

Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die
Transkriptionsinitiation ribosomaler RNA P1-Promotoren
von *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Lars Jöres
aus Oberhausen

Düsseldorf 2001

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

Vorsitz: Prof. Dr. Steffen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Wagner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2002

Für meine Familie

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

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf H. Wagner für die wissenschaftliche Betreuung und die Überlassung des Themas.

Allen Freunden und Kollegen innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe Wagner, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich für die geleistete Hilfe und Unterstützung danken.

Besonders möchte ich mich bei den Mitstreitern in der Arbeitsgruppe Wagner, für die geleistete Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit danken, insbesondere für die Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Vielen Dank für die humorvolle Atmosphäre und die angenehme Zeit.

Den Kolleginnen der ppGpp-Abteilung (Britta und Corinna) möchte ich für die amüsante Zeit im Isotopenlabor und bei abendlichen Arbeitsbesprechungen danken.

Für die Präparation der RNA-Polymerase gilt mein Dank Frau Reinhild Wurm.

Ebenso möchte ich den Mitglieder des Institutes für die gute Zusammenarbeit danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die zur Verfügung gestellten Mittel. Ohne die finanzielle Unterstützung, insbesondere für Kongreßreisen, wäre diese Arbeit nicht so abwechslungsreich verlaufen.

Meinen Eltern und meiner gesamten Familie danke ich dafür, daß sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

Schließlich danke ich Nicole für ihre Geduld und Hilfe während der Entstehung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung:.....	1
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Die Struktur und Funktion von Promotoren.....	1
1.3	Aufbau der ribosomalen Operons in <i>E. coli</i>	2
1.3.1	Die Promotoren <i>rrn</i> P1 und P2.....	4
1.3.2	Die UAS-Region	4
1.3.3	Die Diskriminator-Region.....	5
1.4	Struktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase.....	6
1.4.1	Die α -Untereinheit	6
1.4.2	Die β -Untereinheiten.....	7
1.4.3	Die σ^{70} -Untereinheit.....	7
1.4.4	Die dreidimensionale Struktur von Holo- und Core-Enzym.....	8
1.5	Die Phasen der Transkription	10
1.5.1	Initiation der Transkription	10
1.5.2	Elongation.....	12
1.5.3	Termination.....	13
1.6	Stringente Kontrolle und Wachstumsratenregulation.....	14
1.6.1	Wachstumsratenregulation	14
1.6.2	Stringente Kontrolle	15
1.6.3	Regulationsmodelle	18
1.7	Fragestellung und Konzeption der Arbeit.....	19
2	Ergebnisse:.....	21
2.1	Der Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die Transkription stringent regulierter und nicht regulierter Promotoren in <i>E. coli</i>	21
2.1.1	Problemstellung und Experimenteller Ansatz	21
2.1.2	Experimentelle Vorgehensweise.....	22
2.1.2.1	Präparation von Transkriptionskomponenten	22
2.1.2.1.1	Isolierung der <i>in vitro</i> Transkriptionsmatritzen.....	22
2.1.2.1.2	Präparation eines internen Standards.....	23
2.1.3	<i>In vitro</i> Transkription mit der <i>E. coli</i> DNA-abhängigen RNA-Polymerase.....	23
2.1.3.1	Einfluß von verschiedenen Guanosintetraphosphatkonzentrationen auf die Transkription	23
2.1.3.2	Effekt von Guanosintetraphosphat auf die verschiedenen Phasen der Transkription.....	25
2.1.3.3	Nukleotidabhängige Effekte von ppGpp auf die Transkription.....	27

2.1.3.4	Vergleich der Transkription im 'multiple round' gegen 'single round' System.....	28
2.2	Einfluß von Guanosintetraphosphat auf Struktur, Stabilität und Komplexbildung des ternären Initiationskomplexes	32
2.2.1	Struktur und Stabilität des ternären Initiationskomplexes	32
2.2.1.1	Einleitung und experimenteller Ansatz	32
2.2.1.2	Untersuchungen durch KMnO ₄ Modifikation von Initiationskomplexen..	33
2.2.1.2.1	Struktur der Initiationskomplexe	33
2.2.1.2.2	Stabilität der Initiationskomplexe	34
2.2.1.3	Test der Stabilität von Initiationskomplexen anhand der Produktbildung... ..	36
2.2.2	Bildung von ternären Initiationskomplexen	38
2.2.2.1	Einleitung und experimenteller Ansatz	38
2.2.2.2	Analyse der Kinetik ternärer Initiationskomplexbildung durch KMnO ₄ Modifikation am <i>rrnB</i> P1	38
2.2.2.3	Retardierungsgelanalysen von Initiationskomplexen.....	40
2.2.2.4	Bildungsgeschwindigkeit von Initiationskomplexen	42
2.2.2.5	Transkriptionsanalysen von Initiationskomplexen.....	44
2.3	Analysen von superhelikalen Transkriptionstemplates	48
2.3.1	Einleitung und experimenteller Ansatz.....	48
2.3.2	'multiple round' Analyse am pRT4 I	48
2.3.3	Bildung des Initiationskomplexes.....	49
2.3.4	'multiple round' Analyse am pRT4 II	51
2.4	Überprüfungen des "Kompetitionsmodells"	52
2.4.1	<i>In vitro</i> Transkription mit ppGpp Funktionsanalogen.....	53
2.4.1.1	Einleitung und experimenteller Ansatz	53
2.4.1.2	'multiple round' <i>in vitro</i> Transkriptionen.....	53
2.4.1.3	Initiations- und Elongationsmessungen am <i>rrnB</i> P1, <i>rrnD</i> P1 und Ptacl.... ..	56
2.4.1.4	Analysen der Initiationskomplexebildung in Gegenwart von ppGpp Analogen	57
3	Diskussion	60
3.1	<i>In vitro</i> Transkriptionsstärke und differentielle Inhibierung der Promotoren <i>rrnB</i> P1, <i>rrnD</i> P1 und Ptacl	60
3.2	Wirkphase des Effektors im Rahmen der Initiation stringent kontrollierter Promotoren	61
3.2.1	Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit mit bereits publizierten Arbeiten	63

3.3	Molekularer Mechanismus und Determinanten der Inhibierung: Das "Kompetitionsmodell"	64
3.3.1	Herleitung des Kompetitionsmodells aus den vorherigen Untersuchungen	64
3.3.2	Überprüfung des Modells durch Funktionsanaloge.....	67
3.3.3	Relevanz des Modells <i>in vivo</i>	68
3.4	Topologieabhängige Transkriptionseinhibierung am <i>rrnB</i> P1	69
4	Material und Methoden.....	72
4.1	Material.....	72
4.1.1	Allgemeines	72
4.1.2	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	72
4.1.3	Plasmide	72
4.1.4	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	73
4.1.4.1	Verschiedene Nukleinsäuren.....	73
4.1.4.2	Desoxyoligonukleotide.....	73
4.1.4.3	Nukleotide.....	73
4.1.5	Proteine	74
4.1.6	Feinchemikalien.....	75
4.1.7	Allgemeine Puffer und Medien.....	76
4.1.8	Verschiedenes	77
4.2	Methoden.....	78
4.2.1	Allgemeine Methoden	78
4.2.2	Mikrobiologische Methoden	78
4.2.2.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten.....	78
4.2.2.2	Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen.....	78
4.2.2.3	Anzucht von Über-Nacht-Kulturen (ÜN-Kulturen).....	78
4.2.3	Messung von Konzentrationen	78
4.2.3.1	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....	79
4.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden.....	79
4.2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	80
4.2.3.4	Messung von Radioaktivität.....	80
4.2.3.5	Densitometrie	80
4.2.4	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren.....	80
4.2.4.1	Extraktionen mit Phenol und Chloroform	80
4.2.4.2	Fällung von Nukleinsäuren	80
4.2.4.3	Dialyse von Nukleinsäuren	81
4.2.5	Gelelektrophorese	81
4.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	81
4.2.5.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	81

4.2.5.3	Denaturierende Gelelektrophorese.....	81
4.2.5.4	Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	81
4.2.5.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	82
4.2.6	Nachweis von Makromolekülen in der Gelmatrix.....	82
4.2.6.1	Nachweis von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid.....	82
4.2.6.2	Autoradiographie	80
4.2.6.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Coomassie-Färbung	83
4.2.7	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	83
4.2.8	Isolierung von Plasmid DNA	84
4.2.8.1	Isolierung von Plasmid DNA im großen Maßstab	84
4.2.8.2	Isolation der DNA des Phagen T7 Δ 111	85
4.2.9	Enzymatische Reaktionen	86
4.2.9.1	Hydrolyse doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen ...	86
4.2.9.2	Auffüllreaktion von 5'überhängenden Enden durch Klenow-Polymerase..	86
4.2.9.3	Kinasierung von freien 5' Enden mittels Polynukleotidkinase	87
4.2.9.4	5' Endmarkierung von DNA Oligonukleotiden.....	87
4.2.10	Sequenzierung von DNA	88
4.2.10.1	Denaturierung.....	88
4.2.10.2	Hybridisierung.....	89
4.2.10.3	Sequenzierung	89
4.3	Spezielle Methoden	90
4.3.1	Filterbindungsassays	90
4.3.1.1	Festzeitpunktverfahren (Chamberlin <i>et al.</i> , 1979).....	90
4.3.1.2	Aktivitätstest (Chamberlin <i>et al.</i> , 1979).....	90
4.3.2	Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp).....	92
4.3.2.1	Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp).....	92
4.3.2.2	Analytischer Nachweis von ppGpp	93
4.3.2.3	Affinitätschromatographie	93
4.3.2.4	Gelfiltration	94
4.3.3	<i>in vitro</i> Transkriptionen	94
4.3.3.1	'multiple round' <i>in vitro</i> Transkription	94
4.3.3.2	'single round' <i>in vitro</i> Transkription	96
4.3.3.2.1	'single round' <i>in vitro</i> Transkription zur Analyse der Initiationskomplexbildung	96
4.3.3.2.2	'single round' <i>in vitro</i> Transkription zur Bestimmung von Halbwertszeiten produktiver Initiationskomplexe.....	97
4.3.4	Footprint-Techniken.....	98

4.3.4.1	KMnO ₄ -Footprints	98
4.3.4.2	Chemische Modifikation durch KMnO ₄ zur Analyse von RNA- Polymerase/DNA-Komplexen <i>in vitro</i>	98
4.3.4.3	Aufreinigung der modifizierten Template-DNA	98
4.3.4.4	Primer-Extension-Analyse	99
4.3.5	Native Gelelektrophorese zur Bestimmung von Polymerase-DNA- Komplexen (Gelretardierung)	100
4.3.5.1	Native Gelelektrophorese zur Bestimmung von RNA-Polymerase Promoter-Komplexen.....	100
4.3.5.2	Native Gelelektrophorese zur Bestimmung der Kinetik von Initiationskomplexbildungen.....	101
5	Literaturverzeichnis:.....	102
	Abkürzungsverzeichnis	115

Zusammenfassung

Bakterien reagieren während einer Aminosäuremangelsituation durch sofortige Inhibierung der stabilen RNA-Synthese. Dieses Regulationsnetzwerk bezeichnet man als stringente Kontrolle. Die Inhibierung wird durch das Effektormolekül Guanosintetraphosphat (ppGpp) vermittelt. Der Mechanismus der Inhibierung stabiler rRNA-Synthese ist dabei noch weitgehend unverstanden. Die Regulation durch ppGpp findet offenbar sowohl auf Ebene der Transkriptionsinitiation, als auch auf Ebene der Elongation statt. Als verantwortliche Komponenten gelten die DNA-abhängige RNA-Polymerase und die jeweiligen Promotoren. Ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Promotorelement für stringent kontrollierte Promotoren stellt die GCGC-Diskriminatorsequenz zwischen -10-Region und Transkriptionsstart dar.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Mechanismus der ppGpp-vermittelten Inhibierung stringent kontrollierter Promotoren im Rahmen der Transkriptionsinitiation. Detaillierte *in vitro* Untersuchungen der Initiation wurden an drei Modellpromotoren aus *Escherichia coli* durchgeführt. Als Prototyp für stringent kontrollierte Promotoren gilt der *rrnB* P1 Promotor. Darüberhinaus wurde ein weiterer rRNA Promotor, *rrnD* P1 untersucht. Dieser Promotor besitzt einige Sequenzunterschiede zum *rrnB* P1, die eine veränderte Sensitivität hervorrufen könnten. Als Kontrolle diente der unregulierte Ptacl Promotor.

In *in vitro* Transkriptionsansätzen wurden die Transkriptionsstärken und die relative ppGpp Sensitivität der verschiedenen Promotoren ermittelt. In 'multiple round' und 'single round' Systemen erfolgte die Untersuchung des Einflusses der Initiationsnukleotid-Konzentrationen auf die ppGpp vermittelte Inhibierung. Es wurden anschließend die verschiedenen Schritte der Initiation analysiert, wobei das Hauptgewicht auf Struktur, Stabilität und Bildungsgeschwindigkeit der ternären Initiationskomplexe lag. Diese Charakteristika wurden durch 'footprint'-Analysen, Gelretardierungs-Systeme und Transkriptanalysen überprüft.

Im Rahmen der Initiation an stringent kontrollierten Promotoren zeigte sich, daß die Bildung des ternären Initiationskomplexes in Gegenwart von ppGpp verzögert abläuft. Dies führt im Falle der sensitiven Promotoren, die sich durch labile binäre Komplexe auszeichnen, zur Dissoziation der RNA-Polymerase. Nicht-sensitive Promotoren besitzen zumeist stabile binäre Komplexe, so daß sich eine Inhibierung der ternären Komplexbildung nicht bemerkbar macht.

Anhand dieser Daten wurde das sogenannte "Kompetitionsmodell" entwickelt, welches die unterschiedliche Sensitivität der Promotoren erklären kann. Es handelt sich bei der ppGpp-vermittelten Inhibierung der Initiation um eine Konkurrenz des Effektors mit Substratnucleotiden, welche den Initiationskomplex stabiler rRNA Promotoren stabilisieren müssen. Nicht-stringent kontrollierte Promotoren benötigen diese Nucleotide für die Stabilisierung nicht, werden daher auch nicht inhibiert. Dieses Modell wurde anhand von ppGpp-Funktionsanalogen bestätigt.

1 Einleitung:

1.1 Allgemeine Einleitung

Bakterien adaptieren schnell und effizient ihr Wachstum an die umgebenden Umweltbedingungen. Eine rasche Anpassung der Genexpression und des Wachstums an die Veränderungen des Nährstoffangebots währenddessen ist notwendig. Dabei steht die Anpassung der Ribosomensynthese in unmittelbarem Zusammenhang mit diesen Mechanismen. Über die Zahl der Ribosomen und damit der Synthese aller ribosomaler Komponenten ist die Zelle in der Lage die allgemeine Proteinsynthese zu steuern. Daher ist die Kontrolle der Ribosomenkonzentration ein wichtiges Mittel der Zelle auf Änderungen der Wachstumsbedingungen zu reagieren. Die beiden bekanntesten globalen Regulationsmechanismen in diesem Zusammenhang sind die stringente Kontrolle und die Wachstumsratenkontrolle. Die stringente Kontrolle und die Wachstumsratenregulation werden eng mit den Effektormolekülen Guanosintetraphosphat (ppGpp) und Guanosinpentaphosphat (pppGpp) in Verbindung gebracht, welche inhibierend auf die Synthese stabiler RNAs wirken. Da bei Prokaryoten größtenteils auf der Stufe der Transkriptionsinitiation reguliert wird, wurde bei der Untersuchung der Mechanismen der ppGpp-vermittelten Inhibierung der Ribosomensynthese besonderer Augenmerk auf die Initiation der Transkription ribosomaler Gene gelegt. Daher steht die Interaktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase mit ribosomalen RNA Promotoren im Vordergrund dieser Arbeit.

Aus diesem Grunde werden im Folgenden Promotorstrukturen, Aufbau und Struktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*, die Mechanismen der Transkriptionsinitiation in Prokaryoten und die Regulation der ribosomalen RNA Operons erläutert.

1.2 Die Struktur und Funktion von Promotoren

Als Promotor wird diejenige DNA-Struktur definiert, an der die DNA-abhängige RNA-Polymerase im Rahmen der Transkription initiiert. Dabei enthält die Sequenz des Promotors Informationen, die der spezifische Initiationsfaktor σ erkennt. Im Folgenden wird nur auf den Aufbau σ^{70} -abhängiger Promotoren eingegangen. Für σ^{70} -abhängige Promotoren sind Konsensus-Merkmale aus Vergleichen von mehr als 300 natürlichen Promotoren abgeleitet worden (Lisser und Margalit, 1993). Der Kern-Promotor für σ^{70} -abhängige Gene besitzt eine konservierte -35 und -10 Region, welche durch einen 17 bp langen Spacer voneinander getrennt werden.

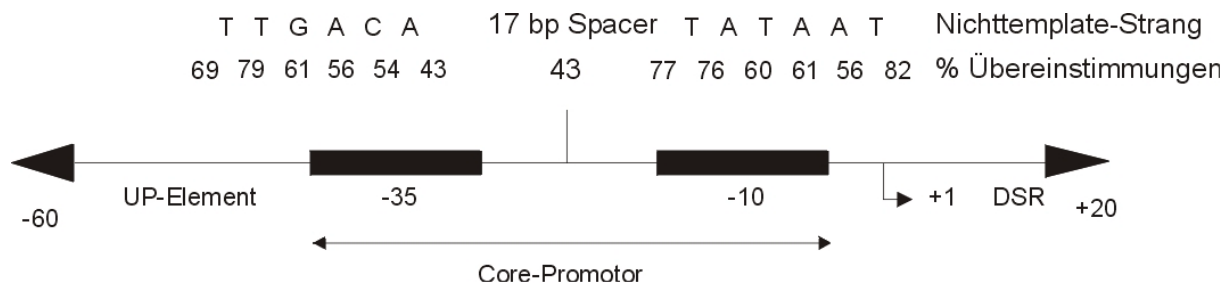


Abb. 1.1: Struktur des σ^{70} -abhängigen Kernpromotors (aus: Record *et al.*, 1996, verändert). DSR="downstream region". Die Konsensussequenzen für die -35 und -10 Region und die Konsensusspacer Länge sind zusammen mit der Häufigkeit der Übereinstimmungen aus Sequenzvergleichen von ca. 300 verschiedenen Promotoren angegeben.

Ein natürlicher Promotor, der exakt die Konsensussequenz besitzt wurde bislang nicht identifiziert. *E. coli* Promotoren, an welchen RNA-Polymerase mit einer hohen Frequenz initiieren, besitzen typischerweise nicht mehr als 3 Abweichungen von entweder der Konsensussequenz oder der Konsensus-Spacer Länge (Mulligan *et al.*, 1984). Weitere Abweichungen von der Konsensussequenz senken die Initiationsfrequenz der RNA-Polymerase. Bei einem Großteil der Promotoren ist die +1 Position ein ATP, und die flankierenden Positionen werden von einem CTP (-1) und einem TTP (+2) eingenommen (Hawley und McClure, 1983). Ebenfalls besitzen in einigen Fällen Promotoren stromaufwärts und stromabwärts Sequenzen, welche die Initiation der Transkription beeinflussen. Als Beispiel hierfür ist das sogenannte UP-Element zu nennen, welches einen aktivierenden Effekt auf die Initiation der Transkription hat. Das UP-Element liegt typischerweise stromaufwärts des Promotors und nimmt die Positionen von -60 bis -40 ein. Dieses AT-reiche Sequenzelement ist zusammengesetzt aus zwei Sequenzabschnitten, die mit jeweils einer α -Untereinheit der RNA-Polymerase wechselwirken. Es wurde gezeigt, daß die Transkriptionsverstärkung durch die direkte Wechselwirkungen zwischen den α -Untereinheiten und dem UP-Element ausgelöst wird (Blatter *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 2001).

1.3 Aufbau der ribosomalen Operons in *E. coli*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation der Transkription ribosomaler Gene durch Inhibierung der Initiation. Für das Verständnis der Vorgänge am Promotor soll im Folgenden der Aufbau ribosomaler Gene am Beispiel des *rnnB* Operons erläutert werden. *Escherichia coli* besitzt sieben ribosomale Operons (*rnnA*, *rnnB*, *rnnC*, *rnnD*, *rnnE*, *rnnG* und *rnnH*), welche über das Genom verteilt sind (Elwood und Nomura, 1982).

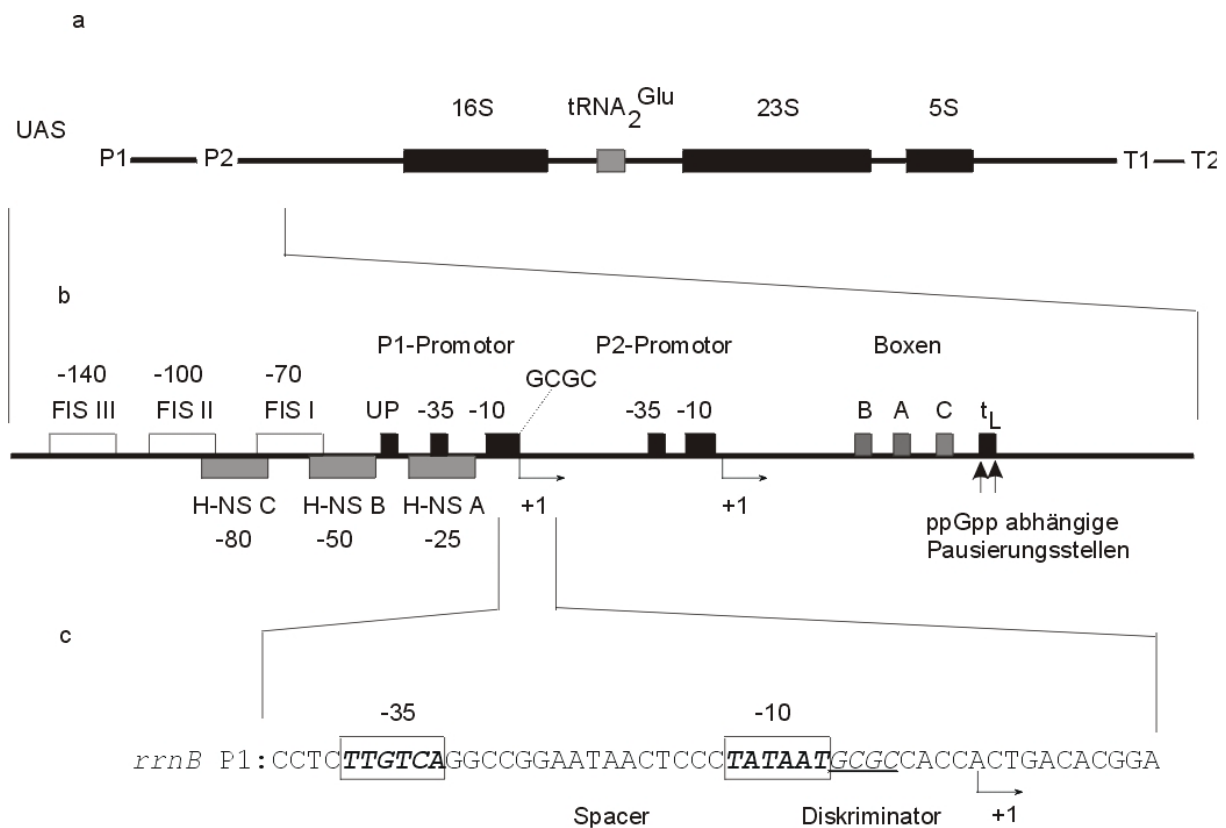


Abb.1.2: Schematischer Aufbau des *rrnB* Operons aus *E. coli*.

- a: Überblick über die Gene des *rrnB* Operons
- b: Anordnung der regulatorischen Elemente des Operons, gezeigt sind Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (H-NS und FIS), die tandemartig angeordneten Promotoren P1 und P2, und konservierte Sequenzelemente im stromabwärts-Bereich der Promotoren (Boxen B, A und C stellen 'nut'-ähnliche Elemente der Antitermination beim Phagen λ dar. t_L bezeichnet eine Sequenz, die eine Pausierungsstelle stromabwärts bildet und die homolog zu Rho-abhängigen Terminatoren ist).
- c: Promotorsequenz des *rrnB* P1 Promotors

Die Mehrzahl dieser Operons ist in der unmittelbaren Nähe zum Replikationsursprung des Chromosoms lokalisiert, daher ist die Gendosis stark abhängig von dem Replikationsstatus der Zelle. So kann bei exponentiellen Wachstumsraten die Anzahl der ribosomalen Operons auf bis zu 30 Kopien pro Zelle ansteigen (Condon *et al.*, 1995). Diese sieben ribosomalen Operons sind sehr ähnlich aufgebaut. Sie kodieren alle für 16S, 23S, 5S-rRNA und einige tRNAs, wobei in der Anzahl und Typus der tRNAs Unterschiede zwischen den Operons auftreten. Eine Ausnahme bildet das *rrnD*-Operon, welches zwei 5S-Gene besitzt (Duester und Holmes, 1980). In Abbildung 1.2 sind die Charakteristika der ribosomalen Operons am Beispiel des *rrnB*-Operons dargestellt.

Die Transkription an allen Operons wird von zwei tandemartig angeordneten Promotoren P1 und P2 gestartet. Vor dem P1 Promotor befindet sich die sogenannte UAS-Region (upstream activating sequence), die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren enthält. An die Promotoren schließt sich der stark konservierte ‚leader‘ Bereich an, gefolgt von den Genen für 16S, eine oder mehrere tRNAs und

anschließend 23S und 5S rRNA. Die verschiedenen Operons werden durch einen Einzel- oder Doppelterminator begrenzt. Unterschieden werden die Operons in ihrem allgemeinen Aufbau nur auf Grund der verschiedenen Spacer-Regionen zwischen den Genen und der Art und Anordnung der tRNAs.

1.3.1 Die Promotoren *rrn*P1 und P2

Der ribosomale P1 Promotor ist unter exponentiellen Wachstumsbedingungen *in vivo* der wesentlich stärkere der beiden Tandempromotoren (deBoer und Nomura, 1979; Liebig und Wagner, 1995). Er gehört *in vivo* zu den stärksten Promotoren der Zelle. Es erfolgen an ihm ca. eine Initiation pro Sekunde unter hohen Wachstumsraten. Darüberhinaus scheint er aber auch stärker reguliert zu werden als der P2 Promotor. Er unterliegt mehrfacher Regulation, beispielsweise der Wachstumsratenregulation und der stringenten Kontrolle (Glaser *et al.*, 1983; Sarmientos *et al.*, 1983). Der P2 Promotor scheint für ein basales Transkriptionsniveau verantwortlich zu sein (Glaser *et al.*, 1983; Kajitani und Ishihama, 1984, Sarmientos *et al.*, 1983; Liebig und Wagner, 1995), obwohl festgestellt wurde, daß er *in vitro* und *in vivo* ebenfalls sensitiv auf ppGpp reagiert (Heinemann und Wagner, 1997), welches als verantwortliches Effektormolekül für stringente Kontrolle und Wachstumsratenregulation diskutiert wird. Der P1 ist *in vitro*, im Gegensatz zu seiner hohen Aktivität *in vivo*, ein eher schwacher Promotor. Er reagiert sensitiv auf Erhöhung der Salzkonzentration und Veränderungen der Superhelikalität des Templates (Oostra *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 1979; Leirimo und Gourse, 1991; Ohlsen und Gralla, 1992). Auf linearen Transkriptionstemplates sind RNA-Polymerase Promotor-Komplexe nur zu stabilisieren, indem man die ersten beiden Startnukleotide hinzufügt (Gourse, 1988; Langert *et al.*, 1991). Die Stabilisierung im Falle des *rrnB* P1 durch die ersten beiden Startnukleotide führt zu einer Transkriptlippage-Reaktion, die teilweise einen -3 Start provoziert (Borukhov *et al.*, 1993). Dies geschieht überwiegend bei einer Limitierung des dritten Startnukleotids. Ist dieses anwesend, wird der +1 Start bevorzugt.

Die Sequenz der -35 Region und die Spacerlänge mit 16 Basenpaaren weicht von den Konsensuselementen ab, so daß die hohe Aktivität *in vivo* nur durch eine Reihe von akzessorischen Mechanismen erklärbar ist.

1.3.2 Die UAS-Region

Die UAS-Region, welche stromaufwärts der Tandempromotoren liegt, gilt als die regulatorisch wirkende Region der *rrn*-Operons. In dieser Region binden die Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS, die ebenfalls für die Wachstumsratenregulation eine entscheidende Rolle spielen. Die Bindung des Aktivators FIS an die UAS-Region bewirkt eine Steigerung der Transkription (Ross *et al.*, 1990; Leirimo und Gourse, 1991), H-NS wirkt dagegen als Repressor der

ribosomalen RNA-Synthese (Afflerbach *et al.*, 1998; Schröder und Wagner, 2000 siehe auch 1.6.1.).

Ein weiteres wichtiges Element der Transkriptionsaktivierung ist das bereits erwähnte UP-Element, welches eine bis Steigerung der *in vivo* Aktivität von bis zu 70% zur Folge hat (Meng *et al.*, 2001). Die UAS-Region ist nicht essentiell für die stringente Kontrolle, eine Deletion dieser Region zeigt immer noch eine Sensitivität *in vivo*. Der für die Regulation ausreichende Promotorbereich konnte auf eine Minimalsequenz von -40 bis +1 (Gourse *et al.*, 1986; Bartlett und Gourse, 1994; Josaitis *et al.*, 1995) eingegrenzt werden. Dennoch ist eine Beteiligung dieser Region an der Regulation nicht auszuschließen, da eine Auswirkung auf die Geometrie der Initiationskomplexe wahrscheinlich ist.

1.3.3 Die Diskriminator-Region

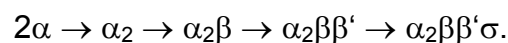
Bei negativ stringent kontrollierten Promotoren ist die GCGC-Sequenz im Anschluß an die -10 Region konserviert. Bei positiv regulierten Genen, wie zum Beispiel dem *his*-Gen, ist eine AT-reiche Diskriminatorsequenz essentiell für die Regulation (Riggs *et al.*, 1986). Über die Diskriminatorsequenz verfügen alle ribosomalen P1 Promotoren, viele tRNA Promotoren und einige Promotoren, die für ribosomale Proteine kodieren. Die weniger sensitiven P2 Promotoren ribosomaler RNAs dagegen besitzen eine Diskriminatorsequenz, welche nicht der Konsensussequenz entspricht (GCAG für *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnG* und ACGC für *rrnD*, *rrnE* und *rrnH*). Mutationsstudien, in welchen das GCGC-Motiv durch AT-Sequenzen ausgetauscht wurden, zeigten eine abgeschwächte ppGpp Sensitivität (Jung und Lee, 1997). Wurde andererseits der nicht perfekte Diskriminator des *rrnB* P2 Promotors komplettiert, zeigte sich eine Verstärkung der Regulierbarkeit in Zusammenhang mit der wachstumsraten- und der stringenten Kontrolle (Zacharias *et al.*, 1989). Das Diskriminatormotiv ist jedoch nicht ausreichend, um die Sensitivität eines Promotors herzustellen. So ist die Einführung eines perfekten Diskriminatormotivs in den unregulierten Ptacl Promotor nicht ausreichend um die Sensitivität im Rahmen der wachstumsraten- oder stringenten Kontrolle zu ändern (Zacharias *et al.*, 1989). Für die Regulierbarkeit scheint ebenfalls die nicht-Konsensus -35 Region und die suboptimale Spacerlänge am *rrnB* P1 verantwortlich zu sein. Eine Überführung einer der beiden Regionen in die Konsensussequenz zerstört die Sensitivität (Gaal *et al.*, 1989). Wahrscheinlich spielt der Zusammenhang aller Regionen eine entscheidende Rolle, da die Komplexgeometrie durch alle Parameter wesentlich beeinflusst wird.

Die Wirkungsweise des Diskriminatormotivs ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Diskutiert werden unter anderem die Tatsache, das ein Austauschen des GCGC-Diskriminators gegen ein ATAT-Motiv die Stabilität der Promotor-Komplexe erhöht (Mizushima-Sugano und Kaziro, 1985; J.W. Park,

persönliche Mitteilung). Wahrscheinlich wird das Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs durch die schwächeren AT-Basenpaare im Vergleich zu GC-Paaren erleichtert (Ohlsen und Gralla, 1992). Wie schon erwähnt zeichnen sich die ribosomalen P1 Promotoren durch eine besondere Instabilität der offenen Promotorkomplexe aus, die durchaus Angriffspunkt für das Effektor nukleotid ppGpp sein könnten (Barker *et al.*, 2001). Bei den Diskriminatorsequenzen handelt es sich also um notwendige, aber nicht hinreichende Sequenzmotive für die Regulation im Rahmen der stringenten Kontrolle (Travers, 1980; Zacharias *et al.*, 1989).

1.4 Struktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Bei Prokaryoten werden im Gegensatz zu den Eukaryoten alle Gene durch ein Enzym transkribiert, der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Das Core-Enzym besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten, welche die katalytische Aktivität des Enzyms bilden. Es ist alleine nicht in der Lage am Promotor spezifisch zu initiieren. Die Zusammensetzung besteht aus den folgenden Untereinheiten: $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Die ω -Untereinheit übernimmt dabei die Funktion der Assemblierungshilfe der β -Untereinheiten (Minakhin *et al.*, 2001). ω hat keine transkriptions-spezifische Aufgabe, daher wird im Folgenden nicht weiter auf diese Untereinheit eingegangen. Das Holoenzym besitzt die Dimension 90 x 95 x 160 Å und hat ein Molekulargewicht von etwa 460 kDa. Die Assemblierung des Holoenzym erfolgt in der Reihenfolge:



Den unterschiedlichen Untereinheiten des Enzyms werden verschiedene Funktionen zugeordnet. Für die Promotorerkennung ist der σ -Faktor zuständig. Erst wenn dieser Faktor anwesend ist, ist das sogenannte Holoenzym in der Lage den Promotor zu erkennen und produktiv zu initiieren.

1.4.1 Die α -Untereinheit

Die α -Untereinheit ist die kleinste Untereinheit mit 329 Aminosäuren und einer Masse von 36,5 kDa. Sie besteht aus zwei unabhängigen Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Dabei unterscheidet man zwischen der N-terminalen Domäne oder α -NTD (Aminosäuren 8-235) und der C-terminalen Domäne, oder α -CTD (Aminosäuren 249-329). Die α -Untereinheit besitzt drei wichtige Funktionen: Erstens vermittelt die α -NTD die Initiation der Assemblierung. Sie ist notwendig für Kontakte zwischen den beiden α -Untereinheiten als auch für den Kontakt zu β und β' (Igarashi und Ishihama, 1991). Zweitens beteiligt sich diese Untereinheit an der Ausbildung von Transkriptionsfaktor-RNA-Polymerase Wechselwirkungen. Als Beispiel hierfür dienen CRP (Igarashi und Ishihama, 1991) oder OxyR (Tao *et al.*, 1993). Hier ist die α -CTD offenbar die Kontaktstelle für diese Transkriptionsfaktoren. Drittens bindet die α -CTD an ein konserviertes

Promotorstrukturelement, welches eine Verstärkung der Transkription zur Folge hat. Dieses Strukturelement ist das schon vorher erwähnte UP-Element (Gaal *et al.*, 1996, Meng *et al.*, 2001). Es wird benötigt, um eine maximale Promotoraktivität zu erreichen. Es besteht aus zwei AT-reichen Sequenzen, die direkt an die -35-Region des Core-Promotors grenzen. Diese beiden Motive binden jeweils an eine α -CTD (Estrem *et al.*, 1999).

1.4.2 Die β -Untereinheiten

Die größten Untereinheiten der RNA-Polymerase sind die β -Untereinheiten (β mit 150 kDa und β' mit 155 kDa). Sie bilden das katalytische Zentrum der Polymerase und haben wichtige Funktionen bei NTP-Bindung und DNA-Kontakten (Gross *et al.*, 1996). Die beiden Untereinheiten zeigen eine hohe Homologie zu den größten Untereinheiten von eukaryotischen RNA-Polymerasen. Die Bereiche der Homologie sind geclustert über die gesamten Proteine verteilt. Für die β -Untereinheit wurden neun Bereiche gefunden, die von A-I benannt wurden.

Die Bindestelle für das Antibiotikum Rifampicin liegt in der Nähe der Bindestelle für die Initiationsnukleotide (Musteav *et al.*, 1994; Severinov *et al.*, 1995). Das Antibiotikum inhibiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen der ersten Nukleotide, hat jedoch keinen Einfluß auf die Elongation der Transkription (Schulz und Zillig, 1981; McClure und Cech, 1978). Außerdem konnte man folgende Regionen in der β -Untereinheit lokalisieren: Regionen am C-Terminus kontaktieren α - und β' -Untereinheit. Mutationen in der Mitte des Enzyms verändern Pausierungs- und Terminationseigenschaften der RNA-Polymerase. Desweiteren wurden eine Reihe von Mutationen in der β -Untereinheit gefunden, die die Reaktion auf Aminosäuremangel (stringente Kontrolle) betreffen (siehe auch 1.4.2).

Die β' -Untereinheit ist die größte Untereinheit der RNA-Polymerase. Hier findet man acht Bereiche hoher Homologie, die von A-H benannt sind. Am N-terminalen Bereich dieser Untereinheit befindet sich eine Zinkfinger Struktur, die ein DNA-Bindemotiv darstellt. Das Antibiotikum Streptoglydin, welches die Elongation beeinflusst, bindet an die β' -Untereinheit. Ebenfalls bildet die β' -Untereinheit mit der β -Untereinheit zusammen das katalytische Zentrum des Enzyms. Es wurden auch Mutationen gefunden, welche die Termination der Transkription beeinflussen. Darüberhinaus wurden durch Crosslinking-Untersuchungen Bereiche in der β' -Untereinheit detektiert, welche Kontakte zu der σ -Untereinheit bilden.

1.4.3 Die σ^{70} -Untereinheit

Die Erkennung des Core-Promotors wird durch die σ -Untereinheiten gewährleistet. Es gibt mindestens sieben alternative σ -Faktoren, die jeweils verschiedene Promotoren ablesen können (Gross *et al.*, 1992) und zu verschiedenen

Umweltbedingungen exprimiert werden. So gibt es spezielle σ -Faktoren, die bei stationärer Phase (σ^{38}) oder Hitzeshock (σ^{32}) synthetisiert werden. Der σ -Faktor für ‚Housekeeping‘ Gene ist σ^{70} . Dieser σ -Faktor wird für die Expression der Gene für die fundamentalen Zellfunktionen während der exponentiellen Wachstumsphase benötigt.

