 % Agarosegel, 5.2.8.1) auf Konzentration und Reinheit überprüft.

Lösung 1: 50 mM Glukose
 25 mM Tris/HCl, pH 8.0
 10 mM EDTA

Proteinase K: 20 mg/ml in H₂O

Lösung 2: 1 % (w/v) SDS

5.2.4.4 Isolation von *E. coli* Gesamt-RNA

Die Isolation wurde nach einer von Beate Liebig (1996) beschriebenen Methode durchgeführt.

5-25 ml einer Flüssigkultur (5.1.3.2) gewünschter optischer Dichte wurden in einem sterilen Zentrifugenröhrchen (Greiner oder Falcon, je nach Menge) sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.0R oder Beckmann Coulter, GPKR Centrifuge, Ausschwingrotor, 4°C) und in 0.5 ml Puffer I resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 0.5 ml 60°C heißem Phenol (mit 20 mM NaOAc, pH 5.5 gesättigt) versetzt. Nach guter Durchmischung (Vortex) wurden die Phenolgemische 5 min bei 60°C inkubiert (zwischendurch vortexen). Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge 1.5) und die wässrige Phase erneut mit 0.5 ml heißem Phenol versetzt, erneut inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein 2.2 ml fassendes Eppendorfgefäß überführt, mit dreifachem Volumen absolutem Ethanol versetzt und 30 min bei -70°C ausgefällt. Nach der Zentrifugation (45 min, 13.000 rpm, 4°C, Zentrifuge) wurde das Nukleinsäuresediment in 0.5 ml Puffer I aufgenommen, in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und noch zweimal wie beschrieben gefällt. Die RNA wurde schließlich in 15-30 µl TE-Puffer (4.5) aufgenommen, spektroskopisch auf Konzentration und Reinheit geprüft (5.2.6.2) und auf einem 2.5 % Agarosegel bezüglich der stöchiometrischen Zusammensetzung ribosomaler RNAs überprüft.

Puffer I: 20 mM NaOAc, pH 5.2; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.5 % (w/v) SDS

5.2.5 Isolation von *E. coli* Gesamtprotein

Die Isolation wurde nach einer von Afflerbach *et al.* (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. 30 ml Flüssigkulturen (5.1.3.2) wurden mit *E. coli* Zellen aus üN-Kulturen (5.1.3.1) 1:100 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von etwa 0.6 aufgewachsen (5.1.3.2). 3 OD_{600 nm} Zellen (etwa 5 ml) wurden zwecks Proteinisolierung weiterverarbeitet. Die Suspension wurde 5 min bei 5000 rpm und 4°C zen

trifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R), das Sediment dann viermal in PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugationen wie oben beschrieben) und letztlich in 1 ml TEN-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (13.000 rpm, 30 sec, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0R). Nach Abheben des Überstandes wurde das Pellet in 150 µl 250 mM Tris/HCl, pH 7.8 suspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch die 'Einfrier-Auftau-Lyse' aufgeschlossen. Hierzu wurde das Gemisch viermal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach sofort bei 37°C wieder aufgetaut. In einer nachfolgenden Zentrifugation (10 min, 15.000 rpm, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0R) wurde die Proteinlösung von den Zelltrümmern getrennt und für die Konzentrationsbestimmung (5.2.6.3) weiterverwendet.

TEN-Puffer: 40 mM Tris/HCl, pH 7.8
1 mM EDTA
150 mM NaCl

PBS-Puffer: 8 g NaCl
0.2 g KCL
10.1 ml 1 M Na_2HPO_4
1.8 ml 1 M KH_2PO_4
ad 1 l mit *Aqua dest.*

5.2.6 UV/VIS-Spektroskopie

5.2.6.1 Streumessung

Das Bakterienwachstum wurde in einem Spektralphotometer (Beckmann Modell 64) durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (Streumessung) verfolgt. Um im linearen Bereich messen zu können, wurden die Suspensionen bei Bedarf durch Verdünnung mit dem entsprechenden Medium auf OD-Werte von maximal 0.8 eingestellt. Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgte gegen Nährmedium.

5.2.6.2 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren und Nukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen wurde in einem Beckmann Spektralphotometer (Modell 64) mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Um im linearen Messbereich zu arbeiten, wurden alle zu messenden Proben ebenso wie bei der Streumessung so verdünnt, dass ihre Absorption maximal einen Wert von 0.9 annahm. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder H_2O). Zur Berechnung der Konzentration wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors folgende vereinfachte Beziehungen verwendet:

$$1.0 A_{260} = 37 \mu\text{g ss NS/ml}$$

$$1.0 A_{260} = 50 \mu\text{g ds NS/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über mögliche Verunreinigungen der Nukleinsäure. Reine Präparationen sollten A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1.8 und 2.0 besitzen, Kontaminationen durch Proteine führen zu deutlich geringeren Quotienten, was eine genaue Konzentrationsbestimmung erschwert.

Desoxynukleotidlösungen und Desoxyoligonukleotidlösungen wurden nach dem Ansetzen spektrometrisch auf die angegebene Konzentration hin überprüft.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz lassen sich Konzentrationen von absorbierenden Substanzen mittels des substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten errechnen.

Nach Lambert-Beer gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit: E = gemessene Extinktion bei angegebener Wellenlänge λ
 ε = substanzspezifischer molarer Extinktionskoeffizient bei angegebener Wellenlänge λ
 c = molare Konzentration der absorbierenden Lösung
 d = Länge des Lichtweges durch die absorbierende Lösung, also Durchmesser der Küvette (hier 1 cm)

Für die Konzentration gilt folglich:

$$c = E \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1}$$

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten für die Desoxynukleotide werden bei Maniatis *et al.* (1982) wie folgt angegeben:

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	$\varepsilon_{259} = 1.54 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	$\varepsilon_{271} = 9.1 \cdot 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	$\varepsilon_{253} = 1.37 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	$\varepsilon_{260} = 7.4 \cdot 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

5.2.6.3 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von *E. coli* Gesamtproteinfraktionen wurde ein Bradford-Microassay (Bio-Rad) eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue, welche einen Anstieg der Absorption bei 595 nm zur Folge hat. Zunächst wurde eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt. Anhand deren Geradengleichung oder durch Ablesen im Diagramm konnte die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt werden.

Nach Herstellerangaben wurden 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Dye-Reagenz vermischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend im Spektralphotometer (Beckmann, Modell 64) vermessen.

5.2.7 Enzymatische Reaktionen

5.2.7.1 Restriktionshydrolysen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme gehören zu den Endonukleasen vom Typ II (Zabeau und Roberts, 1979), bei welchen die palindromische Erkennungs- und Spaltungssequenz jeweils identisch ist. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA führt, abhängig von der eingesetzten Restriktionsendonuklease, entweder zu glatten oder zu 3'- bzw. 5'- überhängenden Enden an den entstandenen ds DNA-Fragmenten.

Alle Restriktionsenzyme wurden bezüglich Aktivität, Inkubationstemperatur und Pufferbedingungen den Herstellerangaben entsprechend bzw. mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt. Präparative Ansätze und solche, die in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden sollten, wurden nach der Restriktionshydrolyse mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.1) und ethanolpräzipitiert (5.2.2). Zur Analyse auf Agarosegelen (5.2.8.1) wurden die Restriktionsansätze ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

5.2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen (5.3.1) mit 'blunt end' linearisiertem Vektor wurde nach Herstellerangaben über Nacht (16-18 h) bei 20°C inkubiert. Dem Ansatz wurde PEG₆₀₀₀ in einer Endkonzentration von 15 % (w/v) zugefügt und immer 1 Unit T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Zusatz von PEG erhöht zwar die Ligationsfrequenz, die Transformationseffizienz wird durch PEG allerdings erheblich vermindert. Bei diesen 'blunt-end-Ligationen' ist ein molarer Überschuss des Inserts erforderlich, hier wurde mit Insert/Vektor-Verhältnissen von 30:1 gearbeitet.

1 x Ligase Puffer: 66 mM Tris/HCl
 5 mM MgCl₂
 1 mM DTE
 1 mM ATP
 pH 7.5 (20°C)

5.2.7.3 Radioaktive 5'-Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide

Synthetisierte ss DNA-Oligonukleotide wurden in einer direkten Phosphorylierungsreaktion radioaktiv endmarkiert. Hierzu wurden 10 pmol Oligonukleotid in einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl mit 5 µl 2 µM [γ ³²P]-ATP (50 µCi) und 10 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 (NH₄OAc, pH 5.0), 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml) und 5 Volumen abs. Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt und anschließend 30 min bei 12.000 rpm (Heraeus Biofuge A) pelletiert. Nach dreimaligem Waschen des Pellets mit 80 % Ethanol und Lufttrocknung wurden die Proben in 20 µl TE-Puffer (4.5) aufgenommen. Zur Bestimmung der Reaktionseffizienz wurde 1 µl dieser Lösung im Szintillationszähler gemessen (5.2.11). Aufgrund großer Probenzahl der nachfolgenden PE-Analysen war gegebenenfalls eine Verdopplung oder Verdreifachung des Ansatzes erforderlich, hierdurch konnten jedoch keine Beeinträchtigungen festgestellt werden.

1 x Kinasepuffer (NEB): 50 mM Tris/HCl, pH 7.6
 10 mM MgCl₂
 5 mM DTT
 0.1 mM EDTA, pH 8.0
 0.1 mM Spermidin

5.2.7.4 Radioaktive 5'-Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden über die Klenow-Reaktion

Das Klenow-Fragment der *E. coli* Polymerase I besitzt sowohl eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, welche als Template jedoch nur ungepaarte Einzelstrang-DNA erkennt, als auch eine 5'→3' Polymerase-Aktivität, die zur Auffüll-Reaktion erforderlich ist. Mittels des großen Fragmentes der Polymerase I können 5'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente mit den entsprechend komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden. Durch den Einsatz radioaktiver Nukleotide erfolgt somit eine radioaktive Markierung des DNA-Doppelstranges. Es werden [α ³²P]dNTPs

eingesetzt, das markierte Phosphat bleibt somit auch bei Strangverlängerung erhalten.

Ein Markierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg DNA
2.5 µl NTB (*Nick-Translation-Buffer*)
je 1 µl 10 mM dCTP, dGTP, dTTP
ad 23 µl Aqua dest.
1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl)
1 µl 10 mM [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (spez. Aktivität 3000 Ci/mmol)

Nick-Translation-Buffer: 500 mM Tris/HCl, pH 7.2
100 mM MgSO₄
1 mM DTT
500 µg/ml BSA

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei RT inkubiert, anschließend auf 50 µl mit TE-Puffer (4.5) aufgefüllt, zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.1) und dann mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen abs. Ethanol gefällt (10 min Eisbad). Das luftgetrocknete Sediment wurde in 250 µl *Aqua dest.* aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

5.2.8 Gelelektrophorese

5.2.8.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmid-DNA, Restriktionsfragmente, chromosomale *E. coli* DNA) und einzelsträngiger RNA (*E. coli* Gesamt-RNA) wurden horizontale Agarosegele mit 0.8-2.5 % (w/v) Agarose verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Das aufgekochte Gel (erforderliche Agarosemenge in 80-100 ml 1 x TAE-Puffer (4.5)) wurde nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer (4.5), der mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt war. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x TAE-Probenpuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 90-120 V aufgetrennt. Bei geringem Probenumfang wurden kleinere Gele (6 x 10 cm) angefertigt. Für RNA-Gele wurde eine gesonderte Laufkammer verwendet, die vor Gebrauch mindestens 2 h oder über Nacht mit 0.1 % DEPC behandelt wurde.

Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel über die Fluoreszenz der in den Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromidmoleküle bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Appligene oncor, Modell M20) sichtbar gemacht. Da die RNA-Gele unter nativen Bedingungen elektrophoretisch getrennt wurden, konnte diese Form der Visualisierung auch bei primär einzelsträngiger

RNA genutzt werden, da aufgrund der Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle doppelsträngige Bereiche eine Interkalation von Ethidiumbromid ermöglichen.

Zur Dokumentation wurden die Gele über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt.

5.2.8.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen

Wässrige Lösungen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid als bifunktionelles Vernetzungsreagens bilden nach Zugabe von geeigneten Katalysatoren stabile hydrophile Gele. Hier diente als Polymerisationskatalysator N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED). Als Polymerisationsstarter wurde Ammoniumperoxodisulfat (APS) verwendet, welches in wässriger Lösung freie SO_4^- -Radikale bildet und somit als Radikalstarter für die Polymerisation dient. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS (0.1 %, f.c.) und TEMED (0.1 %, f.c.) gestartet. Die verwendeten Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch mit Detergenz, *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt.

Es wurde mit einer 40 % Acrylamid-Stammlösung gearbeitet, bei der Acrylamid und Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:1 vernetzt waren. Derartige Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen zur Entfernung von Fremdionen mit einem Ionenaustauscher (Amberlite MB-1) 2-3 h gerührt und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert und konnten so mehrere Monate lichtdicht bei 4°C aufbewahrt werden. Aus solchen Stammlösungen wurden Gele gewünschter Prozentigkeiten auf 1 x TBE-Basis hergestellt (Maniatis *et al.*, 1982).

Für die Krümmungsanalysen dieser Arbeit wurden 8 % PAA-Gele in einer Dimension von 160 x 140 x 1.5 mm eingesetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Gele wurden in eine temperierbare Hoefer-Kammer (Hoefer, USA) eingespannt und bei 60°C Geltemperatur mit einer konstanten Spannung von 200 V 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Elektrophorese bei 2°C wurde die gesamte Apparatur im Kühlraum (4-6°C) installiert und an ein Eis/Wasserbad angeschlossen. Bei dieser Temperatur wurden die Gele mit konstantem Strom (40 mA) und höherer Spannung (Start 340 V, Stop >600 V) gefahren.

Der Nachweis der aufgetrennten Banden erfolgte mittels Silberfärbung (5.2.9.1). Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt (Hewlett Packard, Scan Jet 4C/T) und über einen Laserdrucker ausgedruckt.

5.2.8.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen

Zur Produktanalyse von Primer Extension-Reaktionen und zur Auftrennung von Plasmidsequenzierungen wurden denaturierende 10 oder 16 % Polyacrylamidgele verwendet. Hierbei wurde dem Gel als denaturierendes Agens Harnstoff in einer

Konzentration von 7 M zugesetzt. Der Vernetzungsgrad der Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung betrug für diese Gele 20:1. Gelpuffer und Elektrophoresepuffer war wie in nativen Gelen 1 x TBE (4.5). APS und TEMED wurden in einer Endkonzentration von jeweils 0.05 % als Polymerisationsstarter zugegeben. Die Dimension der Gele betrug 390 x 335 x 0.4 mm. Die Glasplatten wurden vor jeder Benutzung gründlich mit Detergenz, *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt. Vor erstmaliger Benutzung und dann nach jedem zweiten Gebrauch wurden die Glasplatten mit 2 % Repelcote (2 % (v/v) Dichlordimethylsilan in Trichlormethan (Chloroform)) silikonisiert. Die Gellösung wurde vor Zugabe der Polymerisationsstarter für 3 min mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die aufzutrennenden Nukleinsäureproben wurden mit 1 Volumen Formamidprobenpuffer versetzt und vor dem Auftrag 3 min bei 96°C denaturiert. Die Gele wurden vor dem Probenauftrag in drei Schritten von jeweils 10 min auf eine konstante Leistung von 75 W gebracht. Die Elektrophoresedauer betrug je nach Länge der zu analysierenden Fragmente 90-330 min. Zur Dokumentation wurden die Gele autoradiographiert (5.2.9.6).

5.2.8.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidsystem nach Laemmli (1970) eingesetzt. Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt als denaturierendes Agens die Auffaltung der Proteinstruktur. Es bindet über hydrophobe Wechselwirkungen seines aliphatischen Schwanzes mit entsprechenden Proteinbereichen. SDS bindet in einem konstanten Verhältnis von 1.4 g an 1 g Protein. Hieraus resultiert ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt unter denaturierenden Bedingungen ausschließlich nach dem Molekulargewicht.