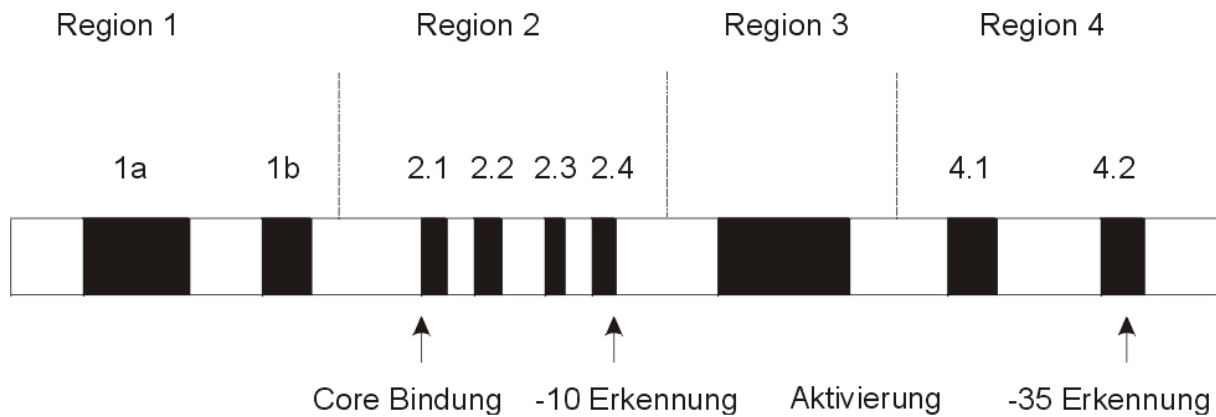


Abb. 1.3: Konservierte Bereiche des σ^{70} -Faktors

Die Abbildung zeigt sequenzkonservierte Bereiche des Initiationsfaktors vom σ^{70} -Typ mit deren Funktion

Der σ^{70} -Faktor ist eine sehr gut untersuchte Untereinheit und wird ebenfalls in mehrere konservierte Bereiche unterteilt, denen man bestimmte Funktionen zuordnen kann. So werden die Bindung an das Core-Enzym an die Bereiche 2.1, 2.2 und 3.1 beobachtet. DNA-Erkennungsdomänen konnte man ebenfalls lokalisieren. Dabei wechselwirkt die Region 2.4 mit der -10 Region und der Bereich 4.2 mit der -35 Region (Record *et al.*, 1996). Der σ -Faktor spielt ebenfalls eine Rolle im lokalen Öffnen des DNA-Doppelstrangs. Hier konnte die Region 2.3 als verantwortliche Komponente identifiziert werden (Juang und Helman, 1994). Die konservierte Region 3 scheint in der Nähe der Bindungsstelle der Initiationsnukleotide und des Transkriptionsstarts am Template-Strang positioniert zu sein (Severinov *et al.*, 1994). Der isolierte σ -Faktor bindet in Abwesenheit des Core-Enzyms nicht an die DNA, da die konservierte Region 1.1 die DNA Bindung inhibiert. Nach Deletion dieser Domäne ist die isolierte σ -Untereinheit zur DNA-Bindung fähig (Dombroski *et al.*, 1993).

1.4.4 Die dreidimensionale Struktur von Holo- und Core-Enzym

In den letzten Jahren wurden neue Ansätze zur Lösung der Struktur von RNA-Polymerasen entwickelt. Es wurden hochauflösende Strukturen mittels Röntgenkristallstruktur-Analysen und EM-Mikroskopie dargestellt. Diese geben detaillierte Einblicke in die Gesamtstruktur des Enzyms und den Mechanismus der Transkription bakterieller RNA-Polymerasen.

Die Gesamtform der RNA-Polymerase gleicht einer Krabbenklauen-ähnlichen Struktur, wobei der eine Arm der Schere von der β -Untereinheit und der andere Teil von der β' -Untereinheit gebildet wird. Zwischen diesen läuft ein Kanal mit einer Breite von 27 Å, welcher der Ort für die Interaktion mit der Template-DNA ist. Dort, wo die beiden Arme zusammenlaufen befindet sich das aktive Zentrum des Moleküls mit einem universell konservierten Mg^{2+} -Ion. Eine Struktur, die von der konservierten Domäne G der β -Untereinheit gebildet wird, ist die sogenannte ' β G-flap'. Diese Domäne ist flexibel verbunden mit dem Rest des Enzyms. Region F der β' -Untereinheit kontaktiert β -Untereinheit und bildet ein helikales Segment, welches die obere mit der unteren Seite des Kanals verbindet. Man nennt diese Helix die ' β 'F-bridging Helix'. Das aktive Mg^{2+} -Ion ist gegenüber der 'bridging Helix' an der Rückseite des Kanals positioniert. Die Helix teilt diesen Abschnitt in zwei separate Kanäle. Der kleinere der Kanäle ('secondary channel') hat einen Durchmesser von 12 Å und ist wahrscheinlich der Eintrittsort der Initiations-NTPs zum aktiven Zentrum der RNA-Polymerase. Im Hauptkanal liegt die DNA und das naszierende RNA-Transkript als verbundenes RNA-DNA Hybrid mit einer Länge von 9 Basenpaaren. Dabei liegt die DNA mit einer Gesamtlänge von 12 bp geöffnet in dem größeren Kanal.

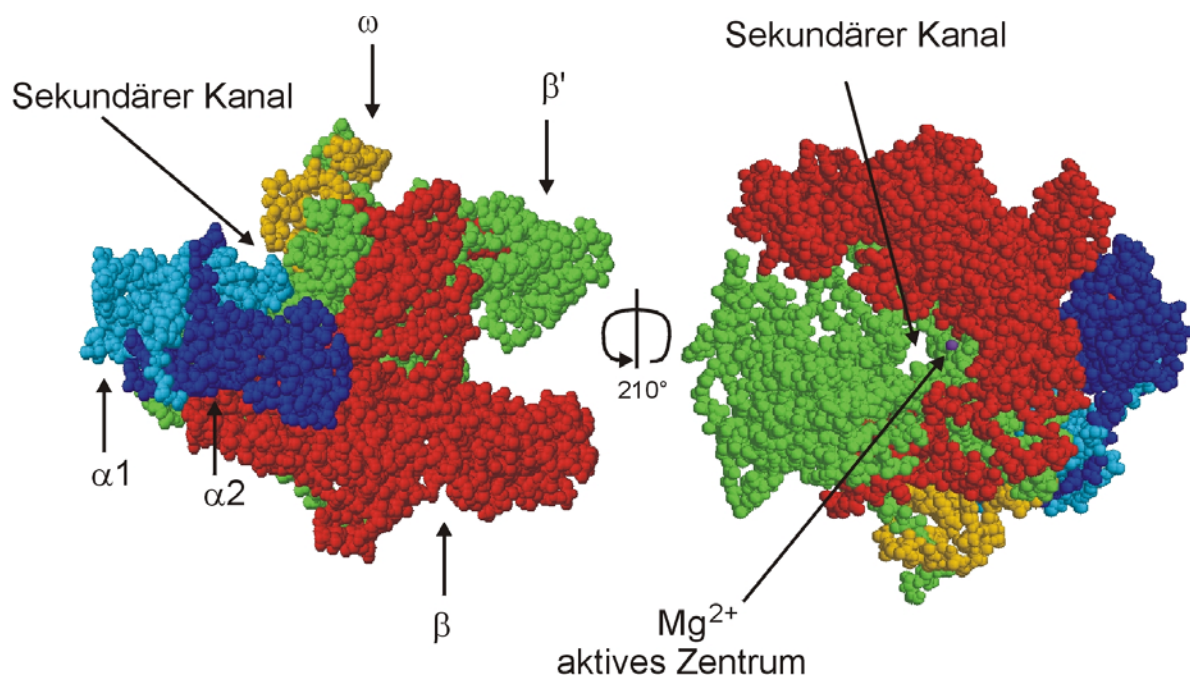


Abb. 1.4: Dreidimensionale Gestalt der 'core'-RNA-Polymerase.

Dargestellt ist die räumliche Struktur der RNA-Polymerase als 'core'-Enzym. Dabei sind die Untereinheiten farblich gekennzeichnet: Die α -Untereinheiten sind in blau eingefärbt und gekennzeichnet, die ω -Untereinheit in gelb, die β -Untereinheit in rot und die β' -Untereinheit in grün. Im linken Teil der Abbildung ist eine Aufsicht des Enzyms dargestellt. Der sekundäre Kanal verläuft hier verdeckt durch das Enzym (die Richtung ist markiert durch einen Pfeil). Im rechten Teil wurde das Enzym um 210° gedreht. Hier ist das aktive Zentrum mit dem konservierten Magnesium-Ion und der sekundäre Kanal markiert.

Schließlich konnte noch eine weitere Struktur aufgelöst werden, die sogenannte 'coiled coil' Struktur, die aus dem Hauptkanal in eine Schlaufenstruktur mündet, welche wie ein Ruder in den Hauptkanal ragt und zum Teil aus der konservierten β' -Untereinheit gebildet wird (' β' -C-rudder').

Aufgrund dieser Beobachtungen und weiterer experimenteller Daten wurde ein ternärer Elongationskomplex modelliert. Wie schon bereits erwähnt liegen 12 bp einer Duplex-DNA zwischen β' und β . Ein 9 bp langes RNA-DNA-Hybrid liegt im Hauptkanal, wobei sich das Hybrid von dem aktiven Zentrum bis zum ' β' -C-rudder' erstreckt. Die einzelsträngige RNA wird aus dem Komplex durch den Kanal unter der ' β G-flap' Domäne herausgeschleust. Die aufgeschmolzenen Stränge der DNA in der Transkriptionsblase werden durch Domänen der β -Untereinheit voneinander getrennt. Dieser Komplex unterscheidet sich von den Initiationskomplexen, da sie in Anwesenheit von σ existieren. Die Arme der Krabbenklauen-Struktur scheinen im Initiationskomplex im Vergleich zum Elongationskomplex weiter geöffnet zu sein, desweiteren induziert die σ -Bindung noch starke Konformationsänderungen in β und β' . Die σ -Wechselwirkung erstreckt sich stärker auf β' als auf β . Wahrscheinlich gibt es keine Wechselwirkungen zwischen α und σ (Finn *et al.*, 2000).

1.5 Die Phasen der Transkription

Der gesamte Prozess der Transkription kann in drei Phasen unterteilt werden. Dabei unterscheidet man zwischen Initiation, Elongation und Termination. Als Initiation bezeichnet man den Beginn der Transkription. Hier nimmt die RNA-Polymerase Kontakt zum Promotor auf, bildet charakteristische Promotorkomplexe und leitet die Transkription ein. Die Initiation wird beendet, wenn der σ -Faktor abgespalten wird und die RNA-Polymerase den Promotor verläßt. Man spricht dabei von 'promoter clearance', die den Beginn der Elongation bezeichnet. Diese ist durch die Bildung von produktiven Transkripten entlang des Templates gekennzeichnet. Die Elongationsphase wird beendet durch die Termination. Hierbei erreicht die RNA-Polymerase spezielle Elemente auf der DNA, welche die Dissoziation des Enzyms induzieren.

1.5.1 Initiation der Transkription

Die Initiationsphase kann in mindestens vier verschiedene Schritte unterteilt werden. Diese Phasen sind gekennzeichnet durch die Bildung verschiedener Polymerase-Promotor-Komplexe, welche zum Teil voneinander isoliert und analysiert werden können. Zu Beginn der Initiation liegen die Komponenten voneinander getrennt vor, die RNA-Polymerase als Holoenzym und das Transkriptionstemplate als DNA-Doppelstrang. Im ersten Schritt nimmt die RNA-Polymerase Kontakt mit den Promotorelementen auf, es wird ein erster geschlossener Komplex (RP_{c1}) gebildet. Man nennt diesen Komplex geschlossen, da der DNA-Doppelstrang noch nicht

aufgeschmolzen ist. Hierbei bedeckt die RNA-Polymerase einen Bereich von ca. 60 bp, der sich von Position -55 bis $+5$ erstreckt (Meccas *et al.*, 1991). In diesem Komplex kommt es wahrscheinlich noch nicht zu Wechselwirkungen zwischen σ und den Transkriptionsstartstellen. Nachfolgend kommt es zu Komplexveränderungen, die eine Ausweitung des bedeckten Bereichs zur Folge haben (Nukleation). Man spricht von einem intermediären Promotorkomplex (RP_{c2}), welcher sich von -55 bis $+20$ erstreckt (Spassky *et al.*, 1985, Record *et al.*, 1996).

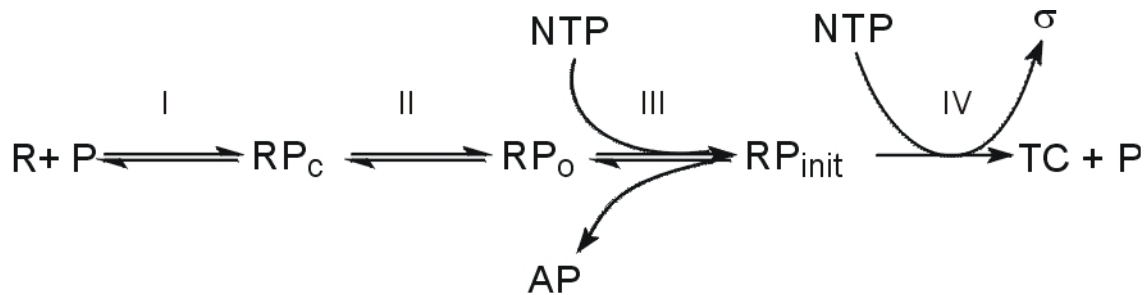


Abb. 1.5: Initiation der Transkription bei Prokaryoten (verändert nach Record *et al.*, 1996)

R= RNA-Polymerase; P= Promotor; RP_c = geschlossener Komplex; RP_o = binärer offener Komplex; RP_{init} = ternärer Initiationskomplex; TC= ternärer Elongationskomplex; AP= abortive Produkte; NTP= Nukleotide. Vereinfacht werden die geschlossenen Komplexe RP_{c1} und RP_{c2} in RP_c zusammengefaßt.

Anschließend kommt es zu lokalen Veränderungen der RNA-Polymerase, die ein Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges zur Folge hat. Dabei wird die DNA über eine Länge von ca. 14 bp (-12 bis $+2$) aufgeschmolzen, der von der Polymerase abgedeckte Bereich ändert sich dabei nicht (Sasse Dwight und Gralla, 1989). Dieser Komplex wird binärer offener Initiationskomplex (RP_o) genannt, da hier die DNA einzelsträngig im Komplex vorliegt. Dieser Komplex ist bei den meisten Promotoren, im Gegensatz zu den geschlossenen Promotorkomplexen, heparinstabil. In diesem Komplex wechselwirkt σ spezifisch mit dem Nichtmatritzenstrang (Roberts und Roberts, 1996), der Matritzenstrang ist zugänglich für Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum der Polymerase und für Basenpaarungen mit den Initiationsnukleotiden. Die Bindung der Initiationsnukleotide führt zum ternären Initiationskomplex (RP_{init}), welcher bis zum Einbau des dritten Nukleotids strukturell keine Unterschiede zu den binären Komplexen aufweist (Spassky, 1986; Newlands *et al.*, 1991). Ab dem Einbau des dritten Nukleotids kann eine stromabwärts-Bewegung der RNA-Polymerase beobachtet werden. Nach Einbau der ersten Nukleotide gibt es zwei Wege, die die RNA-Polymerase beschreiten kann: Die abortive Initiation und die produktive Bildung eines Elongationskomplexes. Als abortive Initiation bezeichnet man die Bildung von kurzen Transkripten (ca. 2-12 Nukleotide), ohne daß die RNA-Polymerase den Promotor verläßt. Die Transkripte werden entlassen und der Komplex reagiert zurück zur Stufe des binären offenen Komplexes (RP_o). Über den Schritt des sogenannten ‚abortiven cyclings‘ kann die ‚promoter escape‘ reguliert

werden, das heißt, daß unter diesen Bedingungen die Bildung des offenen Komplexes nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sondern daß das Ausmaß der abortiven Produktbildung den Übergang in die Elongationsphase bestimmen kann. Als Beispiel für ein Transkriptionssystem mit starker abortiver Transkription ist hier der lacUV5 Promotor zu nennen (Straney und Crothers, 1985). Wird ein Transkript mit einer Länge von über 12 Nukleotiden gebildet, wird σ entlassen und die RNA-Polymerase durchläuft Konformationsänderungen. Es entsteht ein Elongationskomplex, welcher sich sowohl strukturell, als auch in der Prozessivität von den Initiationskomplexen unterscheidet. Neuere Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, daß der Initiationsfaktor σ nicht notwendigerweise während der ‚promoter escape‘ entlassen wird, sondern an der Polymerase assoziiert bleiben kann (Mukhopadhyay *et al.*, 2001).

1.5.2 Elongation

Während der Elongation transkribiert das Core-Enzym mit hoher Prozessivität den Templatestrang mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 50 Nukleotiden/Sekunde. Die Konformation des Elongationskomplexes ist ebenfalls unterschiedlich zu der Konformation der Initiationskomplexe. Die Transkriptionsblase umfaßt ca. 18 Nukleotide und die RNA-Polymerase bedeckt einen Bereich von ca. 30 Basenpaaren. Dabei stehen sowohl die flankierenden doppelsträngigen Sequenzen als auch der transient geöffnete Bereich mit der RNA-Polymerase in Kontakt (Kainz und Roberts, 1992), wobei auch Wechselwirkungen zu dem nicht-Matritzenstrang detektierbar sind (Ring und Roberts, 1994). Darüberhinaus ist der Templatestrang in der Transkriptionsblase mit dem 3'-Ende der nascierenden RNA-Kette hybridisiert. Das aktive Zentrum mit der terminalen 3'-OH Kette der RNA befindet sich nahe am downstream-Ende der Transkriptionsblase. Das RNA-DNA Hybrid hat im Elongationskomplex wahrscheinlich eine Länge von 8 Basenpaarungen (Nudler *et al.*, 1997). Am upstream-Ende des Komplexes wird das wachsende RNA-Transkript herausgeschleust.

Im Rahmen der Elongation wurden ebenfalls regulatorische Mechanismen beobachtet. Die Elongation ist kein kontinuierlicher Prozess, sondern kann durch teilweise lange Pausen unterbrochen werden (Kassavetis und Chamberlin, 1981; Artsimovitch *et al.*, 2000). So ist bekannt, daß bei stark transkribierten Genen eine Verlängerung der Pausierung zu einem Auflaufen der Polymerasen führt und dadurch die Konzentration von freier RNA-Polymerase in der Zelle gesenkt werden könnte, da Elongationskomplexe sehr stabil sind und Pausenverlängerungen nicht zu einer verfrühten Termination führen. Als Beispiel ist hier zu nennen, daß die Elongation im Leaderbereich des *rrnB* Operons in Gegenwart von ppGpp zu verstärkter Pausierung an definierten Stellen führt (Kingston und Chamberlin, 1981;

Krohn und Wagner, 1996). Dadurch kann es zu Rückstauungsphänomenen kommen, die zu sterischer Inhibierung von Initiationsereignissen führen könnten. Dabei scheint die Dauer und Position der Pause vom Promotorkontext abzuhängen, da bei Veränderung des Promotorhintergrundes aber gleichbleibender Elongationssequenz eine veränderte Pausierungssensitivität in Gegenwart von ppGpp bei nichtsensitiven Promotoren auftreten kann (Krohn und Wagner, 1996). Die Veränderung des Pausierungsverhaltens im Rahmen der stringenten Kontrolle scheint daher ebenfalls ein Mechanismus zu Regulation der Transkription zu sein.

1.5.3 Termination

Die Termination beschreibt das Ende der Transkription, die Core-Polymerase dissoziiert von der Matrizen-DNA ab und das fertige Transkript wird entlassen. In *E. coli* sind zwei Arten der Termination bekannt: Die intrinsische oder Rho-unabhängige Termination und die Rho-abhängige Termination.

Rho-unabhängige Terminatoren besitzen gemeinsame Sequenzmotive: Ein zweigeteiltes GC-reiches Symmetrieelement gefolgt von einer oligo-T Sequenz (d'Aubenton Carafa *et al.*, 1990). Das naszierende Transkript bildet eine stabile Haarnadelstruktur mit 7-15 Basenpaaren aus, gefolgt von 3-8 Uridin-Basen. Die Haarnadelstruktur provoziert dabei eine lange Pause des Elongationskomplexes. Dabei korreliert die Pausenstärke direkt proportional zu der Stabilität des Hairpins. Zusätzlich codiert der Templatestrang eine Sequenz von 3-8 Uracil-Resten, welche den Elongationskomplex destabilisieren (Brendel *et al.*, 1986). Man geht davon aus, daß die Haarnadelstruktur das RNA/DNA-Hybrid verkürzt und die instabilen AU-Basenpaare den Komplex weiter destabilisieren, so daß es zu einem Entlassen des Transkriptes kommt (Yager und von Hippel, 1991). Intrinsische Terminatoren findet man bei 50% aller Terminationsereignisse. Beim *rnnB* Operon findet man sogar zwei Rho-unabhängige Terminatoren hoher Effizienz hintereinandergeschaltet. Dabei schreibt man den einzelnen Terminatoren *in vivo* unterschiedliche Terminationsaktivitäten zu: Für den isolierten T1 Terminator findet man eine Effizienz von 87%, der T2 hingegen beendet 100% aller Transkriptionen (Orosz *et al.*, 1991).

Faktorabhängige Terminatoren besitzen, im Gegensatz zu intrinsischen Terminatoren, keine destabilisierende DNA-Sequenzelemente. Die Termination wird katalysiert durch den Terminationsfaktor Rho. Die Destabilisierung des Elongationskomplexes wird vermittelt durch die Helikaseaktivität des Rho-Faktors (Walstrom *et al.*, 1997). Rho erkennt als Hexamer C-reiche Abschnitte auf dem Transkript. Der auf der codierenden DNA stromaufwärts liegende Bereich (ca. 70 bp lang) codiert für einen unstrukturierten Bereich im RNA-Transkript. An diese Region des Transkripts bindet Rho und bewegt sich aufgrund seiner ATPaseaktivität auf dem 3'-Ende entlang. Die Helikaseaktivität des Terminationsfaktors führt dann zur

Trennung des RNA/DNA-Hybrids, welches zur Dissoziation des Elongationskomplexes und Freisetzung des RNA-Transkripts führt (Jin *et al.*, 1992; Walstrom *et al.*, 1996). Als Beispiel für Rho-abhängige Terminatoren an ribosomalen Operons ist das Beispiel *rnnG* zu nennen. *rnnG* besitzt sowohl intrinsische als auch Rho-abhängige Terminatoren, wobei *in vivo* die Rho-abhängigen Terminatoren eine hohe Terminationseffizienz besitzen (96%), auch in Abwesenheit der intrinsischen Terminatoren (Albrechtsen *et al.*, 1990).

1.6 Stringente Kontrolle und Wachstumsratenregulation

Bakterien adaptieren ihr Wachstum an die herrschenden Umweltbedingungen. Adaptierung in diesem Zusammenhang bedeutet die Änderung der Genexpression entsprechend den Erfordernissen der Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Änderung der Transkriptionsaktivität ribosomaler RNA Gene untersucht.

Zwei globale Regulationsmechanismen sind die Wachstumsratenregulation und die stringente Kontrolle. Beide stehen in engem Zusammenhang mit den Effektormolekülen Guanosinpentaphosphat und Guanosintetraphosphat und besitzen vermutlich mechanistische Parallelen. Beide Moleküle wirken als Inhibitoren der ribosomalen RNA Synthese. Im Folgenden wird die Regulation der Synthese und ihre Wirkung auf die Zelle erläutert.

1.6.1 Wachstumsratenregulation

Als Wachstumsratenregulation bezeichnet man die Anpassung der Ribosomenbiosynthese an die Wachstumsphase, das heisst, daß die Synthese der stabilen RNA dabei annähernd im Quadrat zur Wachstumsrate ansteigt (Gausing, 1977; Nierlich, 1978). Bei dieser Regulation wird eine Rolle des Effektornukleotids ppGpp diskutiert (Barrachini and Bremer, 1988). Die Synthese des Effektors wird im Gegensatz zur stringenten Kontrolle vorwiegend durch das Gen *spoT* (Hernandez und Bremer, 1991) gewährleistet, welches durch Anwesenheit die Synthese der stabilen RNAs in späten Wachstumsphasen reduziert.

Ein weiteres Modell für einen Regulationsmechanismus, ist die Steuerung der Synthese stabiler RNAs durch die Konzentration der Initiations-NTPs (Gaal *et al.*, 1997). Dabei wird postuliert, daß die Konzentrationen von ATP und GTP, welche die Initiationsnukleotide der *rnn* P1-Promotoren sind, mit steigender Wachstumsrate ebenfalls ansteigen. Diese erhöhte Konzentration stabilisiert die Initiationskomplexe, welches durch *in vitro* Analysen bestätigt wurde (Gaal *et al.*, 1997). Durch die erhöhte Stabilität der Initiationskomplexe wird die Wahrscheinlichkeit des Komplexes, produktive Transkripte zu synthetisieren gesteigert. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die Konzentration der Initiationsnukleotide nicht von der Wachstumsrate beeinflusst wird, sondern relativ konstant bleibt (Petersen und Moller, 2000). Die Rolle

der Initiationsnukleotide bei der Produktbildung ist jedoch unbestritten. Diese Art der Regulation wird im Zusammenhang mit der stringenten Kontrolle noch diskutiert.

Die Regulation über die Effektormoleküle pppGpp und ppGpp ist nicht die alleinige Regulation, die Synthese ribosomaler RNAs wird darüberhinaus über eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Als Beispiele sind hier die Transkriptionsfaktoren H-NS und FIS zu nennen, deren Expressionsniveaus über die Wachstumsrate verschieden reguliert werden und die einen direkten Einfluss auf die Transkription ribosomaler RNAs ausüben. Die Expression von FIS (factor for inversion stimulation) als stimulierenden Transkriptionsfaktor erfolgt parallel zur Wachstumsphase. So steigt die Konzentration der FIS-Dimere auf etwa 20000 Dimere pro Zelle bei frühen Wachstumsphasen an, erreicht jedoch ein Minimum in der stationären Phase (Nilsson *et al.*, 1992). Im Gegensatz hierzu wurde die Konzentration von H-NS (histone-like nucleoid structuring protein), einem reprimierendem Transkriptionsfaktor, als invers korrelierend zur Wachstumsphase ermittelt. Bei stationärer Phase erreicht die H-NS Konzentration ein Maximum von etwa 20000 bis 100000 Molekülen pro Zelle (Afflerbach *et al.*, 1998). Beide Transkriptionsfaktoren beeinflussen direkt die Synthese ribosomaler RNAs.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß ppGpp nicht die alleinige Rolle bei der wachstumratenabhängigen Regulation einnimmt, ist, daß eine ppGpp-Nullmutante noch immer einen regulierten Phänotyp zeigt (Gaal und Gourse, 1990). Jedoch ist eine Veränderung der ppGpp-Konzentration invers zur Wachstumsrate zu beobachten, welches mit der Inhibierung der stabilen RNA Synthese ebenfalls übereinstimmt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß, obwohl ppGpp nicht der alleinige Regulator der Wachstumsratenregulation ist, es jedoch als wichtige Komponente des Regulationssystems der Synthese ribosomaler RNA angesehen werden muß.

1.6.2 Stringente Kontrolle

Als stringente Kontrolle bezeichnet man die Reaktion der Zelle auf die Verarmung von frei verfügbaren Aminosäuren. Dabei reagiert die Zelle durch Inhibierung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese sowie Aktivierung von Proteinabbau und Aminosäuresynthese. Als auffälligste Reaktion des Aminosäuremangels wird eine unmittelbare Inhibierung der ribosomalen RNA Synthese um ca. 90 % beobachtet. Dies führt zu einem unmittelbarem Stop in der Ribosomenbiosynthese. Gene, die der Zelle helfen den Aminosäuremangel zu kompensieren, werden dagegen aktiviert. Als Beispiele hierfür sind die Aminosäuresynthesegene *his* und *trp* zu nennen. Die Aktivierung der Transkription dieser Gene erfolgt jedoch wahrscheinlich passiv (Barker *et al.*, 2001; Choy, 2000), das heißt, daß die Transkriptionsaktivierung eher durch eine Umverteilung der RNA-Polymerasen erfolgt. Die RNA-Polymerasen, die

nicht mehr an den negativ kontrollierten Promotoren produktiv initiieren können, werden frei und können nun an den positiv stringent kontrollierten Promotoren binden. Es ist also keine Affinitätssteigerung der RNA Polymerasen zu beobachten, lediglich die Konzentration der freien RNA Polymerasen wird im Zuge der stringenter Kontrolle erhöht.

Eine weitere Auswirkung des Aminosäuremangels ist die Aktivierung von bestimmten Proteasegenen wie das *lon*-Gen, welches zur einer Erhöhung der Konzentration freier Aminosäuren führt. Weitere Effekte wie zum Beispiel die Inhibierung der Aminoacylsynthetasen oder Verbesserung der Genauigkeit der Translation führen zur Erhöhung des Aminosäurepools der Zelle. Ebenfalls ist eine Veränderung des Nukleotidpools zu beobachten. Dies betrifft im Wesentlichen die Nukleotide ATP und GTP (Gallant und Harada, 1969). Hierbei ist eine rasche Erniedrigung der Konzentration um ca. 50 % direkt als Folge des Auslösens der stringenter Kontrolle zu beobachten. Ein Grund für die Verknappung von ATP und GTP ist die Inhibierung der *de novo* Synthese von Guanylat und Adenylat, die als Vorstufen für die Nukleotidsynthese von ATP und GTP fungieren (Gallant und Harada, 1969, Gallant *et al.*, 1971, Hou *et al.*, 1999). Hierbei hat ppGpp einen direkten Effekt auf die Enzyme Adenylsuccinat-Synthetase und IMP-Dehydrogenase, welche die *de novo* Synthese katalysieren. Hauptverantwortlich für die Verknappung ist jedoch die Synthesereaktion des pppGpp und ppGpp. Hierbei dienen ATP und GTP als Substrate. Es wurde beobachtet, daß die Konzentration von pppGpp und ppGpp im Sekundenbereich nach Auslösen der stringenter Kontrolle bis in den millimolaren Konzentrationsbereich ansteigt. Der Mechanismus der Synthese ist weitgehend aufgeklärt. Die Synthese im Rahmen der stringenter Kontrolle wird im Gegensatz zur Wachstumsratenregulation durch den ribosomenassoziierten Faktor RelA vermittelt. Diese Reaktion wird ausgelöst, wenn als Folge von Aminosäuremangel unbeladene tRNAs in der A-Site des Ribosoms binden (Haseltine und Block, 1973). RelA phosphoryliert enzymatisch GTP, wobei ATP als Diphosphat-Donor dient. SpoT wirkt als Hydrolase und als Synthetase unter Wachstumsratenbedingungen (siehe Abbildung 1.6) und ist hauptverantwortlich für den Abbau des ppGpp nach Überwindung des Aminosäuremangels.

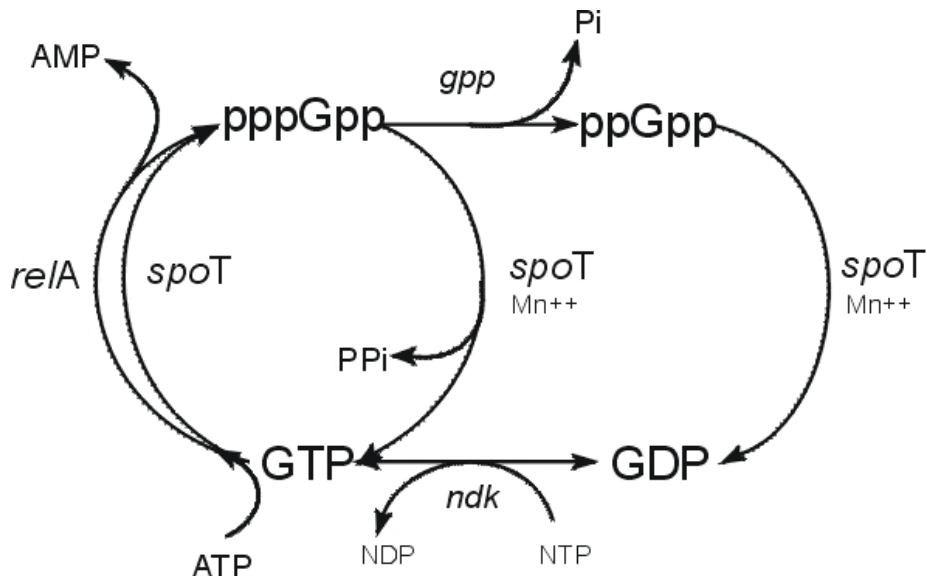


Abb. 1.6: Syntheseweg des Guanosintetraphosphats (verändert aus Cashel *et al.*, 1998). Gezeigt ist der Metabolismus des ppGpp in *E. coli*. Alle Enzyme, die an der Synthese beteiligt sind, werden durch ihre Gene repräsentiert: ndk: Nukleosid-5'-diphosphat Kinase; gpp: pppGpp 5'-Phosphohydrolase.

In vivo Untersuchungen an dem *rnnB* Operon zeigten, daß die Transkription des P1 Promotors stark, jedoch des P2 Promoter nur schwach inhibiert wird (Glaser *et al.*, 1983; Kajitani und Ishihama, 1984, Sarmientos *et al.*, 1983; Liebig und Wagner, 1995). Der Mechanismus dieser Inhibierung ist noch relativ unklar. Es wurde gezeigt, daß ppGpp die Dissoziation der offenen RNA-Polymerase-Promotorkomplexen der ribosomalen Proteinpromotoren *rplJ* und *rpsA* induziert (Raghavan und Chatterji, 1998). Barker *et al.* (2001) wiesen eine Destabilisierung der offenen Promotorkomplexe für eine Vielzahl von Promotoren nach, auch Promotoren, welche nicht unter stringenter Kontrolle stehen. Sie führen die spezifische Wirkung des ppGpp auf den instabilen Charakter der ribosomalen P1 Promotorkomplexe zurück, deren Halbwertszeiten im Sekundenbereich liegen. Die Initiation kann an solchen Promotoren nur erschwert produktiv erfolgen, da in dem Zeitbereich, den die RNA-Polymerase braucht um einen Elongationskomplex zu bilden, die Dissoziation stark bevorzugt ist. Im Gegensatz hierzu bilden nicht sensitive Promotoren stabile Komplexe mit Halbwertszeiten im Minutenbereich, die jedoch in dieser Zeit, auch in Gegenwart von ppGpp, produktive Elongationskomplexe bilden können.

Die Frage nach dem Mechanismus der ppGpp vermittelten Wirkung ist jedoch immer noch nicht zur Zufriedenheit geklärt. Als ausreichend gesichert kann die RNA-Polymerase als Zielort der Regulation angesehen werden. Dies wird untermauert durch die Entdeckung von RNA-Polymerase Mutanten, welche einen relaxierten Phänotyp zeigen, also während Aminosäuremangels nicht durch starke Inhibierung der stabilen RNA Synthese reagieren. Diese Mutationen wurden lokalisiert in den Genen *rpoB* (Little *et al.*, 1983, Nene und Glass, 1983, Tedin und Bremer, 1992)

welches für die β -Untereinheit codiert und *rpoD* (Hernandez und Cashel, 1995), welches für die σ^{70} -Untereinheit codiert. Es wurden ebenfalls Mutationen in der β -Untereinheit gefunden, welche in Abwesenheit von ppGpp einen stringenten Phänotypen hervorriefen (Zhou und Jin, 1998). Um diese Theorie noch weiter zu erhärten, wurden in Crosslink-Experimenten ppGpp-Analoga mit der RNA-Polymerase verbrückt. Hier wurden Bindungen an die β - und β' - Untereinheit in der Nähe der Rifampicin-Bindestelle gefunden (Reddy *et al.*, 1995, Touloukhonov *et al.*, 2001). Dies legt die Vermutung nahe, daß ppGpp an eine Bindestelle bindet, welche von den β -, β' - und σ^{70} - Untereinheiten gebildet wird. Eine direkte Bindung von nativem ppGpp konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine instabile, transiente Wechselwirkung sein.

1.6.3 Regulationsmodelle

Aufgrund der spezifischen Wirkung von Guanosintetraphosphat auf die Transkription bestimmter Gene werden eine Reihe von Regulationsmodellen diskutiert. Zu den neueren Modellen gehört sicherlich die Regulation über die Konzentration der Initiationsnukleotide, die bereits schon vorher erwähnt wurde (Gaal *et al.*, 1997). Für die Wachstumsratenregulation wurde bereits gezeigt, daß die Nukleotidkonzentration sich nicht mit der Wachstumsphase ändert (Petersen und Moller, 2000), sondern relativ konstant bleibt. Diese Regulation könnte jedoch durchaus eine Rolle bei der Stringenten Kontrolle spielen, da sich hier die Konzentration der Initiationsnukleotide signifikant ändert (siehe auch 1.6.2.).

Ein weiteres Modell ist das sogenannte ‚partition model‘ (Travers *et al.*, 1980; Ryals *et al.*, 1982). Nach diesem Modell liegen zwei Populationen von RNA-Polymerasen vor, welche durch ppGpp reversibel ineinander überführbar sind. Danach initiieren RNA-Polymerasen, die durch ppGpp verändert wurden, bevorzugt an mRNA-Promotoren. Polymerasen in Abwesenheit von ppGpp binden dagegen an stabile RNA-Promotoren. Eine Verschiebung der ppGpp Konzentration beeinflusst daher den Anteil der veränderten Polymerasen, so daß bei hohen ppGpp Konzentrationen nur noch Polymerasen an mRNA-Promotoren binden. Das ‚partition model‘ gilt daher sowohl für Wachstumsratenregulation als auch für stringente Kontrolle.

Ein drittes Modell zielt auf die Einflüsse von ppGpp auf die Elongation der Transkription im ‚leader‘-Bereich der ribosomalen Operons (Kingston und Chamberlin, 1981; Krohn und Wagner, 1996; siehe auch 1.5.2.). Eine durch ppGpp verursachte Verstärkung der Pausierung kann zu Rückstauungen der transkribierenden RNA-Polymerasen bis hin zu einer sterischen Inhibierung der Initiation führen.

Ein viertes Modell zu Elongationsveränderungen durch ppGpp ist das sogenannte ‚RNA chain elongation‘ Modell (Jensen und Pedersen, 1990). Hierbei führte die

Beobachtung, daß die Elongation von mRNA-Genen durch ppGpp verlangsamt wird (Vogel und Jensen, 1994; 1995), zu der Vorstellung, daß die Konzentration freier RNA-Polymerasen in Gegenwart von ppGpp sinkt, da die Polymerasen durch verzögerte Elongationsprozesse gebunden werden. Da die Verfügbarkeit von initiationsfähigen RNA-Polymerasen limitiert ist, werden zuerst solche Gene transkribiert, deren Promotoren leicht zu sättigen sind. Die Promotoren von stabilen RNA-Genen sind nach Jensen und Pedersen schwer zu sättigen, somit wirkt ppGpp indirekt auf die Initiation von *rrn* Promotoren, indem es die Konzentration der freien RNA-Polymerasen senkt.

Ein weiterer Regulationsmechanismus ohne die Beteiligung von ppGpp ist die sogenannte ‚feedback‘-Kontrolle. Diese Regulation wird jedoch überwiegend auf die wachstumsratenabhängige Regulation angewandt. Hierbei geht man von der Vorstellung aus, daß die Produkte der rRNA-Transkription direkt ihre eigene Neusynthese inhibieren. Gendosisexperimente, bei denen zusätzliche plasmidkodierte *rrn*-Operons in die Zellen eingeführt wurden, zeigten, daß die Konzentration der rRNA nur geringfügig anstieg (Jinks-Robertson *et al.*, 1983). Dabei wird von einer Rückkopplung durch überschüssige Ribosomen anhand ihrer freien Translationsaktivität ausgegangen (Cole *et al.*, 1987; Yamagishi *et al.*, 1987). Man spricht ppGpp die Beteiligung an dieser Regulation ab, da in ppGpp Nullmutanten ebenfalls eine Regulation der Ribosomensynthese beobachtet werden konnte (Gaal und Gourse, 1990). Neuere Befunde zeigen jedoch, daß in diesen Stämmen die Konzentration und Aktivität der RNA-Polymerase beeinflusst werden, und nicht das Verhältnis von stabiler zur Gesamt-RNA durch die Wachstumsraten verändert wird (Hernandez und Bremer, 1993).

1.7 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Regulation der Transkriptionsinitiation von stabilen rRNA Promotoren im Rahmen der stringenten Kontrolle.

Es war bekannt, daß ppGpp einen Einfluß auf die Elongation der Transkription stabiler rRNA hat. Dabei sind die spezifischen Effekte abhängig vom Promotorumgebung. Diese Effekte reichen jedoch nicht aus, um den unmittelbaren Stop der Neusynthese nach Start der stringenten Kontrolle *in vivo* zu erklären. Dabei steht die RNA-Polymerase als Zielort fest, da eine Wechselwirkung von ppGpp mit verschiedenen Untereinheiten gefunden wurden. Die Art der Wechselwirkung ist jedoch noch ungeklärt, da immer nur ppGpp Analoge mit der RNA-Polymerase verbrückt werden konnten. Eine stabile Bindung von nativem ppGpp konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

In dieser Arbeit soll die Initiation der Transkription an ribosomalen RNA-Promotoren untersucht werden, um den Mechanismus der ppGpp vermittelten Inhibierung der

Synthese weiter aufzuklären. Weiterhin soll untersucht werden, wie zwischen stringent kontrollierten und nicht kontrollierten Promotoren unterschieden wird. Dabei soll eine Analyse der Eigenschaften verschiedener Promotoren durchgeführt werden, da seit längerem ein Zusammenhang zwischen Komplexstabilitäten und stringenter Antwort diskutiert wird.

Die vorliegende Arbeit ist in drei Teile unterteilt. Im ersten Teil soll ein *in vitro* Transkriptionssystem benutzt werden, welches spezifische Effekte durch ppGpp nachweist. Dabei werden stringent regulierte und nicht-regulierte Promotoren betrachtet. Im zweiten Teil sollen RNA-Polymerase DNA-Komplexe untersucht werden, sowohl durch ‚footprint‘-Techniken, welche Aussagen über Struktur und Stabilitäten der Komplexe liefern, als auch durch Gelretardierungsstudien, ‚footprints‘ und Transkriptanalysen, die Änderungen der Komplexbildungskinetiken detektieren sollen. Initiationskinetiken sollen ebenfalls durch Transkriptanalysen ermittelt werden, welche präzisere Aussagen über den Zeitverlauf der Reaktion liefern. Schließlich sollen funktionelle ppGpp Analoge in verschiedenen Experimenten getestet werden, um den ppGpp vermittelten Mechanismus der Inhibierung in einem Modell zu formulieren.

2 Ergebnisse:

2.1 Der Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die Transkription stringent regulierter und nicht regulierter Promotoren in *E. coli*.

2.1.1 Problemstellung und Experimenteller Ansatz

Die Effekte von ppGpp auf die Transkription ribosomaler Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit an den ribosomalen P1 Promotoren des *rrnB* und *rrnD* Operons ermittelt. Es wurden diese Promotoren gewählt, da der *rrnB* P1 Promotor als Prototyp für stringent kontrollierte Promotoren angesehen wird und schon eine beträchtliche Anzahl von Untersuchungen zu diesem Promotor existieren. Der *rrnD* Promoter wurde benutzt, da er, im Unterschied zu allen anderen ribosomalen Promotoren, mit GTP anstelle von ATP startet. Dies sollte den Einfluß unterschiedlicher Initiationsnukleotide auf die Inhibierung klären. Als Kontrollpromotor wurde der nicht ppGpp sensitive Ptacl Promotor benutzt (deBoer *et al.*, 1983). Dieses synthetische Konstrukt besitzt die ideale Konsensussequenz der –35 und –10 Region, nur die Spacerlänge weicht mit 16 bp von der idealen Promotorsequenz ab.



Abb. 2.1: DNA-Sequenzen der untersuchten Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und Ptacl. Dargestellt sind die Kernsequenzen der Promotoren, hervorgehoben sind die –35 Region, die –10 Region, der Diskriminator und der Promotorstart. Für den *rrnB* P1-Promotor ist ein alternativer *in vitro* Start an Position –3 beschrieben und gekennzeichnet.

Es wurden sowohl lineare Transkriptionsmatritzen, als auch superhelikale Templates benutzt, da diese eher den *in vivo* Bedingungen entsprechen. Für die rRNA P1 Promotoren wurde nur ein Transkriptionssystem mit superhelikalen Templates beschrieben, welches ppGpp Effekte zeigte (Barker *et al.*, 2001). Dieses System

arbeitet unter Hochsalzbedingungen, ist also weit entfernt von den *in vivo* herrschenden Bedingungen. Ältere Analysen mit superhelikalen Templates zeigten keinerlei Inhibierung, selbst unter hohen ppGpp Konzentrationen (Chatterji *et al.*, 1998; Ohlsen und Gralla, 1992).

Die Transkriptionssysteme wurden der Problemstellung angepaßt. Es wurde ebenfalls eine Analyse der Transkriptionssysteme durchgeführt, da nicht bekannt war, inwiefern das Standardverfahren der 'multiple round' Transkription in der Lage ist, mehrere Initiationsvorgänge der RNA-Polymerase pro Template zu gewährleisten. Dazu wurde 'multiple round' mit 'single round' Systemen verglichen. Hierbei wurde eine qualitative und quantitative Analyse der Syntheseprodukte durchgeführt. Diese Erkenntnisse wurden benutzt um die ppGpp-Wirkkonzentrationen auf die verschiedenen Promotoren zu ermitteln. Weiterhin wurde der Einfluß von verschiedenen Nukleotidkonzentrationen auf die Inhibierung durch ppGpp getestet.

2.1.2 Experimentelle Vorgehensweise

2.1.2.1 Präparation von Transkriptionskomponenten

2.1.2.1.1 Isolierung der *in vitro* Transkriptionsmatrizen

Es wurden standardmäßig lineare DNA-Fragmente der Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und Ptacl benutzt. Dabei wurden für *in vitro* Transkriptionen ausschließlich Fragmente mit glatten Enden benutzt, um eine unspezifische Endbindung der RNA-Polymerase, die vor allem an überhängende Enden beschrieben ist, auszuschließen (Kadesch und Chamberlin, 1982; Melancon *et al.*, 1983). Hierzu wurden entweder Restriktionen mit Enzymen durchgeführt, welche glatte Enden erzeugen, oder 5'-überhängende Enden wurden mittels Klenow-Polymerase und [α ³²P] NTPs aufgefüllt. Für Gelretardierungsanalysen wurden Fragmente mit 5'-überhängenden Enden isoliert, welche anschließend mittels Auffüllreaktion durch Klenow-Polymerase radioaktiv markiert wurden.

Experiment	DNA	Vektor	Restriktionsenzyme	Position	Länge
IVT	<i>rrnB</i> P1	pUC18-1	<i>Ecl</i> 136, <i>Hinc</i> II	-183 bis +63	256 bp
	<i>rrnD</i> P1	pHD1D	<i>Eco</i> RI	-259 bis +316	575 bp
	Ptacl	pTacW	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	-223 bis +180	403 bp
Retardierung	<i>rrnB</i> P1	pUC18-1	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI	-183 bis +63	256 bp
	Ptacl	pTacW	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	-223 bis +180	403 bp

Tab. 2.1: Herstellung der Fragmente. Angegeben sind verwendete Vektoren, Restriktionsenzyme, Positionen relativ zum Transkriptionsstart und Fragmentlängen.

Die Vektoren wurden standardmäßig mit Restriktionsenzymen nach Vorschrift des Herstellers restringiert, anschließend Phenol/Chloroform extrahiert und die Fragmente über präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente wurden über das Glaswollverfahren isoliert, worauf sich eine Mikrotropfendialyse gegen 1x TE-Puffer anschloß. Superhelikale Templates wurden über das Verfahren der Plasmidpräparation in großem Maßstab hergestellt. Der Anteil der Präparation an superhelikalen Plasmiden wurde durch Agarose-Gelelektrophorese ermittelt und bewegte sich bei ca. 90%.

2.1.2.1.2 Präparation eines internen Standards

Als Fällungsstandard für *in vitro* Transkriptionen wurde radioaktiv-markierte DNA benutzt. Dabei handelte es sich entweder um aufgefülltes *rrnB* P1 Fragment, welches auch für Gelretardierung benutzt wurde, oder um pUC18-DNA, welche durch Restriktion mit *PvuII* und *BamHI* hergestellt wurde. Dabei wurden drei Fragmente der Längen 146 bp, 176 bp und 2364 bp hydrolysiert, welche anschließend durch Klenow-Einbau radioaktiv markiert wurden.

2.1.3 *In vitro* Transkription mit der *E. coli* DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Für alle Messungen wurde RNA-Polymerase einer Fraktion benutzt, deren spezifische Aktivität durch Aktivitätsmessung nach Chamberlin ermittelt wurde (siehe 3.3.1.2). Dazu wurde die Fraktion in An- und Abwesenheit von externem σ^{70} -Faktor vermessen, um sicherzustellen, daß die RNA-Polymerase mit σ^{70} gesättigt war. Die *in vitro* Transkriptionen erfolgten nach Standardprotokoll (siehe 3.3.3.1).

2.1.3.1 Einfluß von verschiedenen Guanosintetraphosphatkonzentrationen auf die Transkription

Um die ppGpp-Sensitivität verschiedener Promotoren zu überprüfen wurden standard 'multiple round' Transkriptionen mit den Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und *Ptacl* durchgeführt. Die Transkription erfolgte mit linearen Templates in Gegenwart von 80 mM Kaliumglutamat, 3 nM aktiver RNA-Polymerase und 50 μ M ATP/CTP/GTP und 2,5 μ Ci [α^{32} P]-UTP für *rrnB* P1 und *Ptacl*. Für den *rrnD* P1 wurde folgender NTP-Mix gewählt: 50 μ M ATP/GTP/UTP und 2,5 μ Ci [α^{32} P]-CTP. Dies war durch die Transkriptionsstartsequenz begründet, da der *rrnD* P1 an Position +2 und +3 für ein UTP codiert, und eine Destabilisierung des Initiationskomplexes durch UTP Limitierung vermieden werden sollte. Es wurden ppGpp Konzentrationen von 0-1000 μ M gewählt. Dabei spiegeln diese Effektorkonzentrationen die *in vivo* Bedingungen während eines Aminosäuremangels wieder (Gourse *et al.*, 1996). Um eine Wechselwirkung von ppGpp mit der RNA-Polymerase zu ermöglichen, wurden Polymerase, Template und ppGpp in 1x Transkriptionspuffer für 8 min vorinkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Nukleotidmixes gestartet. Abbildung 2.2 zeigt exemplarisch Autoradiographien von Transkriptionen und deren graphische Auswertung.

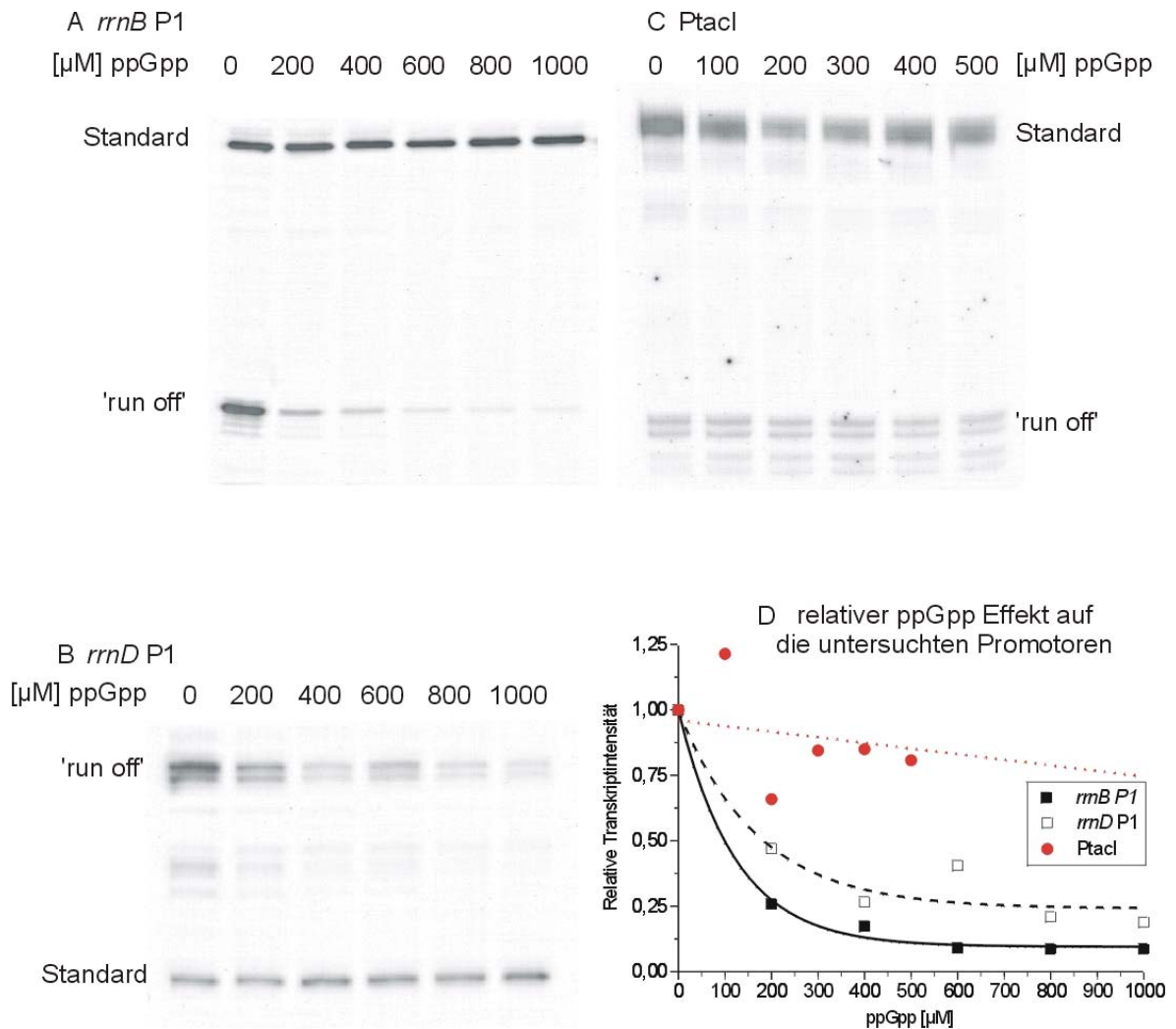


Abb. 2.2: Autoradiographien der gelelektrophoretischen Trennung von 'multiple round' Transkriptionen der Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und *Ptacl*.

Dargestellt sind Autoradiographien der 'multiple round' Transkriptionsexperimente mit verschiedenen Promotoren in Gegenwart von wachsenden ppGpp Konzentrationen. A: *rrnB* P1. B: *rrnD* P1. C: *Ptacl*. Die Spuren sind mit den jeweiligen ppGpp Konzentrationen markiert. 'run off' markiert das spezifische Transkript, Standard bezeichnet den in die Reaktion eingebrachte Fällungsstandard. D: Quantifizierung der Autoradiographien: Die verschiedenen Symbole bezeichnen die relative Transkriptausbeuten der jeweiligen Promotoren. *rrnB* P1: geschlossenes Quadrat, *rrnD* P1: offenes Quadrat und *Ptacl*: Kreis

Die Anwendung dieses Transkriptionssystems erlaubt die quantitative Aussage über den "über alles" Effekt, den ppGpp auf die Transkription von verschiedenen Promotoren ausübt. Dabei kann weder zwischen den verschiedenen Phasen der Transkription noch den Stufen der Initiation unterschieden werden. Die in Abbildung 2.2 dargestellten Expositionen zeigen einen deutlichen spezifischen ppGpp vermittelten Effekt auf die Transkription ribosomaler Promotoren, wobei sich die

Sensitivität der P1 Promotoren des *rrnB* und *rrnD* Operons voneinander unterscheiden. Die Quantifizierung der Expositionen ist in Abbildung 2.2D dargestellt. Dabei wurden die Intensitäten der 'run off'-Transkriptionsprodukte auf die Bandenintensitäten des Fällungsstandards derselben Spur normiert. Der in Abwesenheit von ppGpp erhaltene Wert wurde dabei gleich 1 und alle anderen relativ zu diesem gesetzt, um die Transkriptausbau der verschiedenen Promotoren in Bezug zueinander zu bringen.

Die Auswertung zeigt, daß die Transkription vom *rrnB* P1 Promotor um 92% im Maximum inhibiert wird, der *rrnD* P1 Promotor jedoch nur um 82% im Maximum. Die Inhibierung erreicht hierbei oberhalb von 300 µM ppGpp ein Plateau. Diese Konzentration wurde für alle folgenden Messungen als Wirkkonzentration benutzt, bei der man nicht in einen unspezifischen Bereich der Inhibierung gelangt. Der unregulierte Ptacl Promotor zeigt eine maximale Inhibierung von 21%. Die Abweichungen der Signalstärken liegen hierbei im Bereich des Meßfehlers. Um abzusichern, daß die Transkriptioninhibierung tatsächlich auf das eingesetzte Guanosintetraphosphat zurückzuführen ist und nicht auf das in der ppGpp Präparation enthaltene LiCl, wurden Vergleichstranskriptionen durchgeführt, welche eine LiCl-Konzentration enthielten, die denen der Präparation entspricht. Dabei zeigte sich keine Inhibierung der getesteten Promotoren (nicht gezeigt).

2.1.3.2 Effekt von Guanosintetraphosphat auf die verschiedenen Phasen der Transkription

Die in 2.1.3.1. gewonnenen Daten lassen zunächst keine Rückschlüsse auf die Phase der Transkription, in der ppGpp seine inhibitorische Wirkung entfaltet, zu. Aus diesem Grund wurde versucht den Reaktionsablauf weiter einzugrenzen. Hierzu wurde das Verfahren der 'single round' Transkription benutzt. Mit dieser Transkriptionstechnik erreicht man eine einmalige Ablesung des Templates durch die RNA-Polymerase mittels Konkurrenz der noch nicht spezifisch gebundenen Enzyme. Dies wird erreicht durch Bildung von stabilen Initiationskomplexen und anschließender Konkurrenz der freien oder unspezifischen gebundenen RNA-Polymerasen durch das Polyanion Heparin. Dieser Konkurrent bindet an nicht spezifisch gebundene RNA-Polymerasen und verhindert ihre Anlagerung an die DNA. Daher kann nur die spezifisch initiierte RNA-Polymerase das Template einmal ablesen. Im Falle der ribosomalen RNA-Operons ist bekannt, daß nur die ternären Initiationskomplexe heparinstabil sind (Ohlsen und Gralla, 1992; siehe auch 1.5.1.). Alle binären RNA-Polymerase-Promoter Komplexe sind instabil und zerfallen schon in Gegenwart von geringen Konkurrentkonzentrationen (Gourse, 1988, Langert *et al.*, 1991). Die ternären Initiationskomplexe werden durch die Gegenwart der ersten

beiden Initiationsnukelotide erzeugt (ATP und CTP beim *rrnB* P1 und GTP und UTP beim *rrnD* P1) (Gourse, 1988). Diese Methode erlaubt durch eine zeitlich unterschiedliche ppGpp Zugabe eine Aussage darüber, ob die ppGpp vermittelte Inhibierung vor Bildung des ternären Initiationskomplexes einsetzt, oder erst nach der Komplexbildung.

Es wurde daher folgender Ansatz gewählt, um die Wirkungsphase des Guanosintetraphosphates näher einzugrenzen: In den identisch aufgebauten Ansätzen wurden Initiationskomplexe durch Anwesenheit der Initiationsnukleotide vorgebildet. Bei einer Hälfte der Ansätze war ppGpp von Beginn an anwesend. Bei dem anderen Teil wurde ppGpp erst nach Bildung der Initiationskomplexe, also nach Heparinaddition, zugefügt. Als Nullkontrolle wurden identische Ansätze ohne Guanosintetraphosphat angesetzt. Anschließend wurden die verbleibenden NTPs hinzugegeben, inkubiert, mit der Chase Lösung versetzt und abschließend gefällt. Die Transkriptionsprodukte wurden dann über eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen. Die Transkriptionsprodukte wurden durch Densitometrie der Röntgenfilme quantifiziert und die Ergebnisse graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 2.3).

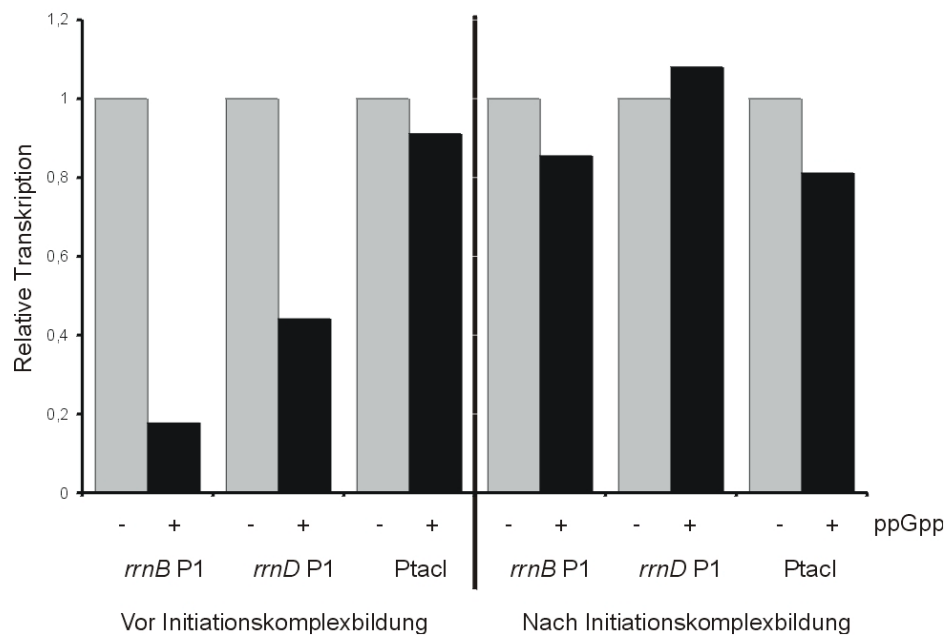


Abb. 2.3: 'single round' Transkriptionen zur Bestimmung des ppGpp-Effekts

Gezeigt ist die Inhibierung der Transkriptionsprodukte nach verschiedenen Zeitpunkten der ppGpp Zugabe. Im linken Teil der Abbildung ist ppGpp vor Bildung der Initiationskomplexe anwesend, im rechten Teil nach Initiationskomplexbildung. Getestet wurden die Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und *Ptacl*. Die Höhe der Balken entspricht der relativen Intensität der Transkriptionsprodukte, es wurde immer auf die Stärke des Transkripts in Abwesenheit von ppGpp normiert.

Es zeigte sich, daß ppGpp nur inhibiert, wenn es vor Initiationskomplexbildung anwesend war (linker Teil der Abbildung). Dabei zeigten sich Inhibierungsraten von 82 % für den *rrnB* P1, 56 % für den *rrnD* P1 und 9 % für den unregulierten *Ptacl*. Wie

unter 2.1.3.1. ist hier eine ebenso abgestufte Inhibierung zu beobachten. Der *rrnB* P1 ist hier ebenfalls der am stärksten inhibierte Promotor. Der Ptacl Promotor wird nur leicht durch ppGpp beeinflusst. Im rechten Teil der Abbildung ist der Effekt der ppGpp-Zugabe nach Bildung der Initiationskomplexe zu beobachten. Hier kann man nur einen marginalen Effekt von ppGpp auf die Transkription erkennen. Dieser liegt bei den einzelnen Promotoren in folgender Größenordnung vor: *rrnB* P1: 15 % Inhibierung, *rrnD* P1: 8% Aktivierung und 19 % Inhibierung für den Ptacl. Die Aktivierung für den *rrnD* P1 liegt jedoch im Rahmen des Meßfehlers. Hier ist also ein deutlich schwächerer Effekt von Guanosintetraphosphat auf die Transkription zu beobachten. Zusammenfassend kann man daher von einer hauptsächlichen Wirkung von ppGpp vor Initiationskomplexbildung ausgehen. Ist der Initiationskomplex erst gebildet, ist keine spezifische Inhibierung der Transkription zu beobachten.

2.1.3.3 Nukleotidabhängige Effekte von ppGpp auf die Transkription

Da die Bildung des Initiationskomplexes abhängig von der Konzentration der Initiationsnukleotide ist, wurde im folgenden Experiment die Bedeutung der NTP-Konzentration auf den inhibitorischen ppGpp Effekt untersucht. Hierzu wurde in einem standard 'multiple round' Ansatz die Konzentration der Initiationsnukleotide ATP und CTP für den *rrnB* P1 variiert. Dabei wurde CTP als das zweite Nukleotid nach Transkriptionsstart mit 1/10 der Konzentration des ATP eingesetzt, da dieses Verhältnis für eine effiziente Stabilisierung des Initiationskomplexes ausreicht (Gourse, 1988). Es wurden identische Ansätze in Abwesenheit und in Anwesenheit von 300 μM ppGpp durchgeführt (siehe Abbildung 2.4).

Die Auswertung des Experimentes zeigt, daß eine maximale Inhibierung in einem mittleren Konzentrationsbereich erreicht wird (Inhibierung von 70 % bei einer Konzentration von 10 μM ATP). Das Ausmaß der Inhibierung geht bei höheren NTP-Konzentrationen wieder zurück (25 % Inhibierung bei 1000 μM ATP).

Durch dieses Experiment zeigt sich, daß die Konzentration der Initiationsnukleotide offenbar eine große Rolle bei dem Mechanismus der ppGpp vermittelten Inhibierung spielt. Dies legt eine Beteiligung des ternären Initiationskomplexes in seiner Struktur, Stabilität oder Bildungsgeschwindigkeit nahe, da die Initiationsnukleotide nur bei der Bildung des ternären Initiationskomplexes beteiligt sind. Alle Schritte der binären Komplexbildungen im Rahmen der Initiation verlaufen Nukleotid-unabhängig (siehe auch 1.5.1).

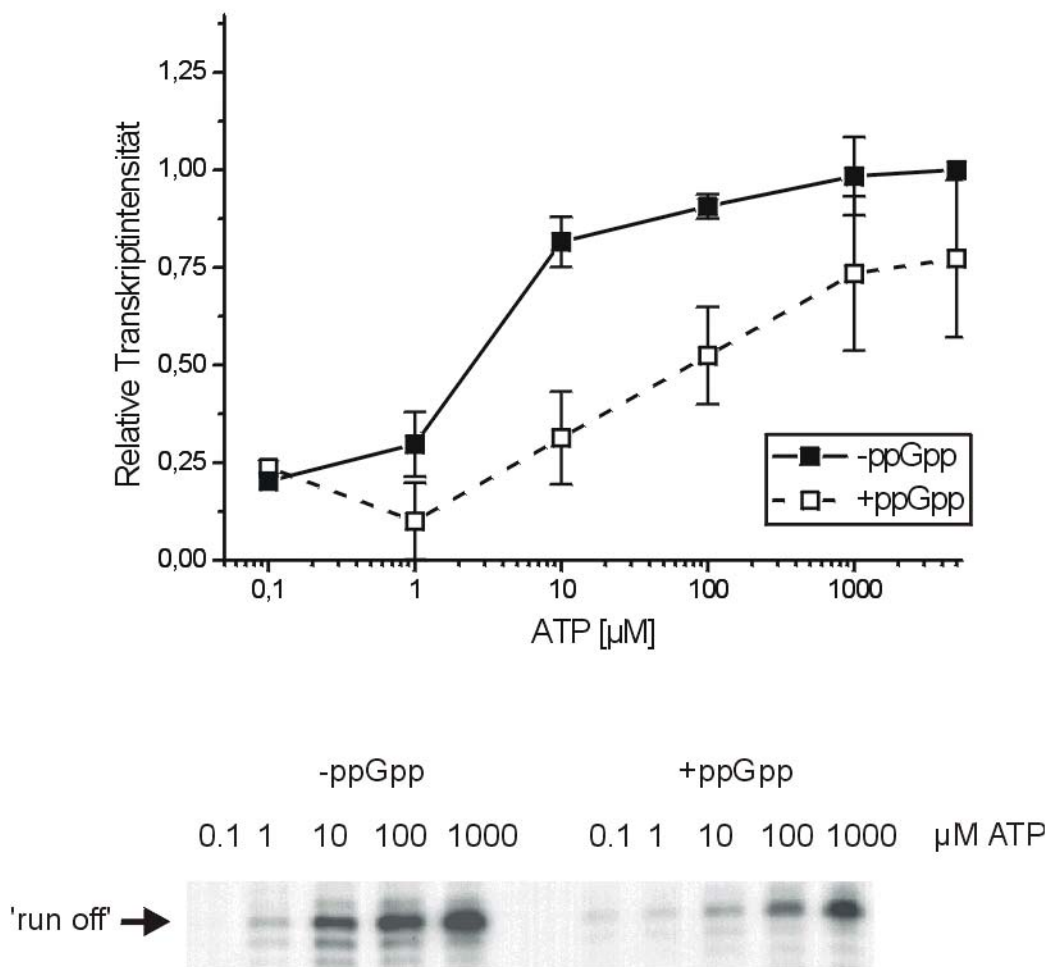


Abb. 2.4: ppGpp Effekt auf 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen in Abhängigkeit von verschiedenen Initiations-NTP Konzentrationen. Dargestellt sind die *rnmB* P1 Transkriptionsprodukte von 'multiple round' Transkriptionen in Gegenwart und Abwesenheit von 300 μM ppGpp. Das obere Diagramm enthält die graphische Auswertung von densitometrischen Messungen der Transkriptionsprodukte relativ zu Fällungsstandard (nicht gezeigt). Dabei wurde die stärkste Intensität gleich 1 gesetzt (5000 μM ATP in Abwesenheit von ppGpp).

2.1.3.4 Vergleich der Transkription im 'multiple round' gegen 'single round' System

Im Folgenden wurden die Eigenschaften der Transkriptionssysteme untersucht. Dabei wurde auf die Wirkung von ppGpp bei verschiedenen NTP-Konzentrationen in 'single round' und 'multiple round' Transkriptionssystemen verglichen. Diese Systeme unterschieden sich in der theoretischen Anzahl der Templateablesungen. In 'single round' Transkriptionen wird das Template von einer Polymerase nur einmal abgelesen, wohingegen beim 'multiple round' System die Polymerasen nach erfolgter Transkription in der Lage sind erneut am Promotor zu initiieren. Desweiteren wurden die abortiven und pausierten Produkte der Transkriptionen untersucht. Die qualitative und quantitative Analyse dieser Produkte lässt Rückschlüsse auf weitere regulatorische Mechanismen während der Transkription zu. So weist eine verstärkte

Synthese der abortive Transkripte auf eine verzögerte 'promoter clearance' hin. Dies kann durchaus ebenfalls als regulatorisches Mittel der Transkriptionsteuerung angesehen werden. So wurde gezeigt, daß der Promotor N25_{antiDSR} limitiert in der 'promoter escape' ist, er also eine verzögerte Bildung des Elongationskomplexes aufweist (Hsu *et al.*, 1995). Erst die Gegenwart der sogenannten Elongationsfaktoren GreA und GreB erleichtert das Verlassen des Promotors. Eine Erhöhung der pausierten Produkte ist bei einer verlängerte Pausierung durch Guanosintetraphosphat zu erklären (Krohn und Wagner, 1996).

Es wurden in Abänderung des Standardprotokolls folgende Ansätze pipettiert: Jeweils 3 nM RNA-Polymerase wurden mit 1 nM Template in 1x Transkriptionspuffer in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem jeweiligen Nukleotidmix versetzt und weiter inkubiert. Dabei enthielten die Ansätze für 'multiple round' Transkriptionen alle vier Nukleotide (siehe 3.3.3.1), von denen UTP nur als radioaktives Substrat mit einer Aktivität von 10 µCi/Ansatz (spezifische Aktivität 3000Ci/mmol) eingesetzt wurde. Im 'single round' Ansatz wurden nur die Initiationsnukleotide (65 oder 500 µM ATP; 6.5 oder 50 µM CTP) zugesetzt, für 10 min inkubiert, anschließend mit Heparin behandelt. Erst jetzt wurden die restlichen Nukleotide zur vergleichbaren Endkonzentrationen, wie sie im 'multiple round' Ansatz herrschen, hinzugefügt. In allen Ansätzen liegen also die gleichen Konzentrationen der Nukleotide vor. Aus diesen Ansätzen wurden zeitversetzt Proben entnommen, in gleichen Volumen Formamid-Probenpuffer aufgenommen um die Reaktion zu stoppen, denaturiert und auf ein 20 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel gegeben. Zu dem Gesamtansatz wurde nach 15 minütiger Inkubation die 'chase'-Lösung zugefügt, welche den Kompetitor Heparin und alle vier NTPs in hohen Konzentrationen enthält. Diese Lösung verhindert Neuintiation, ermöglicht die Beendigung aller noch nicht fertiggestellten Transkripte und unterdrückt Pausierung während der Elongation. Der Ansatz wurde anschließend 8 min inkubiert und ebenfalls durch Formamidprobenpuffer gestoppt. Auch dieser Ansatz wurde aufgetragen. Abbildung 2.5 zeigt die Expositionen dieser Gele.

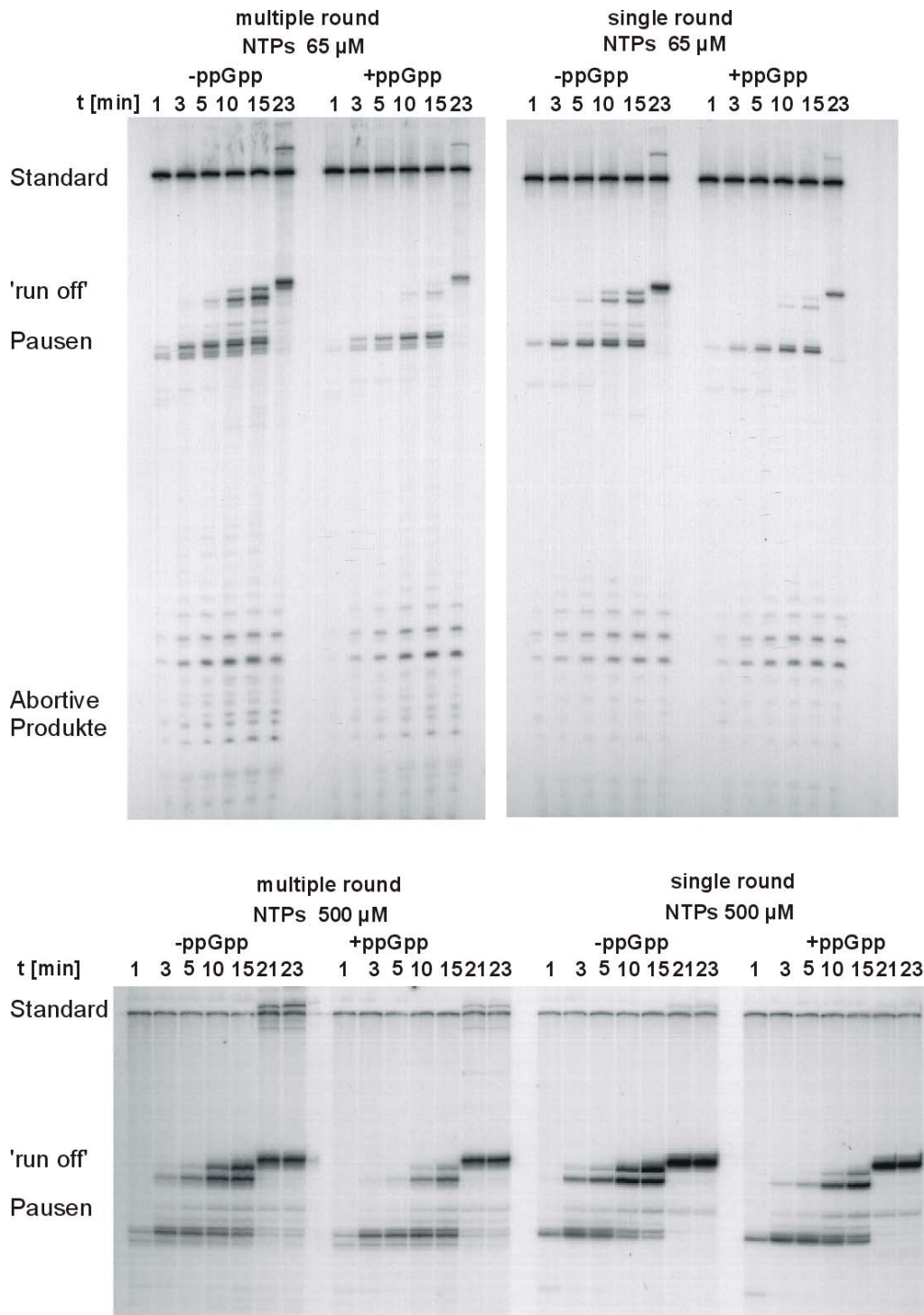


Abb. 2.5: Exposition von *in vitro* Transkriptionen am *rrnB* P1 in Gegenwart von unterschiedlichen ATP-Konzentrationen. Dargestellt sind multiple und 'single round' Transkriptionen mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen in Abwesenheit und Gegenwart von 300 μM ppGpp. Oberer Abschnitt: multiple und 'single round' Transkriptionen bei niedrigen ATP Konzentrationen. Standard bezeichnet den Fällungsstandard, 'run off' entspricht dem Vollängentranskript, abortive Produkte entsprechen den kurzen abortive Produkten und Pausen bezeichnen Elongationspausen. Die Bezeichnung der Spuren entspricht den Zeitpunkten der Entnahme der Transkriptionsproben nach Inkubation mit dem vollständigen NTP-Mix. Die Probe nach 23 min sind in Anwesenheit der Chase-Lösung. Unterer Abschnitt: multiple und 'single round' Transkriptionen bei hohen NTP-Konzentrationen. Gezeigt ist nur der obere Teil der Exposition, die kurzen Produkte wurden abgeschnitten. Auch hier entsprechen die Proben 21 und 23 min in Anwesenheit der 'chase'-Lösung.

Dieses Experiment liefert mehrere Aussagen über das Transkriptionssystem und den Mechanismus der Inhibierung:

Erstens ist zu erkennen, daß Vollängenprodukte erst nach Zugabe der 'chase'-Lösung entstehen. Dies bedeutet, daß bedingt durch lange Elongationspausen die Bedingungen der Reaktion vor dem 'chase' nicht ausreichend sind, um Transkripte bis zur Volllänge zu synthetisieren, weder unter hohen NTP-, noch unter niedrigen NTP-Bedingungen. Man kann daher davon ausgehen, daß unter den Bedingungen der standard 'multiple round' keine Polymerase das Template mehrfach ablesen kann. Die Proben, die mit 'chase'-Lösung behandelt wurden zeigen außerdem keine Pausierungsbanden im Elongationsbereich, was bedeutet, daß Pausierungsereignisse in diesen Proben aufgehoben werden.

Zweitens ist eine deutliche Inhibierung der Transkription nur unter niedrigen NTP-Konzentrationen zu beobachten, sowohl im 'multiple round' Ansatz, als auch im 'single round' System. Bei hohen Konzentrationen fällt die Inhibierung in beiden Systemen weg. Dies entspricht den unter 2.1.3.3. gemachten Beobachtungen, und läßt sich hier auch auf das 'single round' System übertragen.