In dieser Arbeit wurden *E. coli* Gesamtproteinproben in Gelen mit den Dimensionen 160 x 140 x 1.5 mm aufgetrennt. Die Proteine wurden zunächst in einem weitporigen Sammelgel (5 % PAA) fokussiert (ca. 20 x 160 mm) und dann in einem engporigen (15 % PAA) Trenngel (ca. 120 x 160 mm) aufgetrennt.

Die Glasplatten wurden wie unter 5.2.8.2 beschrieben gereinigt. Nach dem Gießen des Trenngeles wurde die noch flüssige Acrylamidlösung zur Gewährleistung einer geraden Oberfläche vorsichtig mit n-Butanol überschichtet, welches nach der Polymerisation gründlich entfernt wurde.

Da Artefakte abhängig von der Proteinkonformation (z. B. intramolekulare Schwefelbrücken) auftreten können, werden die Proben für SDS-Gele mit einem Schwefelbrückenbrecher wie Mercaptoethanol oder DTT versetzt.

Die Proteinproben (ca. 20 µg in 20 µl) wurden zunächst mit 3 µl β-Mercaptoethanol und 7 µl Probenpuffer vermischt und 5 min im Wasserbad aufgeköcht. 15 µl der so behandelten Proben wurden in einer Spur aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht (15 h) bei einer konstanten Spannung von 60 V.

Trenngellösung: 15 % PAA/Bis (30:0.8 vernetzt)
375 mM Tris/HCl, pH 8.8
0.1 % (w/v) SDS
0.1 % (v/v) TEMED
0.1 % (w/v) APS

Sammelgellösung: 5 % PAA/Bis (30:0.8 vernetzt)
125 mM Tris/HCl, pH 6.8
0.1 % (w/v) SDS
0.1 % (v/v) TEMED
0.1 % (w/v) APS

Elektrophoresepuffer: 50 mM Tris
384 mM Glycin
0.1 % (w/v) SDS
pH 8.8 mit HCl

5.2.8.5 Standard-Retardierungsgelelektrophorese

Die Komplexierung von DNA durch bindende Proteine kann anhand der Retardierungsgelelektrophorese (Gelverzögerung) nachgewiesen werden. Die Methode der Gelretardierung ermöglicht qualitative und quantitative Analysen von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen (Fried, 1989, Lane *et al.*, 1992). Durch die Komplexbildung eines Proteins und einer Nukleinsäure wird die elektrophoretische Mobilität der Nukleinsäure in einer Gelmatrix unter nativen Bedingungen verzögert. Verursacht wird diese Gelretardierung einerseits durch das erhöhte Molekulargewicht des Nukleo-Proteinkomplexes gegenüber der freien DNA, eine weitere Ursache ist die mögliche Änderung der DNA-Konformation durch proteininduzierte Krümmungen.

Die nachfolgenden Standardbedingungen, nach denen alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bindungsstudien erfolgt sind, wurden so gewählt, wie von Tippner *et al.* (1994) beschrieben. Die Retardierungsansätze wurden auf einem nativen 5 % Polyacrylamidgel in 0.5 x TBE (4.5) aufgetrennt. Die Geldimension betrug 320 x 220 x 1 mm.

Retardierungsansatz: 1 µl ³²P-markiertes UAS-Promotor-Fragment (4 ng/µl)
1.5 µl Poly (dI-dC) (1 µg/µl), Endkonzentration 0.15 µg/µl
1 µl 10 x Bindungspuffer
0.5-5 µl Proteinlösung
ad 10 µl mit *Aqua dest.*

10 x Bindungspuffer:	500 mM Tris/HCl, pH 7.4
	700 mM KCl
	150 mM NaCl
	10 mM EDTA, pH 8.0
	100 mM β -Mercaptoethanol

Die Retardierungsansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 2 μ l 5 x TBE-Probenpuffer (4.5) versetzt und dann sofort auf das Gel aufgetragen und bei konstantem Strom von 25 mA viereinhalb Stunden elektrophoretisiert. Die Geltemperatur wurde über einen Indikatorstreifen kontrolliert, da eine Aufheizung des Gels die Komplexbindung beeinträchtigen würde. Der Nachweis der Bandenmuster erfolgte über Autoradiographie (5.2.9.6).

5.2.9 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen

5.2.9.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, die in nativen PAA-Gelen aufgetrennt werden, können mit der von Beidler *et al.* (1982) beschriebenen Methode mit Silber angefärbt werden. Diese Methode erlaubt den Nachweis von Nukleinsäuren im ng-Bereich. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese in Fixierer I unter leichtem Schwenken (Gerhardt Schüttelmaschine LS 10) mindestens 10 min fixiert und anschließend in der Färbelösung 20 min gefärbt. Danach wurden die Gele viermal für jeweils 20-60 sec in *Aqua dest.* gewaschen, wobei der letzten Waschlösung ein wenig Entwickler zugefügt wurde und diese Mischung nach kurzem Schwenken verworfen wurde. Es folgte ein Entwicklungsbad von 5-20 min, bis die Banden gut sichtbar wurden. Letztlich wurde 10 min in Fixierer II fixiert, das Gel anschließend in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation aufbewahrt oder gescannt.

Fixierer I:	10 % (v/v) Ethanol 0.5 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung:	0.19 % (w/v) Silbernitrat
Entwickler:	15 g/l NaOH 0.08 g/l Natriumborhydrid (NaBH_4) 0.148 % (v/v) Formaldehyd (CH_2O) <i>immer frisch ansetzen</i>
Fixierer II:	0.75 % (w/v) Natriumcarbonat (Na_2CO_3) oder 5 % (v/v) Essigsäure <i>(hell auf)</i>

5.2.9.2 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Coomassiefärbung von Proteinen nach SDS-PAGE (5.2.8.4) wurde der Farbstoff 'Coomassie-Brillant-Blue R250' eingesetzt. Die Proteinfärbung erfolgt durch Anlagerung des Farbstoffes an das Protein. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Coomassiefärbelösung 1-3 h unter leichtem Schwenken auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Anschließend folgte die Entfärbung mit mehrfachem Lösungswechsel, bis die Banden auf transparentem Untergrund deutlich blau gefärbt zu erkennen waren (am besten über Nacht). Mit dieser Färbemethode können Proteine ab einer Menge von 300 ng nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Silberfärbung (5.2.9.3) erlaubt die Coomassiefärbung eine quantitative Zuordnung der Proteinbanden.

Coomassiefärbelösung: 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

5.2.9.3 Silberfärbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) ermöglicht die Detektion von geringeren Proteinmengen. Die Silberfärbung ist etwa 5 x empfindlicher als die Coomassiefärbung.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mindestens 3 h (oder über Nacht) in Fixierlösung I unter leichtem Schwenken fixiert. Dann wurde das Gel 3 x 20 min in 50 % Methanol gewaschen. Zur Verstärkung wurde das Gel 1 min in 0.02 % Natriumthiosulfat geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 3 x für je 20 sec in *Aqua dest.* gewaschen und dann 20-40 min in der Färbelösung gefärbt. Erneut folgte ein dreimaliger Waschvorgang in *Aqua dest.* (je 20 sec). In der Entwicklerlösung wurde das Gel bis zur gewünschten Bandenintensität (mindestens 10 min) geschwenkt, dann wurde mit Fixierer II gestoppt, ebenfalls etwa 10 min.

Diese Färbemethode kann nach Irie *et al.* (1982) auch an eine Coomassiefärbung angeschlossen werden. Hierzu muss das Gel gründlich entfärbt werden, dies geschieht praktischerweise durch den Fixierer I der Silberfärbung.

Fixierlösung I: 50 % (v/v) Methanol
 12 % (v/v) Essigsäure
 0.0185 % (v/v) Formaldehyd
 (frisch zugeben)

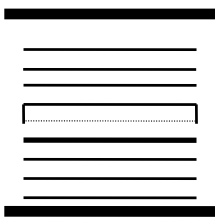
Natriumthiosulfatlösung: 0.2 g/l Natriumthiosulfat

Färbelösung:	2 g/l Silbernitrat 0.0185 % (v/v) Formaldehyd (frisch zugeben)
Entwicklerlösung:	60 g/l Natriumcarbonat 0.04 g/l Natriumthiosulfat 0.0185 % (v/v) Formaldehyd (frisch ansetzen)
Fixierlösung II:	25 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure

5.2.9.4 Elektrotansfer von Proteinen für den Immunonachweis (Westernblot)

Zur Identifizierung von Proteinen eines Proteingemisches nach SDS-Gelelektrophorese (5.2.8.4) durch eine Antikörperreaktion wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) transferiert. Der Transfer erfolgte nach Herstellerangaben in der 'Semi-Dry-Blot' Apparatur der Firma BioRad im 'Sandwichverfahren'. Die Membran wurde vor Gebrauch mit Ethanol benetzt und dann ebenso wie das Gel nach Elektrophorese 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Gel und Membran wurden dann nach dem folgend abgebildeten Blotaufbau in der Blotapparatur luftblasenfrei angeordnet und die Proteine mit konstanter Stromstärke von 250 mA (maximal 3 mA/cm²) 3 h transferiert.

Transferpuffer:	50 mM Tris 384 mM Glycin pH 8.8 mit HCl
-----------------	---

Blot-Aufbau:		→ Edelstahl-Kathode → 3 Lagen Whatman, feucht → Gel → Membran → 3 Lagen Whatman, feucht → Platin-Elektrode, Anode
--------------	---	--

Proteine, die an eine PVDF-Membran gebunden sind, können ebenso wie in PAA-Gelen angefärbt werden (Schaffner & Weissmann, 1973). In dieser Arbeit wurden nach jedem Blot zuvor markierte Molekulargewichtsmarker-Spuren vom Blot abgetrennt und mit einer Amidoschwarzlösung 10 min angefärbt. Hierdurch konnte einerseits der Transfer kontrolliert werden, andererseits erhielt man eine Markerspür zur Molekulargewichtszuordnung der detektierten Proteine.

Färbelösung:	25 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure 0.1 % (w/v) Amidoschwarz
Entfärbelösung:	25 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure <i>entfärben, bis der Membranhintergrund wieder hell wird</i>

5.2.9.5 Immunonachweis von Proteinen

Der Immunonachweis der Transkriptionsfaktoren H-NS und FIS im *E. coli* Gesamtprotein erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion. Einer an den Zweitantikörper gekoppelten Phosphatase wird als Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat zugeführt. Das Produkt der enzymatischen Reaktion reagiert mit einem Elektronenakzeptor (O_2 oder hier Nitroblautetrazoliumchlorid=NBT) unter Ausbildung eines unlöslichen violetten Indigofarbstoffes.

Nach dem Elektrotransfer (5.2.9.4) auf die PVDF-Membran wurde diese zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen 2-3 h (oder üN) bei RT in TBST-M-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Zur Erst-Antikörper-Inkubation wurde das gewünschte Antiserum (H-NS- oder FIS-Antikörper) 1:5000 in 10 ml TBST-M verdünnt. Die Membran wurde mit dieser Antikörperlösung üN bei RT und leichtem Schwenken inkubiert.

Anschließend wurde der Blot dreimal je 10 min mit TBST-M gewaschen und dann etwa 2 h mit dem Zweitantikörper inkubiert. Vom Zweitantikörper ('*goat-anti-rabbit-AK-alkaline phosphatase conjugate*', Boehringer) wurden 5 µl in 12.5 ml TBST-M 1:2500 verdünnt. Nach dieser Inkubation wurde die Membran 10 min in 100 ml TBST-Puffer gewaschen und danach 10 min in 100 ml AP-Puffer inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte in ST-Puffer, die Membran wurde jeweils solange inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden (ca. 10 min). Die Farbreaktion wurde durch Waschen in TE-Puffer gestoppt.

TBST-Puffer:	20 mM Tris/HCL, pH 7.5 150 mM NaCl 0.05 % (v/v) Tween 20
TBST-M-Puffer:	TBST mit 5 % (w/v) fettfreiem Trockenmilchpulver
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl pH 9.5 100 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$

ST-Lösung: 10 ml AP-Puffer
 33 µl NBT (100 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)
 33 µl BCIP (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid)

5.2.9.6 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Proben nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte über die Belichtung von Röntgenfilmen. Die Gele wurden dazu nach der Elektrophorese auf alte Röntgenfilme oder Whatman Papier 3MM aufgezogen und mit einer Polyethylenfolie abgedeckt. So wurden die Gele in eine Expositionskassette (Siemens) gelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Strahlungsintensität des radioaktiven Materials wurden die Gele bei -20°C oder -70°C für ein bis mehrere Tage exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einem Entwicklerbad für 2-4 min, dieser Prozess wurde kurz in einem Stopbad (3 % Essigsäure) gestoppt und der Film in einem Fixierbad 3 min fixiert. Die Filme wurden gut gewässert, kurz mit *Aqua dest.* abgespült und dann getrocknet.

5.2.10 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung der Autoradiographien wurden die entwickelten Röntgenfilme eingescannt (Hewlett Packard Scan Jet 4C/T; 100 %, 150 dpi, Ø Helligkeit und Kontrast) und mit dem Computerprogramm *Scion Image* ausgewertet. Zur Auswertung in diesem Programm wurden nur Bitmap (*bmp*)-Dateien bearbeitet. Für andere Speicherformate konnten Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung beobachtet werden. In *Scion Image* wurden die Bilddateien gedreht und verkleinert (*'scale and rotate'*, 0.5/0.6, bilinear) und der Hintergrund abgezogen (*'subtract background: 2D remove streaks'*). Die Slots wurden entweder als Gesamtspuren (*Macro: Gelplot 2*) oder als Einzelbanden (*Macro: Measure*) quantifiziert. Die Messwerte wurden zur Speicherung und weiteren Bearbeitung in eine Textdatei kopiert.

5.2.11 Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivität von [³²P]-markierten Proben wurde im Tritiumkanal eines Beckman LS 5000 TD Szintillationszählers ohne Szintillationsflüssigkeit über die Messung der Cerenkov-Strahlung durchgeführt. Die Zählausbeute betrug 49 %.

5.2.12 Präparative DNA-Gelelution

Präparative Agarosegele wurden entsprechend den Bedingungen für analytische Gele hergestellt und elektrophoretisiert, allerdings wurde eine hochreine Agarose

(ultrapur) verwendet. Die Elution wurde als Elektroelution durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die zu eluierende Bande auf dem Transilluminator (Appligene oncor) mittels langwelligem UV-Licht (302 nm) möglichst kurz sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell markiert. Bei ausgeschaltetem UV-Licht wurde die Bande dann ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch (vorbereitet wie unter 5.2.3.1), von etwa doppelter Gelstreifenbreite geschoben, der Schlauch an einer Seite mit einer Schlauchklemme verschlossen und soviel 1 x TE-Puffer (4.5) eingefüllt, dass das Gelstück gut benetzt war. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit einer zweiten Schlauchklemme luftblasenfrei verschlossen. Dieser gefüllte Schlauch wurde in einer Elektrophoresekammer für horizontale Agarosegele senkrecht zur angelegten Spannung ausgerichtet, sodass das Gelstück zur Kathode wies und die DNA bei angelegter Spannung Richtung Anode, also in den Puffer im Dialyseschlauch, wanderte. Die Elution erfolgte 30-45 min bei konstant 200 Volt in $\frac{1}{4}$ x TE-Puffer (4.5). Auf dem UV-Transilluminator konnte die Elution überprüft werden, das Gelstück war optisch rein, während eine Ethidiumbromid-Fluoreszenz nur im Puffer zu beobachten war. Die DNA-haltige Pufferlösung wurde dem Dialyseschlauch entnommen und dieser anschließend mit wenig 1 x TE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert (5.2.2), mit 80 % Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 1 x TE-Puffer oder *Aqua dest.* aufgenommen. Zur Überprüfung der Elutionseffizienz wurde ein Aliquot des Eluates auf einem analytischen Agarosegel getestet. Die Ausbeuten lagen je nach DNA-Fragment bei 50-80 %. Vereinzelt wurden DNA-Fragmente über ein Elutionskit der Firma Quiagen (nach Herstellerangaben) aufgereinigt.