Drittens ist eine Verlangsamung der Transkriptsynthese in Gegenwart von ppGpp zu beobachten. Dies ist erkennbar, da die Transkriptsynthese in Abwesenheit von ppGpp schneller Pausierungsstellen erreicht im Vergleich zur Anwesenheit von ppGpp. Dies bedeutet, daß der Einbau von Nukleotiden durch ppGpp verzögert wird, und somit die gesamte Elongationsgeschwindigkeit gesenkt wird.

Viertens kann man in dem Bandenmuster der abortiven Transkripte keine Unterschiede ausmachen, weder in Qualität, noch in der Quantität. Das bedeutet, daß im Falle der Transkription am *rrnB* P1 die 'promoter clearance' nicht durch ppGpp beeinflusst wird. Dieser Befund bestätigt die vorhergehenden Beobachtungen aus 2.1.3.2, da in diesem Experiment gezeigt wurde, daß ppGpp seinen inhibitorischen Einfluß vor oder während der Bildung des Initiationskomplexes ausübt, und nicht während des Übergangs in die Elongationsphase.

Die Veränderung der Pausierungseigenschaften der RNA-Polymerase scheint mit der Zusammensetzung des Nukleotidmixes in Verbindung zu stehen. Sobald man alle Nukleotide in hohen Konzentrationen zuführt, verschwinden die Pausierungsbanden und das 'run off' Produkt wird gebildet. Die geringe Konzentration des Markierungsnukleotids ist offenbar der Grund dafür, daß die Templates nur einmal abgelesen werden können, und daher *de facto* nur 'single round' Bedingungen herrschen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß ppGpp nur auf die Bildung oder Stabilität des ternären Initiationskomplexes wirkt. Die 'promoter clearance' scheint nicht in die Regulation eingebunden zu sein. Ebenfalls zeigt ppGpp einen leichten Effekt auf die

Pausierungseigenschaften. Dieser Effekt kann jedoch nicht die starke Inhibierung der Transkription erklären.

2.2 Einfluß von Guanosintetraphosphat auf Struktur, Stabilität und Komplexbildung des ternären Initiationskomplexes

Die vorherigen Untersuchungen zeigten, daß die Wirkung des Guanosintetraphosphat eng mit der Konzentration der Initiationsnukleotide verknüpft ist. Der ternäre Initiationskomplex ist der erste Komplex, der abhängig von den Initiationsnukleotiden gebildet wird. Daher nimmt wahrscheinlich die Bildung, Struktur oder Stabilität der Initiationskomplexe eine wichtige Rolle in der ppGpp vermittelten Wirkung ein. Diese Charakteristika wurden daher im Folgenden genauer untersucht.

2.2.1 Struktur und Stabilität des ternären Initiationskomplexes

2.2.1.1 Einleitung und experimenteller Ansatz

Der ternäre Initiationskomplex (RP_{init}) ist das erste stabilisierbare Intermediat im Rahmen der Initiation. Zwar wird im allgemeinen die Bildung des offenen Komplexes (RP_o) als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Initiation angesehen (McClure 1985), aber es wurde beispielsweise für den *rrnD* P1 Promotor gezeigt, daß die Bildung des ternären Initiationskomplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Langert *et al.*, 1991). Für den ribosomalen P1 Promotor wurde anhand von $KMnO_4$ -'footprints' ein inhibitorischer Effekt von ppGpp auf die Strangöffnung gezeigt (Ohlsen und Gralla, 1992), es existieren aber auch Daten über die ppGpp vermittelte Inhibierung der Bindung an ribosomalen P1 Promotoren, also die Bildung der binären Komplexe (RP_c) (Kingston *et al.*, 1981). Eine Untersuchung der isolierten Komplexe gestaltet sich jedoch als überaus schwierig, da bis auf den ternären Initiationskomplex alle Komplexe sehr instabil und daher nur schwer voneinander getrennt zu betrachten sind.

Daher wurde in den folgenden Analysen der Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die Struktur, Stabilität und Bildung der ternären Initiationskomplexe gelegt. Diese Parameter wurden durch verschiedene Techniken charakterisiert: Eine direkte Betrachtung des aufgeschmolzenen DNA-Doppelstrang Bereichs ist durch $KMnO_4$ - 'footprint'-Techniken möglich. Hiermit kann man die Struktur der Transkriptionsblase untersuchen. Komplexstabilitäten lassen sich ebenfalls durch 'footprints' überprüfen. Ein anderer Ansatz ist die zeitabhängige Messung der Stabilitäten über die Produkte der Transkription.

Kinetiken der Initiationskomplexbildung wurden über Gelretardierungsanalysen, $KMnO_4$ - 'footprints' und Messung der Produkte durchgeführt. Dabei kann man mit Gelretardierungsanalysen die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA direkt untersuchen.

2.2.1.2 Untersuchungen durch KMnO_4 Modifikation von Initiationskomplexen

Das Reagenz Kaliumpermanganat modifiziert überwiegend Thymin- und in schwächerem Maße Cytidinreste durch Oxidation der 5,6-Doppelbindung und bildet dadurch cis-Thymin-Glykole oder cis-Cytosin-Glykole (Hayatsun und Ukita, 1967; Idle *et al.*, 1985). Diese Reaktion läuft nur einzelstrang-spezifisch ab, daher können aufgeschmolzene DNA-Bereiche, also solche, wie sie in den Transkriptionsblasen von RNA-Polymerase Promotor Komplexen entstehen, detektiert werden. Diese Modifikationen wurden in diesen Experimenten durch eine anschließende Primer-Extension Reaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I nachgewiesen. Dieses Enzym bricht erst ein Nukleotid hinter der modifizierten Stelle die Synthese der DNA ab (Ide *et al.*, 1985, Rouet und Essigmann, 1985). Diese Verlängerungsreaktion kann nicht nur an modifizierten Thyminen oder Cytosinen abbrechen, sondern auch an Adeninresten, welche sich 5'-seitig eines modifizierten Thymins befinden (Sasse-Dwight und Gralla, 1989). Die Kaliumpermanganat-'footprints' wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt, um die Struktur der Transkriptionsblase zu bestimmen. Außerdem wurde diese Technik modifiziert, um die Komplexbildungszeit der Initiationskomplexe und die Stabilität nach Heparinkompetition zu bestimmen. Hierzu wurde ein Protokoll modifiziert, welches Schmidt und Reiss (1995) zur Bestimmung der 'promoter escape' benutzten. In diesen Experimenten wurde nur der *rrnB* P1 untersucht, da zu diesem Promotor eine Fülle von Literaturdaten aus 'footprint'-Experimenten anderer Arbeitsgruppen vorlagen und man somit Vergleichsmöglichkeiten hatte.

2.2.1.2.1 Struktur der Initiationskomplexe

Die KMnO_4 -Modifikation wurde mit Komplexen, die wie folgt gebildet wurden durchgeführt: 15 nM RNA-Polymerase, 5 nM linearem *rrnB* P1 Fragment, 50 μM ATP und 5 μM CTP in 1x Transkriptionspuffer bei 30°C. Es waren je nach Ansatz 300 μM ppGpp vorhanden. Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 30°C inkubiert, dann mit Heparin (Endkonzentration 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt und anschließend sofort mit 37 mM Kaliumpermanganat für 1 min bei 30°C modifiziert. Die Proben wurden wie unter 3.3.4.3 aufgearbeitet. Die Analyse erfolgte über Primer Extension, Trennung der Produkte auf denaturierenden Polyacrylamidgelen und anschließender Autoradiographie. Das Ergebnis eines solchen Experiments ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

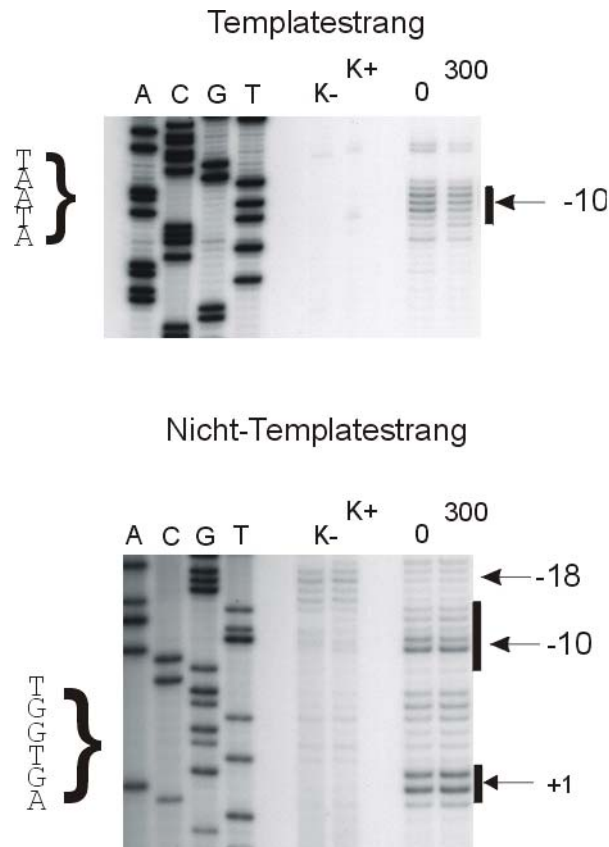


Abb. 2.6: Autoradiographie der Primer-Extension Analyse KMnO_4 -modifizierter DNA (Matrizenstrang und nicht-Matrizenstrang) aus *rrnB* P1 Promotorkomplexen. Als Oligonukleotide dienen die Primer #81194 für den Matrizenstrang und #170398 für den nicht-Matrizenstrang. Als Kontrollen diente DNA ohne KMnO_4 -Modifikation (K-) und DNA mit KMnO_4 Modifizierung (K+). Die Reaktionen wurden in Abwesenheit von ppGpp (0) und Anwesenheit von 300 μM ppGpp (300) durchgeführt. Neben den Primer-Extension Spuren wurde zwecks Zuordnung eine Sequenzierung nach Sanger mit den gleichen Oligonukleotiden aufgetragen. Die spezifischen Signale sind durch Balken an den Signalen und zugehöriger Position gekennzeichnet.

In den Initiationskomplexen ist ein aufgeschmolzener Bereich von -12 bis $+2$ detektierbar. Dabei sind die Positionen -1 , $+1$ und -10 besonders zugänglich für Modifikationen im Vergleich zu den anderen Signalen. Dies entspricht den durchgeführten 'footprint'-Experimenten anderer Arbeitsgruppen (Newlands *et al.*, 1991; Ohlsen und Gralla, 1992). Die Proben in An- und Abwesenheit von Guanosintetraphosphat unterscheiden sich nicht, weder in der Intensität der Signale noch im Muster der Modifikationen. Dies läßt die Vermutung zu, daß ppGpp nicht die Struktur der Transkriptionsblase verändert. Dies ist ein Hinweis, daß durch Guanosintetraphosphat die Struktur des gesamten RNA-Polymerase Promotor-Komplexes nicht verändert wurde und die reprimierende Wirkung des ppGpp nicht auf eine Veränderung der "über-alles" Struktur der RNA-Polymerase beruht.

2.2.1.2.2 Stabilität der Initiationskomplexe

Da wahrscheinlich die Struktur der ternären Initiationskomplexe nicht durch ppGpp verändert wird, stellt sich die Frage ob die ppGpp-vermittelte Inhibierung der

Transkription nicht durch eine Detabilisierung der Komplexe hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wurde die Stabilität durch Konkurrenz mit dem Polyanion Heparin getestet. Es ist bekannt, daß ternäre Initiationskomplexe am *rrnB* P1 heparinstabil sind, andererseits eine ausreichende Heparinkonzentration die Neuinitiation von RNA-Polymerasen effizient verhindert. Wenn man also ternäre Initiationskomplexe mit Heparin inkubiert, resultieren alle Veränderungen der Komplexkonzentration aus dem Zerfall der Komplexe, da die abdissoziierenden RNA-Polymerasen mit Heparin komplexiert und damit aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Eine Veränderung der Konzentration der ternären Initiationskomplexe sollte sich in einer Veränderung der Reaktivität gegenüber Kaliumpermanganat erkennen lassen.

Zur Bestimmung der Stabilität der ternären Initiationskomplexe wurde daher folgender Versuchansatz pipettiert: 15 nM RNA-Polymerase wurden mit 5 nM *rrnB* P1-Promotorfragment, 50 µM ATP und 5 µM CTP in 1x Transkriptionspuffer für 30 min bei 30°C in An- und Abwesenheit von 300 µM ppGpp inkubiert. Anschließend wurde Heparin mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben. Aus diesem Ansatz wurden Aliquots nach bestimmten Zeiten entnommen und mit 37 mM Kaliumpermanganat modifiziert. Die Proben wurden wie unter 3.3.4.3 aufgearbeitet, die Modifikationspositionen über Primer Extension und anschließender denaturierender Gelelektrophorese nachgewiesen. Die spezifischen Signale an Position -10 wurden densitometrisch ausgewertet und die Intensität zum Zeitpunkt 0 gleich 1 gesetzt. Abbildung 2.7 zeigt die graphische Auswertung einer Autoradiographie.

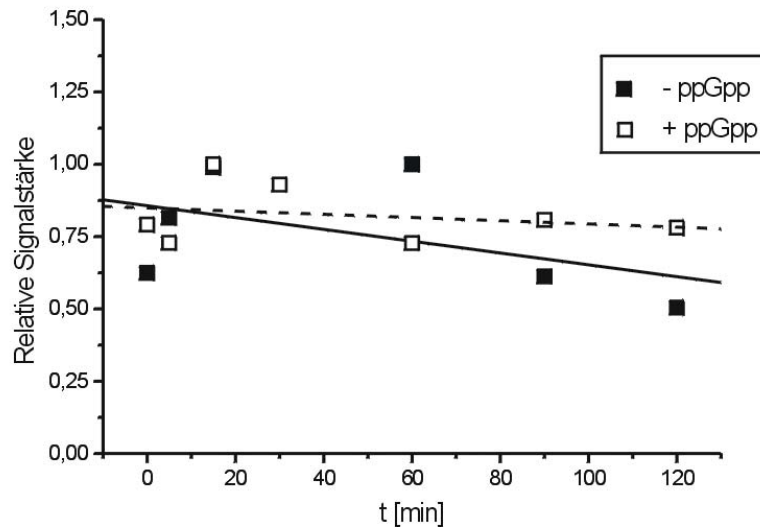


Abb. 2.7: Zeitabhängige Kaliumpermanganat-Modifikation der Position -10 von ternären Initiationskomplexen nach Heparinzugabe in Gegenwart und Abwesenheit von ppGpp. Dargestellt ist die relative Signalstärke der Position -10 in Abwesenheit und Gegenwart von 300 μM ppGpp über die Meßzeit. Dabei bezeichnen die geschlossenen Quadrate die Komplexe in Abwesenheit von ppGpp und die offenen Quadrate die Probe in Anwesenheit von 300 μM ppGpp.

Die lineare Regression der Signalstärken zeigt eine Abnahme der Promotorkomplexe über 120 min bis auf 75% der ternären Initiationskomplexe in Abwesenheit von ppGpp. Dabei zeigt die Anwesenheit von ppGpp eine leichte Stabilisierung der Komplexintensität über die Zeit, welche jedoch nicht signifikant ist. Jedoch reichen die gefundenen Abweichungen der Stabilität nicht aus den ppGpp-abhängigen Effekt der *in vitro* Transkriptionen zu erklären. Außerdem weisen die gefundenen Signalstärken eine große Varianz in den Intensitäten auf, was sicherlich ein Nachteil des Verfahrens ist. Aus diesem Grunde wurde ein alternatives Verfahren zur Ermittlung der Komplexstabilitäten verwendet.

2.2.1.3 Test der Stabilität von Initiationskomplexen anhand der Produktbildung

Ein alternativer Ansatz zur Messung der Stabilität von Initiationskomplexen wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die Methode ist eine Abwandlung der 'single round' *in vitro* Transkription. Hier wird der Initiationskomplex vorgebildet, mit Heparin kompetiert und anschließend zum Vollängenprodukt verlängert. Die Markierung und Visualisierung der Transkripte erfolgt durch Einbau eines radioaktiv markierten CTP an Position +2, also vor Erreichen der Elongationsphase. Mit dieser Art der Markierung werden Elongationseffekte ausgeblendet, die auf unterschiedlich effizienten Einbau radioaktiven Substrates während der Elongationsphase in das Transkript zurückzuführen sind, da nur gebildete Vollängenprodukte nachgewiesen werden. Jedes Transkript besitzt also nur ein radioaktiv markiertes Nukleotid.

Hierzu wurden 15 nM RNA-Polymerase mit 5 nM Template in 1x Puffer inkubiert, und Initiationskomplexe durch Zugabe von 50 μM ATP, 5 μM CTP und 20 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-CTP in An- und Abwesenheit von 300 μM ppGpp gebildet. Diese wurden anschließend mit Heparin behandelt und nach bestimmten Zeiten durch Zugabe einer konzentrierten Nukleotidlösung verlängert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Formamid-Probenpuffer gestoppt, denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Transkripte wurden anschließend densitometrisch ausgewertet. Dabei wurden die Proben zum Zeitpunkt 0 gleich 1 gesetzt. Abbildung 2.8 zeigt die Auswertung einer solchen Autoradiographie:

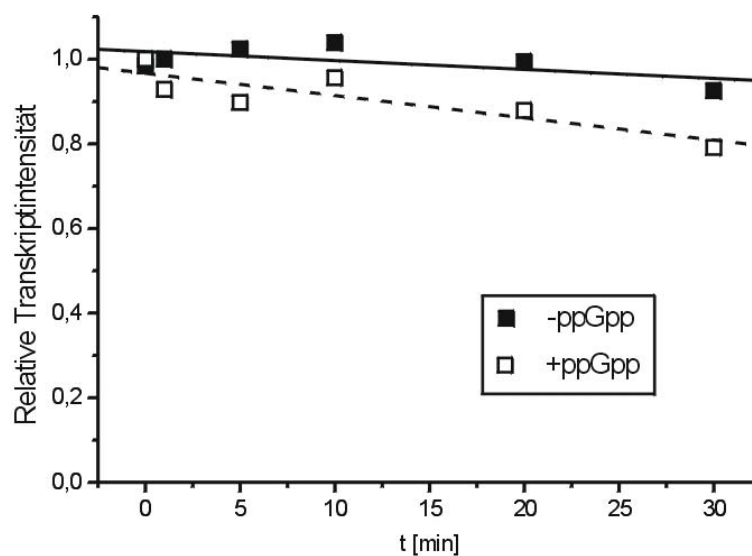


Abb. 2.8: Auswertung von Transkriptintensitäten einer Autoradiographie von vorgebildeten Initiationskomplexen am *rrnB* P1 nach Heparinkompetition. Dargestellt ist die relative Intensität der Vollängentranskripte am *rrnB* P1 in Abwesenheit und Gegenwart von 300 μM ppGpp über die Meßzeit. Dabei bezeichnen die geschlossenen Quadrate die Transkripte in Abwesenheit von ppGpp und die offenen Quadrate die Probe in Anwesenheit von 300 μM ppGpp.

Auch in diesem Experiment zeigt sich, daß die Komplexe stabil über die Zeit verfolgbar sind. Die Versuchszeit betrug 30 min, in dieser Zeit zerfielen circa 10 % der Komplexe in Gegenwart und 5% in Abwesenheit von ppGpp. Dies stellt eine geringe Destabilisierung in Gegenwart von ppGpp über die Zeit dar. Diese Größenordnung des Stabilitätsverlusts ist jedoch nicht die Erklärung für die starken Effekte in den anfänglichen Transkriptionsexperimenten. Ebenfalls wird deutlich, daß dieser Weg der Verfolgung der Stabilitäten eine relativ gesehen kleinere Abweichung der Meßwerte produziert.

Zusammenfassend sagen beide Experimente aus, daß die Stabilität der Komplexe durch ppGpp nicht derart beeinflusst wird um die inhibierenden Effekte zu erklären.

2.2.2 Bildung von ternären Initiationskomplexen

2.2.2.1 Einleitung und experimenteller Ansatz

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, daß die ppGpp-vermittelte Regulation vor oder während der Bildung der ternären Initiationskomplexe stattfindet. Dabei scheint die Konzentration der Initiationsnukleotide eine wichtige Rolle zu spielen, was den ternären Initiationskomplex als Wirkort der Inhibierung nahelegt. Außerdem zeigte sich, daß die Struktur des ternären Initiationskomplexes durch Guanosintetraphosphat voraussichtlich nicht verändert wird. Stabilitätsmessungen durch zwei unabhängige Verfahren zeigten keine signifikante Veränderung der Komplexstabilitäten in Gegenwart von ppGpp gegenüber Heparin. Daher wurde im Folgenden die Bildung von Initiationskomplexen untersucht. Für die *rrn* P1 Promotoren ist bekannt, daß die Initiationsgeschwindigkeit limitiert ist, dagegen die 'promotor escape' schnell im Vergleich zu anderen starken Promotoren verläuft (Langert *et al.*, 1991). Die binären Komplexe sind instabil und nicht zu isolieren. Erst die Addition der ersten beiden Initiationsnukleotide stabilisiert den Komplex und macht diesen zugänglich für weitere Untersuchungen (Gourse, 1988). Im Folgenden wurden verschiedene Ansätze zur Ermittlung der Komplexbildungsgeschwindigkeit gewählt: Es wurde die schon vorher benutzte Methode des KMnO_4 -'footprints' abgewandelt, um die Initiationskinetik zu bestimmen. Außerdem wurde die Technik der Verzögerungsgelelektrophorese angewandt, um direkt die Geschwindigkeit der Bindung von RNA-Polymerase an das Promotorfragment zu testen. Schließlich wurde mittels Transkriptionsuntersuchungen die Bildung produktiver Komplexe am *rrnB* P1 untersucht.

2.2.2.2 Analyse der Kinetik ternärer Initiationskomplexbildung durch KMnO_4 Modifikation am *rrnB* P1

Hier wurde die schon zuvor benutzte Methode der Kaliumpermanganat-'footprints' abgewandelt, um die Strangöffnung über die Zeit zu beobachten. Hierzu wurde RNA-Polymerase mit Template in Gegenwart und Abwesenheit von Guanosintetraphosphat vorinkubiert, um Promotorkomplexe vorzubilden. Anschließend wurden Initiationsnukleotide hinzugefügt, und das Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges wurde durch KMnO_4 -Modifikation in verschiedenen Abständen verfolgt (siehe 3.3.4.1). Hierzu wurden 15 nM RNA-Polymerase mit 5 nM Template in 1x Transkriptionspuffer in Gegenwart und Anwesenheit des Effektors ppGpp vorinkubiert. Die Komplexbildung wurde durch Zugabe der Initiationsnukleotide ATP (50 μM) und CTP (5 μM) gestartet. Aus dem Ansatz wurden dann nach verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen und in eine Kaliumpermanganat-Lösung überführt (Endkonzentration 37 mM). Dieser Ansatz wurde für 1 min bei 30°C

inkubiert und anschließend gestoppt. Die Modifikationen wurden dann über eine 'Primer Extension' detektiert und durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Signal an Position -10 wurde quantifiziert und gegen die Initiationszeit aufgetragen. Als interner Standard für die Ermittlung der relativen Signalstärken wurde ein Polymerase-unabhängiges Signal an Position -42 benutzt. Die graphische Auswertung dieses Experimentes ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

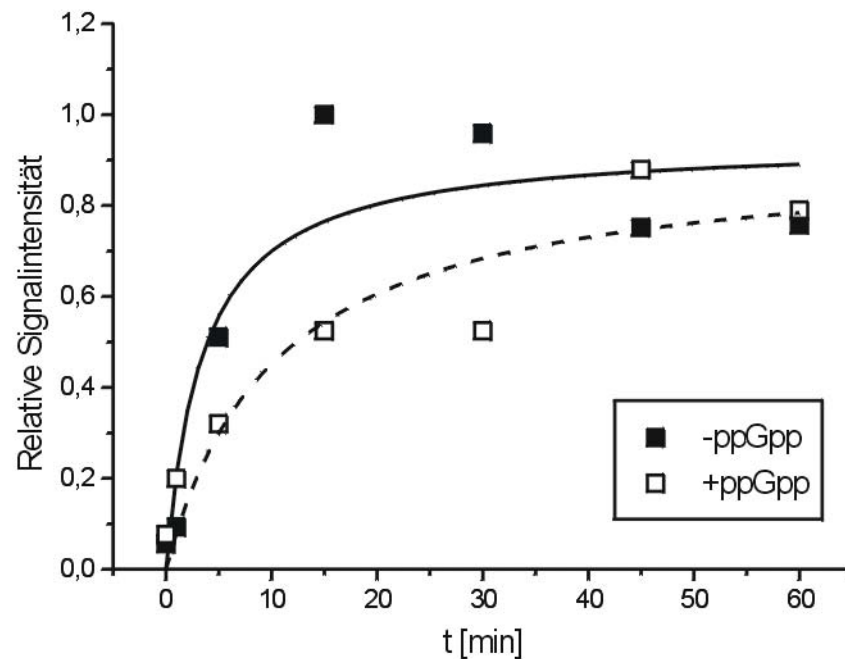


Abb. 2.9: Graphische Auswertung der Initiationskomplexbildung am *rrnB* P1, detektiert durch KMnO_4 -'footprints'. Dargestellt ist die graphische Auswertung eines Autoradiogramms der Strangöffnung des Promotorbereichs. Dabei wurde die Intensität des stärksten Signals an Position -10 gleich 1 gesetzt und alle anderen relativ dazu. Diese Werte wurden dann gegen die Initiationszeit aufgetragen.

Dieses Experiment zeigt, daß das Aufschmelzen des Promotorbereiches durch ppGpp verzögert wird. Dabei ist am *rrnB* P1 Promotor die Strangöffnung mit der Bildung des ternären Initiationskomplexes gleichzusetzen, da dieser Promotor nur instabile binäre Komplexe bildet, die in Abwesenheit der Initiationsnukleotide sofort zurückreakt und zerfällt. Die Komplexbildung gelangt in Abwesenheit von ppGpp schon nach 15 Minuten in ein Plateau, wohingegen das Plateau in Gegenwart von 300 μM ppGpp erst nach 30 bis 45 Minuten erreicht wird.

Die Messung der Initiationskomplexbildung durch Kaliumpermanganat ist jedoch aus folgenden Gründen ungenau und fehleranfällig. Zum Einen ist die Meßmethode nur indirekt, da zur Detektion der Modifikationen der Proben erst eine Primer Extension Analyse durchgeführt werden mußte. Außerdem ist die Modifikationsdauer des Reagens sehr kurz. Dies kann daher auch ein Grund für Abweichungen sein.

Es wurden daher noch weitere Analysemethoden etabliert, um eine genauere Messung der Initiationskomplexe zu ermöglichen.

2.2.2.3 Retardierungsgelanalysen von Initiationskomplexen

Eine weitere Technik, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, um Komplexbildung über die Zeit zu verfolgen, war die Verzögerungsgelelektrophorese. Dabei analysiert man die direkte Bindung der RNA-Polymerase an ein radioaktives Promotorfragment und trennt diese Komplexe unter nativen Bedingungen auf. Dabei migriert die freie DNA schneller im nativen Polyacrylamidgel als der RNA-Polymerase Promotor-Komplex. Im Idealfall kann man die unterschiedlichen Initiationskomplexe von einander unterscheiden. Zur Identifikation der sichtbaren Komplexe auf einem Retardierungsgel wurden zwei unterschiedliche Markierungsmethoden verwendet: Alle Polymerase-DNA-Komplexe wurden durch radioaktive Markierung der DNA sichtbar gemacht, wohingegen die ternären Komplexe direkt durch Einbau von radioaktiven Initiationsnukleotiden markiert wurden. Dabei geben nur solche Komplexe Signale, die tatsächlich ein radioaktiv-markiertes Nukleotid eingebunden haben.

Die Auswertung eines solchen Experimentes ist in Abbildung 2.10 zu sehen:

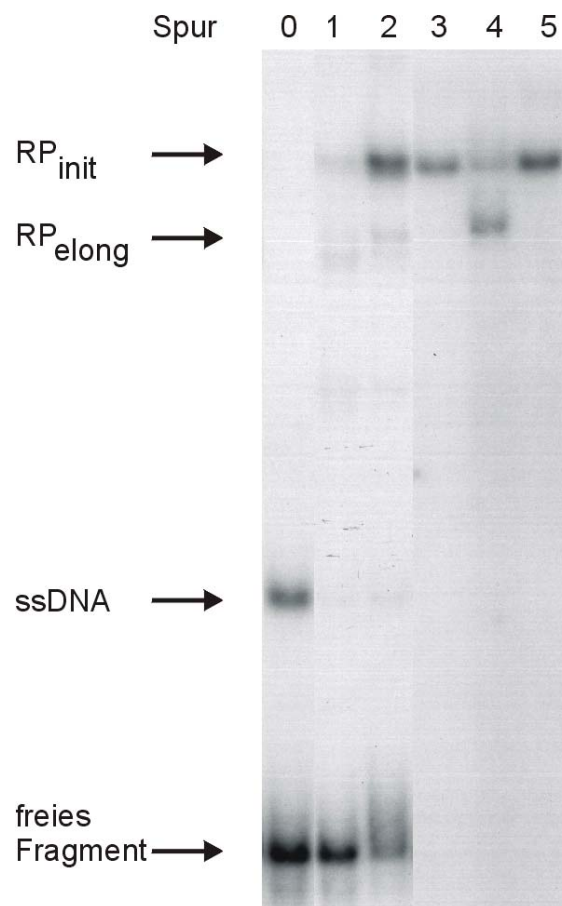


Abb. 2.10: Autoradiographie eines Retardierungsgeles zur Identifikation von RNA-Polymerase Promotor-Komplexen am *rrnB* P1. Spuren 0 bis 2: radioaktiv markiertes *rrnB* P1 Fragment. 0: freies Fragment; 1: Fragment mit RNA Polymerase; 2: Fragment mit RNA Polymerase und ATP/CTP (50/5 μM). Spuren 3 bis 5: Einbau radioaktiver Substrat-NTPs. 3: RNA Polymerase mit unmarkiertem *rrnB* P1 Fragment und ATP 50 μM und $[\alpha^{32}\text{P}]$ CTP 10 μCi ; 4: RNA-Polymerase mit *rrnB* P1 Fragment und ATP 50 μM , CTP 5 μM und $[\alpha^{32}\text{P}]$ UTP mit 10 μCi ; 5: RNA-Polymerase mit *rrnB* P1 Fragment und 50 μM ApC und 10 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]$ UTP.

In Spur 0 ist das radioaktiv markierte *rrnB* P1 Fragment aufgetragen. Dabei stellt die unterste Bande das freie Fragment dar. Bei dem mit ssDNA markierten Signal handelt es sich um einzelsträngige DNA, welche durch Markierung des Promotorfragmentes entsteht. In Spur 1 wurde das Promotorfragment mit RNA-Polymerase ohne Initiationsnukleotide vorinkubiert. Man kann auch hier schwache Komplexe detektieren, welche auf Höhe des Initiationskomplexes (RP_{init}) laufen. In Spur 2 sind RNA-Polymerase mit Fragment in Gegenwart der Initiationsnukleotide ATP und CTP aufgetragen. Hier kann man ein starkes Signal in Höhe des RP_{init} nachweisen. Dieses ist um ein vielfaches stärker als die Promotorkomplexe in Abwesenheit der Initiationsnukleotide. Dies entspricht den Erwartungen, da nur in Anwesenheit der Initiationsnukleotide heparinstabile produktive Komplexe gebildet werden (Gourse, 1988). Die folgenden Spuren benutzen den Einbau radioaktiven Substrats als Markierung für Initiationskomplexe, da in diesen das Substrat stabil ins aktive Zentrum der Transkriptionsblase inkorporiert wird und keine Rückreaktion in

dem beobachteten Zeitraum stattfindet (siehe Stabilitätsmessungen; Gourse, 1988). Spur 3 stellt einen Bindungsansatz in Gegenwart von 50 μM ATP und 10 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$] CTP dar. Hier kann man deutlich einen Komplex in Höhe des RP_{init} beobachten, welches den Komplex eindeutig als Initiationskomplex mit inkorporierten Nukleotiden identifiziert. In Spur 4 wurde RNA-Polymerase mit Promotorfragment und ATP, CTP und 10 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP inkubiert und aufgetragen. Bei dieser Nukleotidzusammensetzung war aus Transkriptionsmessungen (nicht gezeigt) bekannt, daß die RNA-Polymerase die Synthese nicht bei Position +3 stoppt, sondern durch Fehleinbau an einer GTP-Position die Synthese bis +8 durchgeführt wird. Erst an dieser Position wird durch ein doppeltes GTP die Synthese gestoppt. Diese Transkriptlänge kann durchaus ausreichend sein, um den Sigmafaktor abzuspalten und die Elongationsform der Polymerase zu bilden. Man kann in dieser Spur zwei Komplexe beobachten, welche mit RP_{init} und RP_{elong} bezeichnet wurden. Dabei ist der RP_{init} in seiner Intensität schwächer als der schneller laufende RP_{elong} . Dies bedeutet, daß ein Großteil der Polymerasen den Fehleinbau durchgeführt haben um den stabileren RP_{elong} zu bilden. Das unterschiedliche Laufverhalten ist nur durch starke Konformationsänderung der RNA-Polymerase oder einen Verlust von σ^{70} zu erklären. Schließlich wurde in Spur 5 RNA-Polymerase mit Template und dem Dinukleotid ApC und [$\alpha^{32}\text{P}$] UTP inkubiert. Dieses Dinukleotid bildet stabile Komplexe am *rrnB* P1 aus, kann aber nicht in Verlängerungsreaktionen als Substrat benutzt werden, da es aufgrund der fehlenden 5'-Triphosphatgruppe nur am 5'-Ende der RNA-Kette inkorporiert werden kann. Es dient also nur als Primer für die Transkriptionsinitiation. Dieses Dinukleotid wurde benutzt um Komplexe am *rrnB* P1 zu arretieren, die ein Trimer (ApCpU) inkorporiert haben. Dabei ist das UTP radioaktiv markiert und dient so zur Visualisierung des Komplexes. Wie erwartet ist hier nur ein Komplex zu beobachten, welcher auf gleicher Höhe mit dem ATP/CTP gebildeten Komplex migriert, also auch einen ternären Initiationskomplex darstellt. Im Vergleich zum ATP/CTP/UTP gebildeten Komplex ist hier auch nur der stabile Initiationskomplex sichtbar, da ein Fehleinbau hier nicht zu erwarten ist und daher auch nicht der stabilere RP_{elong} gebildet werden kann.

2.2.2.4 Bildungsgeschwindigkeit von Initiationskomplexen

Nachdem die Komplexbande des Initiationskomplexes eindeutig zugeordnet werden konnte, wurde die Bildungsgeschwindigkeit der Komplexe untersucht. Hierzu wurde 3 nM RNA-Polymerase mit 1 nM radioaktiv markiertem *rrnB* P1 und Ptacl Fragment in 1x Transkriptionspuffer vorinkubiert. Die Komplexbildung wurde gestartet durch Zugabe der Initiationsnukleotide ATP (50 μM) und CTP (5 μM) für den *rrnB* P1 Promotor und ATP (50 μM) für den Ptacl. Aus diesem Ansatz wurden zeitversetzt Aliquots entnommen und die Komplexbildung durch Zugabe von Heparin

(Endkonzentration 200 $\mu\text{g/ml}$) gestoppt. Die Proben wurden aufgearbeitet und auf ein 5%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Autoradiographie und Auswertung eines solchen Experimentes ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

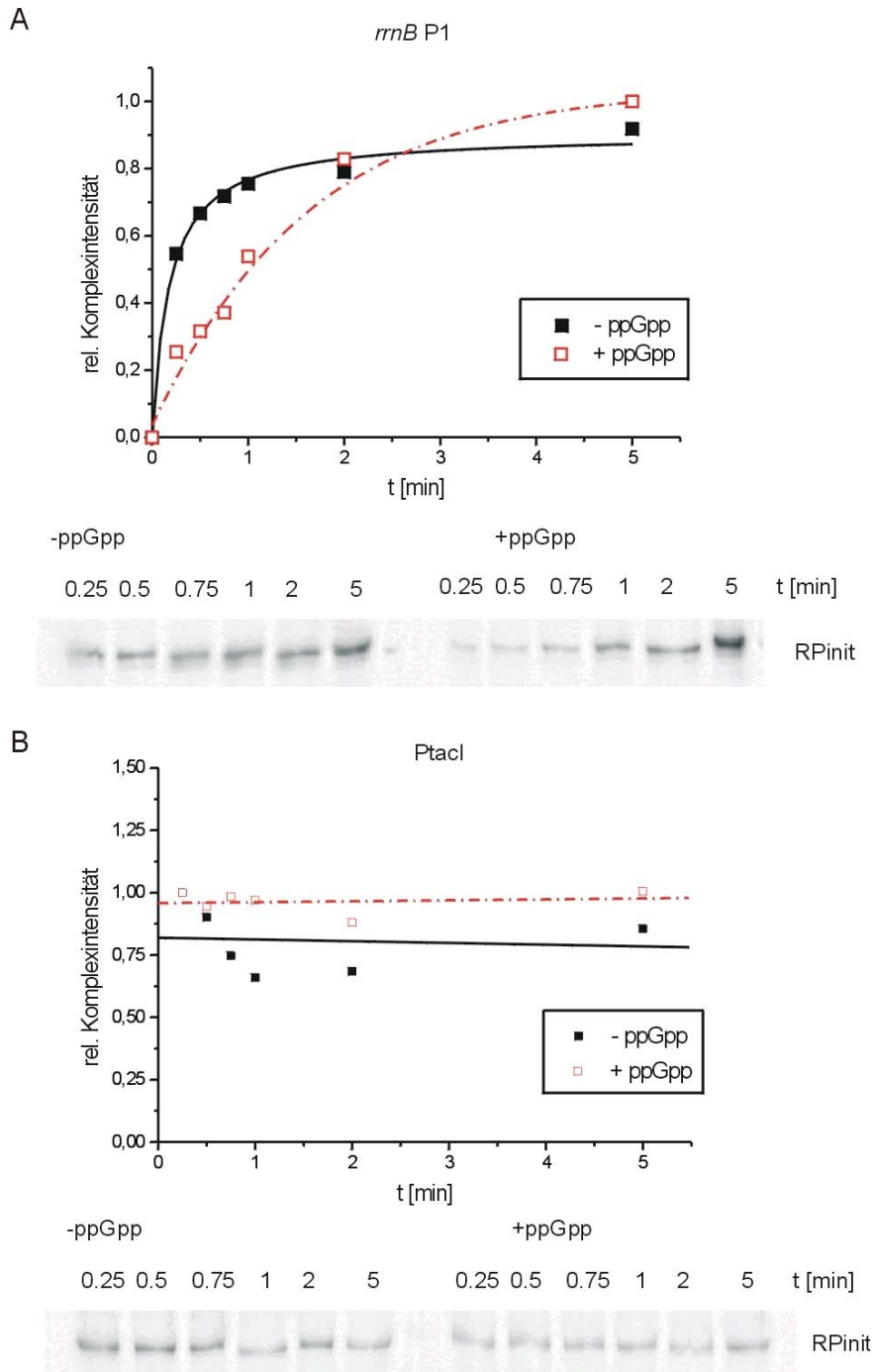


Abb. 2.11: Gelretardierungsanalyse der Initiationskomplexbildung am *rrnB* P1 und Ptacl. Dargestellt sind die Autoradiographien von Retardierungsgelen, sowie deren densitometrische Auswertung. A: Unterer Teil der Abbildung: Autoradiographie eines Retardierungsgeles mit dem *rrnB* P1, Die Spuren sind durch die Zeitpunkte der Heparinzugabe markiert, links sind die Ansätze in Abwesenheit von ppGpp dargestellt, rechts in Gegenwart von 300 μM ppGpp. Oberer Teil: Densitometrische Auswertung B: Unterer Teil der Abbildung: Autoradiographie eines Retardierungsgeles mit Ptacl, die Spuren sind durch die Zeitpunkte der Heparinzugabe markiert. Links sind die Ansätze in Abwesenheit von ppGpp, rechts in Anwesenheit von 300 μM ppGpp. Oberer Teil: Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms.

Die Auswertung der Gelretardierungsanalysen zeigt, daß ppGpp eine Verzögerung der Bildung des Initiationskomplexes am *rnnB* P1 induziert. Die halbmaximale Komplexbildung wird in Abwesenheit von ppGpp nach 15 Sekunden erreicht, in Gegenwart von ppGpp erst nach 1 Minute. Beim Ptacl Ist der Komplex offenbar schon bei Zugabe der Startnukleotide im Maximum, was bedeutet, daß der vorgebildete offene Komplex heparinstabil ist, und nicht im Retardierungsgel vom ternären Initiationskomplex zu unterscheiden ist. Daher kann man aus diesem Experiment nur die Aussage für den Ptacl Treffen, daß ppGpp keinen Einfluß auf Stabilität der Komplexe in Gelretardierungsanalysen hat.

Die Retardierungsanalysen haben den Nachteil, daß die Komplexbanden zum Teil sehr diffus sind. Dies ist darin begründet, da sowohl Vernetzung als auch Konzentration des Geles sehr gering sind, um die Komplexe im Gel nicht zu destabilisieren. Außerdem betragen die Laufzeiten der Gele bis zu 6 Stunden. Dies trägt ebenfalls zur Unschärfe der Banden bei.

2.2.2.5 Transkriptionsanalysen von Initiationskomplexen

Ein weiterer Weg die ternäre Initiationskomplexbildung zu untersuchen ist durch zeitabhängige Untersuchung der Produkte. Diese Methode hat im Vergleich zu Kaliumpermanagant-'footprints' und Gelretardierungsanalysen den Vorteil, daß nur die Bande des Vollängenprodukts in die Auswertung einbezogen werden muß, störende Nebenprodukte treten kaum auf. Ein weiterer Vorteil ist, daß über diese Methode die Menge des produktiven, elongierbaren Komplexes analysiert werden kann. Gelretardierungsanalysen und footprint-Techniken geben nur Auskunft darüber in welcher Menge Komplexe effektiv gebildet werden können. Dabei geben die Methoden keinen Aufschluß über die Qualität der Komplexe. So können ebenfalls sogenannte 'dead-end' oder 'moribund' Komplexe Signale mit den oben genannten Techniken erzeugen, obwohl sie nicht produktiv elongieren können. So wurde für den *lacUV5* Promotor gezeigt, daß nur ein bestimmter Prozentsatz von initiierten Polymerasen befähigt ist, produktiv zu elongieren (Mukhopadhyay *et al.*, 2001).

Zeitabhängige Transkriptmessungen zeigen nur die Menge der produktiven Komplexe an, da bei Abwesenheit von Pausen und vorzeitiger Termination die Menge an Vollängentranskript direkt proportional zu den produktiv initiierten Promotorkomplexen ist. Dabei muß sichergestellt werden, daß keine Elongationseffekte die Ergebnisse verfälschen. Die Initiationskomplexbildung wurde bei verschiedenen Konzentrationen der Initiationsnukleotide durchgeführt, um deren Einfluß auf die Inhibierung durch ppGpp zu untersuchen. Dabei wurde nur die Konzentration von ATP variiert, da die Erhöhung der CTP-Konzentration zu einer Verringerung der spezifischen Radioaktivität führt. So führt eine Erhöhung der

Konzentration um Faktor 10 zu einer 10fach schwächeren Markierung der Transkripte, die dann nicht mehr verlässlich nachzuweisen sind.

Aus diesem Grunde wurde folgendes Experiment für den *rnnB* P1 durchgeführt: Es wurde 5 nM Template-DNA mit 15 nM RNA-Polymerase in 1x Transkriptionspuffer in Abwesenheit und Gegenwart von 300 µM ppGpp vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Initiationsmixes gestartet, welcher 500 oder 50 µM ATP, 5 µM CTP und 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$] CTP enthielt. Aus diesem Ansatz wurden zeitversetzt Proben in eine 'chase'-Lösung überführt, welche Heparin (200 µg/ml Endkonzentration) und alle vier Nukleotide (200 µM Endkonzentration) enthält. Diese Lösung verhindert Neuintiation und verlängert die produktiven Initiationskomplexe. Elongationseffekte haben keinen Einfluß auf die Vollängenprodukte, da durch die hohe Nukleotidkonzentration Elongationspausen unterdrückt werden (siehe auch 2.1.3.4.). Der Ansatz wurde für weitere 8 min inkubiert und durch Zugabe eines gleichen Volumens Formamidprobenpuffer gestoppt und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Die Autoradiographie und Auswertung eines solchen Experimentes ist in Abbildung 2.12 zu sehen.

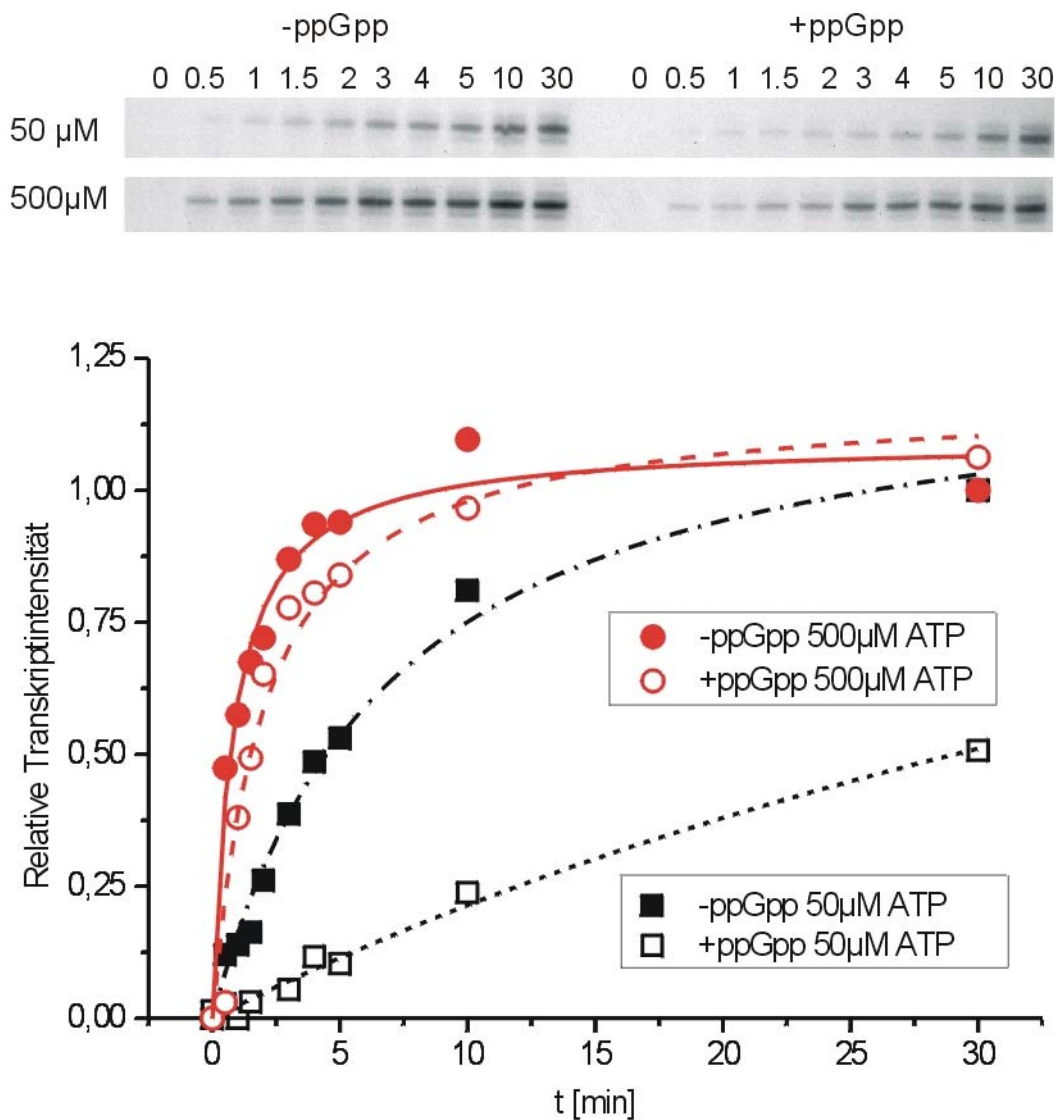


Abb. 2.12: Autoradiographie und densitometrische Auswertung der Initiationskomplexbildung am *rrnB* P1. Untersucht wurde die Initiationskomplexbildung bei 50 und 500 µM des Initiationsnukleotids ATP in An- und Abwesenheit von ppGpp. In dem oberen Teil der Abbildung sind die Autoradiographien der Vollängen-Transkriptionsprodukte in An- und Abwesenheit von 300 µM ppGpp dargestellt. Am linken Rand der Gele ist die ATP Konzentration aufgetragen, die Spuren sind mit dem Zeitpunkt der Überführung in 'chase'-Lösung beschriftet. Im unteren Teil ist die Auswertung der Experimente dargestellt. Die Kreise stellen die Transkriptionsreaktionen mit 500 µM ATP, die Quadrate mit 50 µM ATP dar. Die geschlossenen Symbole markieren die Reaktionen in Abwesenheit von ppGpp, die offenen Symbole in Anwesenheit von ppGpp.

Die Rate der Initiationskomplexbildung wird beschrieben durch die Steigung in der linearen Phase der Transkriptbildung. Diese ist direkt proportional zu Komplexmenge in Abhängigkeit der Reaktionszeit. Falls die Inhibierung durch ppGpp unabhängig von der Konzentration der Initiationsnukleotide sein sollte, muß die Inhibierung der Komplexbildungsrate bei unterschiedlichen Nukleotidkonzentrationen gleich sein. Dies wäre der Fall, wenn die nukleotidabhängige Bildung des Initiationskomplexes nicht der Schritt wäre, den ppGpp inhibiert. So wird zum Beispiel diskutiert, daß ppGpp den offenen Promotorkomplex destabilisiert (Barker *et al.*, 2001), der ppGpp-

vermittelte Mechanismus daher unabhängig vom Nukleotideinbau ist. Ein Unterschied in der Inhibierung der Rate spricht dagegen für die Inhibierung des Nukleotideinbaus in den Initiationskomplex, unabhängig von den zuvor gebildeten Komplexen. Tabelle 2.2 zeigt die Rate der Initiationskomplexbildung und die Guanosintetraphosphat vermittelte Inhibierung der Rate. Dabei wurde die Steigung der Kurve im linearen Bereich berechnet und als relative Transkripte pro Minute in die Tabelle eingetragen. Dies ist in diesem Fall ein Maß für die Rate der produktiven Initiationskomplexbildung. Die Inhibierung berechnet sich dann aus dem Quotienten der Komplexbildungsrate in An- und Abwesenheit von ppGpp.

Ansatz	Rate der Komplexbildung [relative Transkripte/min]		
	-ppGpp	+ppGpp	Inhibierung
50 μ M ATP	0,12	0,02	6 fach inhibiert
500 μ M ATP	0,25	0,28	1,12 fach aktiviert

Tab. 2.2: Dargestellt ist die Rate der Initiationskomplexbildung bei verschiedenen Konzentrationen der Initiationsnukleotide. In Abhängigkeit hierzu wurde der Grad der Inhibierung errechnet.

Der Grad der Inhibierung bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen zeigt, daß der Schritt des Nukleotideinbaus, also die Bildung des Initiationskomplexes direkt von ppGpp inhibiert wird.

Wie ist das zu erklären? Es wurde ein Modell entwickelt, auf welches in der Diskussion noch ausführlich eingegangen wird. Hier soll nur kurz die Basis des Modells erläutert werden: Man geht hierbei davon aus, daß ppGpp mit den Initiationsnukleotiden um die Bindung im aktiven Zentrum der RNA-Polmerase kompettiert. Ist bei sensitiven Promotoren die Konzentration der Initiationsnukleotide in Gegenwart von Guanosintetraphosphat gering, ist die Wahrscheinlichkeit der Einlagerung der Nukleotide zur Stabilisierung des Komplexes ebenfalls gering, was zum Zerfall des Komplexes führt, da die Rückreaktion bevorzugt wird. Ist die Konzentration der Nukleotide dagegen erhöht, steigt die Wahrscheinlichkeit der Einlagerung, was bedeutet, daß der Komplex stabilisiert und daher die inhibierende Wirkung des ppGpp abgeschwächt wird. Die Instabilität des offenen Komplexes bei ppGpp sensitiven Promotoren spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da bei stabilen Promotoren die Verzögerung des Nukleotideinbaus nicht relevant ist. Die instabilen *rrn* P1 Promotoren reagieren jedoch bei einer Verzögerung des Einbaus der Initiationsnukleotide zurück in den offenen und damit instabilen Komplex. Dies hat die Dissoziation der RNA-Polymerase zur Folge.

2.3 Analysen von superhelikalen Transkriptionstemplates

2.3.1 Einleitung und experimenteller Ansatz

Die Topologie der Promotorregion hat einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität des offenen Komplexes und damit auch auf die Transkription. Dabei erleichtert die negative Superhelikalität das Aufschmelzen der Promotorregion und erleichtert so die Bildung des offenen Komplexes. Für den *RNAI* Promotor des pBR322 wurde beispielsweise gezeigt, daß eine Veränderung der superhelikalen Dichte von 0.00 auf -0.06 die Bildung des offenen Komplexes um den Faktor zwei steigert (Wood und Lebowitz, 1984). Als superhelikale Dichte bezeichnet man die Anzahl superhelikaler Windungen pro DNA-Länge auf einem zirkularisiertem DNA-Strang. Dabei bewegt sich die superhelikale Dichte von Plasmiden beispielsweise bei -0.05, das heißt 1 negative superhelikale Windung pro 200 bp DNA. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, daß die ppGpp vermittelte Wirkung auf superhelikalen Templates im Vergleich zu linearen Templates nicht unter gleichen Bedingungen reproduziert werden konnte. Einerseits wurde bei Untersuchungen in Gegenwart von ppGpp unter Standard-Bedingungen keine Transkriptionsinhibierung festgestellt (Chatterji *et al.*, 1998; Ohlsen und Gralla, 1992), andererseits waren hohe Salzkonzentrationen notwendig, um auf superhelikalen Templates einen ppGpp-abhängigen Effekt hervorzurufen (Barker *et al.*, 2001). Diese Hochsalz-Bedingungen entsprechen nicht den nativen Bedingungen, es wurden 220 mM NaCl eingesetzt. Unter vergleichbaren Bedingungen kann man am linearen *rrnB* P1 Promotor keine Transkription mehr beobachten. Daher war es lohnenswert im Rahmen dieser Arbeit den Effekt der Topologie auf die Transkription und damit die ppGpp vermittelte Wirkung zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl 'multiple round' Transkriptionen als auch Analysen der Initiationskomplexbildung durchgeführt. Die Salzbedingungen entsprechen den vorherigen Experimenten. Als superhelikales Template wurde der pRT4 benutzt, der die komplette *rrnB* UAS-Region besitzt. Der P2 wurde deletiert und im Anschluß des P1 Promotors trägt das Plasmid die Sequenz für die stabile 5S-rRNA. Die Transkription wird durch die Rho-unabhängigen Terminatoren T1 und T2 des *rrnB*-Operons beendet.

2.3.2 'multiple round' Analyse am pRT4 I

Die 'multiple round' Transkription erfolgte unter Standardbedingungen (siehe 4.3.3.1). Es wurden 3 nM RNA-Polymerase mit 1 nM Template in 1x Transkriptionspuffer in An- und Abwesenheit von verschiedenen Guanosintetraphosphatkonzentrationen vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des NTP-Mixes gestartet, nach 15 Minuten mit 'chase-Lösung' behandelt, gestoppt und aufgearbeitet. Die Auftrennung

erfolgte über denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Autoradiographie und Auswertung eines solchen Experimentes ist in Abbildung 2.13 dargestellt:

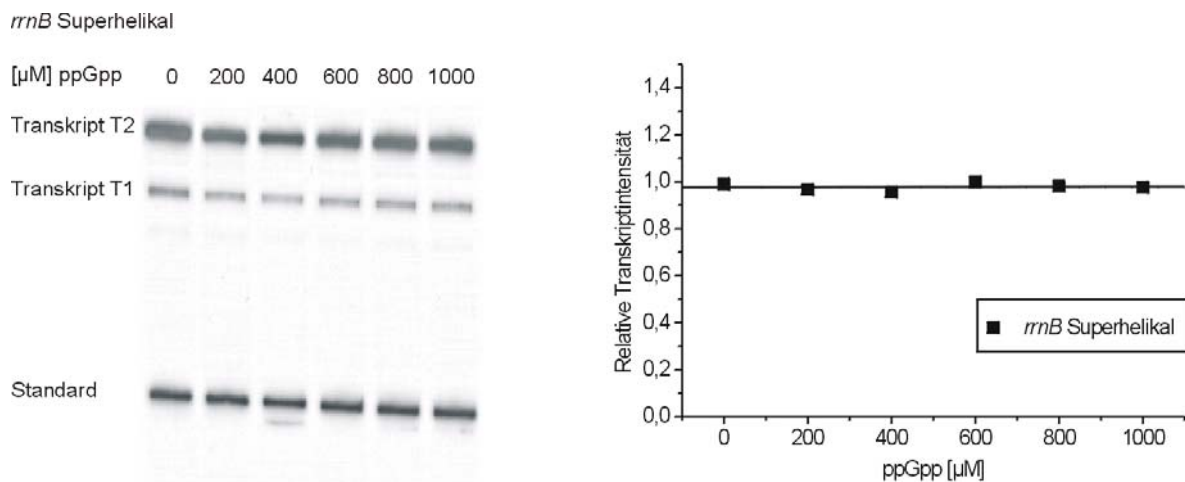


Abb. 2.13: 'multiple round' Analyse am supercoiled *rrnB* P1 Template. Dargestellt ist die Autoradiographie einer 'multiple round' Analyse (linker Teil der Abbildung) und die Auswertung des Experimentes (rechter Teil der Abbildung). Die Spuren der Autoradiographie sind mit der ppGpp-Konzentration beschriftet. Transkript T1 bezeichnet das Transkript, welches vom Terminator 1 beendet wird, Transkript T2 das vom Terminator T2 stammende Transkript. Standard bezeichnet den in die Reaktion eingebrachten Fällungsstandard. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die graphische Auswertung des Experimentes. Dabei ist die relative Transkriptintensität gegen die ppGpp-Konzentration aufgetragen.

Die Auswertung des Experimentes zeigt, daß unter Standardbedingungen keine Transkriptionshibierung bei superhelikalen Templates beobachtet werden kann. Die von Chatterji *et al.* (1998) gemachten Beobachtungen treffen damit auch auf dieses Experiment zu. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte die topologieabhängige Stabilität der Promotorkomplexe sein, da die ppGpp vermittelte Wirkung nur dann eintritt, wenn der offenen Promotorkomplex instabil ist. In dem Zeitraum, der analysiert wurde, könnte der Promotor derartig stabilisiert worden sein, daß der ppGpp Effekt nicht mehr detektierbar ist. Aus diesem Grund wurden Initiationsanalysen durchgeführt, um den Einfluß des Guanosintetraphosphats auf die Bildung des ternären Initiationskomplexes auf superhelikalen Templates zu überprüfen.

2.3.3 Bildung des Initiationskomplexes

Die Experimente wurden analog zu den Analysen unter 2.2.2.5. durchgeführt. Hierzu wurden 5 nM superhelikales Template mit 15 nM RNA-Polymerase in 1x Transkriptionspuffer in An- und Abwesenheit von ppGpp vorinkubiert, und durch Zugabe eines Initiationsmixes gestartet. Dieser Mix enthielt 50 µM ATP, 5 µM CTP und 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP. Es wurden zeitversetzt Aliquots entnommen und in die 'chase'-Lösung überführt. Diese Proben wurden weiter inkubiert, mit

Formamidprobenpuffer gestoppt, und über denaturierende Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Vollängentranskripte wurden densitometrisch ausgewertet und in dem folgenden Diagramm dargestellt. Es wurde das stärkste Signal in ppGpp-Abwesenheit gleich 1 gesetzt, um die relativen Transkriptaussbeuten zu ermitteln.

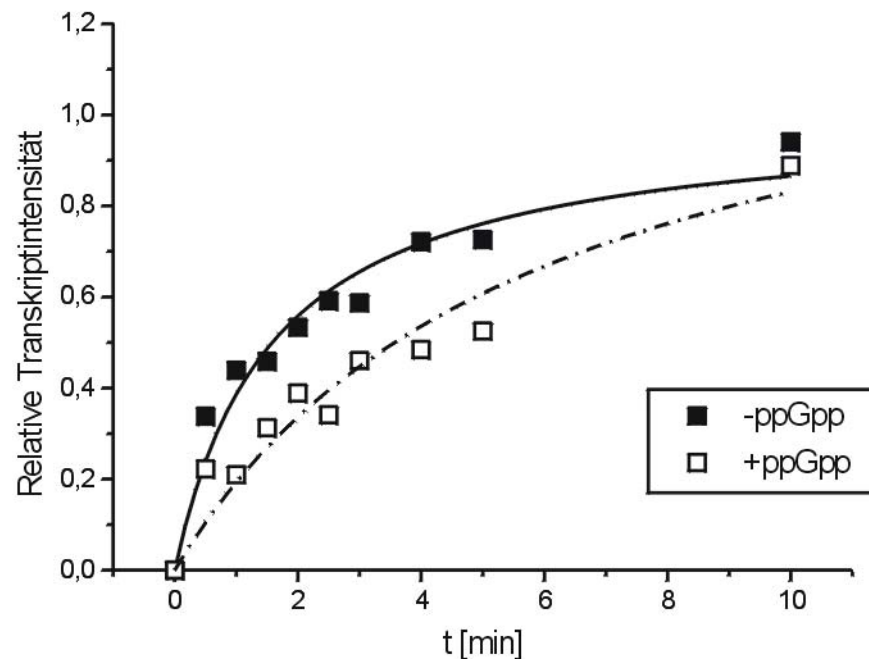


Abb. 2.14: Auswertung der Initiationskomplexbildung am superhelikalen *rmB* P1. Dargestellt ist die graphische Auswertung der ternären Initiationskomplexbildung. Dabei ist die relative Intensität gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

Die Auswertung der Experimente zeigt, daß ppGpp auch bei Transkriptionen von superhelikaler DNA Effekte auf die Bildung der ternären Initiationskomplexe ausübt. Hier ist besonderer Augenmerk auf den beobachteten Zeitbereich zu legen. Die Initiationskomplexbildung kommt schon bei einem untersuchten Bereich von 10 Minuten in ein Plateau. Dieses Ergebnis erreicht man bei linearen Templates erst bei einer 10-fach höheren ATP-Konzentration. Da die Inkubation mit dem Nukleotid-Mix in der Standard 'multiple round' Transkription 15 Minuten beträgt (siehe 2.1.3.1), ist es wahrscheinlich, daß auch hier die Komplexbildung schon ein Plateau erreicht hat, und daher die Inhibition der Transkription nicht mehr zu detektieren ist. Dies ist vergleichbar mit Transkriptionen von linearen DNA-Fragmenten in Anwesenheit von hohen Substratkonzentrationen. In diesen Experimenten war ebenfalls eine Abschwächung der inhibitorischen Wirkung zu beobachten. Um ppGpp-Effekte zu detektieren muß man daher in einem Zeitbereich der Initiationskomplexbildung

messen, in dem ein Unterschied zwischen der Komplexmenge in Abwesenheit und Gegenwart von ppGpp sichtbar war. Bei 15 minütiger Komplexbildungszeit sind die Komplexintensitäten jedoch vergleichbar, daher die Inhibierung minimal. Bei einer Initiationskomplexbildung von 2 Minuten kann man jedoch einen deutlichen ppGpp-Effekt beobachten. Die Komplexmenge in Abwesenheit des Effektors betrug 53 % im Vergleich zum Plateauwert. In Anwesenheit von Guanosintetraphosphat konnte eine Reduktion auf 38 % im Vergleich zum Plateau beobachtet werden.

2.3.4 'multiple round' Analyse am pRT4 II

Die Transkriptionsaktivität am superhelikalen Template wurde erneut in einer 'multiple round' *in vitro* Transkription mit zunehmender ppGpp-Konzentration untersucht. Aus der vorhergehenden Untersuchung wurde ein Zeitbereich der Inhibierung abgeleitet. Dazu wurde die Komplexmenge bei 2 Minuten Bildungszeit verglichen. Dieser Zeitwert wurde nun benutzt, um den Ablauf der 'multiple round' Transkription zu modifizieren. Dazu wurden die Transkriptionskomponenten mit zunehmender Guanosintetraphosphat-Konzentration standardmäßig vorinkubiert und anschließend mit dem Nukleotidmix gestartet (siehe 2.3.2.). Die anschließende Inkubationsdauer wurde nun aber, statt der üblichen 15 Minuten, auf zwei Minuten verkürzt. Im Anschluß wurden die Ansätze mit der 'chase'-Lösung inkubiert, gestoppt und aufgearbeitet. Die Transkripte wurden denaturierend aufgetrennt und autoradiographiert. Die Auswertung der Autoradiographie ist in Abbildung 2.15 dargestellt. Dabei wurde die Transkriptintensität der Probe in Abwesenheit von ppGpp gleich 1 gesetzt und alle anderen relativ hierzu. Als Fällungsstandard diente auch hier ein radioaktives DNA-Fragment, welches der Stopplösung zugesetzt war.

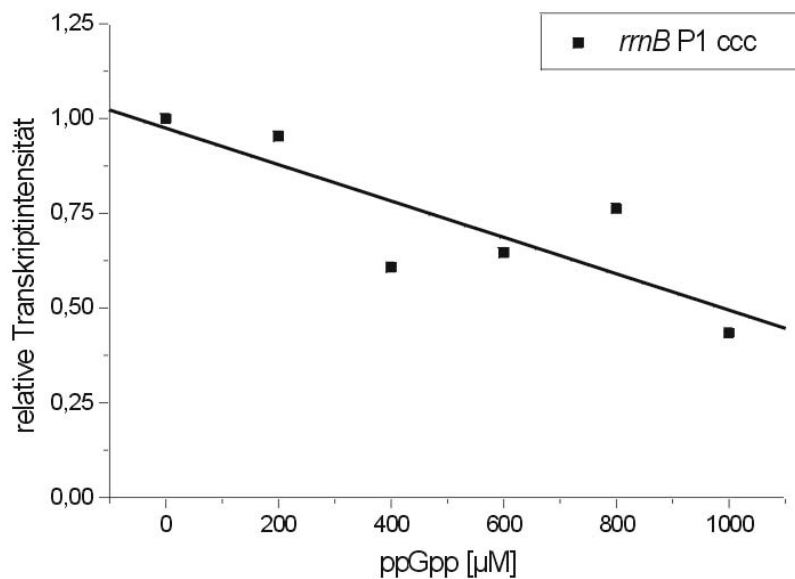


Abb. 2.15: Graphische Darstellung der Ergebnisse einer 'multiple round' Transkription am superhelikalen Template mit verkürzter Initiationszeit. Aufgetragen ist die relative Transkriptintensität gegen die ppGpp-Konzentration

Die Auswertung des Experimentes zeigt, daß man eine Inibierung der Transkription am superhelikalen Template durch Verkürzung der Komplexbildungszeit erreichen kann. Dabei fallen Abweichungen der Inkubationsdauer stärker ins Gewicht, da sie einen höheren prozentualen Fehler ausmachen. Dennoch ist eine Inhibierung mit zunehmender Guanosintetraphosphatkonzentration auszumachen. Diese beträgt bei einer ppGpp Konzentration von 1 mM 57 %. Das lineare System hingegen wird bei einer ppGpp Konzentration von 300 µM um ca. 90 % inhibiert. Das dieser Wert nicht erreicht wird ist mit der topologie-induzierten Stabilität der offenen Promotorkomplexe zu erklären. Um ähnliche Inhibierungen zu erhalten müßte man wahrscheinlich die Nukleotidkonzentration weiter reduzieren oder noch kürzere Zeiten für die Initiationskomplexbildung erlauben. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet. Zusammenfassend weisen die an superhelikalen Templates gewonnenen Daten ebenfalls auf die Richtigkeit des entwickelten Modells hin, da die Stabilisierung des offenen Komplexes eine Verminderung der Sensitivität verursacht. Die Verzögerung des Nukleotideinbaus hat daher nicht die gleiche drastische Auswirkung im Vergleich zu linearen Templates.

2.4 Überprüfungen des "Kompetitionsmodells"

Im Folgenden wurden Analysen mit ppGpp Funktionsanalogen durchgeführt, um die Richtigkeit des aufgestellten Modells zu überprüfen. Dabei mußten die Funktionsanalogen folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Sie müssen durch den sekundären Kanal in das aktive Zentrum der RNA-Polymerase gelangen und daher nukleotidartigen Charakter besitzen.
2. Sie dürfen dennoch nicht als Substrat für die Transkriptionsreaktion dienen.
3. Die Diffusionszeit im sekundären Kanal sollte, relativ zu 'normalen' Nukleotiden, verlangsamt sein um einen wirksamen Block der Nukleotiddiffusion zu bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dinukleotide als Funktionsanaloge benutzt. Von diesen war bekannt, daß sie als Initiationsnukleotide fungieren können und daher durch den sekundären Kanal ins aktive Zentrum gelangen (siehe auch 2.2.2.3). Dinukleotide besitzen am 5' Ende keine Triphosphatgruppe. Sie können also nicht mit dem naszierenden RNA-Transkript verknüpft werden, da eine Hydrolyse der Triphosphatgruppe am 5'-Ende essentiell für die Knüpfung der Phosphodiesterbindung ist. Setzt man Dinukleotide ein, die nicht der Startsequenz des Promotors entsprechen, können diese nicht als Substrat für die Transkriptionsreaktion dienen. Schließlich ist aus eigenen Transkriptionsmessungen bekannt, daß der Einbau der Dinukleotide verlangsamt im Vergleich zu Mononukleotiden erfolgt (nicht gezeigt). Hiermit ist also auch der letzte Punkt der Voraussetzungen erfüllt.

2.4.1 *In vitro* Transkription mit ppGpp Funktionsanalogen

2.4.1.1 Einleitung und experimenteller Ansatz

Für die folgenden Experimente wurden Dinukleotide gewählt, die den genannten Anforderungen entsprachen. Es mußten für jeden Promotor verschiedene Dinukleotide benutzt werden, um nicht als Startprimer zu dienen. Daher wurden folgende Kombinationen untersucht: Für den Ptacl Promotor CpC und ApC, für den *rrnD* P1 ApA und für den *rrnB* P1 ApA und ApU. Es wurden verschiedene Analysen durchgeführt, um Vergleiche zu den vorherigen Ergebnissen zu ziehen. Das System wurde in 'multiple round'-Transkriptionen untersucht, um den 'über alles'-Effekt zu testen. Anschließend wurden 'single round'-Transkriptionen durchgeführt, um den inhibitorischen Effekt auf die Phase der Transkription einzugrenzen. Schließlich wurden Komplexbildungsraten bestimmt, um den Mechanismus der Inhibierung zu bestimmen. Nur falls alle diese Experimente ähnliche Ergebnisse im Vergleich zum Guanosintetraphosphat ergeben, ist ein gleicher Mechanismus wahrscheinlich.

2.4.1.2 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen

Es wurden 'multiple round' Analysen in Gegenwart von ppGpp und ppGpp Funktionsanalogen durchgeführt. Die Transkriptionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Effektonukleotide durchgeführt, um eine Sensitivitätsabstufung der getesteten Promotoren zu detektieren. Die Transkriptionen wurden nach

Standardprotokoll durchgeführt (siehe 4.3.3.1), es wurden die verschiedenen Ansätze mit den Effektornukleotiden vorinkubiert und durch Nukleotidzugabe gestartet. Die Abbildungen 2.16 und 2.17 zeigen die Autoradiographien und densitometrische Auswertung dieser Experimente.

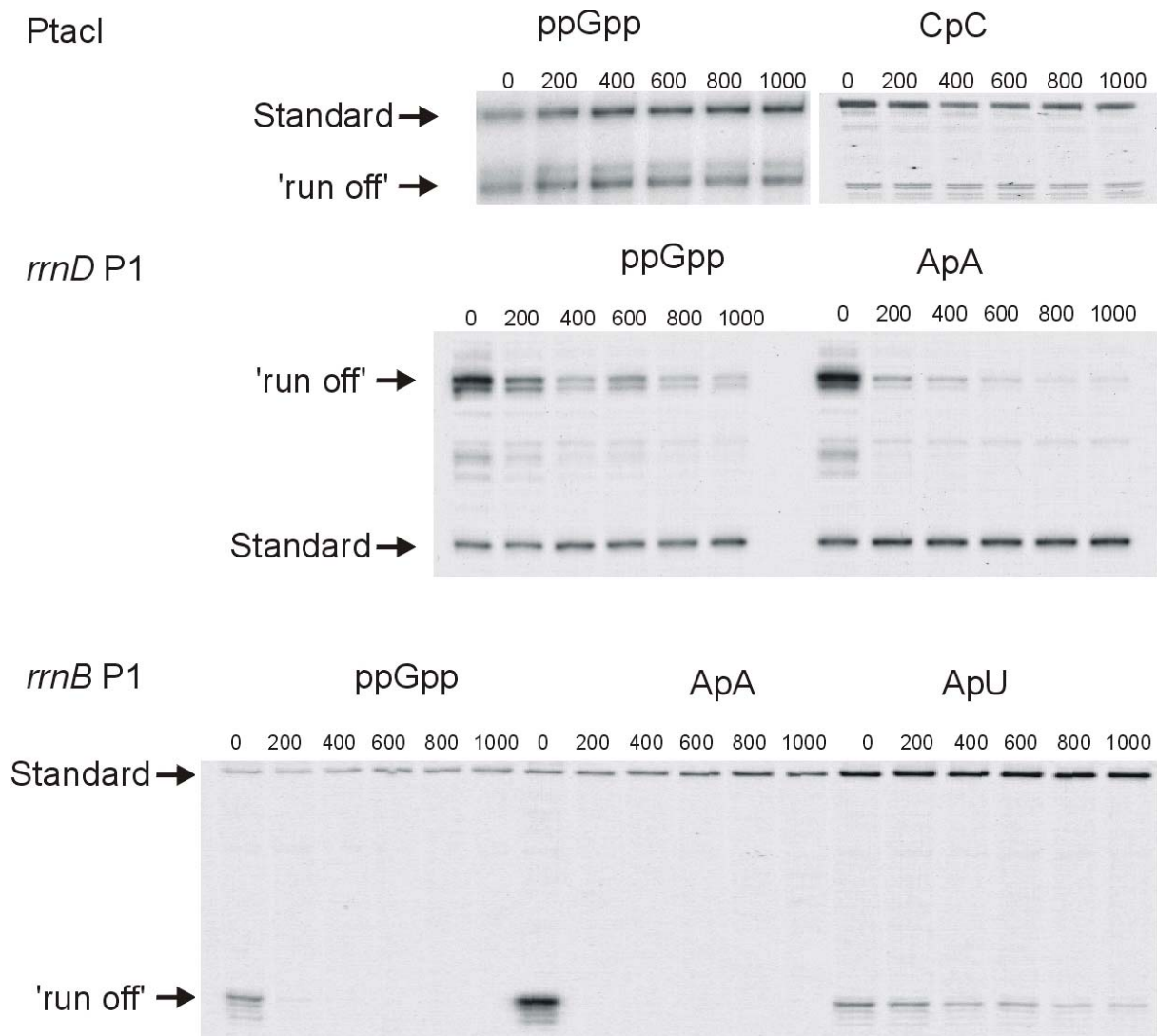


Abb. 2.16: 'multiple round' Analyse von ppGpp Funktionsanalogen. Untersucht wurde die Transkriptaubeute in 'multiple round' Analysen in Gegenwart von verschiedenen Effektorkonzentrationen. Die Abbildung zeigt die Autoradiographien der *in vitro* Transkriptionen der Promotoren Ptacl, *rrnD* P1 und *rrnB* P1, wobei die Spuren mit der Konzentration des jeweiligen Effektors [µM] beschriftet sind. Die Transkript- und Standardbanden sind ebenfalls gekennzeichnet.

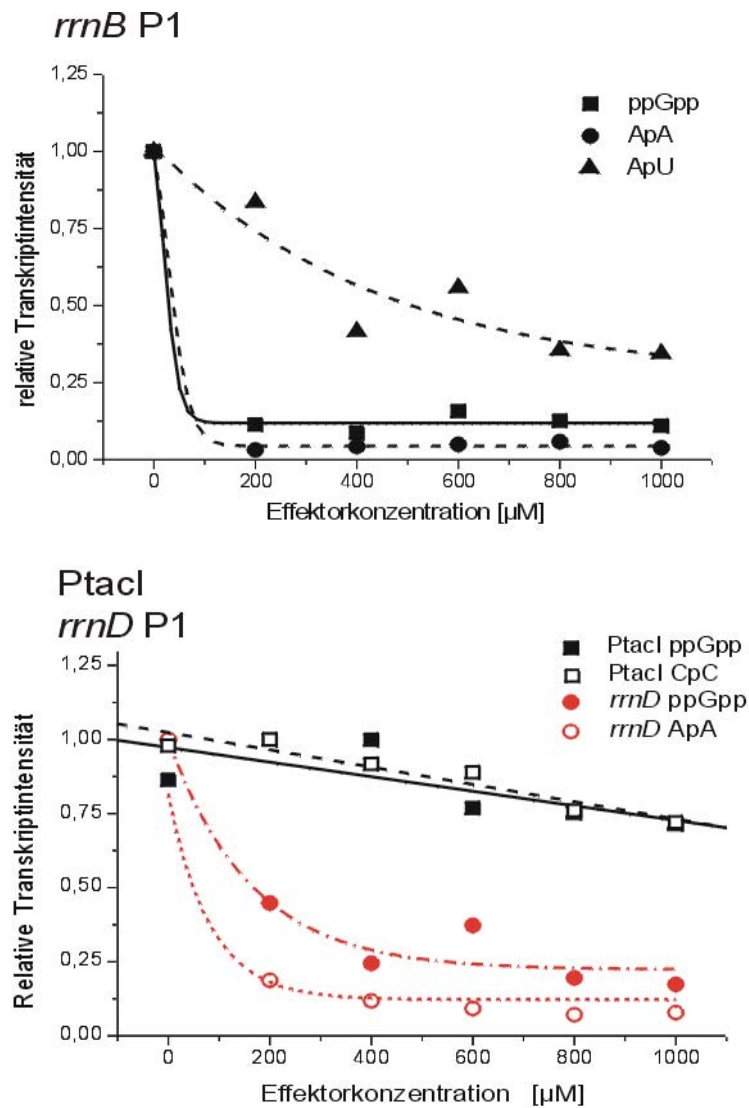


Abb. 2.17: Auswertungen der Autoradiographien der Abbildung 2.16. Dargestellt sind die densitometrischen Auswertungen der 'multiple round' Transkriptionen in Anwesenheit von verschiedenen Effektorkonzentrationen. Dabei wurde die Intensität des Signals in Abwesenheit des Effektors immer gleich 1 gesetzt und alle anderen Signale relativ dazu berechnet.