5.3 Spezielle Methoden

5.3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), ein von Mullis und Faloona (1987) beschriebenes Verfahren, ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotide, welche gegen die flankierenden Bereiche der beiden komplementären Stränge der Ziel-DNA hybridisieren und einer hitzestabilen DNA-Polymerase ist es möglich, durch wiederholte Zyklen der DNA-Denaturierung, Oligonukleotidbindung (Annealing) und Verlängerung der gebundenen Primernukleotide geringste Mengen an Ziel-DNA millionenfach zu amplifizieren. Die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) stellt durch ihre Stabilität bei 95°C ein geeignetes Enzym für die Methodik dar, besitzt aber nur eine 5'→3'-Polymeraseaktivität, sodass kein 'proofreading' möglich ist. Die in dieser Arbeit verwendete *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* hat gegenüber der *Taq* DNA-Polymerase den Vorteil einer 12-fach höheren Genauigkeit der Replikation (Lundberg *et al.*, 1991), da sie zusätzlich zu der Polymeraseaktivität auch über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt, und somit eine Fehlerkontrolle möglich ist.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt beschrieben durchgeführt. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 ng Plasmid-DNA bzw. 500 ng chromosomale *E. coli* DNA, je 10 pmol der spezifischen Primeroligonukleotide mit 10 µl einer dNTP-Lösung (f.c.:0.2 mM je dNTP) und 10 µl des 10-fach konzentrierten PCR-Puffers sowie 2.5 Units der *Pfu* Polymerase in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt, mit 100 µl Paraffinöl überschichtet und in einem PCR-Thermocycler (Landgraf) inkubiert. Das durchgeführte Programm besaß folgendes Reaktionsprofil:

A: 2'	94°C	<i>Denaturierung</i>
B: 2"	94°C	<i>Aufheizen</i>
60"	94°C	<i>Denaturierung</i>
2"	57°C	<i>Abkühlen</i>
30"	57°C	<i>Annealing</i>
2"	72°C	<i>Aufheizen</i>
60"	72°C	<i>Primerverlängerung</i>

Zyklus B wurde 30 x wiederholt

C: 2"	72°C	<i>Aufheizen</i>
600"	72°C	<i>Verlängerung</i>
900"	38°C	<i>schrittweises Abkühlen</i>
900"	4°C	" "

Die gesamte Inkubationszeit betrug etwa 2 h und 25 min. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer und sollte 15°C unter dem T_m liegen, kann aber experimentell optimiert werden. Die Berechnung der T_m -Werte erfolgte nach einer bei Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (G + C) \% - 650 / L$$

L = Länge des Oligos

Im Anschluss an die Reaktionszyklen wurde das Paraffin abgehoben, hierzu wurde der gesamte Ansatz 30 min bei -20°C eingefroren, wobei das Paraffin flüssig blieb und somit vollständig abgehoben werden konnte. Ein Zehntel des Ansatzes wurde sofort auf einem Agarosegel (5.2.8.1) analysiert und auf Reaktionseffizienz überprüft. Der Rest wurde bei erfolgreicher Amplifizierung weiter über zweifache Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.1) und Ethanolpräzipitation (5.2.2) aufgereinigt und dann aus einem präparativen Agarosegel elektroeluiert (5.2.12).

4dNTP-Lösung:	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP in 10 mM Tris/HCl, pH 7.8
10 x PCR-Puffer:	100 mM KCl 200 mM Tris/HCl, pH 8.8 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄ 1000 µg/ml BSA 1 % (v/v) Triton-X-100

5.3.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit einem Sequenase Kit der Firma USB. Die im Kit Version 2.0 enthaltene Sequenase 2.0 ist eine T7-DNA-Polymerase ohne 3'→5' -Exonukleaseaktivität. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift der Firma USB. Die Plasmid-DNA (30 µg) wurde vor Durchführung der Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsvolumen von 400 µl für 30 min bei 37°C mit 50 µg/ml RNase A und 1 U RNase T1 inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.1) und mit Ethanol präzipitiert (5.2.2), in 25 µl H₂O aufgenommen, gegen 1 x TE-Puffer (4.5) mikrodialysiert und zur Konzentrationsabschätzung auf einem Agarosegel (5.2.8.1) aufgetrennt. Für den dann folgenden Denaturierungsschritt wurden 5 µg der gereinigten DNA in 10 µl Volumen mit 40 µl einer 0.25 M NaOH/0.25 mM EDTA-Lösung 40 min bei 37°C inkubiert, ethanolpräzipitiert (5.2.2), lyophilisiert und anschließend in 7 µl *Aqua dest.* aufgenommen. Zur Hybridisierung wurden diesem Ansatz 2 µl Sequenase-Reaction-Buffer und 1 µl des jeweiligen ss DNA Primernukleotides (0.2 pmol) zugegeben und 2 min bei 65°C inkubiert und anschließend langsam (ca. 1°C/min) im Heizblock auf RT abgekühlt.

Der gesamte Hybridisierungsansatz wurde zu einem auf Eis vorgelegten Markierungsansatz gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Nach 2 min der Inkubation wurden jeweils 2.5 µl A-, C-, G- und T-Lösung für 1 min ebenfalls bei 37°C vorinkubiert, bevor jeweils 3.5 µl des Markierungs-/Hybridisierungsansatzes mit je 2.5 µl der A-, C-, G- und T-Lösung vermischt (total 6 µl) und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stop-Solution beendet, die Proben 3 min bei 96°C denaturiert und auf 10 % PAA-Gelen (5.2.8.3) analysiert.

<i>Sequenase-Reaction-Buffer:</i>	200 mM Tris/HCl, pH 7.5 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl
-----------------------------------	--

Markierungsansatz:	1 µl 0.1 M DTT 2 µl <i>dG-Labeling Mix</i> , 1:5 verdünnt in H ₂ O 2 µl Sequenase 2.0, 1:8 verdünnt in <i>Enzyme Dilution Buffer</i> 0.5 µl [α ³² P] dATP (5 µCi)
<i>dG-Labeling-Mix</i> :	7.5 µm dCTP 7.5 µm dGTP 7.5 µm dTTP
<i>Enzyme Dilution Buffer</i> :	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 5 mM DTT 0.5 mg/ml BSA
A-, C-, G-, T-Lösung:	50 mM NaCl je 80 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP zusätzlich das ihrer Bezeichnung entsprechende ddNTP in einer Konzentration von 8 µM
<i>Stop-Solution</i> :	95 % (v/v) Formamid 20 mM EDTA 0.05 % (w/v) Bromphenolblau 0.05 % (w/v) Xylencyanol FF
<i>Sequenase Version 2.0</i> :	13 U/µl in 20 mM KPO ₄ , pH 7.4 1 mM DTT 0.1 M EDTA 50 % (v/v) Glycerin

5.3.3 Konformationsanalysen von DNA-Restriktionsfragmenten

5.3.3.1 K-Wert-Berechnungen

Untersuchungen zur DNA-Krümmung wurden anhand der veränderten Mobilität von gekrümmter und nicht oder weniger gekrümmter DNA gleicher Größe in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Nicht gekrümmte DNA-Fragmente zeigen in Polyacrylamidgelen eine größere Mobilität als gebogene DNA gleicher Fragmentlänge (Marini *et al.*, 1982; Harrington, 1993), d.h. gebogene Fragmente zeigen das Laufverhalten eines längeren DNA-Fragmentes, man spricht von der apparenten Fragmentlänge. Dieses Laufverhalten ist ebenfalls durch die Temperatur beeinflussbar. Bei niedrigen Temperaturen (hier 2°C) stabilisiert sich die Krümmung und die Mobilität einer DNA ist bedeutend geringer als bei hohen Temperaturen (hier 60°C), bei denen sich die Biegung der DNA fast vollständig aufhebt. Vollkommen ungekrümmte DNA zeigt keine Mobilitätsunterschiede bei hohen oder niedrigen Temperaturen. Die elektrophoretische Mobilität hängt ausschließlich vom Masse/ Ladungsverhältnis, bei Nukleinsäuren also von der Fragmentgröße ab. Aus den experimentell ermittelten

apparenten Fragmentlängen kann der K-Wert eines Fragmentes berechnet werden, dessen Größe mit dem Ausmaß der Krümmung korreliert. Der K-Wert beschreibt das Verhältnis der apparenten zur tatsächlichen Fragmentlänge, die man über Sequenzierung erhält und wird folgendermaßen definiert:

$$\text{K-Wert} = Bp_{\text{apparent}} / Bp_{\text{sequenziert}}$$

Ein ermittelter K-Wert, der größer als 1 ist, zeigt eine intrinsische Krümmung eines Fragmentes an. Anhand der Gegenüberstellung verschiedener K-Werte können differierende Krümmungsausmaße verglichen werden.

Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit von DNA-Fragmenten erfordert neben den isolierten Restriktionsfragmenten Molekulargewichtsstandards, die eine Bestimmung der apparenten Molekulargewichte der zu analysierenden Fragmente über sogenannte „log-Plots“ ermöglichen. Durch halblogarithmische Auftragung der Laufstrecken (x-Achse, linear) von Markerfragmenten gegen die entsprechende Fragmentgröße in Bp (y-Achse, log 10) erhält man eine Gerade, die eine Zuordnung jeder beliebigen Laufstrecke innerhalb der Gerade ermöglicht. Als Eichstandard wurde hier ein kommerzieller Molekulargewichtsmarker (Gibco BRL) eingesetzt. Von den isolierten Restriktionsfragmenten wurden jeweils etwa 30 ng pro Spur aufgetragen und von der kB-Leiter 2.5 µl einer 1:7 Verdünnung der BRL-Stammlösung.

Die Elektrophorese der nativen 8 % Polyacrylamidgele wurde wie unter (5.2.8.2) beschrieben durchgeführt. Nach einer Silberfärbung (5.2.9.1) konnten die Gele ausgewertet und die apparenten Molekulargewichte der *rrn*-Fragmente über 'log-Plots' bestimmt werden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *ORIGIN*. Für den Standard wurde eine Eichgerade erstellt. Anhand der Geradengleichung

$$y = a + bx$$

wurde für jede ausgemessene Laufstrecke (x) der zu untersuchenden Fragmente die zugehörige Fragmentlänge (10^y) berechnet.

5.3.3.2 Berechnung von DNA-Krümmung mit dem Computerprogramm *DIAMOD*

Neben experimentellen Konformationsanalysen wurden in dieser Arbeit auch theoretische Krümmungsberechnungen mit dem Computerprogramm *DIAMOD* V3.5 (Dlagic & Harrington, 1998) durchgeführt. Das Programm ermöglicht die Berechnung von DNA-Krümmung über die Sequenz anhand verschiedener Berechnungsmodelle. Die hier durchgeführten Berechnungen wurden über das Trinukleotidmodell *Gabriel* (Bruner *et al.*, 1995) erhalten.

5.3.4 Vergleich der Plasmidkopienzahl in verschiedenen Wirtsstämmen

Zur Analyse der Transkriptmengen in verschiedenen Wirtsstämmen wurde ein Vergleich der Plasmidkopienzahl vorgenommen, um quantitative Unterschiede in Transkriptmengen durch unterschiedliche Plasmidkopienzahl auszuschließen.

Aus $\bar{u}$ N-Kulturen des zu untersuchenden *E. coli*-Stammes wurden je 8 OD₆₀₀ Zellen transformiert mit dem Zielplasmid und 8 OD₆₀₀ Zellen transformiert mit einem Referenzplasmid in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt, abzentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, Beckmann Microspin) und die Plasmide über ein Plasmid-präparations-kit (Boehringer) isoliert.

Die so erhaltenen Plasmidgemische wurden mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert und auf 0.6 % Agarosegelen aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend zur Dokumentation über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt und in digitalisierter Form auf dem Rechner gespeichert (Programm *BIOSCAN*). Es folgte die Quantifizierung mit dem Programm *Scion Image* und die Berechnung der Verhältnisse von Testplasmid zu Referenzplasmid, die zum Vergleich untereinander tabellarisiert wurden (Tab. 2.8).

5.3.5 Primer Extension-Analyse

Über Primer Extension-Analysen, d. h. über die Verlängerung unterschiedlicher Primernukleotide, wurde Gesamt-RNA aus *E. coli* analysiert. Die hier durchgeführten Analysen erfolgten in Anlehnung an die von Sigmund *et al.* (1988) beschriebene Methode. Mit dem Enzym AMV Reverse Transkriptase (AMV-RT) wurde ein an mRNA hybridisierter 5' radioaktiv endmarkierter Primer (5.2.7.3) verlängert. Der Abbruch erfolgte am 5'-Ende des RNA-Transkriptes. Die so erhaltenen cDNAs wurden auf 16 % PAA-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Die Hybridisierung eines 5' radioaktiv endmarkierten Primernukleotides (5.2.7.3) an isolierte Gesamt-RNA aus *E. coli* (5.2.4.4) wurde stets mit 10 µg Gesamt-RNA und 0.5 pmol je markiertem Primer (1 µl, 700.000-1.500.000 cpm) in einem Ansatz von insgesamt 7.5 µl, der auf eine Endkonzentration von 100 mM KCl und 50 mM Tris/HCl, pH 8.5 eingestellt wurde, durchgeführt. Der Ansatz wurde 1 min bei 90°C inkubiert, dann im Heatblock langsam auf RT abgekühlt und bis zum Einsatz in eine PrimerExtension-Reaktion im Eisbad oder bei -20°C aufbewahrt. Jeweils 1 µl des Hybridisierungsansatzes wurde in 1 x Primer Extension-Puffer und einer Endkonzentration aller vier dNTP's von 200 µM mit 1 Unit AMV-RT in einem Gesamtvolumen von 5 µl 30 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Formamid-Probenpuffer (4.5) und 3 min Inkubation bei 96°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden direkt auf ein Gel (16 % PAA/7 M Harnstoff) aufgetragen oder bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

5 x Primer Extension-Puffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8.3 (42°C)
	250 mM KCl
	50 mM MgCl ₂
	50 mM DTT
	2.5 mM Spermidin

5.3.6. Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit von mRNA

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten von Transkripten wurden Rifampicin-Kinetiken durchgeführt. Das Antibiotikum Rifampicin inhibiert die Transkriptionsinitiation. Es bindet an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase im RNAP/Promotor Komplex und inhibiert die Bildung der zweiten Phosphodiesterbindung. Hierdurch wird spezifisch die Initiation der RNA-Synthese gehemmt, die Elongation bereits initiierten Transkripte bleibt unbeeinflusst (Mustaev *et al.*, 1994).

100 ml Flüssigkulturen (YT-Medium, 4.5) wurden 1:100 mit einer λ N-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37°C aufgewachsen und dann mit Rifampicin (f.c. 500 μ g/ml) versetzt. Vor Rifampicinzugabe und 20, 40, 60, 80, 100, 150, 300, 600 und 900 Sekunden nach Rifampicinzugabe wurden jeweils 3ml Aliquots der Kultur zur RNA Isolation abgenommen. Diese Aliquots wurden direkt zu 60°C heißem, vorgelegtem, BSCE gesättigten Phenol gegeben und sofort auf dem Vortex für mindestens 1 min gemischt, anschließend bei 60°C inkubiert, bis alle Proben entnommen waren. Es schloss sich die RNA-Isolation über eine weitere Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.1) und eine Ethanolpräzipitation (5.2.2) an. Das Pellet nach der Ethanolpräzipitation wurde in 300 μ l Puffer I (5.2.4.4) gelöst und nochmals ethanolpräzipitiert und letztlich in 30 μ l TE-Puffer (4.5) aufgenommen. Die RNA-Lösung wurde spektralphotometrisch gemessen und jeweils 1 μ g auf einem Agarosegel auf visuelle Reinheit kontrolliert. In einer Primer Extension-Reaktion (5.3.5) wurden die Transkripte revers transkribiert und die Halbwertszeit durch Quantifizierung der von der reversen Transkriptase synthetisierten Produkte ermittelt (Programm *ORIGIN*).

LITERATURVERZEICHNIS

- Adhya, S. and Gottesman, M. (1978) Control of transcription termination.
Ann. Rev. Biochem. **47**: 967-996
- Adhya, S. and Gottesmann, M. (1982) Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity.
Cell **29**: 939-944
- Afflerbach, H., Schröder, O., and Wagner, R. (1998) Effects of the *E. coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*.
Mol. Microbiol. **28** (3): 641-653
- Afflerbach, H. Schröder, O. and Wagner, R. (1999) Conformational Changes of the Upstream DNA Mediated by H-NS and FIS Regulate *E. coli rrnB* P1 Promoter activity.
J. Mol. Biol. **286**: 339-353
- Aiyar, S. E., Gourse, R. L., and Ross, W. (1998) Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase α subunit.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **95**: 14652-14657
- Ammons, D., Rampersad, J., and Fox, G. E. (1999) 5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in *Escherichia coli*.
Nucleic Acids Res. **27**:637-642
- Appleman, J. A., Ross, W., Salomon, J., and Gourse, R. L. (1998) Activation of *Escherichia coli* rRNA Transcription by FIS during a Growth Cycle.
J. Bact. **180**: 1525-1532
- Atlung, T. and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression.
Mol. Microbiol. **24** (1): 7-17
- Azam, T. A. and Ishihama, A. (1999) Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **274**: 33105-33113
- Azam, T. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999) Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid.
J. Bact. **181**: 6361-6370
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C., and Johnson, R.C. (1992) Dramatic changes in FIS levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*.
J. Bact. **174**: 8043-8056
- Bansal, M. Bhattacharyya, D., and Ravi, B. (1995) NUPARM and NUGGEN: Software for analysis and generation of sequence dependent nucleic acid structures.
Comput. Applic. Biosci. **11**: 281-287
- Baracchini, E. and Bremer, H. (1988) Studies *in vivo* on *Escherichia coli* RNA polymerase mutants altered in the stringent response.
Mol. Gen. Genet. **213**: 379-387

- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. and Gourse, R. (2000) 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
- Barth, M., Marschall, C., Muffler, A. Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1995) Role for the Histone-Like Protein H-NS in Growth Phase-Dependent and Osmotic Regulation of σ^S and Many σ^S -Dependent Genes in *Escherichia coli*.
J. Bact. **177**: 3455-3464
- Bateman, E. and Paule, M.R. (1988) Promoter occlusion during ribosomal RNA transcription.
Cell **54**: 985-992
- Beach, M. B. and Osuna, R. (1998) Identification and Characterization of the *fis* Operon in Enteric Bacteria.
J. Bact. **180**: 5932-5946
- Beidler, J.L., Hillard, P.R., and Rill, R.L. (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver.
Analyt. Biochem. **126**: 374-380
- Bertin, P., Terao, E., Lee, E. H. Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A., and Collatz, E. (1994) The H-NS Protein Is Involved in the Biogenesis of Flagella in *Escherichia coli*.
J. Bact. **176**: 5537-5540
- Bétermier, M., Galas, D. J. and Chandler, M. (1994) Interaction of Fis protein with DNA: Bending and specificity of binding.
Biochimie **76**: 958-967
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523
- Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L., and Ebright, R.H. (1994) Domain organization of the RNA polymerase α -subunit: C-terminal 85 amino acids constitutes a domain capable of dimerization and DNA binding.
Cell **78**: 889-896
- Blattner, F.R., Plunkett, III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, J (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.
Science **277**: 1453-1462
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis **8**: 93-99
- Bokal, A. J., Ross, W., and Gourse, R. L. (1995) The Transcriptional Activator Protein FIS: DNA Interactions and Cooperative Interactions with RNA Polymerase at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 Promoter.
J. Mol. Biol. **245**: 197-207

- Bokal, A. J., Ross, W., Gaal, T., Johnson, R. C., and Gourse, R. L. (1997) Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter.
EMBO J. **16**: 154-162
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene **2**: 95-113
- Bolshoy, A., McNamara, P. T., Harrington, R. E. and Trifonov, E. N. (1991) Curved DNA without AA: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles.
Proc. Natl Acad. Sci. USA, **88**: 2312-2316
- Bott, K., Stewart, G. C., and Anderson, A. G. (1984)
In Hoch, J. A. and Ganesan, A. T. (eds) *Syntro Conference on Genetics and Biotechnology of Bacilli*. Academic Press, Inc., New York, pp. 19-34
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **41**: 459
- Brandi, A., Pon, C. L., and Gualerzi, C. O. (1994) Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*.
Biochimie **76**: 1090-1098
- Brosius, J. (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters.
Gene, **27**: 151-160
- Brukner, I., Sanchez, R., Suck, D. and Pongor, S. (1995) Trinucleotide models for DNA bending propensity: comparison of models based on DNase I digestion and nucleosome packaging data.
J. Biomol. Struct. Dyn. **13**: 309-317
- Caramel, A. and Schnetz, K. (2000) Antagonistic control of the *Escherichia coli* *bgl* promoter by FIS and CAP *in vitro*.
Mol. Microbiol. **36**: 85-92
- Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Ebel, J. P. (1979) The complete nucleotide sequence of the ribosomal 16-S RNA from *Escherichia coli*. Experimental details and cistron heterogeneities.
Eur. J. Biochem. **100**: 399-410
- Cashel, M. and Rudd, K.E. (1987) The stringent response. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, Low, K.B., Magasanik, B.; Schaechter, M. and Umberger, H.E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Claret, L. and Rouvière-Yaniv, J. (1996) Regulation of HU α and HU β by CRP and FIS in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **263**: 126-139
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 2110-2114

- Condon, C., Phillips, J., Fu, Z.Y., and Squires, C.L. (1992) Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*.
EMBO J. **11**: 4175-4185
- Condon, C., French, S., Squires, C., and Squires, C. L. (1993) Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies.
EMBO J. **12**: 4305-4315
- Condon, C., Squires, C., and Squires, C.L. (1995a) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*.
Microbiol. Reviews **59**: 623-645
- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., and Squires, C. L. (1995b) rRNA Operon Multiplicity in *Escherichia coli* and the Physiological Implications of *rrn* Inactivation.
J. Bact. **177**: 4152-4156
- Cooper, S. and Helmstetter, C.E. (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r.
J. Mol. Biol. **31**: 519-540
- Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.
Gene **6**: 23-26
- Dame, R. T., Wyman, C., and Goosen, N. (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy.
Nucleic Acids Res. **28**: 3540-3510
- Dame, R. T., Wyman, C., and Goosen, N. (2001) Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA.
Biochimie **83**: 1-4
- Deonder, A., Rethy, R., Fredericq, H., van Montagu, M. and Krebbers, E. (1993) Arabidopsis *rbcS* genes are differently regulated by light.
Plant. Physiol. **101**: 801-808
- Dersch, P., Schmidt, K., and Bremer, E. (1993) Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation.
Mol. Microbiol. **8**: 875-889
- De Santis, P., Palleschi, A., Savino, M. and Scipioni, A. (1990) Validity of the nearest neighbour approximation in the evaluation of the electrophoretic manifestations of DNA curvature.
Biochemistry **29**: 9269-9273
- Dickerson, R. E. et al. (1989) Definitions of nomenclature of nucleic acid structure components.
Nucleic Acids Res. **17**: 1797-1803
- Dickson, R.R., Gaal, T., de Boer, H.A., de Haseth, P.L., Gourse, R.L. (1989) Identification of promoter mutants defective in growth rate dependent regulation of rRNA transcription in *Escherichia coli*.
J. Bact. **171**: 4862-4870

- Diekmann, S. and McLaughlin, L. W. (1988)
DNA curvature in native and modified *EcoRI* recognition sites and possible influence upon the endonuclease cleavage reaction.
J. Mol. Biol. **202**: 823-834
- Dlakic, M. & Harrington, R. E. (1998) DIAMOD: display and modeling of DNA bending.
Bioinformatics, **14**: 326-331
- Drlica, K. and Rouvière-Yaniv, J. (1987) Histone-like proteins of bacteria.
Microbiol. Rev. **51**: 273-289
- Duester and Holmes (1980) The distal end of the ribosomal RNA operon *rrnD* of *Escherichia coli* contains a tRNA^{Thr} gene, two 5S rRNA genes and a transcription terminator.
Nucleic Acids Res. **8**: 3793-3807
- Ellwood, M. and Nomura, M. (1982) Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli*.
J. Bact. **143**: 458-468
- Engbeak, F., Kjeldgaard, N.O., Maaloe, O. (1973) Chain growth rate of β -galactosidase during exponential growth and aminoacid starvation.
J. Mol. Biol. **75**: 109-118
- Espinosa-Urgel, M. and Tormo, A. (1993) σ^S -dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA regions with intrinsic curvature.
Nucleic Acids Res. **21**: 3667-3670
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W. and Gourse, R. W. (1998) Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 9761-9766
- Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. W. S., Niu, W., Ebright, R. H., and Gourse, R. L. (1999) Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxyl-terminal domain of the RNA polymerase α subunit.
Genes & Development **13**: 2134-2147
- Falconi, M., Gualtieri, M.T., La Teana, A., Losso, M.A., and Pon, C.L. (1988)
Proteins from the procaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15 kDa *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS.
Mol. Microbiol. **2**: 323-329
- Falconi, M., Higgins, N., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (1993) Expression of the gene encoding the major bacterial nucleoid protein H-NS is subject to growth-phase control and autoregulation.
Mol. Microbiol. **10**: 273-282
- Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C. O., and Pon, C. L. (1996)
Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression.
Mol. Microbiol. **19**: 965-975

- Finkel, S.-E. and Johnson, R.C. (1992) The FIS protein: it's not just for DNA inversion anymore.
Mol. Microbiol. **6**: 3257-3265
- Finn, R. D., Orlova, E. V., Gowen, B., Buck, M. and van Heel, M. (2000) *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures.
EMBO J. **19**: 6833-6844
- French, S. (1992) Consequences of replication fork movement through transcription units *in vivo*.
Science **258**: 1362-1365
- Free, A. and Dorman, C. (1995) Coupling of *Escherichia coli* *hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control.
Mol. Microbiol. **18**: 101-113
- Free, A. and Dorman, C. (1997) The *Escherichia coli* *stpA* Gene Is Transiently Expressed during Growth in Rich Medium and Is Induced in Minimal Medium and by Stress Conditions.
J. Bact. **179**: 909-918
- Free, A., Williams, R. M., and Dorman, C. (1998) The StpA Protein Functions as a Molecular Adapter To Mediate Repression of the *bgl* Operon by Truncated H-NS in *Escherichia coli*.
J. Bact. **180**: 994-997
- Fried, M. G. (1989) Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assays.
Electrophoresis **10**: 366-376
- Gaal, T., Barkei, J., Dickson R.R., de Boer, H.A., de Haseth, P.L., et al. (1989) Saturation mutagenesis of an *E. coli* rRNA promoter and initial characterization of promoter variants.
J. Bact. **171**: 4852-4861
- Gafny, R., Cohen, S., Nachaliel, N., Glaser, G. (1994) Isolated P2 rRNA promoters of *Escherichia coli* are strong promoters that are subject to stringent control.
J. Mol. Biol. **243**: 152-156
- Gallant, J.A. (1979) Stringent control in *E. coli*.
Ann. Rev. Genet. **13**: 393-415
- Gausing, K. (1977) Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and ribosomal protein messenger RNA at different growth rates.
J. Mol. Biol. **115**: 335-354
- Gausing, K. (1980) Regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. In Ribosomes: Structure, Function and Genetics, (ed.) Chamblis, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M. pp 693-718
Baltimore: Univ. Park Press.
- Glaser, G., Sarmientos, P., Cashel, M. (1983) Functional irrelationship between two tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters.
Nature **302**: 74-76

- Gonzàles-Gil, G., Bringmann, P., and Kahmann, R. (1996) FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **22**: 21-29
- Gonzàles-Gil, G., Kahmann, R., and Mushelishvili, G. (1998) Regulation of *crp* transcription by oscillation between distinct nucleoprotein complexes.
EMBO J. **17**: 2877-2885
- Goodsell, D. S. and Dickerson, R. E. (1994) Bending and curvature calculations in B-DNA.
Nucleic Acids Res. **22**: 5497-5503
- Gorin, A. A., Zhurkin, V. B. and Olson, W. K. (1995) B-DNA twisting correlates with base-pair morphology.
J. Mol. Biol. **247**: 34-48
- Gourse, R.L., Gaal, T., Bartlett, M.S., Appleman, J.A., and Ross, W. (1996) rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*.
Annu. Rev. Microbiol. **50**: 645-677
- Goyard, S. and Bertin, Ph. (1997) Characterization of BpH3, an H-NS-like protein in *Bordetella pertussis*.
Mol. Microbiol. **24** (4): 815-823
- Groisman, E. A., and Ochman, H. (1994) How to become a pathogen.
Trends Microbiol **2**: 289-294
- Gross, C. A., Chan, C. L. and Lonetto, M. A. (1996) A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **351**:475-482
- Gunderson, J. H., Slogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P., and McGutchan, T. F. (1987) Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*.
Science **238**: 933-937
- Hagerman, P.J. (1990) Sequence-directed curvature of DNA.
Annu. Rev. Biochem. **59**: 755-781
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E.coli*.
DNA cloning, D.M. Glover(ed.), Vol. I, 121-124
- Harrington, R.E. (1993) Studies of DNA bending and flexibility using gel electrophoresis.
Electrophoresis **14**: 732-746
- Hawley, D. K. and McClure, W. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences.
Nucleic Acids Res. **11**: 2237-2249
- Harley, C. B. and Reynolds, R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences.
Nucleic Acids Res. **15**: 2343-2361
- Harvey, S., Hill, C. W., Squires, C. and Squires, C. L. (1988) Loss of the spacer loop sequence from the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K-12 subline that bears the *relA1* mutation.
J. Bact. **170**: 1235-1238

- Heinemann, M. and Wagner, R. (1997). Guanosine 3', 5'-bis (diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase.
Eur. J. Biochem. **247**: 990-999
- Henkin, Tina M. (1996) Control of Transcription Termination in Procaryotes
Annu. Rev. Genet. **30**: 35-57
- Hernandez, V.J. and Bremer, H. (1991) *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*.
J. Biol. Chem. **266**: 5991-5999
- Hill, C. W. and Harnish, B. W. (1981) Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **78**: 7069-7072
- Hill, C. W. and Gray, J. A. (1988) Effects of chromosomal inversion on cell fitness in *Escherichia coli* K-12.
Genetics **119**: 771-778
- Hill, C. W. (1999) Large genomic sequence repetition in bacteria: lessons from rRNA operons and *Rhs* elements.
Res. Microbiol. **150**: 665-674
- Hillebrand, A. (1998) Vergleichende Analyse der Transkriptionskontrolle bei unterschiedlichen rRNA-Operons von *E. coli*.
(Diplomarbeit)
- Hirvonen, C. A., Ross, W., Wozniak, C. E., Marasco, E., Anthony, J. R., Aiyar, S. E., Newburn, V. H., and Gourse, R. L. (2001) Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*.
J. Bact. im Druck
- Hübner, P. and Arber, W. (1989) Mutational analysis of a procaryotic recombinational enhancer element with two functions.
EMBO J. **8**: 557-585
- Hui, I. and Dennis, P. P. (1985) Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in *Halobacterium cutirubrum*.
J. Biol. Chem. **260**: 899-906
- Irie, S., Sezaki, M. und Kato, Y. (1982). A faithful double strain of proteins in the polyacrylamide gels with coomassie blue and silver.
Anal. Biochem. **126**: 350-354
- Ishihama, A. (1992). Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation.
Mol. Microbiol. **6**: 3283-3288
- Jinks-Robertson, S., Gourse, R.L., and Nomura, M. (1983) Expression of rRNA and tRNA Genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons.
Cell **33**: 865-876

- Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E. and Uhlin, B.E. (1998) H-NS and StpA Proteins Stimulate Expression of the Maltose Regulon in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **180**: 6117-6125
- Johnson, R.C. and Simon, M.I. (1985) Hin-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell* **41**: 781-791
- Jursa, J. (1994) DNA modeller: an interactive program for modelling stacks of DNA base pairs on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **10**: 61-65
- Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C., and Mertens, G. (1985) G inversion in bacteriophage *Mu* DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell* **41**: 771-780
- Kingston, R.E. and Chamberlin, M.J. (1981) Pausing and attenuation of *in vitro* transcription in the *rrnB* operon of *Escherichia coli*. *Cell* **27**: 523-531
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., and Schmidt, T. M. (2001) rrndb: the ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* **29**: 181-184
- Klotzky, R.-A. and Schwartz, I. (1987) Measurement of *cat* expression from growth-rate-regulated promoters employing β -lactamase activity as an indicator of plasmid copy number. *Gene* **55**: 141-146
- Koch, C. and Kahmann R. (1986) Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage *Mu*. *J. Biol. Chem.* **261**: 15673-15678
- Krohn, M. and Wagner, R. (1996) Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J. Biol. Chem.* **271**: 23884-23894
- Lacatena, R. M. and Cesareni, G. (1981) Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication. *Nature*, **294**: 623-626
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685
- La Fauci, G., Widom, R. L., Jarvis, E. D. and Rudner, R. (1986) Mapping of rRNA genes with integrable plasmids in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **165**: 204-214
- Lane, D., Prentki, P. and Chandler, M. (1992) Use of Gel Retardation To Analyze Protein-Nucleic Acid Interactions *Microbiological Reviews* 509-528