Die Auswertung der Autoradiographien zeigt, daß der inhibitorische Effekt der Funktionsanaloge auf die verschiedenen Promotoren vergleichbar mit dem Guanosintetraphosphates ist. Dabei ist der stärkste Effekt in Gegenwart von ApA auf die regulierten Promotoren *rrnB* P1 und *rrnD* P1 sichtbar. Dieses Nukleotid konnte leider nicht mit dem Ptacl getestet werden, da ApA als Primer für die Transkription genutzt wird. ApU provoziert einen alternativen Promotorstart (nicht gezeigt) am Ptacl und konnte daher ebenfalls nicht als Funktionsanalog genutzt werden. CpC zeigt jedoch in der Analyse mit dem unregulierten Ptacl Promotor eine unspezifische Inhibierung im gleichen Umfang wie ppGpp, was eine spezifische Wirkung der Dinukleotide auf ppGpp sensitive Promotoren nahelegt. Das Dinukleotid ApU hat auf

den regulierten *rrnB* P1 eine schwächere Wirkung relativ zu anderen Effektoren, inhibiert jedoch immer noch deutlich stärker als ppGpp beim Ptacl.

Promotor	Nukleotid	Inhibierung [%]
Ptacl	ppGpp	25
	CpC	24
<i>rrnB</i> P1	ppGpp	90
	ApA	95
	ApU	70
<i>rrnD</i> P1	ppGpp	75
	ApA	80

Tab. 2.3: Inhibitorischer Effekt der verschiedenen Dinukleotide auf die "multiple round"-Transkription der untersuchten Promotoren. In der Tabelle ist der untersuchte Promotor, das verwendete Effektonukleotid und die maximale Inhibierung eingetragen.

Zusammenfassend ist die Wirkung der Funktionsanaloge in einer 'multiple round' Analyse vergleichbar zum Guanosintetraphosphat. Dies alleine ist jedoch kein Beweis für einen ppGpp vergleichbaren Mechanismus. Daher wurden nachfolgend Analysen zum Wirkort in Rahmen der Transkriptionsinitiation durchgeführt.

2.4.1.3 Initiations- und Elongationsmessungen am *rrnB* P1, *rrnD* P1 und Ptacl

Um die Wirkung der Funktionsanaloge auf die Initiationskomplexbildung zu analysieren, wurden 'single round' Analysen nach Standardprotokoll (siehe 2.1.3.2.) durchgeführt. Die Ansätze in Gegenwart des Effektors wurden mit 300 μ M Dinukleotid inkubiert und anschließend verlängert. Die Proben wurden aufgearbeitet, durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und exponiert. Die Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet, wobei das Signal der Probe in Abwesenheit des Effektors gleich 1 gesetzt wurde. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 2.18 dargestellt.

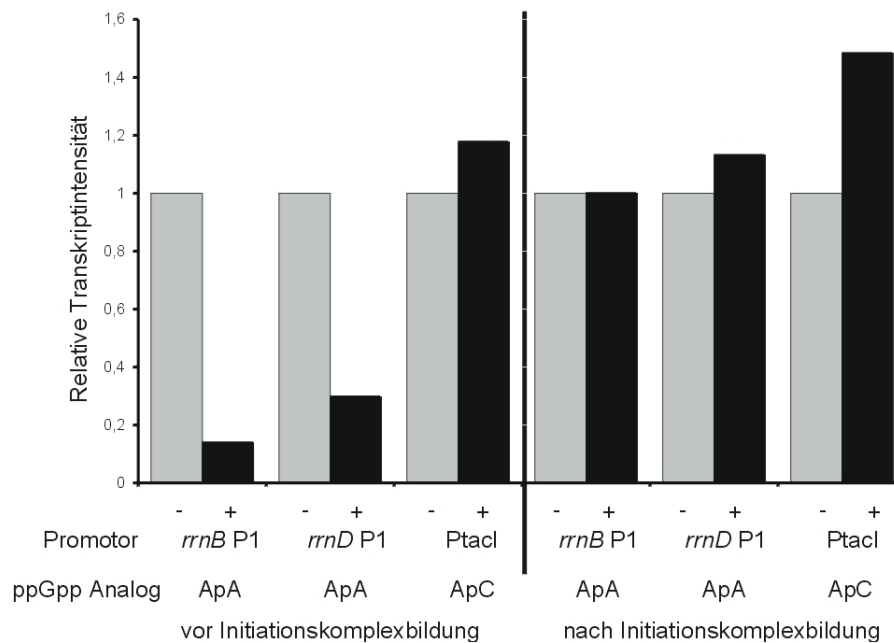


Abb. 2.18: Effekte von ppGpp-Funktionsanalogen auf unterschiedliche Phasen der Transkription. Das Diagramm zeigt den Effekt von Funktionsanalogen auf die Initiation der Transkription (linker Teil des Diagramms) und die Transkription nach Initiationskomplexbildung (rechter Teil des Diagramms). Dabei ist die relative Intensität der Transkriptionsprodukte auf der Y-Achse aufgetragen. Auf der X-Achse wurden die Promotoren sowie die Art und Anwesenheit des Dinukleotids vermerkt.

Die Auswertung der Autoradiographien zeigt, daß die Dinukleotide an den ppGpp sensitiven Promotoren nur auf die Initiation der Transkription wirkt. Dabei liegt die Inhibierung für den *rrnB* P1 bei 90 %, für den *rrnD* P1 bei 75 %. Der *Ptacl* wird um 10 % stimuliert. Bei Zugabe nach Initiationskomplexbildung sind keine Inhibierungen mehr detektierbar: Der *rrnB* P1 bleibt unverändert, der *rrnD* P1 wird um 8 % stimuliert und der *Ptacl* um 45 %. Eine Wirkung nach Initiationskomplexbildung ist also nicht sichtbar. Das Dinukleotid ApC wirkt hingegen nicht inhibierend auf die Transkription des nicht stringent kontrollierten *Ptacl*. Zusammenfassend ist die Wirkung der Funktionsanalogen vergleichbar mit der Wirkung Guanosintetraphosphats auf die Transkription stringent kontrollierter und nicht kontrollierter Promotoren. Dies legt eine Wirkungsweise ähnlich der des ppGpp nahe, ist also eine Bestätigung des aufgestellten Modells.

2.4.1.4 Analysen der Initiationskomplexbildung in Gegenwart von ppGpp Analogen

Abschließend wurde die Wirkung der Funktionsanalogen auf die Initiationskomplexbildung untersucht. Hierzu wurde wie unter 2.2.2.5. verfahren. Es wurde auch hier nur der *rrnB* P1 Promotor untersucht. Als Funktionsanalog wurde ApA verwendet, da dieses den stärksten Effekt auf die Transkription hatte. In diesen Experimenten wurden nur 150 µM des Effektors eingesetzt, da die Anwesenheit von 300 µM ApA eine absolute Inhibierung der Initiationskomplexbildung verursachte

(nicht gezeigt). Um daher noch unter auswertbaren Bedingungen zu arbeiten wurde eine geringere Konzentration eingesetzt. Die Analyse der Initiationskomplexbildung wurde unter den gleichen Bedingungen (siehe 2.2.2.5.) durchgeführt, die Proben wurden aufgearbeitet, über denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographiert. Die densitometrische Auswertung der Autoradiographien ist in der Abbildung 2.19 dargestellt.

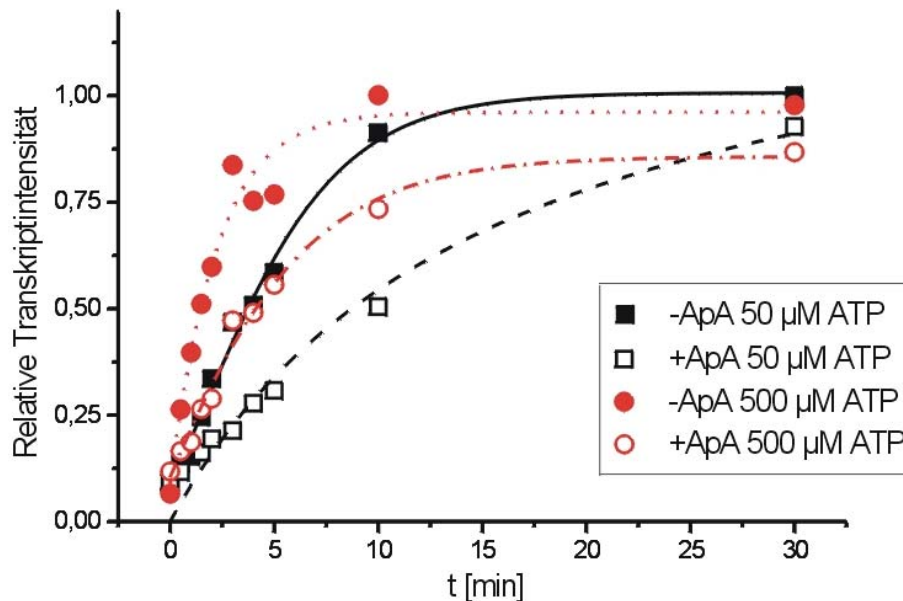


Abb. 2.19: Initiationskinetik am *rmB* P1 in An- und Abwesenheit von 150 μM ApA bei verschiedenen Initiationsnukleotidkonzentrationen. Dargestellt ist das Diagramm der densitometrischen Auswertung von Initiationskinetiken am *rmB* P1 in Abwesenheit und Gegenwart von 150 μM ApA bei Konzentrationen von 50 und 500 μM ATP. Dabei ist die relative Transkriptintensität gegen die Initiationszeit aufgetragen. Die Quadrate beschreiben die Transkription mit 50 μM ATP, die Kreise Signalintensitäten bei 500 μM ATP. Die Signale in Abwesenheit von ApA sind ausgefüllt und die offenen Symbole beschreiben die Transkriptintensitäten in Anwesenheit von ApA.

Wie im Fall der ppGpp vermittelten Inhibierung der Initiationsrate wurde hier ebenfalls der Grad der Inhibierung ermittelt. Dabei muß die ApA vermittelte Wirkung bei hohen Konzentrationen des Initiationsnukleotids ebenfalls geringer ausfallen im Vergleich zu niedrigen Konzentrationen. Nur dann kann von einem gleichen Mechanismus der Transkriptionseinhibierung ausgegangen werden. Daher wurde auch hier der Grad der Inhibierung relativ zur Nukleotidkonzentration errechnet:

Ansatz	Rate der Komplexbildung [relative Transkripte/min]		
	-ApA	+ApA	Inhibierung
50 μM ATP	0,13	0,04	3,25 fach
500 μM ATP	0,25	0,11	2,27 fach

Tab. 2.4: Dargestellt ist die Rate der Initiationskomplexbildung bei verschiedenen Konzentrationen der Initiationsnukleotide in An- und Abwesenheit von 150 μM ApA. Relativ hierzu wurde der Grad der Inhibierung errechnet.

Die Auswertungen der Experimente lassen auf eine Analogie des ppGpp vermittelten Mechanismus schließen. Bei hohen Konzentrationen des Initiationsnukleotides ist ebenfalls eine schwächere Inhibierung der Initiationsrate zu beobachten, im Gegensatz zu niedrigen NTP-Konzentrationen. Diese Inhibierung erreicht in diesem Falle nicht den gleichen Wirkungsgrad, den das Effekturnukleotid Guanosintetraphosphat verursacht. Jedoch muß in Betracht gezogen werden, daß in diesem Experiment die Konzentrationen des Effektors unterschiedlich sind. Wie bereits erwähnt wurden geringere Konzentrationen des Dinukleotids im Vergleich zu den vorher gewählten ppGpp-Konzentrationen eingesetzt, da die Transkripte in Gegenwart des Effektors bei vergleichbaren Konzentrationen nicht zuverlässig auswertbar waren. Zusammenfassend kann man daher von einem Nachahmen des Mechanismus durch die Funktionsanaloge ausgehen, was die Richtigkeit des aufgestellten Modells nahelegt. Natürlich müssen noch weitergehende Untersuchungen mit ppGpp-Analogen durchgeführt werden, welche strukturell ähnliche Eigenschaften aufweisen und nicht an eine diskutierte Bindestelle binden können. Beispielsweise wäre die Synthese eines Adenosintetraphosphats oder anderer Nukleotidtetraphosphate lohnenswert, um die ppGpp vermittelte Wirkung nachzuahmen. Wären diese Derivate in der Lage die gleichen Effekte zu vermitteln, wäre es noch ein sicherer Hinweis für das "Kompetitionsmodell". Dieses Derivat war jedoch leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr darzustellen.

3 Diskussion

3.1 *In vitro* Transkriptionsstärke und differentielle Inhibierung der Promotoren *rrnB* P1, *rrnD* P1 und *Ptacl*

In 'multiple round' Transkriptionsexperimenten wurden die regulierten *rrnB* P1 und *rrnD* P1 Promotoren im Vergleich zum nicht regulierten *Ptacl* Promotor untersucht. Der *Ptacl* zeigte eine lineare Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität zur Effektorkonzentration, die bei weitem nicht das Ausmaß der sensitiven Promotoren besitzt. Die maximale Inhibierung bewegt sich in einem Bereich von 10 % im Vergleich zur Abwesenheit des Effektors. Das Ergebnis entspricht den Erwartungen, denn der *Ptacl* verfügt nicht über einen Konsensus-Diskriminator, welcher ein notwendiges Strukturelement im Rahmen der stringenten Kontrolle darstellt (Zacharias *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu den Ergebnissen am *Ptacl* wurde für die rRNA Promotoren eine abgestufte Sensitivität gegenüber dem Effektor Guanosintetraphosphat festgestellt. Es zeigte sich, daß ppGpp schon bei einer Konzentration von 300 µM eine maximale Inhibierung bei diesen Promotoren auslöst. Dabei wird der *rrnD* P1 schwächer inhibiert (82% im Maximum) als der *rrnB* P1 (92%). Dies entspricht ebenfalls den Erwartungen, da beide Promotoren über einen perfekten Diskriminator verfügen. Die Promotoren sind in ihrer Kernstruktur unterschiedlich aufgebaut, da der *rrnD* P1 drei Abweichungen in der Konsensus -35 Region besitzt, der *rrnB* P1 jedoch nur zwei Abweichungen und damit näher an der Konsensussequenz ist. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Struktur der -35-Region und der Stärke der Regulation in Gegenwart von ppGpp nachgewiesen werden. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist die Struktur der ternären Initiationskomplexe: Der *rrnB* P1 startet mit einem ApCpUpG, der *rrnD* P1 mit einem GpUpUpG. Hier könnte die abgeschwächte Sensitivität begründet sein. Während der *rrnB* P1 unter UTP-Limitierung, wie sie in 'multiple round' Transkriptionen zwecks Markierung eingesetzt wird, lediglich ein Dimer zur Stabilität erzeugen kann, bildet der *rrnD* P1 mit CTP als markiertem Nukleotid, ein möglicherweise stabileres Tetramer. Die Struktur beider Promotoren ist ansonsten gleich. Beide besitzen einen suboptimalen 'spacer' von 16 bp und eine Konsensus -10 Region.

Beide stringent kontrollierten Promotoren werden schon bei geringen Konzentrationen des Effektors wirksam inhibiert. Dies spricht für eine Bedeutung des Guanosintetraphosphats nicht nur im Rahmen der stringenten Kontrolle, bei der die Konzentrationen des Effektors bis ins Millimolare reichen, sondern auch bei der Wachstumsratenregulation (Cashel *et al.*, 1996), bei der die Konzentrationen des Effektors im mikromolaren Bereich liegt.

3.2 Wirkphase des Effektors im Rahmen der Initiation stringent kontrollierter Promotoren

Die Wirkungsweise auf die einzelnen Stufen der Komplexbildung während der Initiation wurde ebenfalls in dieser Arbeit über verschiedene Ansätze untersucht. Diese Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefaßt:

1. Die Transkription wird nur vor oder während der Bildung ternärer Initiationskomplexe wirksam inhibiert. Nach der Bildung der ternären Komplexe fällt die Wirkung des Effektors nur noch gering aus. (siehe 2.1.3.2 und 2.1.3.4)
2. Die 'promoter clearance' ist nicht durch Guanosintetraphosphat inhibiert. Ebenso spielen Pausierungseffekte auf Elongationsebene keine Rolle bei den hier betrachteten Inhibierungen. (siehe 2.1.3.4)
3. Die Konzentration der Initiationsnukleotide ist entscheidend für die ppGpp vermittelte Wirkung. Dabei wird mit hohen NTP-Konzentrationen eine weniger starke Inhibierung beobachtet als bei geringeren NTP-Konzentrationen. Dies unterstreicht eine Beteiligung des ternären Initiationskomplexes für die ppGpp vermittelte Wirkung. (siehe 2.1.3.3)
4. Die Stabilität der Initiationskomplexe wird durch ppGpp nicht signifikant verändert. Dies bedeutet, daß der Zerfall des Initiationskomplexes nicht Basis für die ppGpp vermittelte Wirkung ist. (siehe 2.2.1.2 und 2.2.1.3)
5. Die Struktur der Transkriptionsblase wird durch ppGpp wahrscheinlich nicht verändert. Dies ist ein Hinweis auf eine unveränderte Struktur des Initiationskomplexes. (siehe 2.2.1.2)
6. Die Bildung des ternären Komplexes zeigt eine verzögerte Geschwindigkeit in Gegenwart von Guanosintetraphosphat (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.4) Dies ist abhängig von der Konzentration der Initiationsnukleotide: Bei einer Konzentration von 50 μM ATP wird die Bildung um den Faktor 6 inhibiert, jedoch bei einer Konzentration von 500 μM ATP um den Faktor 1,12 aktiviert, welches im Rahmen des Fehlers liegt (siehe 2.2.2.5) Dies ist ein Beweis für die spezifische Wirkung ppGpps auf die Bildung des Initiationskomplexes, da durch die Inhibierung der Bildungsrate in Abhängigkeit der Konzentration der Initiationsnukleotide nur dieser Schritt in Betracht kommen kann. Ein Effekt auf andere Stufen der Initiation sollte unabhängig von der Nukleotidkonzentration sein. Dies deutet auf eine mögliche Kompetitionssituation zwischen dem Effektor und den Initiationsnukleotiden hin.

Die zuvor gemachten Beobachtungen lassen wie folgt sich in das Schema der Initiation einordnen:

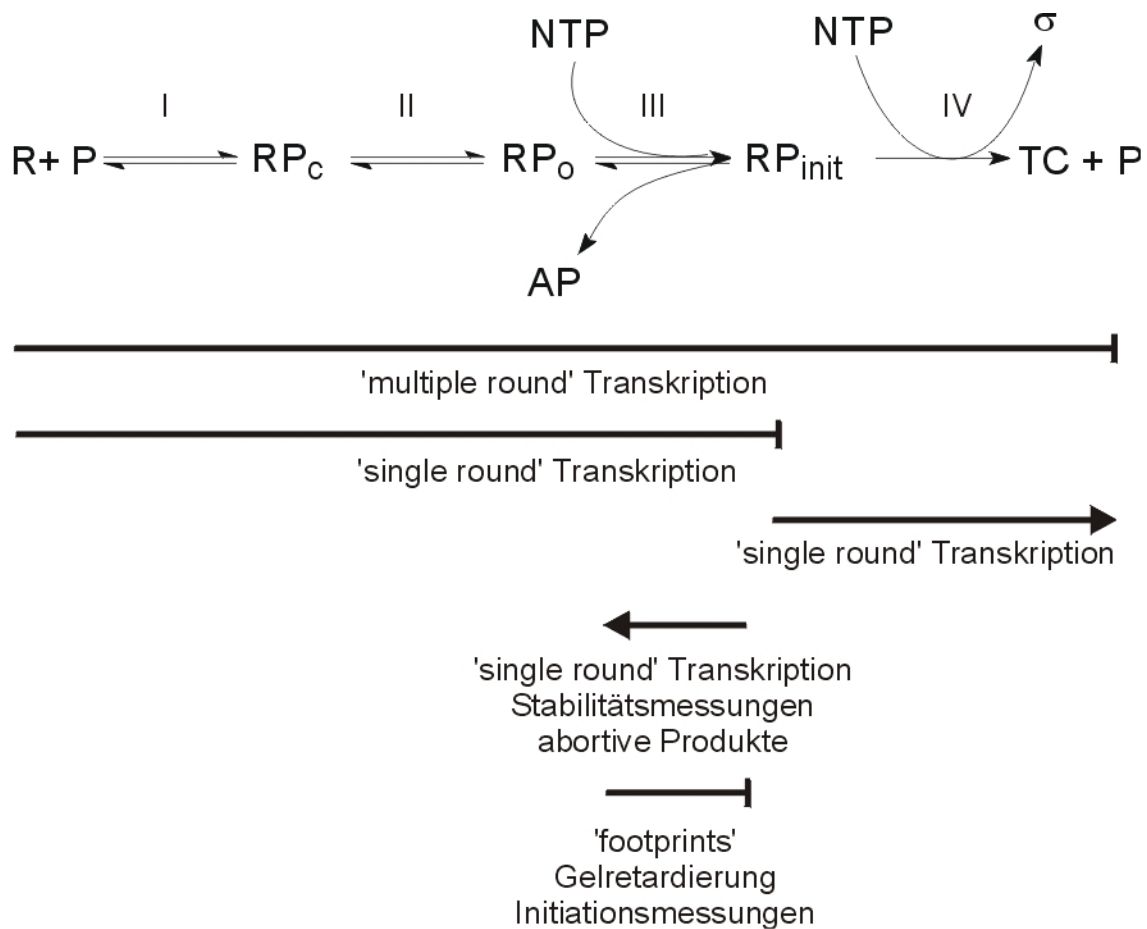


Abb. 3.1: Initiationscharakteristiken stabiler *rrm* Promotoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in das Schema eingeordnet. Dabei sind inhibierende Einflüsse von Guanosintetraphosphat durch abgeschlossene Geraden gekennzeichnet, keine meßbaren ppGpp Effekte werden durch Pfeile markiert. Die Methoden der Datengewinnung sind unter den Geraden beschrieben.

Die Abbildung 3.1 zeigt die Bildung von RNA-Polymerase Promotor-Komplexen im Rahmen der Transkriptionsinitiation. Markiert sind die untersuchten Komplexcharakteristika und der Einfluß von Guanosintetraphosphat auf die einzelnen Schritte. Entscheidend für die Regulation ist die Inhibierung der ternären Initiationskomplexbildung (RP_{init}) durch Guanosintetraphosphat. Dies wurde über verschiedene Methoden bestätigt: Einerseits wurde die Menge von gebundener RNA-Polymerase und der Anteil gebildeter Transkriptionsblase durch Gelretardierungsanalysen und 'footprint'-Techniken analysiert, andererseits wurde die Menge an produktivem Komplex durch Transkriptionsanalysen untersucht. Beide Untersuchungsmethoden zeigten die gleichen Resultate in Gegenwart von ppGpp.

Eine gesteigerte Rückreaktion des Initiationskomplexes (RP_{init}) konnte nicht beobachtet werden, weder über die Lebensdauer der Komplexe, noch durch vermehrte Bildung abortiver Produkte. Über die binären Komplexe (RP_c , RP_o) können nur wenig Angaben gemacht werden, da sie aufgrund der kurzen Lebensdauer mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht verlässlich untersucht werden konnten.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die instabilen Komplexe durch noch weitere Destabilisierung zu der hier untersuchten Inhibierung führen könnten. Einen Effekt auf die 'promoter escape' konnte in dem hier untersuchten System ebenfalls ausgeschlossen werden.

3.2.1 Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit mit bereits publizierten Arbeiten

Die gemachten Beobachtungen werden im Folgenden mit bereits publizierten Arbeiten über den Mechanismus der ppGpp-vermittelten Inhibierung diskutiert. Aus mehreren Untersuchungen war bekannt, daß die Initiation der Transkription für die starke Inhibierung der Synthese ribosomaler RNAs verantwortlich ist. Dafür sprechen mehrere Beobachtungen. Zum einen wurde die Promotorsequenz von stringent kontrollierten Genen als verantwortliche Komponente identifiziert. Dabei ist die essentielle Region für die stringente Kontrolle auf einen Bereich von -40 bis +1 für den *rnnB* P1 identifiziert worden (Gourse *et al.*, 1986; Bartlett und Gourse, 1994; Josaitis *et al.*, 1995). Als notwendiges Sequenzmotiv für alle stringent kontrollierten Promotoren gilt die Diskriminatorsequenz als unumstritten (Riggs *et al.*, 1986; Zacharias *et al.*, 1989). Zum anderen ist die RNA-Polymerase als Zielort der Regulation identifiziert worden. Dafür sprechen gefundene RNA-Polymerase Mutanten, die einen relaxierten Phänotyp zeigen (Little *et al.*, 1983; Nene und Glass, 1983; Tedin und Bremer, 1992; Hernandez und Cashel, 1995), und 'Crosslink'-Experimente, welche eine Wechselwirkung zwischen ppGpp-Analogen und der RNA-Polymerase zeigten (Reddy *et al.*, 1995; Chatterji *et al.*, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001). Diese Aspekte lassen Rückschlüsse auf den Mechanismus der Inhibierung zu: Die identifizierte Promotorsequenz ist zu kurz, um eine Beteiligung der schon bekannten bindenden Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS in Betracht zu ziehen, da die Bindestellen dieser Proteine außerhalb der identifizierten Region liegen (Ross *et al.*, 1990; Leirimo und Gourse, 1991; Afflerbach *et al.*, 1998; Schröder und Wagner, 2000). Außerdem ist bekannt, daß die Diskriminatorsequenz einen Einfluß auf die Stabilität der offenen Komplexe hat (Mizushima-Sugano und Kaziro, 1985; J.W. Park, persönliche Mitteilung). In *in vitro* Systemen wurde an Minimalstrukturen, welche nur über die isolierte Promotorregion mit einer nicht natürlichen Transkriptsequenz verfügten, ebenfalls eine effektive Inhibierung gefunden (Barker *et al.*, 2001; Kajitani und Ishihama, 1984; Heinemann und Wagner, 1997). Dies läßt die Beteiligung weiterer Komponenten für die Inhibierung der rRNA-Synthese im Rahmen der stringenten Kontrolle als nicht notwendig erscheinen. Die UAS-Region ist jedoch für die Regulation im Rahmen der Wachstumsratenkontrolle von großer Bedeutung. Was ist über den Mechanismus der Regulation bekannt? An den Promotoren *rplJ* und *rpsA* P1, welche für ribosomale Proteine kodieren, wurde gezeigt, daß ppGpp

die offenen Komplexe destabilisiert, und dadurch zu einer Inhibierung der Transkription führt (Raghavan und Chatterji, 1998). Eine neuere Untersuchung am *rrnB* P1 Promotor (Barker *et al.*, 2001) sah ebenfalls die Inhibierung durch Destabilisierung der binären offenen Komplexe in Gegenwart von ppGpp begründet. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden verschiedene sensitive und nicht-sensitive Promotoren untersucht, die alle eine unterschiedliche Destabilisierung der offenen Komplexe in Gegenwart von ppGpp zeigten. Danach wird durch unterschiedliche Halbwertszeiten der binären offenen Komplexe zwischen stringent regulierten und nicht regulierten Promotoren unterschieden. So wird der *rrnB* P1 Promotor mit einer Halbwertszeit im Sekundenbereich stärker von ppGpp beeinflusst, als beispielsweise der unregulierte *lacUV5* Promotor, der eine Halbwertszeit im Minutenbereich besitzt. Die angewandten Meßmethoden dieser Arbeit sind jedoch nicht unumstritten, da die Stabilität der offenen Komplexe durch Produktanalysen, also einschließlich der Bildung aller nachfolgenden Komplexe, vermessen wurden. Wenn also die in dieser Arbeit vorgestellte Bildung der ternären Initiationskomplexe eine Rolle bei der ppGpp-vermittelten Wirkung spielt, so geht diese in die Messung der Stabilität ein und beeinflusst das Ergebnis.

Ein weiterer möglicher Mechanismus wurde am *rrnB* P2 ermittelt. Es handelt sich um das sogenannte 'Trapping' Modell, das darauf basiert, daß der geschlossene Komplex (RP_c) durch Guanosintetraphosphat stabilisiert wird, und gleichzeitig die Rückreaktion vom offenen Komplex (RP_o) und vom Initiationskomplex (RP_{init}) bevorzugt wird (Heinemann und Wagner, 1998; Heinemann, Promotion). Dies führt zu einem Einfangen ('Trapping') der RNA-Polymerasen auf der Stufe des geschlossenen Komplexes, was einerseits den Promotor für neu initiiierende RNA-Polymerasen verschließt, andererseits die Transkription effektiv inhibiert. Als Voraussetzung für dieses Modell geht man von einer durch ppGpp veränderten Population von RNA-Polymerasen aus, die dann diesen alternativen Weg der Initiation durchführen. Diesen Mechanismus kann man jedoch für den *rrnB* P1 ebenfalls ausschließen, da hier eine nukleotidabhängige Verzögerung der ternären Komplexbildung beobachtet wurde und keine signifikante Destabilisierung des Komplexes.

3.3 Molekularer Mechanismus und Determinanten der Inhibierung: Das "Kompetitionsmodell"

3.3.1 Herleitung des Kompetitionsmodells aus den vorherigen Untersuchungen

Aus den in der Arbeit gemachten Beobachtungen läßt sich ein Modell herleiten, welches sich auf die Unterscheidung regulierter und nicht regulierter Promotoren anwenden läßt. Wie bereits vorgestellt, inhibiert ppGpp die Bildung der ternären

Initiationskomplexe an ribosomalen RNA Promotoren. Dabei besitzt die Stabilität des binären offenen Promotorkomplexes ohne Zweifel eine Schlüsselfunktion für die Unterscheidung sensibler und nicht sensibler Promotoren, da dies die Größe ist, in der sich regulierte und nicht regulierte Promotoren unterscheiden. Eine besondere Bedeutung kommt hier der Diskriminatorregion zu, da sie offenbar bei geeignetem Promotorkontext die Stabilität des RP_0 bestimmt. So kann ein Basenaustausch in der Diskriminatorregion am *rrnB* P1 die Komplexstabilität erhöhen und dadurch die Sensitivität ändern (Jung und Lee, 1997). Jedoch muß ein geeigneter Promotorkontext vorhanden sein, da sich der nicht stringent kontrollierte Ptacl durch Einfügen einer perfekten Diskriminatorregion nicht in seiner Sensitivität verändern läßt (Zacharias *et al.*, 1989).

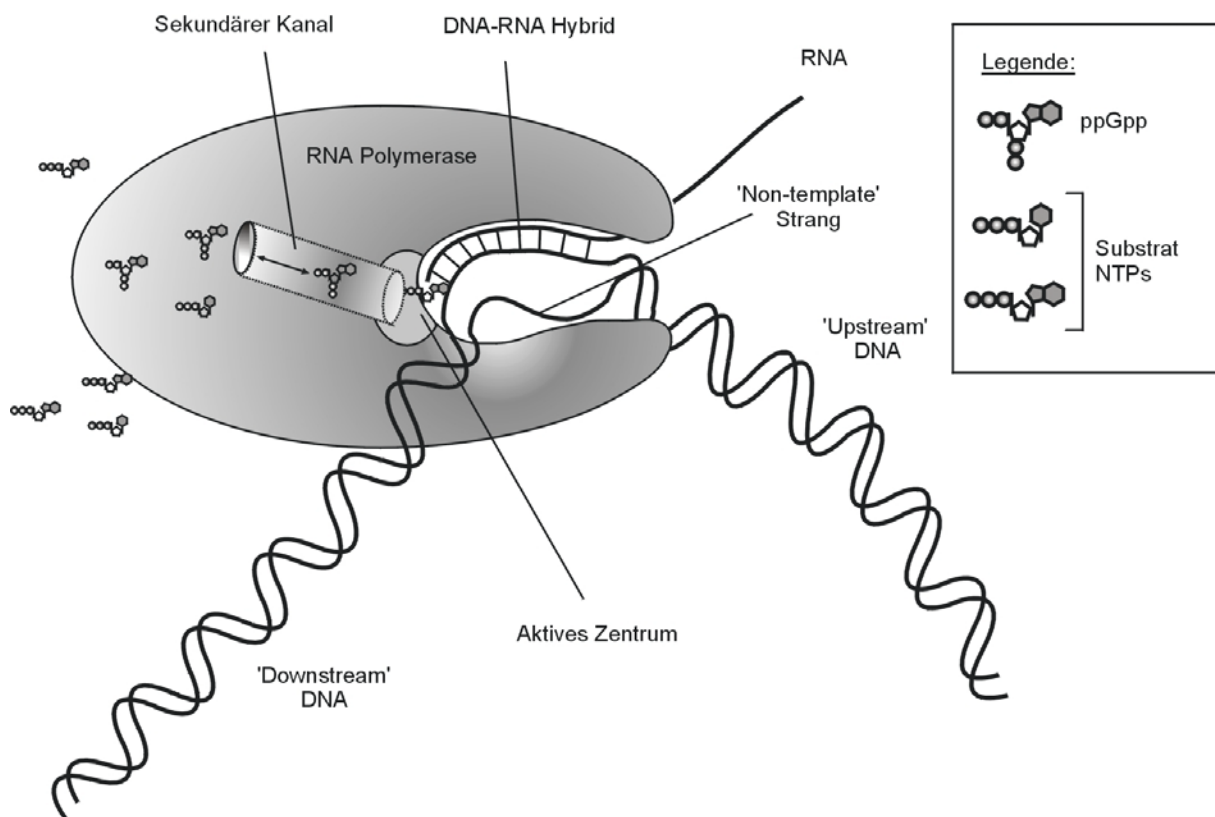


Abb. 3.2: Modell der ppGpp-vermittelten Inhibition der ribosomalen RNA-Synthese (aus: Wagner, in press). Gezeigt ist die Interaktion der RNA-Polymerase mit Substrat-Nukleotiden und Guanosintetraphosphat (ppGpp). Nach diesem Modell diffundieren ppGpp-Moleküle in den Substrat-Kanal (sekundärer Kanal) und kompetieren mit Substrat-Nukleotiden um den Eintritt in das aktive Zentrum des Enzyms.

Wie kann man sich den Mechanismus der ppGpp vermittelten Inhibition der RNA-Polymerase vorstellen? Bei stringent kontrollierten Promotoren wirkt ppGpp verlangsamernd auf die Bildung der Initiationskomplexe. Dies wird vermittelt durch Konkurrenz der ppGpp-Moleküle mit den Initiationsnukleotiden um den Eintritt in den

sekundären Kanal, durch den die Nukleotide ins aktive Zentrum der RNA-Polymerase gelangen. Der sekundäre Kanal ist wahrscheinlich die einzige Eintrittsstelle für Nukleotide ins aktive Zentrum. Ein direkter Zugang zum aktiven Zentrum ist unwahrscheinlich, da die klauenartige Struktur des Hauptkanals gefüllt ist mit DNA und dem naszierenden Transkript, was eine hohe Dichte negativer Ladung zur Folge hat. Die Wechselwirkung Guanosintetraphosphates mit der RNA-Polymerase muß für eine Kompetition nicht stabil sein, setzt also keine hochaffine ppGpp-Bindestelle voraus. Dies deckt sich mit Befunden, die eine Wechselwirkung von ppGpp-Analogen nur über 'crosslink'-Experimente detektieren konnten (Reddy *et al.*, 1995; Touloukhonov *et al.*, 2001). Die Positionen der Verbrückungen konnten auf der β und β' -Untereinheit lokalisiert werden. Diese beiden Untereinheiten bilden zusammen das aktive Zentrum der RNA-Polymerase. Die β' -Untereinheit bildet den sekundären Kanal. Eine Verbrückung an dieser Stelle könnte ein Hinweis für eine Interaktion des Guanosintetraphosphat mit dem sekundären Kanal sein. Dabei ist vorstellbar, daß die hohe Ladungsdichte des ppGpp die Diffusionszeit im Kanal erhöht. Untersuchungen mit Guanosindiphosphat (GDP) anstelle des Guanosintetraphosphates zeigten keine Inhibierung, obwohl es nicht als Substrat dienen kann (Heinemann, Promotion).

Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Initiation bei unterschiedlich sensitiven Promotoren sind verschieden, bei regulierten Promotoren ist oftmals die Bildung der binären Komplexe (RP_c oder RP_o) geschwindigkeitsbestimmend, bei rRNA Promotoren die Bildung der ternären Komplexe (RP_{init}) (Langert *et al.*, 1991).

Daher ist der ternäre Initiations-Komplex an rRNA P1 Promotoren im Gegensatz zu den binären Komplexen das erste stabilisierbare Intermediat der Initiation. Der ternäre Komplex reagiert bei Inhibierung der Komplexbildung zum offenen Promotorkomplex zurück und zerfällt in die Einzelkomponenten. Dies bedeutet eine Erhöhung der freien RNA-Polymerasekonzentration *in vivo*, die nun frei werden würde um an positiv stringent regulierten Promotoren zu initiieren. Dies kann man daher ebenfalls als ein Erklärungsmodell für die Aktivierung von positiv kontrollierten Promotoren heranziehen, die *in vitro* keine Transkriptionssteigerung in Anwesenheit von ppGpp zeigen. Die nicht stringent kontrollierten Promotoren zeigen keinen Einfluß von ppGpp auf die Bildung ternärer Initiationskomplexe (siehe 2.2.2.4), da die offenen Promotorkomplexe bereits so stabil sind, daß eine Verzögerung des Nukleotideinbaus nicht ins Gewicht fällt. Eine Kompetition zwischen Guanosintetraphosphat und den Initiationsnukleotiden ist daher unerheblich.

Allenfalls ist eine Verlangsamung der Transkriptionsgeschwindigkeit zu beobachten, was jedoch keinen Einfluß auf die Transkriptionsstärke hat. Interessanterweise ist diese Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit in Rahmen der Elongation beobachtet worden, was ebenfalls für einen Wettbewerbsmechanismus spricht

(Kingston und Chamberlin, 1981; Krohn und Wagner, 1996; diese Arbeit, 2.1.3.4). In diesen Arbeiten wurden Verlängerungen der Pausierungszeiten an spezifischen Pausenstellen in Gegenwart von ppGpp festgestellt. Es ist bekannt, daß die Dauer von Pausierungen ebenfalls abhängig von der Nukleotidkonzentration ist und die Pausierungsstellen spezifisch sind. So werden Pausierungen beispielsweise durch Sekundärstrukturen des naszierenden Transkriptes induziert. Dies bedeutet, daß die Pause abhängig von der Sequenz des Transkriptes und Stabilität der Sekundärstruktur ist. Bei erhöhten Substratkonzentrationen werden die Pausierungsdauern verkürzt. Daher ist eine Kompetition der Substratnukleotide mit ppGpp eine Erklärung für die spezifische Verlängerung von Pausen an bestimmten Positionen, die einen erhöhten Nukleotidbedarf besitzen.