- Lange, R., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1995) Identification of Transcriptional Start Sites and the Role of ppGpp in the Expression of *rpoS*, the Structural Gene for the σ^S Subunit of RNA Polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **177**: 4676-4680
- Laurent-Winter, Lejeune, P., and Danchin, A. (1995) The *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is one of the first proteins to be synthesized after a nutritional upshift. *Res. Microbiol.* **146**: 5-16
- Laurent-Winter, Ch., Ngo, S., Danchin, A., and Bertin, Ph. (1997) Role of *Escherichia coli* histone-like nucleoid-structuring protein in bacterial metabolism and stress response. Identification of targets by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* **244**: 767-773
- Liebig, B. (1996) Quantitative Analyse der ribosomalen RNA-Expressionsmuster des Bakteriums *Escherichia coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Liebig, B. and Wagner, R. (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
- Lindahl, L. and Zengel, J.M. (1986) Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 297-326
- Lisser, S. and Margalit, H. (1992) Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1507-1516
- Liu, S. L. and Sanderson, K. E. (1996) Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10303-10308
- Liu, S. L. and Sanderson, K. E. (1995) Role of genomic rearrangements in producing new ribotypes of *Salmonella typhi*. *J. Bact.* **181**: 3536-3541
- Harley, C. B. and Reynolds, R.P. (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**: 2343-2361
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. and Sparling, R. (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**: 707-717
- Long, E. O. and Dawid, I. B. (1980) Repeated Genes in Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 727-764
- Lozinski, T., Miarkiewicz, W. T., Wyrzykiewicz, T. K., and Wierzbowski, K. L. (1989) Effect of the sequence-dependent structure of the 17 bp AT spacer on the strength of consensus-like *E. coli* promoters in vivo. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3855-3863
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B., and Bremer, E. (1984) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 6578-6586

- Lund, E. and Kjeldgaard, N. O. (1972) Metabolism of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. **28**: 316-326
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A., and Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*.
Gene **108**: 1-6
- Maeda, H., Fujita, N. and Ishihama, A. (2000) Competition among seven *Escherichia coli* σ subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase.
Nucleic Acids Res. **28**: 3497-3503
- Malooe, O., Kjeldgaard, N.O. (1966) Control of macromolecular synthesis: a study of DNA, RNA, and protein synthesis in bacteria.
New York: Benjamin. 284 pp
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Marini, J.C., Levene, S.D., Crothers, D.M., and Englund, P.T. (1982) Bent helical structure in kinetoplast DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 7664-7668
- Martin, R. G. and Rosner, J. L. (1997) Fis, an Accessorial Factor for Transcriptional Activation of the *mar* (Multiple Antibiotic Resistance) Promoter of *Escherichia coli* in the Presence of the Activator MarA, SoxS, or Rob.
J. Bact. **179**: 7410-7419
- Mcleod, S. M., Xu, J., Cramton, S. E., Gaal, T., Gourse, R. L., and Johnson, R. C. (1999) Localization of Amino Acids Required for Fis to Function as a Class II Transcriptional Activator at the RpoS-dependent *proP* P2 Promoter.
J. Mol. Biol. **294**: 333-346
- Morgan, E. A. and Kaplan, S. (1976) Coordinate regulation of the individual ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **68**: 969-974
- Mori, H., Dammel, C., Becker, E., Triman, K., and Noller, H.F. (1990) Single base alterations upstream of the *E. coli* 16S coding region result in temperature sensitive 16S rRNA expression.
Biochim. et Biophys. Acta **1050**: 323-327
- Mukherjee, K., Nagai, H., Shimamoto, N., and Chatterji, D. (1999) GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the ω subunit *in vivo*.
Eur. J. Biochem. **266**: 228-235
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. **155**: 335-350

- Mushelishvili, G., Travers, A. A., Heumann, H., and Kahmann, R. (1995) FIS and RNA polymerase holoenzyme form a specific nucleoprotein complex at a stable RNA promoter.
EMBO J. **14**: 1446-1452
- Murakami, K., Kimura, M., Owens, J. T., Meares, C. F. and Ishihama, A. (1997) The two α subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact different halves of the DNA upstream element.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 1709-1714
- Mustaev, A., Zaycikoc, E., Severinov, K., Kashlev, M., Polyakov, A., Nikiforov, V., and Goldfarb, A. (1994) Topology of the RNA polymerase active center probed by chimeric rifampicin-nucleotide compounds.
Biochem. **91**, 12036-12040
- Newlands, J.T., Ross, W., Gosink, K.K., and Gourse, R.L. (1991) Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription.II. Characterization of complexes of *rrnB* P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with *Escherichia coli* RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **220**: 569-583
- Newlands, J. T., Gaal, T., Mecsas, J., and Gourse, R. L. (1993) Transcription of the *E. coli rrnB* P1 promoter by the heat shock RNA polymerase ($E\sigma^{32}$) *in vitro*.
J. Bact. **175**: 661-668
- Nilsson, L., Verbeek, H., Vijgenboom, E., van Drunen, C., Vanet, A., and Bosch, L. (1992) Fis-dependent *trans*-activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions.
J. Bact. **174**: 921-929
- Ninnemann, O., Koch, C., Kahmann, R. (1992) The *E. coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation.
EMBO J. **11**: 1075-1083
- Nomura, M., Gourse R., and Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components.
Annu. Rev. Biochem. **53**: 75-117
- Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Hattori, M., Kurokawa, K., Yasunaga, T., Yokoyama, K., Makino, K., Shinagawa, H., and Hayashi, T. (2000) Comparative Analysis of the Whole Set of rRNA Operons Between an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai Strain and an *Escherichia coli* K-12 Strain MG1655.
System. Appl. Microbiol. **23**: 315-324
- Olson, E.R., Flamm, E.L., and Friedman, D.I. (1982) Analysis of *nutR*: a region of phage X required for antitermination of transcription.
Cell **31**: 61-70
- Pedersen, F.S. and Kjeldgaard, N.O. (1977) Analysis of the *relA* gene product of *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. **76**: 91-97

- Perna, N. T., Plunkett, III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamousis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A., and Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Nature* **409**: 529-533
- Pettijohn, D. E. (1996) The Nucleoid
In *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhardt, F. C. ed) pp. 158-166, ASM, Washington D. C.
- Rao, L., Ross, W., Appleman, G.A., Gaal, T., Leirimo, S., Schlax, P.J., Record, M.T., and Gourse, R.L. (1994) Factor-independent activation of *rrnB* P1: An 'extended' promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength.
J. Mol. Biol. **235**: 1421-1435
- Record, M. T., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L., and Schlax, J. P. (1996) *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$) promoters and the kinetics of the steps of transcription initiation. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. R. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D. C., pp. 792-820
- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., and Whittham, T. S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*.
Nature **406**: 64-67
- Renzoni, D., Esposito, D., Pfuhl, M., Hinton, J. C. D., Higgins, C. F., Driscoll, P. C., and Ladbury, J. E. (2001) Structural Characterization of the N-terminal Oligomerization Domain of the Bacterial Chromatin-structuring Protein, H-NS.
J. Mol. Biol. **306**: 1127-1137
- Richter, D. (1979) In vitro synthesis and decay of guanosine3',5'-bis-diphosphate (ppGpp). In Chambliss, D., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, M., and Nomura, M. (ed.), *Ribosomes: structure, function and genetics*. University Park Press Baltimore, p. 743-765
- Ross, W., Thompson, J.F., Newlands, J.T., and Gourse, R.L. (1990) *E.coli* FIS protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*.
EMBO J. **9**: 3733-3742
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishiama, A., Severinov, K., and Gourse, R.L. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α -subunit of RNA polymerase.
Science **262**: 1407-1413
- Ross, W., Aiyar, S., Salomon, J., and Gourse, R. L. (1998) *Escherichia coli* Promoters with UP elements of different Strength: Modular Structure of Bacterial Promoters.
J. Bact. **180**: 5375-5383

- Safo, M. K., Yang, W.-Z., Corselli, L., Cramton, S. E., Yuan, H. S., and Johnson, R. (1997) The transactivation region of the Fis protein that controls site-specific DNA inversion contains extended mobile β -hairpin arms.
EMBO J. **16**: 6860-6873
- Sarmientos, P. and Cashel, M. (1983) Carbon starvation and growth-rate-dependent regulation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters: differential control of dual promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 7010-7013
- Sarmientos, P., Sylvester, J.E., Contente, S., and Cashel, M. (1983) Differential stringent control of the tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters from the *rrnA* operon expressed *in vivo* in multicopy plasmids.
Cell **32**: 1337-1346
- Satchwell, S., Drew, H. R. and Travers, A. A. (1986) Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA.
J. Mol. Biol. **191**: 659-675
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all.
Trends Biochem. Sci. **20**: 374-376
- Schaffner, W. and Weissmann, C. (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution.
Anal. Biochem. **56**: 502-514
- Schmid, M. B. (1990) More Than Just "Histone-like" Proteins
Cell **63**: 451-453
- Schmidt, T. M. (1997) Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotic genomes. In F. J. deBruijn, J. R. Lupski, and G. M. Weinstock (eds) *Bacterial genomes: physical structure and analysis*. Chapman and Hall, New York, N. Y., pp. 221-229
- Schröder, O. and Wagner, R. (2000) The Bacterial DNA-binding Protein H-NS Represses Ribosomal RNA Transcription by Trapping RNA Polymerase in the Initiation Complex.
J. Mol. Biol. **298**: 737-748
- Shindo, H., Iwaki, T., Ieda, R., Kurumizaka, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Morikawa, S., Nakamura, H., and Kuboniwa, H. (1995). Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*.
FEBS Letters **360**: 125-131
- Shindo, H., Ohnuki, A., Ginba, H., Katoh, E., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Yamazaki, T. (1999) Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy.
FEBS Letters **455**: 63-69
- Sigmund, C.D., Ettayebi, M., Borden, A., and Morgan, E. (1988) Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*.
Methods Enzymol. **164**: 673-690

- Sondén, B. and Uhlin, B., E. (1996) Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA.
EMBO J. **15**: 4970-4980
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H., and Buc, H. (1984) H1a, an *E. coli* DNA binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*.
Nucleic Acids Res. **12**: 5321-5340
- Shpigelman, E. S., Trifonov, E. N. and Bolshoy, A. (1993) Curvature: software for the analysis of curved DNA
Comput. Appl. Biosci. **9**: 435-440
- Smyth, C. P., Lundbäck, T., Renzoni, D., Siligardi, G., Beavil, R., Layton, M., Sidebotham, J. M., Hinton, J. C. D., Driscoll, P. C., Higgins, C. F., and Ladbury, J. E. (2000) Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS.
Mol. Microbiol. **36**: 962-972
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999) Multiple Control of Flagellum Biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS Protein and the Cyclic AMP-Catabolite Activator Protein Complex in Transcription of the *flhDC* Master Operon.
J. Bact. **181**: 7500-7508
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L., and Gualerzi, C. O. (1997) The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending.
EMBO J. **16**: 1795-1805
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., and Takahashi, H. (1993) Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 3511-3515
- Thompson, J.F. and Landy, A. (1988) Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to site-specific recombination complexes.
Nucleic Acids Res. **16**: 9687-9705
- Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C., and Wagner, R. (1994) Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal synthesis.
Mol. Microbiol. **11**: 589-604
- Tippner, D. and Wagner, R. (1995) Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or non-specific DNA sites.
J. Biol. Chem. **270**: 22243-22247
- Trifonov, E. N. (1991) DNA in profile.
TIBS **16**: 467-470

- Tung, C. S. and Carter, E. S. (1994) Nucleic acid modeling tool (Namot): an interactive graphic tool for modeling nucleic acid structures.
Comput. Appl. Biosci. **10**: 427-433
- Ueguchi, C., Kakeda, M., and Mizuno, T. (1993) Autoregulatory expression of the *Escherichia coli hns* gene encoding a nucleoid protein-H-NS functions as a repressor of its own transcription.
Mol. Gen. Genet. **236**: 171-178
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., and Mizuno, T. (1996) Systematic Mutational Analysis Revealing the Functional Domain Organization of *Escherichia coli* Nucleoid Protein H-NS.
J. Mol. Biol. **263**: 149-162
- Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T., and Mizuno, T. (1997) Clarification of the Dimerization Domain and its Functional Significance for the *Escherichia coli* Nucleoid Protein H-NS.
J. Mol. Biol. **274**: 145-151
- Ulyanov, N. B. and James, T. L. (1995) Statistical analysis of DNA duplex structural features.
Methods Enzymol. **261**: 90-120
- Ussery, D.W., Hinton, J.C.D., Jordi, B.J.A.M., Granum, P.E., Seirafi, A., Stephen, R.J., Tupper, A.E., Berridge, G., Sidebotham, J.M., and Higgins, C.F. (1994) The chromatin-associated protein H-NS.
Biochimie **76**: 968-980
- Varshavsky, A.J., Nedospasov, S.A., Bakajeva, V.V., Georgiev, G.P. (1977) Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* desoxyribonucleoprotein.
Nucleic Acids Res. **4**: 2725-2745
- Verbeek, H., Nilsson, L., Baliko, G., and Bosch, L. (1990) Potential binding site of the *trans* activator FIS are present upstream of all rRNA operons and of many but not all tRNA operons.
Biochim. Biophys. Acta **1050**: 302-306
- Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene **19**: 259-268
- Voulgaris, J., Pokholok, D., Holmes, W. M., Squires, C., and Squires, C. L. (2000) The Feedback Response of *Escherichia coli* rRNA Synthesis Is Not Identical to the Mechanism of Growth Rate-Dependent Control.
J. Bact. **182**: 536-539
- Wackwitz, B., Bongaerts, J., Goodman, S. D., and Uden, G. (1999) Growth phase-dependent regulation of *nuoA-N* expression in *Escherichia coli* K-12 by the Fis protein: upstream binding sites and bioenergetic significance.
Mol. Gen. Genet. **262**: 876-883
- Wagner, R. (1994) The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth.
Arch. Microbiol. **161**: 100-109

- Wang, J. Y. and Syvanen, M. (1992) DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes.
Mol. Microbiol. **6**: 1861-1866
- Williams, R. M. and Rimsky, S. (1997) Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks.
FEMS Microbiol. Letters **156**: 175-185
- Wösten, M. M. S. M. (1998) Eubacterial sigma-factors
FEMS Microbiol. Reviews **22**: 127-150
- Wood, D. C. and Lebowitz, J. (1984) Effect of supercoiling on the abortive initiation kinetics of the RNA-I promoter of ColE1 plasmid DNA.
J. Biol. Chem. **259**: 11184-11187
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations.
J. Biol. Chem. **266**: 5980-5990
- Xu, F., Lin-Chao, S., and Cohen, St. N. (1993) The *Escherichia coli* *pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids *in vivo* and degradation of RNAI decay intermediates.
Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 6756-6760
- Xu, J. and Johnson, R. C. (1995a) Fis activates the RpoS-dependent stationary-phase expression of *proP* in *Escherichia coli*.
J. Bact. **177**: 5222-5231
- Xu, J., and Johnson, R. C. (1995b) *aldB*, an RpoS-dependent gene in *Escherichia coli* encoding an aldehyde dehydrogenase that is repressed by Fis and activated by Crp.
J. Bact. **177**: 3166-3175
- Xu, J., and Johnson, R. C. (1997) Cyclic AMP receptor protein functions as a repressor of the osmotically inducible promoter *proP* P1 in *Escherichia coli*.
J. Bact. **179**: 2410-2417
- Yamada, H., Muramatsu, S., and Mizuno, T. (1990) An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA.
J. Biochem. **108**: 420-425
- Yamada, H., Yoshida, T., Tanaka, K., Sasakawa, C., and Mizuno, T. (1991) Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences.
Mol. Gen. Genet. **230**: 332-336
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC 19 vectors.
Gene **33**: 103-119
- Yanofsky, Charles (2000) Transcription Attenuation: Once Viewed as a Novel Regulatory Strategy
J. Bact. **182**: 1-8

- Yarnell, W. S. and Roberts, J. W. (1999) Mechanism of Intrinsic Transcription Termination and Antitermination.
Science **284**: 611-615
- Yasuzawa, K., Hayashi, N., Goshima, N., Kohno, K., Imamoto, F. and Kano, Y. (1992) Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA.
Gene **122**: 9-15
- Zabeau, M. and Roberts, R. (1979) The role of restriction endonucleases in molecular genetics. In: Molecular Genetics, J.H. Taylor (ed.) Academic Press, New York, Part III. 1-63
- Zacharias, M., Göringer, H.U., Wagner, R. (1989) Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth rate control and stringent sensitivity.
EMBO J. **11**: 3357-3363
- Zacharias, M., Göringer, H.U., Wagner, R. (1990) The signal for growth rate control and stringent sensitivity in *E. coli* is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region.
Nucleic Acids Res. **18**: 6271-6275
- Zacharias, M., Göringer, H.U., and Wagner, R. (1992) Analysis of the FIS-dependent and independent transcription activation mechanism of the *E.coli* ribosomal RNA P1 promoter.
Biochemistry **31**: 2621-2628
- Zhang, A. and Belfort, M. (1992) Nucleotide sequence of a newly identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein.
Nucleic Acids Res. **20**: 6735
- Zhang, A., Derbyshire, V., Galloway Salvo, J. L. and Belfort, M. (1995) *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*.
RNA **1**: 783-793
- Zhang, A., Rimsky, S., Reaban, M. E., Buc, H. and Belfort, M. (1996) *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics.
EMBO J. **15**: 1340-1349

7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A	Adenosin
A _{260,280}	Absorption bei 260 oder 280 nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Acet	Acetat
Amp	Ampicillin
AMV - RT	<i>Avian myeloblastosis virus</i> - Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaare
BLA	β-Lactamase
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
Casaminoa	Casaminoacids
cDNA	copied DNA (DNA-Abschrift aus RNA)
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
Ci	Curie (2,22 x 10 ¹² dpm)
CIP	Kälberdarmphosphatase
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
cpm	'counts per minute'
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle / min
ds	doppelsträngig
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	femto (10 ⁻¹⁵)
f.c.	'final concentration', Endkonzentration
FIS	'Factor of inversion stimulation'

G	Guanosin
GvO	Genetisch veränderter Organismus
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	lambda = Wellenlänge
Lrp	'Leucine-responsive regulatory Protein'
m	milli (10^{-3})
M	Mol
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle
mol	molar (Mol / L)
mg	Milligramm
min = '	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimolar
mRNA	messenger RNA
mS	Millisiemens
Mw	Mittelwert
μ	Mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
n	nano (10^{-9})
NaOAc	Natriumacetat
NS	Nukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	pico (10^{-12})
[32 P]	Phosphorisotop, Massezahl 32, radioaktiv
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Primer Extension
PEG	Polyethylenglykoll
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen / min
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec = "	Sekunde

ss	einzelsträngig
Std.=h	Stunde
T	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Aktivitätseinheit von Enzymen
UAS	'Upstream Activating Sequence'
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
ups	'upshift'
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
VirB	Aktivator bakterieller Virulenzgene
v/v	'volume per volume' (Volumenprozent)
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	'weight per volume' (Gewichtsprozent)
z. B.	zum Beispiel

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin
B	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Z	Glutamin oder Glutaminsäure

8 Anhang

8.1 Sequenzen der sieben analysierten *rrn*-Fragmente (*EcoRI*/*PstI* Restriktionsfragmente)

Angabe aller Sequenzen in 5'→3'-Orientierung, angegeben ist der Nichtmatritzenstrang (+)
rrnA-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 288 Bp

```
AATTCCCCGTTATCGCTGGTACGACCGTTTTATGATCAAGCTGATTATGAAGATGTCAGGCGGTGAAACGGATAC
GCGCAAAGAAGTTGWCTATACCGATTGGGAGCAGGTGGCGAATTCGCCCCGAGAAATCGCCCATTTAACCGACAA
ACCGACGCTGAAATAAGCATAAAGAATAAAAAATGCGCGGTCAGAAAATTATTTTAAATTCCTCTTGTCAGGCC
GGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGGGGGATCCGTCGACCTGCA
```

rrnB-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 308 Bp

```
AATTCCCGATTCTGGCGCAGCGATTGCTCGCCGAACGGCCTGGTTGTTAGAACATGAAGCCCCGGATGCAAAATC
TGCCGATGCGAATATTGCCTTTTGTATGGCAATGACGCCAGGAGCTGAACAATTATTGCCCGTTTTACAGCGTTA
CGGCTTCGAAACGCTCGAAAAACTGGCAGTTTTAGGCTGATTGGTTGAATGTTGCGCGGTGAGAAAATTATTTT
AAATTCCTCTTGTCAGGCCCGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGGGGGATCCGTC
GACCTGCA
```

rrnC-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 277 Bp

```
AATTCCCGAAAGGTTTTCTGTGCAGCTAACTGTTGTGCGCTTAAAGGCATTACTTATCTTCCTTTTTCTTTTTA
TTCTCCTTAGTATGCCACCAGGAAGTGTGATTACGGTTGCAAAAACGGCAAATTGCTTGTTTTATGGCACATTA
ACGGGGCTTTTGCTGAAAAAATGCGCGGGTCAGAAAATTATTTTAAATTCCTCTTGTCAGGCCGGAATAACTCC
CTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGGGGGATCCGTCGACCTGCA
```

rrnD-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 293 Bp

```
AATTCCCGATCATTACGCGCTGACCGATTTGTGGAAAAAGATCGCGGTATGGGCGTAAACATCAGACATACTT
ACCTCAGCAATAAATGATTTACTAATGACTTTGGGGGCATTATTGGCCTTGTCAGTCTTTTAGTATGCAAAAA
AGCACCGTTTTGTGTGCGATTGCAGCAAAAAAGGGTGAAAAACAACAAACAGAAAAAAGATCAAAAAATACTT
GTGCAAAAAATTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACGGGGGGATCCGTCGACCTGCA
```

rrnE-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 314 Bp

```
AATTCCCCTCAGCTAACGCCCCCTAACGGGGCATCCTTATTTTTTCGCCCCGATGTAAACGAAAACGTTTGCGCAAC
GCTCGCGAATTTTTCTCTTTCAATGGTGATCACAATTTTGACTGTGGTTACCGTGGGCAAAATACAGAAATTACA
TTGATGATTGTGGATAACTCTGTGCGTAAAAAGGTATAAAGCGGGCTTTTGCTGGGGAATGCAGCAGTCAGTCAT
TTTTCTGCAATTTTTCTATTGCGGCCTGCGGAGAACTCCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGATGGGGGA
TCCGTCGACCTGCA
```

rrnG-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 301 Bp

```
AATTCCCGCAGATCGAAAAACCGCTGGCACAGCAAATACTGTCTGGTGAATTGGTTCCGGGTAAAGTGATTCGCC
TGGAAGTTAATGAAGACCGGATTGTCGCCGTCCAGTAAATGATAAACGAGCCCTTCGGGGCTCGTTTTTGTCTA
TAAGTTAGACGGAAAAGACTATATTTAAGATGTTTTGCCTGAAAAGTGAGCGAACGATAAAGTTTTATATTTTT
CGCTTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGGGGGATCCGTCGACCTGC
A
```

rrnH-Fragment, *EcoRI*/*PstI*, 279 Bp

```
AATTCCCGATATGCAGGCAGCGGTTGCGGCGAACGTGGGAACAAAAGTGCTGGTGCGTACGGGTAAACCTATTAC
GCCTGAAGCAGAAAACGCGGCGGATTGGGTGTTAAATAGCCTGGCAGACCTGCCGCAAGCGATAAAAAAGCAGCA
AAAACGGGCACAATGATTAAGAGATGAGCGGTTGAAATAAAAAATGCATTTTTCCGCTTGCTTCTTGAGCCGACT
CCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGGCGGATGTGGGGGATCCGTCGACCTGCA
```


8.3 Gesamt-RNA-Ausbeuten bei verschiedenen Wachstumsraten

Stamm/Phase	niedrige Raten		hohe Raten	
	$\emptyset \mu$	$\emptyset \mu\text{g je OD}$	$\emptyset \mu$	$\emptyset \mu\text{g je OD}$
BSN26 exp			1.9	44
BSN26 stat			1.9	21
BSN29 exp			1.6	52
BSN29 stat			1.6	43
MC4100 (WT) exp	0.9	13	1.9	18
MC4100 (WT) stat	0.9	7	1.9	8
PD32 <i>hns</i> ⁻ exp	0.7	17	1.8	43
PD32 <i>hns</i> ⁻ stat	0.7	8	1.8	20
CSH50 (WT) exp	0.8	13	1.9	39
CSH50 (WT) stat	0.8	8	1.9	22
CSH50 <i>fis::kan</i> exp	0.8	16	1.9	38
CSH50 <i>fis::kan</i> stat	0.8	10	1.9	18
C600 (WT) exp	0.9	17	1.8	46
C600 (WT) stat	0.9	8	1.8	18
C600 <i>fis::kan hns::tet</i> , exp	0.8	15	1.9	33
C600 <i>fis::kan hns::tet</i> , stat	0.8	10	1.9	11

Tab. 8.3 Gesamt-RNA Ausbeuten je OD₆₀₀ bei hohen und niedrigen Wachstumsraten

In der Tabelle sind die durchschnittlichen Wachstumsraten ($\emptyset \mu$, je sieben Plasmide pHD1-A bis H) und die durchschnittlichen Mengen isolierter Gesamt-RNA ($\emptyset \mu\text{g je OD}$) berechnet auf die Menge an Zellen, die einer OD₆₀₀ entspricht, aufgelistet. Von den Stämmen BSN26 und BSN29 wurden keine Gesamt-RNA bei niedrigen Wachstumsraten isoliert. Die höheren Syntheseraten bei hohen Wachstumsraten werden anhand der durchschnittlichen Ausbeuten klar ersichtlich.

8.4 Quantifizierungsdaten zur Auswertung der Primer Extension-Analysen

8.4.1 Hohe Wachstumsraten

MC4100

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 57-2						
pHD1-A	5779	6912	0,84	520	8938	0,06
pHD1-B	3787	5373	0,70	324	6337	0,05
pHD1-C	6338	6923	0,92	516	8056	0,06
pHD1-D	4364	5463	0,80	334	8385	0,04
pHD1-E	8926	6389	1,40	369	7117	0,05
pHD1-G	3485	4332	0,80	387	8275	0,05
pHD1-H	10569	5059	2,09	1501	7039	0,21

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 59-1						
pHD1-A	10844	5774	1,88	1095	8223	0,13
pHD1-B	10801	5489	1,97	704	6468	0,11
pHD1-C	11364	5311	2,14	1125	7686	0,15
pHD1-D	11964	4438	2,70	538	5987	0,09
pHD1-E	11623	5473	2,12	639	8853	0,07
pHD1-G	11031	4483	2,46	909	8216	0,11
pHD1-H	12216	3988	3,06	2019	7241	0,28

PD32

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 57-3						
pHD1-A	5918	4837	1,22	2134	9056	0,24
pHD1-B	9285	5214	1,78	2272	8305	0,27
pHD1-C	5078	1077	4,71	1699	6359	0,27
pHD1-D	14879	5663	2,63	3188	6558	0,49
pHD1-E	1310	905	1,45	6564	9322	0,70
pHD1-G	9443	4991	1,89	1064	3898	0,27
pHD1-H	2357	735	3,21	3752	8451	0,44

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 59-2						
pHD1-A	9859	2178	4,53	1472	3455	0,43
pHD1-B	9441	2270	4,16	3959	4073	0,97
pHD1-C	10339	1786	5,79	4790	2964	1,62
pHD1-D	13962	1655	8,44	4562	2182	2,09
pHD1-E	10880	3224	3,37	4384	4546	0,96
pHD1-G	13181	2009	6,56	4252	3504	1,21
pHD1-H	7043	1664	4,23	3215	3618	0,89

CSH50

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 58-1						
pHD1-A	9955	1471	6,77	2510	2752	0,91
pHD1-B	8988	1572	5,72	4931	2468	2,00
pHD1-C	10542	975	10,81	4677	2960	1,58
pHD1-D	11508	1527	7,54	3116	2390	1,30
pHD1-E	13221	1309	10,10	1548	3029	0,51
pHD1-G	11048	961	11,50	1826	2888	0,63
pHD1-H	11584	1413	8,20	1654	2554	0,65

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 62-1						
pHD1-A	9571	1995	4,80	2163	5712	0,38
pHD1-B	8133	1708	4,76	5450	5208	1,05
pHD1-C	10821	364	29,73	3130	2846	1,10
pHD1-D	13547	1412	9,59	2904	3238	0,90
pHD1-E	12578	2775	4,53	1311	4721	0,28
pHD1-G	4949	312	15,86	1291	4505	0,29
pHD1-H	6536	1688	3,87	1685	3825	0,44

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 64						
pHD1-A	13417	985	13,62	1625	3081	0,53
pHD1-B	12031	1450	8,30	4822	5596	0,86
pHD1-C	12749	1104	11,55	4080	5075	0,80
pHD1-D	16120	1392	11,58	3091	3758	0,82
pHD1-E	5520	775	7,12	1818	6296	0,29
pHD1-G	12766	791	16,14	1381	4473	0,31
pHD1-H	12242	1443	8,48	1753	5410	0,32

CSH50 *fis::kan*

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 58-2						
pHD1-A				4804	5378	0,89
pHD1-B				1461	5310	0,28
pHD1-C				3672	4240	0,87
pHD1-D	11778	2066	5,70	6720	4139	1,62
pHD1-E	13591	1839	7,39	10326	4997	2,07
pHD1-G	10679	1927	5,54	2376	4457	0,53
pHD1-H	11919	1480	8,05	8171	5105	1,60

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 62-2						
pHD1-A	10283	6153	1,67	5105	11443	0,45
pHD1-B	9343	7030	1,33	710	7285	0,10
pHD1-C	11976	3733	3,21	2830	6583	0,43
pHD1-D	13322	4137	3,22	7977	7916	1,01
pHD1-E	13389	6998	1,91	10247	9562	1,07
pHD1-G	11035	3788	2,91	3102	10252	0,30
pHD1-H	11888	2647	4,49	8057	7078	1,14

CSH50 *fis::kan*

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 64						
pHD1-A	7942	4061	1,96	3861	9284	0,42
pHD1-B	7152	4753	1,50	563	5832	0,10
pHD1-C	9635	2449	3,93	2250	5114	0,44
pHD1-D	9503	2550	3,73	8238	7700	1,07
pHD1-E	8049	4255	1,89	9109	7963	1,14
pHD1-G	8542	2535	3,37	2570	8480	0,30
pHD1-H	8016	1731	4,63	6540	5581	1,17

C600

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 60-1-1						
pHD1-A	3471	1653	2,10	1227	5169	0,24
pHD1-B	3636	1467	2,48	1944	8396	0,23
pHD1-C	5219	1434	3,64	443	6905	0,06
pHD1-D	6081	2172	2,80	932	5431	0,17
pHD1-E	3560	2312	1,54	316	7495	0,04
pHD1-G	6503	1469	4,43	573	7855	0,07
pHD1-H	6223	2313	2,69	341	6823	0,05

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 60-1-2						
pHD1-A	5840	3315	1,76	2452	8494	0,29
pHD1-B	6784	2878	2,36	3856	11661	0,33
pHD1-C	8500	2960	2,87	826	10264	0,08
pHD1-D	10471	4308	2,43	1931	8459	0,23
pHD1-E	6597	4508	1,46	405	10708	0,04
pHD1-G	10853	2985	3,64	1249	10944	0,11
pHD1-H	9950	4584	2,17	585	10024	0,06