3.3.2 Überprüfung des Modells durch Funktionsanaloge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des Guanosintetraphosphates durch Dinukleotide als Funktionsanaloge imitiert. Dabei zeigten sich alle getesteten Charakteristika des Inhibierungsmechanismus auch bei den eingesetzten Dinukleotiden. Die Inhibierung in 'multiple round' Transkriptionen war vergleichbar mit der ppGpp vermittelten Wirkung. Am *rnnB* P1 wurde eine maximale Inhibierung von 95 % in Gegenwart von ApA festgestellt, am *rnnD* P1 von 85 %. Der Ptacl wurde nur leicht beeinflußt, die maximale Inhibierung betrug hier 24 % in Anwesenheit des Dinukleotids CpC. Auch die 'single round' Analysen ergaben ein ähnliches Bild. Hierbei konnte man ebenfalls nur eine Inhibierung vor Bildung des ternären Initiationskomplexes feststellen. Die festgestellte Inhibierung bewegte sich ebenfalls in gleichen Dimensionen im Vergleich zu Guanosintetraphosphat (*rnnB* P1 mit 90 % Inhibierung; *rnnD* P1 mit 70 % Inhibierung und Ptacl mit 20% Aktivierung vor Initiationskomplexbildung). Abschließend konnte eine Inhibierung der Komplexbildungsrate in Abhängigkeit der Initiationsnukleotide festgestellt werden. Hierbei konnte eine 3,3 fache Inhibierung in Anwesenheit von 50 µM ATP gegen eine 2,3 fache Inhibierung bei 500 µM ATP detektiert werden. Dies zeigt einerseits, daß das Dinukleotid spezifisch die Initiationskomplexbildung inhibiert, andererseits immer noch einen starken inhibitorischen Effekt selbst bei hohen ATP-Konzentrationen bewirkt. Man könnte diesen inhibitorischen Effekt bei 500 µM ATP wahrscheinlich durch noch höhere Konzentrationen der Initiationsnukleotide kompensieren. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet.

Zusammenfassend scheinen die eingesetzten Dinukleotide den ppGpp-vermittelten Wirkmechanismus zu imitieren. Die Inhibierung ist insgesamt sogar stärker an stringent kontrollierten Promotoren, der Kontrollpromotor hingegen bleibt unbeeinflußt. Die stärkere Wirkung des Dinukleotids ist ebenfalls in den Initiationsmessungen sichtbar. Diese Ergebnisse kann man nun auch auf das

Kompetitionsmodell anwenden. Die stärkere Inhibierung in Gegenwart der Dinukleotide kann man durch die Größe der Moleküle erklären, da sie einen größeren und damit effektiveren Block im sekundären Kanal bilden und so wirksam die Bildung der Initiationskomplexe verhindern. Andererseits ist klar, daß Dinukleotide den Kanal passieren können, da sie als Primer für Initiationsreaktionen dienen können. Auch die Beteiligung einer hochaffinen ppGpp-Bindestelle an der RNA-Polymerase entfällt in diesem Modell, da keine Rolle für Regulationen durch Dinukleotide *in vivo* bekannt ist und damit das Enzym wahrscheinlich auch keine Bindestelle besitzt. Wie für ppGpp angenommen wird die Wirkung in diesem Fall nur transient vermittelt.

3.3.3 Relevanz des Modells *in vivo*

Das hier vorgeschlagene Modell erklärt die selektive Inhibierung negativ stringent regulierter Promotoren durch die Stabilität der offenen Komplexe. Unregulierte Promotoren verfügen gewöhnlich über stabile offene Komplexe, daher ist die Inhibierung der ternären Initiationskomplexbildung nicht relevant. Negativ stringent kontrollierte Promotoren besitzen dagegen gewöhnlich instabile offene Komplexe und zerfallen daher bei Verlangsamung der Initiationskomplexbildung. Dieser Mechanismus ist abhängig von der Konzentration der Initiationsnukleotide. Bei hohen Konzentrationen ist keine Inhibierung feststellbar, bei niedrigen wird die Synthese stringent kontrollierter Gene stark beeinflußt.

Welche Rolle spielt die Änderung der Nukleotidkonzentration *in vivo* ? Die *rrn* P1 Promotoren starten ohne Ausnahme mit ATP oder GTP. Kurz nach Auslösen der stringenten Kontrolle kann man eine Erniedrigung der ATP und GTP Konzentration in der Zelle beobachten. Dabei wird die GTP-Konzentration direkt nach Auslösen um 40 %, ATP, verzögert um 30 %, bezogen auf die Ausgangskonzentrationen, gesenkt (Gallant und Harada, 1969). Es ist daher vorstellbar, daß im Fall der stringenten Kontrolle der ppGpp abhängige Effekt auf die Bildung der Initiationskomplexe noch zusätzlich durch die Verknappung der Initiationsnukleotide verstärkt wird. Die Veränderung der Konzentration der Nukleotide ATP und GTP als regulatorisches Mittel der stringenten Kontrolle kann auch für die Regulation von Translation und Replikation diskutiert werden. Daten zu diesen Effekten sind jedoch nicht vorhanden. Auch für die wachstumsratenabhängige Regulation wird eine Konzentrations-Änderung dieser Nukleotide kontrovers diskutiert. Einerseits soll bei Veränderungen der Wachstumsphase um den Faktor 2 die ATP- und GTP-Konzentration um den Faktor 4 steigen (Gaal *et al.*, 1997), andererseits zeigen Petersen und Moller (2000), daß die Nukleotidkonzentration nicht mit der Wachstumsrate gekoppelt sind. Die Rolle der Nukleotidkonzentration im Rahmen der Wachstumsrate bleibt also weiterhin ungeklärt.

Ein weiterer Aspekt des Modells besteht in der Erklärung einer Aktivierung positiv regulierter Promotoren. Die verschiedenen Promotoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zur RNA-Polymerase. Das hier vorgeschlagene Modell erklärt die Erhöhung der Konzentration freier RNA-Polymerasen durch Inhibierung der ternären Initiationskomplexbildung, wodurch gebundene RNA-Polymerasen wieder frei werden. Die freien RNA-Polymerasen sind nun in der Lage an positiv regulierten Promotoren zu initiieren und diese abzulesen.

3.4 Topologieabhängige Transkriptionshemmung am *rrnB* P1

Aus vorhergehenden Arbeiten war bekannt, daß eine ppGpp abhängige Inhibierung der Transkription von sensitiven Promotoren auf superhelikalen Templates nicht zu detektieren war (Chatterji *et al.*, 1998; Ohlsen und Gralla, 1992). In jüngeren Analysen konnte eine Inhibierung auf superhelikalen Templates nur in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen beobachtet werden (Barker *et al.*, 2001). Die Erklärung für die fehlende Inhibierung könnte in einer Stabilisierung des offenen binären Promotorkomplexes bestehen. Es wurde in 'footprint' Experimenten nachgewiesen, daß im Vergleich zu linearen Promotorfragmenten der Bereich, den die RNA Polymerase bedeckt, auf superhelikalen Templates erweitert wird. Desweiteren ist auch der Anteil an stabilen Komplexen auf superhelikalen Templates erhöht (Ohlsen und Gralla, 1992). So ist bekannt, daß negative Superhelikalität einen energetischen Beitrag zur Strangöffnung leistet, und so das Aufschmelzen erleichtert (Wood und Lebowitz, 1984). Die Stabilitäten der Komplexe sind jedoch generell stark salzabhängig, sie zerfallen also leichter unter hohen Salzbedingungen (Ohlsen und Gralla, 1992). Unter diesen Bedingungen ist der ppGpp Effekt ebenfalls wieder erhöht. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der Stabilität der offenen binären Komplexe und der ppGpp vermittelten Inhibierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals eine Inhibierung der Transkription des *rrnB* P1 Promotors auf einem superhelikalen Plasmid unter identischen Salzbedingungen wie für lineare Templates beobachtet. Hierzu wurden Kinetiken der Initiationskomplexbildung vermessen um die Erkenntnisse, die mit linearen Templates gewonnen wurden auf ein zellnäheres System zu übertragen. Es zeigte sich, daß auf superhelikalen Templates ebenfalls eine Inhibierung der Initiationskomplexbildung beobachtet werden konnte. Diese betrug bei einer Komplexbildungszeit von 2 Minuten 40% Inhibierung. Bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten war kein Unterschied in der Komplexmenge mehr zu detektieren. Dies erklärt die fehlende Inhibierung bei verschiedenen Guanosintetraphosphat-Konzentrationen unter standard 'multiple round' Bedingungen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit mit dem Substratmix erreicht die Komplexkonzentration ein Plateau, bei dem keine inhibierenden ppGpp Effekte zu beobachten waren. Ein Verkürzung

der Reaktionszeit auf 2 Minuten zeigte dann jedoch einen Einfluß von ppGpp auf die Transkription. Hierbei wurde die Transkription um 57 % in Gegenwart von 1mM ppGpp reduziert.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit dem hier postulierten Modell, da auf superhelikalen Templates ebenfalls eine Inhibierung der Initiationskomplexbildung beobachtet werden kann. Die spezifischen ppGpp-vermittelten Effekte treten hier jedoch nur abgeschwächt auf, da die binären offenen Promotorkomplexe im superhelikalen System stabiler sind als bei linearen Templates. Die offenen Komplexe werden in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen destabilisiert, daher sind in 'multiple round' Transkriptionen ebenfalls Effekte detektierbar (Barker *et al.*, 2001). Diese Effekte beruhen vermutlich in erster Linie nicht auf einer weiteren Destabilisierung des offenen Komplexes durch ppGpp, wie von Barker *et al.* (2001) postuliert, sondern sind wahrscheinlich die Folge des ppGpp-vermittelten Effektes auf die Initiationskomplexbildung und der Destabilisierung durch hohe Salzkonzentrationen. Um die Effekte von ppGpp auf die Initiationskomplexbildung an superhelikalen Templates noch genauer zu erforschen, müßte man die Komplexbildung in Anwesenheit von unterschiedlichen Nukleotidkonzentrationen untersuchen. Dabei bieten sich geringere Nukleotidkonzentrationen an, da in diesem Fall die Komplexbildung verlangsamt und damit der gesamte Vorgang genauer zu erfassen wäre.

Welche Auswirkungen haben diese Beobachtungen auf die *in vivo* Situation?

Die Untersuchungen zeigen, daß beim Wechsel von linearen zu superhelikalen Templates die ppGpp vermittelte Wirkung verringert wird. Daher könnte ebenfalls die Regulation der Superhelikalität eine wichtige Komponente in der Reaktion auf Aminosäuremangel darstellen. Es wurde gezeigt daß Zellen auf Aminosäure- und Kohlenstoffmangel durch Verringerung der superhelikalen Dichte reagieren (Ohlsen und Gralla, 1992). So wurde gezeigt, daß verschiedene Gene teilweise auch durch Änderung des superhelikalen Status reguliert werden. Als Beispiel ist hier das *tonB*-Gen (Dorman *et al.*, 1988) zu nennen. Beim *hisR* Promotor aus *Salmonella typhimurium* ist ebenfalls bekannt, daß das Gen durch Änderung der Superhelikalität reguliert wird. Der Promotor, welcher Transkriptionsstart für verschiedene tRNAs darstellt, besitzt eine konservierte Diskriminator-Region und ist ebenfalls stringent kontrolliert. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Diskriminatorregion und der Strangöffnung gezeigt werden (Figuera-Bossi *et al.*, 1998). Bei Veränderung des Diskriminatormotivs wurde sowohl die Abhängigkeit von negativer Superhelikalität als auch die Regulierbarkeit durch ppGpp gesenkt. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die Veränderung der superhelikalen Dichte von Plasmiden selbst eine Folge der Auslösung stringenter Kontrolle ist.

Darüberhinaus ist die Beeinflussung der Expression einer Reihe von Genen im Rahmen von osmotischer Regulation durch Änderung der Superhelikalität bekannt (Higgins *et al.*, 1988). Diese Änderungen der Topologie werden jedoch nur langsam vollzogen, wohingegen die Inhibierung der rRNA-Synthese sofort nach Auslösen der stringenten Kontrolle stattfindet. Daher kann die Änderung der Superhelikalität nicht alleine für die unmittelbare Inhibierung der Synthese verantwortlich sein. Alle Befunde deuten auf ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen im Rahmen der Regulationen hin, daher können für die Inhibierung der rRNA Synthese Mechanismen auf Basis der Initiation, Elongation, RNA-Polymerase Konzentration, Verknappung der verfügbaren Nukleotidkonzentration, sowie Änderung der Superhelikalität, oder Beteiligung von noch nicht bekannten Cofaktoren verantwortlich sein. Eine zentrale Rolle in diesem Zusammenspiel könnte jedoch sicherlich der hier aufgeklärte Mechanismus darstellen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad "pro analysis". Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wurde hochreines Wasser benutzt, welches im folgenden als Aqua dest. bezeichnet wird (Hausanlage mit nachgeschaltetem water purification system EPA Est. 41237-MA-1, Millipore GmbH, Neu Isenburg).

Das verwendete Phenol wurde vor Benutzung destilliert, jeweils zweimal mit 1M Tris-HCl, pH 8.5 und 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 ausgeschüttelt und anschließend mit Hydroxychinolin auf eine Endkonzentration von 0.1% zur Vermeidung von Radikalbildung eingestellt (Maniatis *et al.*, 1982).

4.1.2 Bakterienstämme (*E. coli*)

Stamm	Genetische Marker	Referenz
CP 79	F ⁺ , thi ⁻ , leu ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , mal ⁻ , xyl ⁻ , gal ⁻ , str ^s , relA ⁻	Fiil und Friesen (1968)
HB 101	F ⁻ , proA2, recA13, ara-14, lacY1, galk2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str ^r), sup E44, hsd S20 (r ⁻ B m ⁻ B), λ ⁻	Boyer und Roulland-Dussoix (1969)
MRE 600	RNase ⁻¹	Cammack and Wade (1965)

4.1.3 Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Referenz
pPtacW	pKK232-8-Derivat mit dem PtacI-Promotor vor dem cat-Gen, Amp ^r	Zacharias <i>et al.</i> (1989)
pUC18-1	pUC18-Derivat mit 235 Bp Sspl-Ddel-Fragment aus pKK3535, in der SmaI-Schnittstelle der MCS	Zacharias <i>et al.</i> (1989)
pUC 18	Kommerzieller Vektor	Viera und Messing, (1982);
pHD1D	pKK232-8 (Brosius, 1984) Derivat, trägt P1 Fragment des <i>rrnD</i> Operons in der SmaI-Schnittstelle der MCS	Diplomarbeit, A. Hillebrand, (1998)

T7 Δ D111 DNA einer Deletionsmutante des Studier *et al.* (1979) Bakteriophagen T7, die Promotoren A2 und A3 sind deletiert, der *E.coli*-Polymerase abhängige A1-Promotor ist vorhanden

4.1.4 Nukleinsäuren und Nukleotide

4.1.4.1 Verschiedene Nukleinsäuren

Kb-Leiter	BRL, Eggenstein
tRNA aus <i>S. cerevisiae</i>	Boehringer, Mannheim

4.1.4.2 Desoxyoligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz und Kurzbeschreibung
----------------	------------------------------

# t-d	5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG G-3' komplementär von +65 bis +47 relativ zum Ptacl-Start zum Nichtmatritzenstrang des PtaclW
# t-u	5'-GCT CAA GGC GCA CTC CCG T-3' komplementär von -115 bis -97 relativ zum Ptacl-Start zum Nichtmatritzenstrang des PtaclW
# 81194	5'-GGAGAACCCCGCTGACCCGG-3' hybridisiert von +29 bis +48 relativ zum P1-Start an den (-)-Strang des <i>rrnB</i> -Operons
# 91194	5'-GCCTTTTGTATGGCAATGAC-3' hybridisiert von -180 bis -161 relativ zum P1-Start an den (+)-Strang des <i>rrnB</i> -Operons
#170398	5'-GGC TGA TTT GGT TGA ATG-3' hybridisiert von -87 bis -70 relativ zum P1-Start an den (+)-Strang des <i>rrnB</i> -Operons

4.1.4.3 Nukleotide

Adenosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-Triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Adenosin-5'-[γ - ³² P]Triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenylyl(3'-5')adenosin (ApA)	Sigma, St. Louis, USA
Adenylyl(3'-5')uridin(ApU)	Sigma, St. Louis, USA
Adenylyl(3'-5')cytidin (ApC)	Sigma, St. Louis, USA
Cytidin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5'-[α - ³² P]-Triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-Triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Cytidylyl(3'-5')cytidin	Sigma, St. Louis, USA
Guanosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim

Guanosin-5'-Triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Guanosin-5'-[α - 32 P]-Triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5'-Diphosphat-3'-Diphosphat (Auch Guanosintetraphosphat, ppGpp)	Diese Arbeit
Guanosin-5'-Triphosphat-3'-Diphosphat (Auch Guanosinpentaphosphat, pppGpp)	Diese Arbeit
Uridin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
Uridin-5'-Triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Uridin-5'-[α - 32 P]-Triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
3'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat	Sigma, St. Louis, USA
2'-Desoxyadenosin-5'-[α - 32 P]-Triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2', 3'-Dideoxyadenosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2', 3'-Dideoxycytidin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2', 3'-Dideoxyguanosin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
2', 3'-Dideoxythymidin-5'-Triphosphat	Boehringer, Mannheim
 4.1.5 Proteine	
AMV- reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
Lysozymchlorid	Sigma, St. Louis, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
 Restriktionsendonukleasen	
<i>Bam</i> HI	Boehringer, Mannheim
<i>Eco</i> RI	Boehringer, Mannheim
<i>Ecl</i> 136	MBI Fermentas, Litauen
<i>Ssp</i> I	Boehringer, Mannheim
<i>Hinc</i> II	MBI Fermentas, Litauen
<i>Hind</i> III	Boehringer, Mannheim
<i>Sal</i> I	Boehringer, Mannheim
<i>Sma</i> I	Boehringer, Mannheim
Ribonuklease A	Sigma, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA), gereinigt	New England Biolabs, USA

Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	Roth, Karlsruhe
RNA-Polymerase aus <i>E.coli</i>	Nach Burgess&Jendrisak (1975)
	Gonzales <i>et al.</i> (1977), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Wurm
σ^{70} -Untereinheit	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Heinemann
Taq-DNA Polymerase	Sigma, St. Louis, USA
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase (Sequenase 2.0)	United States Biochemicals, USA
4.1.6 Feinchemikalien	
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose (ultrapure)	Seakem, Hamburg
Amberlit MB-1 (Ionenaustauscher)	ICN Biomedicals, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cronex TD Entwicklerbad	DuPont, Bad Homburg
Cronex TF Fixierbad	DuPont, Bad Homburg
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	J.T. Baker, Groß-Gerau
Glaswolle, silanisiert	ICN Biochemicals, USA
Glycerin, ultrapure	ICN Biochemicals, USA
Glykogen, molecular biology grade	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	Sigma, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Kaliumglutamat	Serva, Heidelberg
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Paraffin, für IR-Spektroskopie	Fluka Chemie AG, Schweiz
Polyethylenglykol (PEG ₆₀₀₀)	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Spermidin	Sigma, St. Lewis, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merk, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Säulenmaterialien

Sephadex G10	Pharmacia, München
Sephadex DEAE A 25	Pharmacia, München

4.1.7 Allgemeine Puffer und Medien

Formamid-Probenpuffer	0.1%	(w/v) Bromphenolblau
	0.1%	(w/v) Xylencyanol
	80%	deionisiertes Formamid
	50 mM	Tris-Borat, pH 8.3
	10 mM	EDTA
1x TAE-Puffer:	40 mM	Tris-Acetat, pH 7.5
	1 mM	EDTA
TAE-Probenpuffer	0.025%	(w/v) Bromphenolblau
	0.025%	(w/v) Xylencyanol
	30 %	Glycerin
	in 2x TAE-Puffer	
1x TBE-Puffer:	89 mM	Tris-Borat
	2.5 mM	EDTA
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA

YT-Medium:	8 g/L	Trypton
	5 g/L	NaCl
	5 g/L	Hefeextrakt
	in Aqua dest. auf pH 7.4 mit NaOH	

YT-Agar: YT-Medium mit 15 g/L Agar

4.1.8 Verschiedenes

Bradford Reagenz	Bio Rad, Richmond, USA
Dialyseschläuche, Spectra/Por	Spectrum Medical Industries, USA
Plasmid Midi Präp Kit	Boehringer, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilme RX	Fuji, Japan
Röntgenfilme XR	Kodak, New Haven, USA
Sterilfilter FB 030/3 (0.2 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
VS Filtermembranen (Porengröße 0,025 µm, Ø 2,5 cm)	Millipore GmbH, Neu Isenburg

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Methoden

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Bei Umgang mit mikrobiologischen Proben wurden die geltenden biologischen Sicherheitsvorschriften beachtet. Der anfallende biologische Abfall wurde vor Entsorgung autoklaviert. Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, Lösungen wurden vor Benutzung entweder autoklaviert (Dampfdruck-Sterilisation, 20 min, bei 120°C und 2-3 bar Druck), oder sterilfiltriert (0.2 µm Membran, Schleicher und Schuell (FB 030/3)). Glasgeräte wurden bei 210°C hitzesterilisiert.

4.2.2.2 Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen

Mithilfe einer sterilen Platinimpföse wurden die Zellen aus Bakteriensicherheitsstocks auf YT-Platten ausgestrichen und vereinzelt. Gegebenenfalls wurden die YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, sofern die Bakterienkulturen eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum besaßen (z.B. 100 µg/ml Ampicillin). Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerinstocks angelegt, dazu wurde 1 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 200 µl einer sterilen 98%igen Glycerinlösung versetzt. Diese Suspension wurde gründlich gemischt, 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei -70°C gelagert.

4.2.2.3 Anzucht von Über-Nacht-Kulturen (ÜN-Kulturen)

Zur Anzucht von ÜN-Kulturen wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze Einzelkolonien von einer YT-Platte in 3 ml YT-Medium, welches gegebenenfalls mit einer geeigneten Menge Antibiotikum versetzt wurde, übertragen. Diese Kultur wurde über Nacht auf einem Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 120 rpm) bei 37°C inkubiert.

Zur Anzucht von größeren Kulturen wurde das sterile, gegebenenfalls mit Antibiotikum supplementierte Medium auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde 1/100 bis 1/500 Volumen der ÜN-Kultur zugefügt. Das Wachstum wurde mittels Streumessung verfolgt.

4.2.3 Messung von Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mithilfe eines Spektralphotometers (Beckmann, Modell 34) in Quarzküvetten bei den jeweils angegebenen Wellenlängen.

4.2.3.1 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen wurden durch spektroskopische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei gilt vereinfacht:

Für doppelsträngige Nukleinsäuren:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g dsNS/ml}$$

Für einzelsträngige Nukleinsäuren gilt:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden erfolgte im Spektralphotometer durch ihren jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten. Dabei gilt das Lambert-Beersche Gesetz bei einer gegebenen Wellenlänge λ . Es gilt:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Wobei: c = molare Konzentration der absorbierenden Lösung
 ε = molarer Extinktionskoeffizient (Dimension: $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) des Nukleotids bei einer Wellenlänge λ
 d = Länge des Lichtweges in der absorbierten Lösung (hier= 1 cm)
 E = gemessene Extinktion der Lösung

Die molaren Extinktionskoeffizienten bei neutralem pH sind in der untenstehenden Tabelle angegeben :

Nukleotid	Molarer Extinktionskoeffizient
ApA	27400 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 260 nm
ApC	21000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 260 nm
ApU	24000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 260 nm
CpC	14200 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 260 nm
ppGpp	13100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 252 nm

4.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Messung der Konzentration von Proteinen erfolgte ebenfalls im Spektralphotometer unter Zuhilfenahme des Bradford Test (Bio-Rad). Hierzu wurde die Proteinlösung mit einem Farbstoff versetzt (Bradford-Reagenz), welcher sich je nach Proteinmenge intensiver färbt. Die Extinktion der Lösung wurde nach 20 minütiger Inkubation bei 590 nm gemessen, und die Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichgerade bestimmt, welche erstellt wurde durch Proteinlösungen bekannter Konzentrationen. Die Herstellung der 'Microassays' erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.2.3.4 Messung von Radioaktivität

Radioaktivitätsbestimmungen ^{32}P -markierter Proben erfolgten im Tritiumkanal eines Beckmann LS 5000 TD Szintillationszählers ohne Szintillationsflüssigkeit über die Messung der Cerenkov-Strahlung.

4.2.3.5 Densitometrie

Densitometrische Auswertungen von exponierten Röntgenfilmen erfolgten durch scannen der Filme mithilfe eines Hewlett-Packard Flachbettscanners mit Durchlichtaufsatz (HP Deskscan 4c). Die densitometrische Auswertung der gescannten Röntgenfilme erfolgte durch die Software Scion Image (Scion Corporation, USA). Die erhaltenen Meßwerte wurden mit der wissenschaftlichen Darstellungssoftware Origin (Microcal Software) graphisch aufbereitet.

4.2.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

4.2.4.1 Extraktionen mit Phenol und Chloroform

Wäßrige Nukleinsäure-Lösungen wurden zur Entfernung der Proteine mit Phenol/Chloroform (1:1 v/v) extrahiert. Dazu wurde Phenol/Chloroform im gleichen Volumen zugesetzt und auf einem Vortex-Schüttler solange geschüttelt, bis die Lösung homogen erschien. Anschließend wurde bis zur Trennung der Phasen zentrifugiert und die wäßrige Phase ohne Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr auftrat. Abschließend wurde die wäßrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, geschüttelt und erneut zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und weiterverwendet.

4.2.4.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung und Aufreinigung von wäßrigen Nukleinsäurelösungen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.5 und 3 Volumen absolutem Ethanol für 20 min bei -20°C präzipitiert und bei 12000 rpm, 30 min abzentrifugiert

(Hettich Tischzentrifuge). Der alkoholische Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 15 min). Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet getrocknet (Heto VR-1 Speedvac concentrator) und abschließend mit Aqua dest. oder TE-Puffer in einem geeigneten Volumen rückgelöst.

4.2.4.3 Dialyse von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden gegen 1x TE-Puffer dialysiert, falls sie als Template in *in vitro* Transkriptionen benutzt oder durch das Klenow-Fragment aufgefüllt wurden. Dies erfolgte bei großen Nukleinsäuremengen im Dialyseschlauch über Nacht bei 4°C. Bei kleinen Mengen wurde die Lösung in Tropfenform auf eine Dialysemembran (Millipore, 0,0025 µm) aufgebracht und 3-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden anschließend entnommen und ihre Konzentration neu vermessen.

4.2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Trennung von Nukleinsäuren oder Proteinen nach Molekulargewichten im elektrischen Feld.

4.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarose-Gelelektrophoresen aufgetrennt (Maniatis *et al.*, 1982). Dazu wurde Agarose in Konzentrationen von 0.6% bis 1% (w/v) in 1x TAE-Puffer gelöst und im Mikrowellenherd verflüssigt. Die Gellösung wurde anschließend mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1 Volumen TAE-Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen eingefüllt und bei 6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

4.2.5.3 Denaturierende Gelelektrophorese

Zur Vermeidung von Laufunterschieden durch Sekundärstrukturen einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle wurden diese durch denaturierende Agenzien (Formamid, Harnstoff) und Hitze denaturiert, so daß die Bildung gepaarter Doppelstrang-Bereiche unterbunden wurden.

4.2.5.4 Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente wurden 5% bis 25% denaturierende Polyacrylamidgele eingesetzt. Sie dienten ebenfalls zur Auftrennung von RNA-Transkripten und zur Analyse von Produkte der Primer-Extension Reaktion oder Sequenzierungsreaktionen. Als denaturierendes Agenz wurde 7 M Harnstoff

zugesetzt. Die Geldimension beträgt 39 x 33.5 x 0.4 cm. Vor Benutzung wurden die Platten mit Wasser, Detergenz, Ethanol und Aceton gereinigt. Die Gelseite der Platten wurde nach Reinigung mit Repelcote (0,04% (v/v) Dichlordimethylsilan in Chloroform) im Abzug behandelt, die Gellösung mit Starter versehen und zwischen die so vorbereiteten Platten gefüllt. Als Laufpuffer diente 0.5 oder 1x TBE. Die in Formamidprobenpuffer aufgenommenen Nukleinsäureproben wurden bei 95°C für 3 min denaturiert und dann aufgetragen. Die Proben wurden auf das vorgewärmte Gel aufgetragen und bei 75 W aufgetrennt. Nach erfolgter Trennung wurde das Gel autoradiographiert.

4.2.5.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (1970) dient zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts unter denaturierenden Bedingungen. Es besteht aus zwei verschiedenen Gelsystemen, dem fokussierenden Sammelgel und dem Trenngel. Das denaturierende Agens in diesem Fall ist Natriumdodecylsulfat (SDS), welches durch hydrophobe Wechselwirkungen des aliphatischen Restes zu bestimmten Bereichen des Proteins zur Auffaltung führt. Dies hat ein konstantes Ladungs/Masse Verhältnis des Proteins zur Folge, so daß die Proteine im elektrischen Feld ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Proteinproben (etwa 50 ng bis 2 µg in einem Volumen von 10 µl) wurden nach Zugabe von 5 µl β-Mercaptoethanol für 5 min im Wasserbad gekocht. Die Elektrophorese wurde konstant bei einer Stromstärke von 10 mA durchgeführt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Färbung "Coomassie Brilliant Blue R250" eingesetzt.

4.2.6 Nachweis von Makromolekülen in der Gelmatrix

4.2.6.1 Nachweis von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid

Nukleinsäuren wurden in Agarose-Gelen durch den Zusatz von Ethidiumbromid nachgewiesen. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde durch einen UV-Transilluminator (Appligene oncor) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch eine Digitalisierungsanlage mit SW-Kamera und Thermodrucker (Braun-Geldokumentationssystem).

4.2.6.2 Autoradiographie

Radioaktive Proben wurden über die Autoradiographie von Röntgenfilmen nachgewiesen. Dazu wurden die Gele nach erfolgter Auftrennung auf Röntgenfilme aufgezogen, mit Polyethylenfolie abgedeckt und in Expositionskassetten der Firma Siemens verpackt. Auf die Gele wurden Röntgenfilme (Fuji RX oder Kodak XR) in der Dunkelkammer gelegt und diese bei -20°C eingefroren und exponiert. Die Exposition

erfolgte, je nach Stärke des Signals, 0.25 - 48 h. Anschließend wurden die Röntgenfilme im Entwicklerbad (Crontex-TD) 2-10 min entwickelt, zum Stoppen der Reaktion mit 3% Essigsäure gespült und anschließend im Fixierbad (Crontex TF) fixiert. Die Autoradiogramme wurden anschließend mit Aqua dest. gespült.

4.2.6.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte durch Inkubation über Nacht in Coomassie-Färbelösung. Die Entfärbung erfolgte mittels Entfärbelösung solange, bis blaue Banden auf transparentem Hintergrund zu erkennen waren. Diese Methode erlaubt eine Quantifizierung der Banden. Es können bis zu 100 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden.

Färbelösung:	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0.1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250

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

4.2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Probe wurde in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Agarose, "ultra pure", Seakem). Die gewünschte Bande wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht (die Elektrophorese erfolgte in Anwesenheit von Ethidiumbromid), mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und eluiert.

Die Elution erfolgte über das Glaswollverfahren. Hierzu wurde der Boden eines 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit einer über dem Bunsenbrenner erwärmten Kanüle durchbohrt. Anschließend wurde der untere Teil des Reaktionsgefäßes mit silanisierter Glaswolle ausgefüllt. Auf diese legt man das Agarosestück mit der zu eluierenden DNA. Dieses Reaktionsgefäß steckt man in ein weiteres 1.5 ml Reaktionsgefäß und zentrifugiert dieses Paar für 1 min bei 12.000 rpm in einer Hettich Tischzentrifuge. Das durchzentrifugierte Eluat wird aus dem 1.5 ml Reaktionsgefäß entnommen, gesammelt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 3 Volumen absolutem Ethanol gefällt. Anschließend wird die Konzentration der DNA spektralphotometrisch bestimmt (siehe 4.2.3.1).

4.2.8 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde aus Bakterienkulturen zur Gewinnung von DNA-Templates für *in vitro* Transkription, Sequenzierung und Charakterisierung der RNA-Polymerase isoliert.

4.2.8.1 Isolierung von Plasmid DNA im großen Maßstab

Die präparative Isolierung von Plasmid DNA erfolgte nach der von Hillen *et al.* publizierten Methode (1981). Dazu wurde eine 500 ml YT-Kultur mit 1/100 Volumen einer Über-Nacht Kultur angeimpft und ebenfalls über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Diese Über-Nacht Kultur wurde pelletiert (J2/21 Beckmann Zentrifuge, JA10 Rotor, 5 min, 8000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 8 ml einer Saccharoselösung resuspendiert und in ein Beckmann Ti55.2-Polycarbonat-Röhrchen überführt. Zu dieser Lösung wurden 3 ml EDTA-Lösung (0.5 M, pH 8.0) und Lysozym-Lösung gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Brij-Doc Lösung zugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden abzentrifugiert (Zentrifuge: Beckmann Ultrazentrifuge L8-55, Ti55.2 Rotor, 30 min 44000 rpm, 4°C), die Plasmide verbleiben im Überstand. Dieser Überstand wurde zuerst mit RNase A-Lösung (30 min, 37°C), anschließend mit Proteinase K-Lösung (15 min, 37°C) versetzt. Die Plasmid-DNA wurde dann mittels ½ Volumen PEG-Lösung gefällt (30 min, 0°C) und abzentrifugiert (Beckmann Zentrifuge J2/21, JA14 Rotor, 30 min, 10000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml TE Puffer aufgenommen und solange mit Phenol/Chloroform extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Zur Entfernung des Phenols wurde noch einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Aufkonzentrierung der Plasmid-DNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt und in einem Greiner Ausschwenk-Rotor abzentrifugiert (Hettich Laborfuge, 6000 rpm, 45 min, 4°C). Es folgte ein Waschschrift mit 80% Ethanol, erneute Zentrifugation (6000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet (Heto VR-1 Speedvac concentrator) und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Abschließend wurde die Reinheit der Plasmide auf einem Agarose-Gel bestimmt, sowie Konzentration im Spektralphotometer vermessen.

Lösungen:	Saccharose-Puffer:	50 mM 25% (w/v)	Tris/HCl, pH 8.0 Saccharose
	Lysozym-Lösung:	50 mM 20 mg/ml	Tris/HCl, pH 8.0 Lysozymchlorid
	Brij-Doc-Lösung:	2 Vol-Teile	10% Brij 35

	1 Vol-Teile	10% Na-Desoxycholat (in Aqua dest.)
RNase A-Lösung:	20 mg/ml in 100 mM	RNase A (DNase frei) Natriumacetat, pH 5.0
Proteinase K:	20 mg/ml	Proteinase K (in Aqua dest.)
PEG-Lösung:	30% (w/v) 1.5 M	PEG ₆₀₀₀ NaCl

4.2.8.2 Isolation der DNA des Phagen T7 Δ 111

Zur Charakterisierung der RNA-Polymerase aus *E. coli* wurde DNA des Phagen T7 Δ 111 benötigt. Zur Isolierung der Phagen-DNA wurden zunächst Wirtszellen (*E. coli* Wildtyp-Stamm C1A) in 800 ml YT-Flüssigkultur bei 37°C herangezogen, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.8 besaß. Diese Kultur wurde mit einer Phagen-Stammlösung von einer Multiplizität von 0.1 infiziert. Die Infektion und Lyse der Bakterien wurde anhand der OD₆₀₀ verfolgt bis die OD₆₀₀ ca. 30% der Ausgangs-OD betrug. Die Kultur wurde durch Zugabe von festem NaCl auf eine Endkonzentration von 500 mM eingestellt. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch eine anschließende Zentrifugation (Beckmann J2/21, JA10 Rotor, 30min, 8000rpm, 4°C) entfernt. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden durch Zugabe von festem PEG₈₀₀₀ bis zu einer Endkonzentration von 6% (w/v) präzipitiert. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Beckmann J2/21, JA10 Rotor, 30 min, 8000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 24 ml T7-Diluent resuspendiert und erneut zentrifugiert (JA20.2, 40 min, 9000 rpm, 4°C), um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde mit T7-Diluent auf 10 ml aufgefüllt.

Zu dieser Phagen-Lösung wurden 7.5 g CsCl gegeben, diese dann in Quick-Seal Röhrchen (Beckmann: 25x99 mm) überführt. Die Röhrchen wurden dann mit T7-Diluent + 0,75 g CsCl/ml aufgefüllt und versiegelt. Anschließend wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Ti 55.2 Rotor, 24 h, 43000 rpm, 15°C). Die entstandene Phagenbande wurde mit einer sterilen Einwegspritze abgeerntet. Diese Phagenlösung wurde dann 4x gegen je 1 l T7-Dialysepuffer dialysiert.

Um die Phagen-DNA zu isolieren wurde die Lösung je einmal mit Phenol/Chloroform, Chloroform und Diethylether im gleichen Volumen extrahiert. Die Phagen DNA wurde zuerst 2x gegen je 1 l DNA-Dialysepuffer I, dann 2x gegen je 1 l DNA-Dialysepuffer II

dialysiert und abschließend die Konzentration im Spektralphotometer bestimmt. Die Phagen-DNA wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Lösungen:

T7-Diluent:	5 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	250 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

T7-Dialysepuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	500 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂

DNA-Dialysepufferl:	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	50 mM	NaCl
	10 mM	EDTA

4.2.9 Enzymatische Reaktionen

4.2.9.1 Hydrolyse doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Herstellung von Templates für *in vitro* Transkriptionen wurde Plasmid-DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Bei diesem Typ von Endonukleasen stimmen Erkennungs- und Schnittstelle überein, die Hydrolyse führt, abhängig vom Restriktionsenzym, zu glatten oder 3'- bzw. 5'- überhängenden Enden der jeweiligen DNA-Fragmente. Die Hydrolyse wird durch Phenol/Chloroform Extraktion gestoppt, und anschließend durch eine Agarose Gelelektrophorese analysiert. Die Restriktionsendonukleolysen erfolgten in Hinsicht auf Pufferbedingungen, Temperatur, Reaktionszeit und Menge des eingesetzten Enzyms den Vorgaben des Herstellers entsprechend.

4.2.9.2 Auffüllreaktion von 5' überhängenden Enden durch Klenow-Polymerase

Um 5' überhängende Enden von *in vitro* Transkriptionstemplates aufzufüllen wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I benutzt. Eine radioaktive Endmarkierung ist ebenfalls durch die Reaktion mit Klenow-Polymerase möglich bei Einsatz von [α -³²P] markierten Nukleotiden. Es wird folgender Reaktionsansatz hergestellt:

1 µg	DNA-Fragment
2 µl	DNA-Polymerase Puffer
1 µl	4x dNTP-Lösung (je 10mM ATP,CTP, GTP und TTP)
1 µl	Klenow-Enzym (5 U/µl)
ad 25 µl mit Aqua dest.	

Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde solange mit Phenol/Chloroform extrahiert, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Abschließend wurde noch einmal mit Chloroform extrahiert, um alle Phenolreste zu entfernen. Die so extrahierte Lösung wurde noch gegen TE-Puffer dialysiert (siehe 4.2.4.3) um alle Nukleotide zu entfernen. Die Konzentration wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt (siehe 4.2.3.3).

Lösungen:

DNA-Polymerase Puffer:	500 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	100mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT
	1 mM	Spermidin
	1 mM	EDTA

4.2.9.3 Kinasierung von freien 5' Enden mittels Polynukleotidkinase

Zur radioaktiven Endmarkierung von Nukleinsäuremolekülen mit freier 5'-Hydroxylgruppe wurde die γ -Phosphatgruppe des [γ ³²P]-ATP auf das freie 5'-Ende des Substrates durch die T4-Polynukleotidkinase übertragen.