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 61-1						
pHD1-A	8409	1203	6,99	1162	2868	0,41
pHD1-B	9958	658	15,13	821	2406	0,34
pHD1-C	8605	740	11,63	294	1854	0,16
pHD1-D	10358	852	12,16	925	2733	0,34
pHD1-E	2790	1067	2,61	333	4514	0,07
pHD1-G	8704	795	10,95	443	4118	0,11
pHD1-H	2575	1021	2,52	625	5150	0,12

C600 *fis::kan hns::tet*

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 60-2						
pHD1-A	3917	6026	0,65	242	8977	0,03
pHD1-B	5993	3329	1,80	379	9232	0,04
pHD1-C	4041	3358	1,20	373	9419	0,04
pHD1-D	4321	4712	0,92	246	7398	0,03
pHD1-E	4860	5490	0,89	819	10355	0,08
pHD1-G	5236	3973	1,32	248	8984	0,03
pHD1-H	4643	4607	1,01	446	9217	0,05

C600 *fis::kan hns::tet*

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 61-2						
pHD1-A	1936	6177	0,31	195	15365	0,01
pHD1-B	5251	2438	2,15	690	19712	0,04
pHD1-C	7579	4535	1,67	386	18313	0,02
pHD1-D	7593	5771	1,32	539	28776	0,02
pHD1-E	3581	5933	0,60	490	9296	0,05
pHD1-G	4887	5083	0,96	407	16886	0,02
pHD1-H	7833	5738	1,37	595	16727	0,04

BSN26

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 73			1 üN			1 + 3 üN
pHD1-A	6132	3701	1,66	701	7141	0,10
pHD1-B	3488	2185	1,60	845	9083	0,09
pHD1-C	8713	3927	2,22	1008	8944	0,11
pHD1-D	9476	4734	2,00	632	11120	0,06
pHD1-E	6397	1447	4,42	2990	2428	1,23
pHD1-G	5254	1936	2,71	349	4712	0,07
pHD1-H	5823	1813	3,21	1420	5492	0,26

			4 üN			1 + 3 üN
PE 73						
pHD1-A	8249	5520	1,49	701	7141	0,10
pHD1-B	5292	3364	1,57	845	9083	0,09
pHD1-C	10784	5954	1,81	1008	8944	0,11
pHD1-D	11649	7381	1,58	632	11120	0,06
pHD1-E	8870	2103	4,22	2990	2428	1,23
pHD1-G	7483	3174	2,36	349	4712	0,07
pHD1-H	8026	3141	2,56	1420	5492	0,26

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 73 Mittelwerte						
pHD1-A			1,58			0,10
pHD1-B			1,59			0,09
pHD1-C			2,02			0,11
pHD1-D			1,79			0,06
pHD1-E			4,32			1,23
pHD1-G			2,54			0,07
pHD1-H			2,89			0,26

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE75			1 üN			1 + 3 üN
pHD1-A	2231	3844	0,58	550	6559	0,08
pHD1-B	783	1492	0,52	884	12920	0,07
pHD1-C	1980	2696	0,73	798	11056	0,07
pHD1-D	876	1276	0,69	688	16022	0,04
pHD1-E	1510	804	1,88	3857	4147	0,93
pHD1-G	1710	1538	1,11	777	9258	0,08
pHD1-H	4040	2370	1,70	2474	9950	0,25

BSN26

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE75			5 ün			1 + 3 ün
pHD1-A	6944	8660	0,80	550	6559	0,08
pHD1-B	2623	4205	0,62	884	12920	0,07
pHD1-C	6441	6978	0,92	798	11056	0,07
pHD1-D	2794	3722	0,75	688	16022	0,04
pHD1-E	4576	2225	2,06	3857	4147	0,93
pHD1-G	5069	4328	1,17	777	9258	0,08
pHD1-H	9555	6195	1,54	2474	9950	0,25

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 75 Mittelwerte						
pHD1-A			0,69			0,08
pHD1-B			0,57			0,07
pHD1-C			0,83			0,07
pHD1-D			0,72			0,04
pHD1-E			1,97			0,93
pHD1-G			1,14			0,08
pHD1-H			1,62			0,25

BSN29

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 73			1+ 4ün+WH			1 + 3ün
pHD1-A	3842	1803	2,13	4583	1618	2,83
pHD1-B	7548	3372	2,24	3913	1145	3,42
pHD1-C	10675	3510	3,04	9359	3465	2,70
pHD1-D	5951	2009	2,96	7548	3047	2,48
pHD1-E	13817	3166	4,36	13696	4275	3,20
pHD1-G	2013	1213	1,66	7549	2660	2,84
pHD1-H	9575	1586	6,04	13446	3808	3,53

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 75			1 + 3 ün			1 + 3 ün
pHD1-A	2512	1928	1,30	10000	4427	2,26
pHD1-B	2371	3116	0,76	10873	4945	2,20
pHD1-C	3859	3414	1,13	9874	4488	2,20
pHD1-D	3581	1891	1,89	9186	6081	1,51
pHD1-E	6842	2230	3,07	5857	3187	1,84
pHD1-G	6915	4967	1,39	6085	3258	1,87
pHD1-H				11442	4356	2,63

8.4.2 Niedrige Wachstumsraten

MC4100

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 66			1 üN		RI 30 Nt x 8.6	3 üN
pHD1-A	722	8916	0,08	375	22919	0,02
pHD1-B	714	8991	0,08	399	25946	0,02
pHD1-C	1034	7354	0,14	693	26127	0,03
pHD1-D	667	9094	0,07	855	27081	0,03
pHD1-E	727	9627	0,08	791	29954	0,03
pHD1-G	899	10035	0,09	574	25723	0,02
pHD1-H	1770	6471	0,27			

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 66			3 üN		RI 30 Nt x 8.6	3 üN
pHD1-A	3006	25413	0,12	375	22919	0,02
pHD1-B	2808	28036	0,10	399	25946	0,02
pHD1-C	4089	22214	0,18	693	26127	0,03
pHD1-D	2765	31880	0,09	855	27081	0,03
pHD1-E	3158	33428	0,09	791	29954	0,03
pHD1-G	3571	34495	0,10	574	25723	0,02
pHD1-H	6082	20700	0,29			

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 66			3 üN		RI 30 Nt x 8.6	14 üN
pHD1-A	3006	25413	0,12	922	38760	0,02
pHD1-B	2808	28036	0,10	794	37952	0,02
pHD1-C	4089	22214	0,18	2008	36533	0,05
pHD1-D	2765	31880	0,09	2187	33007	0,07
pHD1-E	3158	33428	0,09	2087	38107	0,05
pHD1-G	3571	34495	0,10	1354	33875	0,04
pHD1-H	6082	20700	0,29			

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 66- MC4100Mittelwerte						
pHD1-A			0,10			0,02
pHD1-B			0,09			0,02
pHD1-C			0,16			0,04
pHD1-D			0,08			0,05
pHD1-E			0,09			0,04
pHD1-G			0,10			0,03
pHD1-H			0,28			

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 77 Expo 3 üN					RI 30 Nt x div.	
pHD1-A	396	2747	0,14	505	47081	0,011
pHD1-B	406	1876	0,22	535	47630	0,011
pHD1-C	1834	9591	0,19	1190	29925	0,040
pHD1-D	487	5181	0,09	1023	38595	0,027
pHD1-E	604	1776	0,34	2202	48690	0,045
pHD1-G	975	5371	0,18	571	34089	0,017
pHD1-H	3507	4653	0,75	1276	23018	0,055

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 77 Expo 14/15 üN		RI 30Ntx6,3			RI 30 Nt x div.	
pHD1-A	702	4550	0,15	984	58042	0,017
pHD1-B	1005	4781	0,21	999	57861	0,017
pHD1-C	1834	9591	0,19	2693	41885	0,064
pHD1-D	1438	12802	0,11	2366	49861	0,047
pHD1-E	604	1776	0,34	4740	60585	0,078
pHD1-G	2473	12083	0,20	1191	43538	0,027
pHD1-H	6348	10427	0,61	2365	33285	0,071

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 77 Mittelwerte					RI 30 Nt x div.	
pHD1-A			0,15			0,01
pHD1-B			0,22			0,01
pHD1-C			0,19			0,05
pHD1-D			0,10			0,04
pHD1-E			0,34			0,06
pHD1-G			0,19			0,02
pHD1-H			0,68			0,06

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 78			1üN			5üN
pHD1-A	1831	9476	0,19	510	47686	0,01
pHD1-B	1503	6925	0,22	667	43290	0,02
pHD1-C	1589	6949	0,23	986	42071	0,02
pHD1-D	777	7180	0,11	1662	44154	0,04
pHD1-E	1756	9777	0,18	3974	49322	0,08
pHD1-G	2941	8041	0,37	900	45560	0,02
pHD1-H	5472	6655	0,82	2328	45713	0,05

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 78 - 17 üN			1üN			
pHD1-A	1831	9476	0,19	767	44795	0,02
pHD1-B	1503	6925	0,22	1103	41637	0,03
pHD1-C	1589	6949	0,23	1663	43259	0,04
pHD1-D	777	7180	0,11	2570	39902	0,06
pHD1-E	1756	9777	0,18	5886	45527	0,13
pHD1-G	2941	8041	0,37	1501	44298	0,03
pHD1-H	5472	6655	0,82	3067	47727	0,06

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 78 Mittelwerte						
pHD1-A			0,19			0,02
pHD1-B			0,22			0,03
pHD1-C			0,23			0,03
pHD1-D			0,11			0,05
pHD1-E			0,18			0,11
pHD1-G			0,37			0,03
pHD1-H			0,82			0,06

PD32

	CAT log	RNAi 28 log	CAT/RNAi log	CAT stat	RNAi stat	CAT/RNAi sta
PE 66- 3 üN						
pHD1-A	973	3308	0,29	11253	10253	1,10
pHD1-B	1096	4817	0,23	6968	8750	0,80
pHD1-C	1152	3497	0,33	4289	5806	0,74
pHD1-D	8100	4014	2,02	4487	4468	1,00
pHD1-E	3339	1486	2,25	11740	4847	2,42
pHD1-G	558	1293	0,43	10976	8767	1,25
pHD1-H	3314	1367	2,42	11204	6325	1,77

	CAT log	RNAi log	CAT/RNAi log	CAT stat	RNAi stat	CAT/RNAi sta
PE 77 2.RNA Präp 1 üN						
pHD1-A	4811	11944	0,40	4639	8767	0,53
pHD1-B	3666	10508	0,35	2585	8497	0,30
pHD1-C	2036	2698	0,75	2137	2335	0,92
pHD1-D	3505	3896	0,90	6705	6603	1,02
pHD1-E	10697	8824	1,21	7741	4944	1,57
pHD1-G	6045	8663	0,70	2744	4134	0,66
pHD1-H	8944	11197	0,80	4998	10468	0,48

	CAT log	RNAi log	CAT/RNAi log	CAT stat	RNAi stat	CAT/RNAi sta
PE 77 1.RNA Präp(wie 66) div. Exp.MW stat						
pHD1-A			0,4	456	32568	0,01
pHD1-B			0,35	413	6748	0,06
pHD1-C	2309	4194	0,55	10489	34280	0,33
pHD1-D	3505	3896	0,90	665	3924	0,17
pHD1-E	1352	2348	0,58	3915	27782	0,13
pHD1-G	726	4061	0,18	1881	35881	0,05
pHD1-H	864	2266	0,38	9237	19934	0,50

	CAT log	RNAi log	CAT/RNAi log	CAT stat	RNAi stat	CAT/RNAi sta
PE 78 2. RNA Präp						
pHD1-A	3935	10157	0,39			
pHD1-B	5567	10287	0,54			
pHD1-C	2686	2380	1,13			
pHD1-D	3786	5191	0,73			
pHD1-E	10891	7174	1,52			
pHD1-G	7713	7993	0,96			
pHD1-H	9765	10156	0,96			

	CAT log	RNAi log	CAT/RNAi log	CAT stat	RNAi stat	CAT/RNAi sta
PE 77 1.RNA Präp(wie 66) 1 üN						
pHD1-A			0,4			
pHD1-B			0,35			
pHD1-C	2309	4194	0,55	3205	9362	0,34
pHD1-D	3505	3896	0,90			
pHD1-E	1352	2348	0,58	908	7293	0,12
pHD1-G	726	4061	0,18	391	9816	0,04
pHD1-H	864	2266	0,38	2598	4802	0,54

CSH50

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 67					RI 30 x 8	
pHD1-A	7435	11503	0,65	276	10808	0,03
pHD1-B	7539	10687	0,71	353	7136	0,05
pHD1-C	2497	2937	0,85	302	7096	0,04
pHD1-D	5757	7946	0,72	1068	15960	0,07
pHD1-E			0,78	1390	27336	0,05
pHD1-G	10390	9290	1,12	288	8784	0,03
pHD1-H	9019	5235	1,72	435	6096	0,07

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 72			1 / 2 üN			9 üN
pHD1-A	3511	6833	0,51	584	14504	0,04
pHD1-B	4274	8830	0,48	633	23976	0,03
pHD1-C	7538	5658	1,33	753	26816	0,03
pHD1-D	6505	7248	0,90	551	16720	0,03
pHD1-E	1145	978	1,17	774	27448	0,03
pHD1-G	356	1212	0,29	597	19040	0,03
pHD1-H	15026	8127	1,85	1546	20168	0,08

CSH50 *fis::kan*

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 67						
pHD1-A	7908	10881	0,73	283	11648	0,02
pHD1-B	6882	9747	0,71	323	12544	0,03
pHD1-C	3689	5047	0,73	303	5304	0,06
pHD1-D			0,62	1152	18040	0,06
pHD1-E			1,31	1436	17352	0,08
pHD1-G	6603	9340	0,71	250	7040	0,04
pHD1-H	3752	4624	0,81	683	11192	0,06

	CAT log	RNAI log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 72			1 / 2 üN			9 üN
pHD1-A	3114	8798	0,35	620	24328	0,03
pHD1-B	2995	10578	0,28	704	11288	0,06
pHD1-C	2174	2489	0,87	670	8392	0,08
pHD1-D	3696	10874	0,34	953	35448	0,03
pHD1-E	12994	10778	1,21	716	8496	0,08
pHD1-G	2737	7597	0,36	764	22760	0,03
pHD1-H	2479	3985	0,62	3275	49616	0,07

C600

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 74			1 + 2 üN			1 + 6 üN
pHD1-A	1,21	1,11	1,16			0,04
pHD1-B	1,32	1,21	1,27	0,032	0,041	0,04
pHD1-C	2,06	1,73	1,90			0,04
pHD1-D	1,04	1,09	1,07	0,039	0,047	0,04
pHD1-E	0,28	0,28	0,28	407	25164	0,02
pHD1-G	1,29	1,34	1,32	0,067	0,081	0,07
pHD1-H	0,53	0,74	0,64	383	11060	0,03

C600

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 76			1 + 2 üN		RI 30 x 8.7	1 + 12 üN
pHD1-A	0,73	0,76	0,75	530	9727	0,05
pHD1-B	0,78	0,80	0,79	1389	33747	0,04
pHD1-C	1,41	1,37	1,39	419	5377	0,08
pHD1-D	0,59	0,61	0,60	618	16060	0,04
pHD1-E	0,23	0,24	0,24	275	5046	0,05
pHD1-G	1,12	1,24	1,18	2001	23168	0,09
pHD1-H	0,44	0,61	0,53	259	3550	0,07

C600 *fis::kan hns::tet*

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 74			1 üN		RI 30 x 8.6	1 üN
pHD1-A	3639	8383	0,43	5255	17914	0,29
pHD1-B	4746	11223	0,42	3101	24519	0,13
pHD1-C	4046	8429	0,48	3864	21792	0,18
pHD1-D	7178	9679	0,74	4422	18413	0,24
pHD1-E	8563	8919	0,96	1607	21724	0,07
pHD1-G	7504	10890	0,69	2110	15987	0,13
pHD1-H	6454	8063	0,80	1882	17991	0,10

	CAT log	RNAI 28 log	CAT/RNAIlog	CAT stat	RNAI stat	CAT/RNAIsta
PE 74			1 üN		RI 30 x 8.6	1 üN
pHD1-A	3639	8383	0,43	5255	17914	0,29
pHD1-B	4746	11223	0,42	3101	24519	0,13
pHD1-C	4046	8429	0,48	3864	21792	0,18
pHD1-D	7178	9679	0,74	4422	18413	0,24
pHD1-E	8563	8919	0,96	1607	21724	0,07
pHD1-G	7504	10890	0,69	2110	15987	0,13
pHD1-H	6454	8063	0,80	1882	17991	0,10

Die Kürzel in den Tabellen bedeuten:

- PE ...: Primer Extension-Analyse Nr. ...
 ...üN: Dauer der Exposition des quantifizierten Röntgenfilmes (3 üN= 3 Tage/Nächte)
 Expo: Exposition
 RI 30 x ...: Quantifizierung der 30 Nukleotid langen RNAI cDNA multipliziert mit dem zuvor ermittelten Faktor (RNAI 28 Nt zu RNAI 30 Nt, siehe 2.5)

8.5 Mittelwertbestimmung der Quantifizierungen der PE-Wiederholungen mit dem Programm *Origin*

Datensets <i>Origin</i> , hohe Raten					
MC4100 exp.	PE 57-2	PE 59-1	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100		100	0
pHD1-B	84	105		94,5	10,5
pHD1-C	109	114		111,5	2,5
pHD1-D	95	143		119	24
pHD1-E	166	113		139,5	26,5
pHD1-G	96	131		113,5	17,5
pHD1-H	249	163		206	43
MC4100 stat.	PE 57-2	PE 59-1	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	7	7		7	0
pHD1-B	6	6		6	0
pHD1-C	8	8		8	0
pHD1-D	5	5		5	0
pHD1-E	6	4		5	1
pHD1-G	6	6		6	0
pHD1-H	25	15		20	5
PD32 exp.	PE 57	PE 59-2	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	192	241		216,5	24,5
pHD1-B	224	221		222,5	1,5
pHD1-C	509	298		403,5	105,5
pHD1-D	303	401		352	49
pHD1-E	173	176		174,5	1,5
pHD1-G	220	359		289,5	69,5
pHD1-H	371	215		293	78
PD32 stat.	PE 57	PE 59-2	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	27	22		24,5	2,5
pHD1-B	31	47		39	8
pHD1-C	31	81		56	25
pHD1-D	56	98		77	21
pHD1-E	84	49		66,5	17,5
pHD1-G	32	63		47,5	15,5
pHD1-H	51	48		49,5	1,5
BSN26 exp.	PE 73	PE 75	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100		100	0
pHD1-B	101	83		92	9
pHD1-C	128	120		124	4
pHD1-D	113	104		108,5	4,5
pHD1-E	273	286		279,5	6,5
pHD1-G	161	165		163	2
pHD1-H	183	235		209	26
BSN26 stat.	PE 73	PE 75	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	6	12		9	3
pHD1-B	6	10		8	2
pHD1-C	7	10		8,5	1,5
pHD1-D	4	6		5	1
pHD1-E	78	135		106,5	28,5
pHD1-G	4	12		8	4
pHD1-H	16	36		26	10

BSN29 exp.	PE 73	PE 75	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	135	189		162	27
pHD1-B	142	110		126	16
pHD1-C	192	164		178	14
pHD1-D	187	274		230,5	43,5
pHD1-E	276	445		360,5	84,5
pHD1-G	105	202		153,5	48,5
pHD1-H	382	--		382	0
BSN29 stat.	PE73	PE75	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	179	327		253	74
pHD1-B	216	319		267,5	51,5
pHD1-C	171	319		245	74
pHD1-D	157	219		188	31
pHD1-E	203	266		234,5	31,5
pHD1-G	180	271		225,5	45,5
pHD1-H	223	381		302	79
CSH50 exp.	PE 58-1	PE 62-1	PE 64	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100	100	100	0
pHD1-B	84	99	61	81	11,1
pHD1-C	160	--	85	122,5	37,5
pHD1-D	111	200	85	132	34,8
pHD1-E	149	94	52	98	28,1
pHD1-G	170	330	118	206	63,8
pHD1-H	121	81	62	88	17,4
CSH50 stat.	PE 58-1	PE 62-1	PE 64	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	13	8	4	8,3	2,6
pHD1-B	30	22	6	19,3	7,1
pHD1-C	23	23	6	17,3	5,7
pHD1-D	19	19	6	14,7	4,3
pHD1-E	8	6	2	5,3	1,8
pHD1-G	9	6	2	5,7	2
pHD1-H	10	9	2	7	2,5
CSH50 <i>fis::kan</i> exp.	PE 58-2	PE 62-2	PE 64	Mittelwert	Fehler
pHD1-A		35	14	24,5	10,5
pHD1-B		28	11	19,5	8,5
pHD1-C		67	29	48	19
pHD1-D	84	67	27	59,3	16,9
pHD1-E	109	40	14	54,3	28,3
pHD1-G	82	61	25	56	16,6
pHD1-H	119	94	34	82,3	25,2
CSH50 <i>fis::kan</i> stat.	PE 58-2	PE 62-2	PE 64	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	13	9	3	8,3	2,9
pHD1-B	4	2	1	2,3	0,9
pHD1-C	13	9	3	8,3	2,9
pHD1-D	24	21	8	17,6	4,9
pHD1-E	31	22	8	20,3	6,7
pHD1-G	8	6	2	5,3	1,8
pHD1-H	24	24	9	19	5

C600 exp.	PE 60-1	PE 61-1	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100		100	0
pHD1-B	118	217		167,5	49,5
pHD1-C	173	166		169,5	3,5
pHD1-D	133	174		153,5	20,5
pHD1-E	73	37		55	18
pHD1-G	211	157		184	27
pHD1-H	128	36		82	46
C600 stat.	PE 60-1	PE 61-1	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	11	6		8,5	2,5
pHD1-B	11	5		8	3
pHD1-C	3	2		2,5	0,5
pHD1-D	8	5		6,5	1,5
pHD1-E	2	1		1,5	0,5
pHD1-G	3	2		2,5	0,5
pHD1-H	2	2		2	0
C600 fis::kan hns::tet exp.	PE 60-2	PE 61-2	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	31	4		17,5	13,5
pHD1-B	86	31		58,5	27,5
pHD1-C	57	24		40,5	16,5
pHD1-D	44	19		31,5	12,5
pHD1-E	42	9		25,5	16,5
pHD1-G	63	14		38,5	24,5
pHD1-H	48	20		34	14
C600 fis::kan hns::tet stat.	PE 60-2	PE 61-2	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	1	0		0,5	0,5
pHD1-B	2	1		1,5	0,5
pHD1-C	2	0		1	1
pHD1-D	2	0		1	1
pHD1-E	4	1		2,5	1,5
pHD1-G	1	0		0,5	0,5
pHD1-H	2	1		1,5	0,5

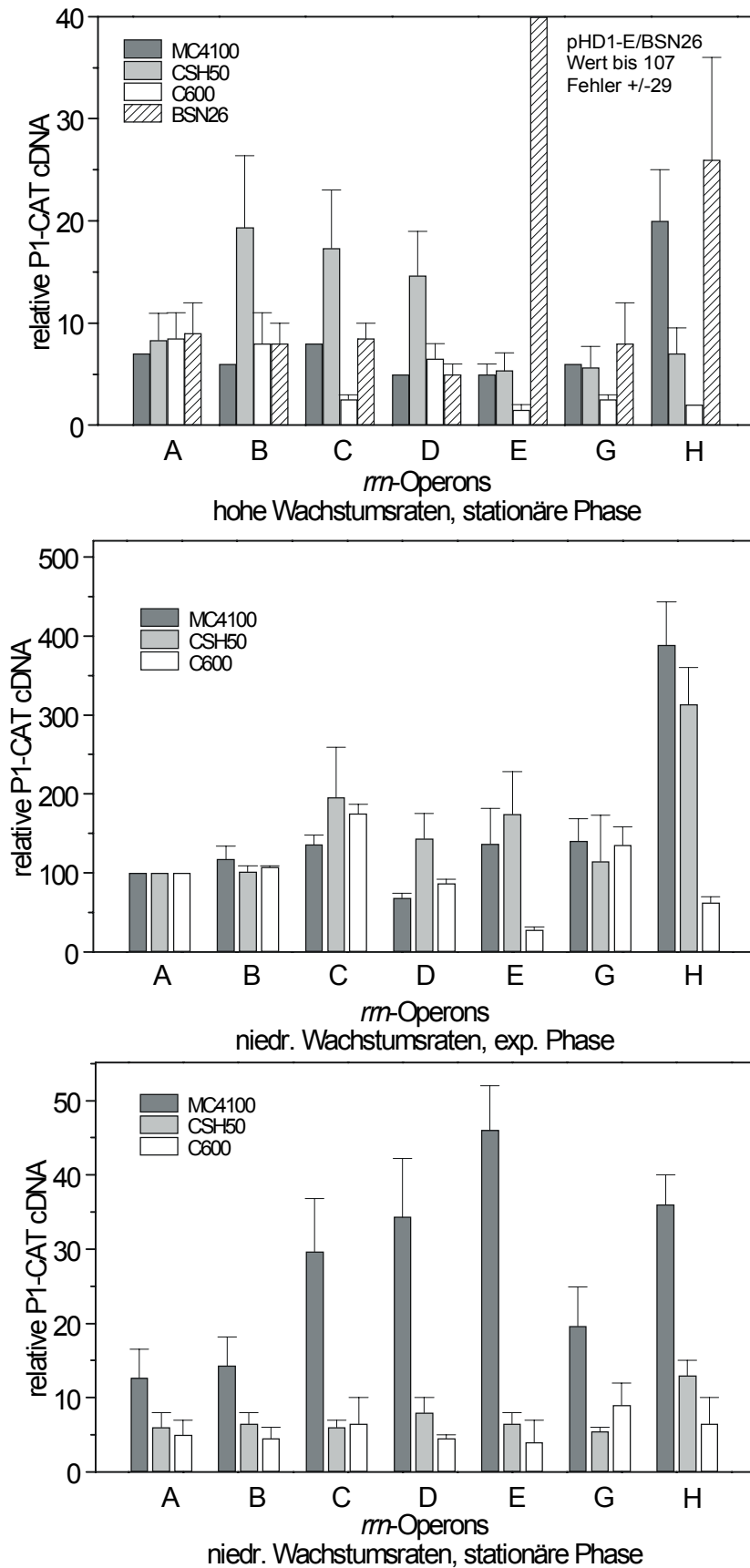
Datensets Origin, niedrige Raten					
MC4100 exp.	PE 66	PE 77	PE 78	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100	100	100	0
pHD1-B	90	147	116	117,7	16,5
pHD1-C	160	127	121	136	12,1
pHD1-D	80	67	58	68,3	6,4
pHD1-E	90	227	95	137,3	44,9
pHD1-G	100	127	195	140,7	28,3
pHD1-H	280	453	432	388,3	54,5
MC4100 stat.	PE 66	PE 77	PE 78	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	20	7	11	12,7	3,8
pHD1-B	20	7	16	14,3	3,8
pHD1-C	40	33	16	29,7	7,1
pHD1-D	50	27	26	34,3	7,8
pHD1-E	40	40	58	46	6
pHD1-G	30	13	16	19,7	5,2
pHD1-H		40	32	36	4

PD32 exp.	PE 66	PE 77	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	281	269		275	6
pHD1-B	231	233		232	1
pHD1-C	348	503		425,5	77,5
pHD1-D	1309	600		954,5	354,5
pHD1-E	1316	808		1062	254
pHD1-G	276	465		370,5	94,5
pHD1-H	1339	533		936	403
PD32 stat.	PE 66	PE 77	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	553	353		453	100
pHD1-B	418	203		310,5	107,5
pHD1-C	480	610		545	65
pHD1-D	559	677		618	59
pHD1-E	1255	1044		1149,5	105,5
pHD1-G	643	443		543	100
pHD1-H	1052	318		685	367
CSH50 exp.	PE 67	PE 72	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100		100	0
pHD1-B	109	94		101,5	7,5
pHD1-C	132	259		195,5	63,5
pHD1-D	112	175		143,5	31,5
pHD1-E	121	228		174,5	53,5
pHD1-G	173	57		115	58
pHD1-H	267	360		313,5	46,5
CSH50 stat.	PE 67	PE 72	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	4	8		6	2
pHD1-B	8	5		6,5	1,5
pHD1-C	7	5		6	1
pHD1-D	10	6		8	2
pHD1-E	8	5		6,5	1,5
pHD1-G	5	6		5,5	0,5
pHD1-H	11	15		13	2
CSH50 fis::kan exp.	PE67	PE 72	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	112	69		90,5	21,5
pHD1-B	109	56		82,5	26,5
pHD1-C	112	171		141,5	29,5
pHD1-D	95	67		81	14
pHD1-E	202	236		219	17
pHD1-G	109	71		90	19
pHD1-H	125	122		123,5	1,5
CSH50 fis::kan stat.	PE67	PE 72	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	4	5		4,5	0,5
pHD1-B	4	12		8	4
pHD1-C	9	16		12,5	3,5
pHD1-D	10	5		7,5	2,5
pHD1-E	13	17		15	2
pHD1-G	5	7		6	1
pHD1-H	9	13		11	2

C600 exp.	PE 74	PE 76	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	100	100		100	0
pHD1-B	109	106		107,5	1,5
pHD1-C	163	187		175	12
pHD1-D	92	81		86,5	5,5
pHD1-E	24	32		28	4
pHD1-G	113	158		135,5	22,5
pHD1-H	55	70		62,5	7,5
C600 stat.	PE 74	PE 76	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	3	7		5	2
pHD1-B	3	6		4,5	1,5
pHD1-C	3	10		6,5	3,5
pHD1-D	4	5		4,5	0,5
pHD1-E	1	7		4	3
pHD1-G	6	12		9	3
pHD1-H	3	10		6,5	3,5
C600 <i>fis::kan</i> <i>hns::tet</i> exp.	PE 74	PE 76	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	37	57		47	10
pHD1-B	36	57		46,5	10,5
pHD1-C	41	83		62	21
pHD1-D	64	69		66,5	2,5
pHD1-E	83	120		101,5	18,5
pHD1-G	59	82		70,5	11,5
pHD1-H	69	71		70	1
C600 <i>fis::kan</i> <i>hns::tet</i> exp.	PE 74	PE 76	PE	Mittelwert	Fehler
pHD1-A	25	46		35,5	10,5
pHD1-B	11	21		16	5
pHD1-C	15	28		21,5	6,5
pHD1-D	21	43		32	11
pHD1-E	6	9		7,5	1,5
pHD1-G	11	21		16	5
pHD1-H	9	13		11	2

8.6 Expression der P1-cat-Fusionstranskripte in diversen Wildtypen

Abb. 8.1 Grafische Darstellung der relativen Transkriptionsraten aller pHD-Plasmide in den verschiedenen Wildtypstämmen



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annette Hillebrand
	geb. Langner
Anschrift	Grunerstraße 23
	40239 Düsseldorf
Geburtsdatum	02.07.1957
Geburtsort	Solingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Kinder	2 Söhne, geb. 06/82 und 04/84

Schulausbildung

04/64 – 07/67	Volksschule Solingen
08/67 – 06/76	Gymnasium August-Dicke-Schule Solingen, Abschluss: Abitur

Berufsausbildung

08/76 – 07/78	Ausbildung zur Landwirtschaftlich-Technischen Assistentin am Max-Planck-Institut f. Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang
---------------	---

Berufstätigkeit

08/78 – 03/80	Festanstellung als Technische Assistentin am Institut für Molekulare Genetik der Universität Heidelberg
04/80 – 12/82	Festanstellung als Technische Assistentin am Max-Planck- Institut f. Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang

Zwischenzeitraum

06/82 – 09/92	ausschließlich Kinderbetreuungszeitraum
---------------	---

Studium

10/92 – 03/97	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/97 – 03/98	Diplomarbeit am Institut f. Physikalische Biologie der HHU- Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Wagner Thema: „ <i>Vergleichende Analyse der Transkriptionskontrolle bei unterschiedlichen rRNA-Operons von Escherichia coli</i> “
21.04.1998	Diplom
04/98 – 06/01	Promotion am Institut f. Physikalische Biologie der HHU- Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Wagner
05.12.2001	Promotionsprüfung