4.2.9.4 5' Endmarkierung von DNA Oligonukleotiden

Zur Primer-Extension Reaktion sind 5' endmarkierte Oligonukleotide als Startprimer zur Verlängerungsreaktion nötig. Diese wurden durch die Polynukleotidkinase endmarkiert. Hierzu wurden 10 pmol eines DNA-Oligonukleotides in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5 µl 2 µM [γ ³²P]-ATP (50 µCi) und 3 U T4-Polynukleotidkinase für 45 min in 1x Kinasepuffer bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 10 minütige Inkubation bei 68°C. Das markierte Oligonukleotid wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 7.5 M Ammoniumacetat, pH 5.0, 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml) und 5 Volumen absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 20 µl TE-Puffer rückgelöst. Zur Bestimmung der Aktivität wurde 1 µl dieser Lösung im Szintillationszähler vermessen (siehe 4.2.3.4.).

Lösungen:

10x Kinasepuffer:	500 mM	Tris/HCl, pH7.5
	100 mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT
	1 mM	Spermidin
	1 mM	EDTA

4.2.10 Sequenzierung von DNA

Zur Auswertung von Primer-Extension Analysen zur Kaliumpermanganat-Modifikationen von ternären Initiationskomplexen waren Sequenzierungsreaktionen nach Sanger nötig. Zur Sequenzierung wurde ein Sequenzierungskit (United States Biochemicals) eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion wurde Mithilfe des Enzyms Sequenase 2.0 durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde vor der eigentlichen Sequenzierungsreaktion alkalisch denaturiert, dann mit einem spezifischen Primer hybridisiert, und anschließend in die eigentliche Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

4.2.10.1 Denaturierung

Zur Denaturierung wurde folgender Ansatz pipettiert:

3-5 µg DNA in 40 µl Aqua dest.
10 µl 1N NaOH

Dieser Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte DNA durch Zugabe von 15 µl 3 M Natriumacetat und 210 µl Ethanol, abs. gefällt. Das lyophilisierte Pellet wurde in 7 µl Aqua dest. aufgenommen und in die Hybridisierung eingesetzt.

4.2.10.2 Hybridisierung

In einem Reaktionsansatz von 10 µl wurde die denaturierte DNA mit 1 pmol Sequenzierungsprimer in 1x Sequenzierungspuffer für 2 min bei 65°C inkubiert und danach langsam (1°C/min) bis zur Raumtemperatur abgekühlt.

4.2.10.3 Sequenzierung

Zur Hybridisierungslösung wurden 5,5 µl Markierungsmix zugegeben und jeweils 3,5 µl des Ansatzes nach 3minütiger Inkubation zu je 2,5 µl vorgewärmten ddNTP-Abbruchmix gegeben und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Harnstoff-Probenpuffer gestoppt, für 3 min bei 96°C inkubiert und auf einem 10% denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Wenn die zu sequenzierenden DNA Längen unterhalb von 100 Basenpaaren sind, wird der Markierungsreaktion 1 μl des Mn-Puffers zugegeben.

Lösungen:

1x Sequenzierungspuffer:	40 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	20 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl
Markierungsmix:	1 μl	DTT
	2 μl	dNTP-Lösung (je 7.5 μM dGTP, dCTP, dTTP)
	0,5 μl	[$\alpha^{32}\text{P}$] dATP
	2 μl	Sequenase 2.0 Enzym (3.25 U)
ddNTP-Abbruchmix:	80 μM	dATP
	80 μM	dCTP
	80 μM	dGTP
	80 μM	dTTP
	8 μM	jeweiliges Abbruchnukleotid
	50 mM	NaCl
Mn-Puffer:	0.15 M	Natriumcitrat
	0.1 M	MnCl ₂

4.3 Spezielle Methoden

4.3.1 Filterbindungsassays

Um die Aktivität der isolierten Polymerasen zu bestimmen, wurden Filterbindungsassays durchgeführt. Es wurde jeweils der Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids in ein neu synthetisiertes Transkript gegen die Zeit gemessen. Die Transkripte werden isoliert, und aus der gemessenen Radioaktivität die Syntheseraten der Polymerasen ermittelt.

4.3.1.1 Festzeitpunktverfahren (Chamberlin *et al.*, 1979)

Zur Charakterisierung der verschiedenen Polymerasefraktionen wurde das Festzeitpunktverfahren angewandt, bei dem die Transkriptaubeute zu einem festen Zeitpunkt bestimmt wurde. Dazu wurde folgender Ansatz auf Eis zusammenpipettiert:

20 μl 5x Transkriptionspuffer

10 µg	Plasmid pUC 18-1
10 µl	NTP-Mix (+ 0.1 µCi/µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-CTP)
10 µl	RNA-Polymerase
ad 100 µl mit Aqua dest.	

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Proteins gestartet und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl eiskalter Carrierlösung sowie 2 ml 20%iger Trichloressigsäure (w/v) gestoppt. Als Blindwert wurde ein Ansatz mit 200 µl Carrierlösung und 2 ml 20%iger Trichloressigsäure angesetzt. Alle Ansätze wurden für 45 min auf Eis präzipitiert und mittels Filterhalter, Saugflasche, Wolfscher Flasche und Wasserstrahlpumpe durch GF/C-Filter, welche vorher in 0.1 M Natriumpyrophosphat-Lösung eingelegt waren, gesaugt. Die Filter wurden anschließend mit 30 ml eiskalter Waschlösung und 10 ml Ethanol (abs.) gewaschen. Die Filter wurden unter Rotlicht getrocknet und die gefallenen Transkripte abschließend im Szintillationszähler bestimmt.

4.3.1.2 Aktivitätstest (Chamberlin *et al.*, 1979)

Die Charakterisierung der Polymerase in Hinsicht auf Terminationseffizienz, Nukleotideinbau/sek, Anteil der aktiven Polymerasen und spezifische Aktivität erfolgte durch den Chamberlin-Assay. Hier wird der Nukleotideinbau als eine Funktion der Zeit verfolgt. Als Template dient die DNA des Bakteriophagen T7 Δ 111. Dieses Template ist eine Deletionsmutante des Phagen T7, das noch den Sigma70-abhängige Promotor A1 und 5960 Nt's stromabwärts davon einen rho-unabhängigen Terminator besitzt.

Für den Chamberlin Assay wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert:

400 µl	AB-Diluent
200 µl	Lösung A
100 µg	T7 Δ 111-DNA
100 µl	NTP-Mix
ad 1000 µl mit Aqua dest.	

Zur Nullwertbestimmung wurde dem Ansatz 100 µl entnommen, mit 200 µl 'Carrier-Lösung' und 2.5 ml 10% (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 30 min auf Eis gehalten. Zu dem Restansatz wurden 5-20 µl (0,2-10 mU) Polymerase gegeben und für 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde der Ansatz bei 30°C inkubiert, nach exakt 1,8 min wurden zur Vermeidung von Reinitiationen der Polymerase 10 µl Heparinlösung (10 mg/ml) zugegeben. Nach 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 und 25 min wurden jeweils 100 µl entnommen und wie die Probe zur Nullwertbestimmung behandelt.

Diese Proben wurden anschließend durch GF/C-Filter filtriert, gewaschen und vermessen, wie im Festzeitpunktverfahren beschrieben (siehe: 2.3.2.1.). Die gemessenen Aktivitäten wurden als Funktion der Zeit graphisch dargestellt. Aus dem Diagramm kann man unter Berücksichtigung der eingesetzten Radioaktivitätsmenge im Reaktionsansatz, der Zählrohrbeute bei den Szintillationsmessungen und der eingesetzten Polymerasemenge die spezifische Aktivität, den Anteil der aktiven Polymerasen, die Terminationseffizienz und die durchschnittliche Elongations-Geschwindigkeit berechnen (wie beschrieben: Chamberlin *et al.*, 1979).

Lösungen :

AB-Diluent:	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	50 mM	NaCl
	100 μM	EDTA
	5% (v/v)	Glycerol
	100 μg/ml	acetyliertes BSA
5x Transkriptionspuffer:	220 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	70 mM	MgCl ₂
	70 mM	β-Mercaptoethanol
	100 mM	NaCl
	10% (v/v)	Glycerol
	200 μM	EDTA
	200 μg/ml	acetyliertes BSA
NTP-Mix	je 4 mM	ATP, CTP, GTP und UTP
	0.1 μCi/μl	[α ³² P]-CTP
Lösung A:	200 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	50 mM	MgCl ₂
	50 mM	β-Mercaptoethanol
Carrier-Lösung:	50 mM	Natriumpyrophosphat
	50 mM	EDTA
	0.5mg/ml	<i>E. coli</i> tRNA

Waschlösung:	1 M	HCl
	100 mM	Natriumpyrophosphat

4.3.2 Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp)

Guanosintetraphosphat wurde mittels der ppGpp-Synthetase I, welche an intakten Ribosomen assoziiert ist, synthetisiert. Die Ribosomen wurden freundlicherweise von A. Michels zur Verfügung gestellt. Die Synthese und Aufreinigung wurde nach Krohn *et al.* (1994) durchgeführt.

4.3.2.1 Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp)

Die Synthese von ppGpp erfolgte in einem 12 ml Reaktionsgefäß (Greiner) unter Zugabe von *relA*⁺ Ribosomen innerhalb eines Standardreaktionsansatzes:

550 µl	10x Standardpuffer
350 OD _{260nm}	<i>relA</i> ⁺ Ribosomen
4 mM	ATP
2 mM	GDP
ad 5.5 ml mit Aqua dest.	

Der Ansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, nach jeder Stunde wurde ein Aliquot abgenommen und für eine Dünnschichtchromatographie verwendet. Dies dient zur Überprüfung der Synthese des ppGpp. Nach Ablauf der dreistündigen Inkubation wurde die Reaktion durch mehrmalige Phenol/Chloroform Extraktion gestoppt. Der Überstand wurde für eine Affinitätschromatographie verwendet.

4.3.2.2 Analytischer Nachweis von ppGpp

Die Aliquots des Reaktionsansatzes wurden auf Fluoreszenz-beschichteten Polyethylenimin-Dünnschichtplatten (Macherey und Nagel) aufgetragen, getrocknet und ca. für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetrennt. Als Laufmittel diente 1,5 M KH₂PO₄- Lösung. Im Anschluß an den Lauf wurde die DC-Platte an der Luft getrocknet und mittels UV-Licht (256 nm) über ihre Fluoreszenz- Löschung nachgewiesen. Der Verlauf der Synthese konnte anhand der Zunahme des ppGpp-Signals gut verfolgt und nachgewiesen werden.

4.3.2.3 Affinitätschromatographie

Der Überstand des Standardreaktionsansatzes nach Phenol/Chloroform Extraktion wurde auf eine Sephadex A 25-Säule aufgetragen. Trennung und Nachweis erfolgten über das ECONO-System (Bio-Rad) bei 254 nm. Die Säule wurde zunächst mit TL1.0 Puffer gewaschen und anschließend mit dem doppelten Volumen TL0.1-Puffer bei einer Flußrate von 0.6 ml/min äquilibriert. Die Fraktionsgröße betrug 3 ml.

Anschließend wurde der Syntheseüberstand (ca 5 ml) auf die Säule aufgetragen, ins Material einsinken lassen, und mittels eines linearen LiCl-Gradienten (TL0.1 bis TL0.5 mit einem Volumen von ca. 600 ml) eluiert und fraktioniert. Dabei werden die Nukleotide voneinander getrennt; die ppGpp-haltige Fraktion eluiert bei ca. 350 mM LiCl. Die ppGpp-haltige Fraktion wird über das Schreiberprofil identifiziert, vereinigt und aufkonzentriert (Heto VR-1 Speedvac concentrator). Diese aufkonzentrierte ppGpp-Lösung wurde in eine Gelfiltration eingesetzt.

Lösungen:

TL0.1 Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
100 mM LiCl

TL0.5 Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
500 mM LiCl

TL1.0 Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
1 M LiCl

4.3.2.4 Gelfiltration

Um die isolierten und aufkonzentrierten ppGpp-Fraktionen von dem, durch die Affinitätschromatographie anfallenden LiCl zu befreien, wurde die Lösung auf eine Gelfiltration aufgetragen. Für die Gelfiltration wurde eine G10-Säule benutzt. Die Trennung und Fraktionierung erfolgte ebenfalls über das ECONO-System bei 254 nm bei einer Flußrate von 0.6 ml/min. Die Fraktionsgröße betrug 3 ml. Die G10-Säule wurde mit 500 ml Aqua dest. gewaschen, anschließend wurden die auf ca. 1 ml aufkonzentrierten Fraktionen zur Filtration auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Lösung in die Gelmatrix eingesickert war, wurde sie mit Aqua dest. überschichtet und eluiert. Die ppGpp enthaltenen Fraktionen wurden über das Schreiberprofil und Dünnschichtchromatographie identifiziert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Vakuum-Konzentration (Heto VR-1 Speedvac concentrator) aufkonzentriert. Die Bestimmung der Nukleotidkonzentration erfolgte über ein Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 252 nm. Die maximale LiCl-Konzentration wurde über Messung der Leitfähigkeit bestimmt. Für den weiteren Gebrauch wurde die ppGpp-Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.3.3 *in vitro* Transkriptionen

Für die *in vitro* Transkriptionen wurde ausschließlich die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *E. coli* MRE 600 Zellen verwendet. Für die Initiation der 'single round' Transkriptionen wurden ausschließlich Nukleotide verwendet, die den

Reinheitsgrad 'ultra pure' besaßen (Pharmacia, München), um Nebenreaktionen durch Verunreinigungen mit anderen Nukleotiden zu vermeiden.

4.3.3.1 'multiple round' *in vitro* Transkription

In dieser Transkription wird eine Transkriptionsmatritze von der RNA-Polymerase mehrmals abgelesen, da jedes Polymerasemolekül nach Beendigung der Transkription neu am Promotor initiieren kann. Nach einer festen Zeit wird die Neuinitiation der Polymerasen durch Zugabe von Heparin gestoppt. Gleichzeitig werden alle unvollständigen Transkriptionen durch eine hohe Konzentration aller 4 NTPs vollendet ('chase').

Es wurde dazu folgender Ansatz pipettiert:

1 nM	Template-DNA
3 nM	Aktive RNA-Polymerase
1x	Transkriptionspuffer

Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C vorinkubiert. Nach 8 Minuten wurden 5 µl der 4 NTP-Lösung zupipettiert. Anschließend wurde für 15 min bei 30°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15,2 µl einer 'chase'-Lösung zupipettiert. Der Ansatz wurde für weitere 6 min bei 30°C inkubiert, anschließend mit 150 µl Stopp-Lösung gestoppt und mit 3 Volumen Ethanol, abs. gefällt. Das Pellet wurde abzentrifugiert (Heraeus Laborfuge, 12000 rpm, 60 min), lyophilisiert und in Formamidprobenpuffer aufgenommen. Diese Proben wurden auf ein 15%iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt.

Lösungen:

10xTranskriptionspuffer:	500 mM	Tris/Acetat, pH 8.0
	800 mM	Kaliumglutamat
	100 mM	Magnesiumacetat
	10 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	100 µg/ml	acetyliertes BSA

4NTP-Lösung:	500 μ M	ATP
	500 μ M	CTP (oder UTP für <i>rrnD</i> P1)
	500 μ M	GTP
	0.31 μ M	[α^{32} P]-UTP (3000 Ci/mmol) (oder [α^{32} P]-CTP (3000 Ci/mmol) für <i>rrnD</i> P1)
'chase'-Lösung:	2 mM	ATP
	2 mM	CTP
	2 mM	GTP
	2 mM	UTP
	1 mM	Tris/HCl, pH 7.0
	2 mg/ml	Heparin
Stopplösung:	3 M	Natriumacetat
	20 μ g/ml	Glycogen
	5000 cpm	Radioaktiv markierter DNA-Marker

4.3.3.2 'single round' *in vitro* Transkription

Ziel von 'single round' *in vitro* Transkriptionen war die Transkription von nicht mehr als einer Polymerase pro Template. Neuinitiationen wurden nach der Komplexbildung durch Zugabe von einer ausreichenden Menge Heparin verhindert. Hierdurch konnte man sicherstellen, daß ein mehrfaches Ablesen der Transkriptionsmatritze nicht die Kinetik der Initiationskomplexbildung verfälscht.

Generell wurde folgender Ansatz pipettiert:

3 nM	RNA-Polymerase
1 nM	DNA-Template
1x	Transkriptionspuffer
x μ M	ppGpp

Dieser Ansatz wurde 8 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Startnukleotide für den betreffenden Promotor hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für

weitere 10 min bei 30°C inkubiert. Die Neuintiation wurde dann durch Hinzufügen von Heparin zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml verhindert. Dieser Ansatz wurde für weitere Messungen benutzt.

4.3.3.2.1 'single round' *in vitro* Transkription zur Analyse der Initiationskomplexbildung

Die Kinetik der Initiationskomplexbildung wurde in diesem Fall durch Quantifizierung der Produkte einer 'single round' *in vitro* Transkription bestimmt. Nur solche Komplexe sind in der Lage Vollängen-Transkripte zu synthetisieren, welche produktiv am Promotor initiiert haben. Daher ist eine Zunahme von Produkten über die Zeit ein Maß für die Geschwindigkeit der Initiationskomplexbildung. Hierzu wurde ein Standardansatz pipettiert:

15 nM	RNA-Polymerase
5 nM	DNA-Template
1x	Transkriptionspuffer
ad 10µl/Zeitwert mit A. dest	

Dieser Ansatz wurde für 8 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch hinzupipettieren einer Initiationsnukleotidlösung gestartet.

50 oder 500 µM	erstes Startnukleotid
5 µM	zweites Startnukleotid
10µCi	zweites Startnukleotid

Der Ansatz wurde weiterhin inkubiert bei 30°C. 10µl Aliquots dieses Ansatzes wurden in 2µl 'chase' Lösung pipettiert, und für 8 min bei 30°C gehalten. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 10 µl Formamidprobenpuffer gestoppt, 5 µl des Ansatzes wurden zu Quantifizierung der Produkte auf ein denaturierendes 20% Polyacrylamid-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

4.3.3.2.2 'single round' *in vitro* Transkription zur Bestimmung von Halbwertszeiten produktiver Initiationskomplexe

Die Halbwertszeiten produktiver Initiationskomplexe wurden ebenfalls durch die Methode der 'single round' *in vitro* Transkription bestimmt. Hierzu wurden Initiationskomplexe hergestellt, durch Heparin kompetitiert und anschließend nach verschiedenen Zeiten produktiv verlängert. Eine Abnahme der produktiven

Transkripte beschreibt die Halbwertszeit der produktiven Initiationskomplexe. Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert:

15 nM	RNA-Polymerase
5 nM	DNA-Template
1x	Transkriptionspuffer
x μ M	ppGpp
50 μ M	erstes Startnukleotid
5 μ M	zweites Startnukleotid
10 μ Ci	zweites Startnukleotid
ad 10 μ l/Zeitwert mit Aqua dest	

Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 30°C gehalten. Anschließend wurde Heparin zu einer Endkonzentration von 200 μ g/ml zugefügt. Der Ansatz wurde weiterhin bei 30°C inkubiert. 10 μ l Aliquots wurden nach bestimmten Zeiten in 2 μ l chase pipettiert, weitere 8 min bei 30°C inkubiert und durch Zugabe von 10 μ l Formamid Probenpuffer gestoppt. Diese Proben wurden auf einem 20%igen denaturierendem Polyacrylamid Gel aufgetrennt.

4.3.4 Footprint-Techniken

4.3.4.1 KMnO₄-Footprints

4.3.4.2 Chemische Modifikation durch KMnO₄ zur Analyse von RNA-Polymerase/DNA-Komplexen *in vitro*

Die chemische Modifikation von DNA mit KMnO₄ wurde nach Sasse Dwight und Gralla (1991) durchgeführt. Durch dieses Reagenz ist es möglich einzelsträngige Thymidine zu modifizieren und anschließend über eine Primer-Extension-Reaktion nachzuweisen, da die Verlängerung an modifizierten Positionen abbricht. Ziel ist es hier durch RNA-Polymerase aufgeschmolzene Template-Bereiche zu detektieren.

Zur chemischen Modifikation von Template-DNA mit KMnO₄ *in vitro* wurde folgender Ansatz bei 30°C für 10 min inkubiert:

15 nM	aktive RNA-Polymerase
3 nM	Promotor-Fragment
500 μ M	erstes Startnukleotid
50 μ M	zweites Startnukleotid
1x	Transkriptionspuffer
80 mM	KGlu

ad auf 70 µl mit Aqua dest.

Anschließend wurde 100 µg/ml Heparin hinzugefügt, nach 15 sec wurden 7 µl 50 mM KMnO₄ zupipettiert. Es folgte eine Inkubation für zwei Minuten bei 30°C. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 7.5 µl β-Mercaptoethanol, anschließend wurde der Ansatz auf Eis überführt. Nach Zugabe von 50 µl EDTA, 7 µl NaOAc, pH 5.5. und 210 µl absolutem Ethanol wurde die DNA mit flüssigem Stickstoff gefällt. Das Pellet wurde lyophilisiert und in 50 µl TE-Puffer rückgelöst. Es folgte eine Aufreinigung der modifizierten DNA.

4.3.4.3 Aufreinigung der modifizierten Template-DNA

Zunächst wurde das gelöste Pellet einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Die wässrige Phase wurde anschließend noch einmal mit Chloroform extrahiert. Die DNA-Lösung wurde mit TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und mittels des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nocheinmal gereinigt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Proben wurden anschließend auf 140 µl aufgefüllt, und dann jeweils 35 µl in Primer Extension Reaktionen eingesetzt.

4.3.4.4 Primer-Extension-Analyse

Die modifizierte DNA wurde durch alkalische Behandlung denaturiert. Hierbei wurde die DNA zuerst denaturiert durch Alkali, anschließend neutralisiert und mit dem spezifischen Primer hybridisiert. Abschließend wurde mit der Klenow-Polymerase verlängert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz auf Eis pipettiert:

35 µl	modifizierte DNA
1 µl	500.000 cpm endmarkiertes Oligonukleotid
4 µl	10 mM NaOH

Diese Proben wurden zur Denaturierung der Template-DNA für 2 min bei 80°C erhitzt und danach sofort auf Eis überführt und dort für weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 10x TMD-Puffer hinzugefügt und die Probe für 3 min bei der berechneten Hybridisierungstemperatur inkubiert. Die Probe wurde im Anschluß darauf sofort auf Eis überführt. Zur Berechnung der jeweiligen Hybridisierungstemperatur (des T_M-Wertes) wurde folgende Formel herangezogen:

$$T_M = 69.3 + 0.41 (G+C)\% - 650 L \quad (\text{nach Maniatis } et al., 1982)$$

wobei: T_M = Hybridisierungstemperatur
(G+C)% = Prozentualer G/C Gehalt

L= Länge des Primers in Nukleotiden

Im Anschluß an diese Hybridisierung wurde der Lösung auf Eis 5 µl dNTP-Lösung und 1 µl Klenow-Fragment (5 U/µl) zugegeben, gemischt und für 10 min bei 50°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1/3 Volumen PE-Quench-Lösung zugesetzt, die Probe auf Eis gehalten und mit drei Volumen abs. Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt. Das lyophilisierte Pellet wurde in 5 µl Formamid-Probenpuffer aufgenommen, und anschließend gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen analysiert.

Lösungen:

10x TMD-Puffer:	0.5 M	Tris-HCl, pH 7.2
	0.1 M	MgSO ₄
	2 mM	DTT
4x dNTP-Lösung:	je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM TE-Puffer	
PE-Quench-Lösung:	4 M	NH ₄ OAc
	20 mM	EDTA

4.3.5 Native Gelelektrophorese zur Bestimmung von Polymerase-DNA-Komplexen (Gelretardierung)

RNA-Polymerase Promotor Komplexe wurden mithilfe von Retardierungsgelen analysiert. Unter nativen Bedingungen wurden RNA-Polymerase Promotor-Komplexe auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt, wobei die Komplexe im Vergleich zur freien DNA deutlich retardiert laufen. Diese Retardierung ermöglicht die Untersuchung des Bindeverhaltens der RNA-Polymerase unter verschiedenen Bedingungen. Die Bedingungen wurden modifiziert nach Garner und Revzin (1981) und Nachaliel et al. (1989) eingesetzt. Es wurden sowohl Komplexanalysen zur Bestimmung von RNA-Polymerase Promotor-Komplexen als auch zur Messung von Initiationskinetiken benutzt.

4.3.5.1 Native Gelelektrophorese zur Bestimmung von RNA-Polymerase Promoter-Komplexen

Zur Identifikation der Komplexe an radioaktivmarkierten Promotorfragmenten wurde folgender Standardbindungsansatz pipettiert:

3 nM	RNA-Polymerase
1 nM	radioaktiv markiertes DNA-Fragment
1 x	Transkriptionspuffer
500 µM	erstes Startnukleotid
50 µM	zweites Startnukleotid
ad 10µl/Ansatz mit Aqua dest	

Dieser Ansatz wurde zunächst 10 min bei 30°C zur Komplexbildung inkubiert. Neuinitiation oder unspezifische Proteinbindung wurden durch Zugabe von Heparin mit einer Endkonzentration von 200 µg/µl verhindert. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 70%igen Glycerinlösung (v/v) auf 5% Glycerin (v/v) eingestellt. Dieser Ansatz wurde auf ein natives 5% Polyacrylamid-Gel (0.5x TBE, Vernetzung 46:1 (Acrylamid:Bisacrylamid)) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einem konstanten Stromfluß von 10-12 mA, um eine Aufwärmung des Gels zu verhindern.

4.3.5.2 Native Gelelektrophorese zur Bestimmung der Kinetik von Initiationskomplexbildungen

Die Kinetik der Initiationskomplexbildung wurde ebenfalls über Retardierungsgele aufgenommen. Hierzu wurde die Komplexbildung zeitabhängig durch Zugabe von Heparin gestoppt und die Initiationskomplexe über Retardierungsgele aufgetrennt. Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert:

3 nM	RNA-Polymerase
1 nM	Radioaktiv markiertes DNA-Fragment
1 x	Transkriptionspuffer
ad 10 µl/Zeitwert mit Aqua dest	

Dieser Ansatz wurde 8 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe eines Nukleotidmixes, welcher die ersten beiden Startnukleotide enthält, gestartet:

50 oder 500 µM	erstes Startnukleotid
50 oder 5 µM	zweites Startnukleotid

Aus diesem Reaktionsansatz werden nach bestimmten Zeiten Aliquots entnommen und in eine Heparinlösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml pipettiert. Anschließend wurde mit einer 70%igen (v/v) Glycerinlösung eine

Glycerinkonzentration von 5% (v/v) eingestellt. Diese Probe wird auf Eis überführt und dort bis zum Auftrag auf das Retardierungsgel gelagert.

5 Literaturverzeichnis:

Afflerbach H., Schroder O., Wagner R. 1998. Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **28**:641-53

Albrechtsen B., Squires C.L., Li S., Squires C. 1990. Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J. Mol. Biol.* **213**:123-34

Artsimovitch I., Svetlov V., Anthony L., Burgess R. R., Landick R. 2000. RNA polymerases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals *in vitro*. *J. Bacteriol.* **182**:6027-35

Baracchini E., Bremer H. 1988. Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp. *J. Biol. Chem.* **263**:2597-602

Baracchini E., Glass R., Bremer H. 1988. Studies *in vivo* on *Escherichia coli* RNA polymerase mutants altered in the stringent response. *Mol. Gen. Genet.* **213**:379-87

Barker M. M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R. L. 2001. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **305**:673-88

Barker M. M., Gourse R. L. 2001. Regulation of rRNA Transcription Correlates with Nucleoside Triphosphate Sensing. *J. Bacteriol.* **183**:6315-23

Barker M. M., Gaal T., Gourse R. L. 2001. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.* **305**:689-702

Bartlett M. S., Gourse R. L. 1994. Growth rate-dependent control of the *rrnB* P1 core promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:5560-4

Blatter E. E., Ross W., Tang H., Gourse R. L., Ebright R. H. 1994. Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* **78**:889-96

Borukhov S, Sagitov V, Josaitis CA, Gourse RL, Goldfarb A. 1993. Two modes of transcription initiation *in vitro* at the *rrnB* P1 promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**:23477-82

Boyer H. W., Roulland-Dussoix D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-72

Brendel V., Hamm G. H., Trifonov E. N. 1986. Terminators of transcription with RNA polymerase from *Escherichia coli*: what they look like and how to find them. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**:705-23

Burgess R. R., Jendrisak J. J. 1975. A procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry* **14**:4634-8

Cammack K. A., Wade H. E. 1965. The sedimentation behaviour of ribonuclease-active and -inactive ribosomes from bacteria. *Biochem. J.* **96**:671-80

Cashel M., Gentry D. R., Hernandez V. J., Vinella D. 1996. The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.*, ed. FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger, pp. 1458-1496. Washington, D. C.: American Society for Microbiology

Chamberlin M. J., Nierman W. C., Wiggs J., Neff N. 1979. A quantitative assay for bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **254**:10061-9

Choy H. E. 2000. The study of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate-mediated transcription regulation *in vitro* using a coupled transcription-translation system. *J. Biol. Chem.* **275**:6783-9

Cole JR, Olsson CL, Hershey JW, Grunberg-Manago M, Nomura M. 1987. Feedback regulation of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. Requirement for initiation factor IF2. *J. Mol. Biol.* **198**:383-92

Condon C., Squires C., Squires C. L. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**:623-45

d'Aubenton C. Y., Brody E., Thermes C. 1990. Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.* **216**:835-58

de Boer H., Nomura M. 1979. *In vivo* transcription of rRNA operons in *Escherichia coli* initiates with purine nucleoside triphosphates at the first promoter and with CTP at the second promoter. *J. Biol. Chem.* **254**:5609-12

De Boer H. A., Comstock L. J., Vasser M. 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**:21-5

Dombroski A. J., Walter W. A., Gross C. A. 1993. Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev.* **7**:2446-55

Dorman C. J., Barr G. C., Bhriain N. N., Higgins C. F. 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* **170**:2816-26

Duester G. L., Holmes W. M. 1980. The distal end of the ribosomal RNA operon *rrnD* of *Escherichia coli* contains a *tRNA^{1thr}* gene, two 5s rRNA genes and a transcription terminator. *Nucleic Acids Res.* **8**:3793-807

Ellwood M., Nomura M. 1982. Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **149**:458-68

Figuroa-Bossi N., Guerin M., Rahmouni R., Leng M., Bossi L. 1998. The supercoiling sensitivity of a bacterial tRNA promoter parallels its responsiveness to stringent control. *EMBO J.* **17**:2359-67

Fiil N., Friesen J. D. 1968. Isolation of "relaxed" mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **95**:729-31

Finn R. D., Orlova E. V., Gowen B. , Buck M., van Heel M. 2000. *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO J.* **19**:6833-44

Gaal T., Barkei J., Dickson R. R., deBoer H. A., deHaseth P. L., Alavi H., Gourse R. L. 1989. Saturation mutagenesis of an *Escherichia coli* rRNA promoter and initial characterization of promoter variants. *J. Bacteriol.* **171**:4852-61

Gaal T., Gourse R. L. 1990. Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate is not required for growth rate- dependent control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:5533-7

Gaal T., Bartlett M. S., Ross W., Turnbough C. L., Jr., Gourse R. L. 1997. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* **278**:2092-7

Gallant J., Harada B. 1969. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. 3. The functional relationship between purine ribonucleoside triphosphate pool sizes and the rate of ribonucleic acid accumulation. *J. Biol. Chem.* **244**:3125-32

Gallant J., Irr J., Cashel M. 1971. The mechanism of amino acid control of guanylate and adenylate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **246**:5812-6

Gausing K. 1977. Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **115**:335-54

Glaser G., Sarmientos P., Cashel M. 1983. Functional interrelationship between two tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters. *Nature* **302**:74-6

Gonzalez N., Wiggs .J, Chamberlin M. J. 1977. A simple procedure for resolution of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**:404-8

Gourse R. L., De Boer H. A., Nomura M. 1986. DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell* **44**:197-205

Gourse R. L. 1988. Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **16**:9789-809

Gourse R. L., Gaal T., Bartlett M. S., Appleman J. A., Ross W. 1996. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:645-77

Haseltine W. A., Block R. 1973. Synthesis of guanosine t. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**:1564-8

Hawley D. K., McClure W. R.. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**:2237-55

Heinemann M., Wagner R. 1997. Guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* **247**:990-9

Heinemann M. 1997. Die Regulation der Transkriptionsinitiation stringent kontrollierter Promotoren in *Escherichia coli* durch das Effektonukleotid Guanosintetraphosphat. *Doktorarbeit*, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Hernandez V. J., Cashel M. 1995. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **252**:536-49

Higgins C. F., Dorman C. J., Stirling D. A., Waddell L., Booth I. R., May G., Bremer E. 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-84

Hou Z., Cashel M., Fromm H. J., Honzatko R. B. 1999. Effectors of the stringent response target the active site of *Escherichia coli* adenylosuccinate synthetase. *J. Biol. Chem.* **274**:17505-10

Hsu L. M., Vo N. V., Chamberlin M. J. 1995. *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:11588-92

Ide H., Kow Y. W., Wallace S. S. 1985. Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **13**:8035-52

Igarashi K., Ishihama A. 1991. Bipartite functional map of the E. coli RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell* **65**:1015-22

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

Jin D. J., Burgess R. R., Richardson J. P., Gross C. A. 1992. Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:1453-7

Jinks-Robertson S., Gourse R. L., Nomura M. 1983. Expression of rRNA and tRNA genes in *Escherichia coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* **33**:865-76

Josaitis C. A., Gaal T., Ross W., Gourse R. L. 1990. Sequences upstream of the -35 hexamer of *rrnB* P1 affect promoter strength and upstream activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**:307-11

Josaitis C. A., Gaal T., Gourse R. L. 1995. Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:1117-21

Jung Y. H., Lee Y. 1997. *Escherichia coli* *rnpB* promoter mutants altered in stringent response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**:582-6

Kadesch T. R., Rosenberg S., Chamberlin M. J. 1982. Binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to bacteriophage T7 DNA. Measurements of binding at bacteriophage T7 promoter A1 using a template competition assay. *J. Mol. Biol.* **155**:1-29

Kainz M. , Roberts J. 1992. Structure of transcription elongation complexes *in vivo*. *Science* **255**:838-41

Kajitani M., Ishihama A. 1984. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase. Differential stringent control of the multiple promoters from ribosomal RNA and protein operons. *J. Biol. Chem.* **259**:1951-7

Kassavetis G. A., Chamberlin M. J. 1981. Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **256**:2777-86

Kingston R. E., Chamberlin M. J. 1981. Pausing and attenuation of *in vitro* transcription in the *rrnB* operon of *E. coli*. *Cell* **27**:523-31

Krohn M., Wagner R. 1995. A procedure for the rapid preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) from *Escherichia coli* ribosomes. *Anal. Biochem.* **225**:188-90

Krohn M., Wagner R. 1996. Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J. Biol. Chem.* **271**:23884-94

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5

Langert W., Meuthen M, Mueller K. 1991. Functional characteristics of the *rrnD* promoters of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:21608-15

Leirimo S., Gourse R. L. 1991. Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription. I. Kinetic analysis of the roles of the upstream activator region and supercoiling on transcription of the *rrnB* P1 promoter *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **220**:555-68

Liebig B., 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**:328-35

Lisser S., Margalit H. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21**:1507-16

Little R., Ryals J., Bremer H. 1983. *rpoB* mutation in *Escherichia coli* alters control of ribosome synthesis by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **154**:787-92

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

McClure W. R. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:171-204

Melancon P., Burgess R. R., Record M. T, Jr. 1983. Direct evidence for the preferential binding of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme to the ends of deoxyribonucleic acid restriction fragments. *Biochemistry* **22**:5169-76

Meng W., Belyaeva T., Savery N. J., Busby S. J., Ross W. E., Gaal T., Gourse R. L., Thomas M. S. 2001. UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase alpha subunit linker. *Nucleic Acids Res.* **29**:4166-78

Minakhin L., Bhagat S., Brunning A., Campbell E. A., Darst S. A., Ebright R. H., Severinov K. 2001. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:892-7

Mizushima-Sugano J., Kaziro Y. 1985. Regulation of the expression of the *tufB* operon: DNA sequences directly involved in the stringent control. *EMBO J.* **4**:1053-8

Mukhopadhyay J., Kapanidis A. N., Mekler V., Kortkhonjia E., Ebright Y. W., Ebright R. H. 2001. Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription:

fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell* **106**:453-63

Mulligan M. E., Hawley D. K., Entriken R., McClure W. R. 1984. *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res.* **12**:789-800

Nene V., Glass R. E.. 1983. Relaxed mutants of *Escherichia coli* RNA polymerase. *FEBS Lett.* **153**:307-10

Newlands J. T., Ross W., Gosink K. K., Gourse R. L. 1991. Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription. II. characterization of complexes of *rrnB* P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **220**:569-83

Nierlich D. P. 1978. Regulation of bacterial growth, RNA, and protein synthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**:393-432

Nilsson L., Verbeek H., Vijgenboom E., van Drunen C., Vanet A., Bosch L. 1992. FIS-dependent trans activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **174**:921-9

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

Ohlsen K. L., Gralla J. D. 1992. DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli rrnB* P1 promoter. *J. Biol. Chem.* **267**:19813-8

Ohlsen K. L., Gralla J. D. 1992. Melting during steady-state transcription of the *rrnB* P1 promoter *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **174**:6071-5

Ohlsen K. L., Gralla J. D. 1992. Interrelated effects of DNA supercoiling, ppGpp, and low salt on melting within the *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter. *Mol. Microbiol.* **6**:2243-51

Oostra B. A., van Vliet A. J., Ab G., Gruber M. 1981. Enhancement of ribosomal ribonucleic acid synthesis by deoxyribonucleic acid gyrase activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **148**:782-7

Orosz A, Boros I., Venetianer P. 1991. Analysis of the complex transcription termination region of the *Escherichia coli rrnB* gene. *Eur. J. Biochem.* **201**:653-9

Petersen C., Moller L. B. 2000. Invariance of the nucleoside triphosphate pools of *Escherichia coli* with growth rate. *J. Biol. Chem.* **275**:3931-5

Raghavan A., Chatterji D. 1998. Guanosine tetraphosphate-induced dissociation of open complexes at the *Escherichia coli* ribosomal protein promoters *rplJ* and *rpsA* P1: nanosecond depolarization spectroscopic studies. *Biophys. Chem.* **75**:21-32

Raghavan A., Kameshwari D. B., Chatterji D. 1998. The differential effects of guanosine tetraphosphate on open complex formation at the *Escherichia coli* ribosomal protein promoters *rplJ* and *rpsA* P1. *Biophys. Chem.* **75**:7-19

Record M. T., Reznikoff W. S., Craig M. L., McQuade K. L., Schlax P. J. 1998. *Escherichia coli* RNA Polymerase ($E\sigma 70$), Promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology.*, ed. FC Neidhardt, R Curtis III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger, pp. 792-820. Washington, D. C.: American Society for Microbiology

Reddy P. S., Raghavan A., Chatterji D. 1995. Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.* **15**:255-65

Riggs D. L., Mueller R. D., Kwan H. S., Artz S. W. 1986. Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:9333-7

Ring B. Z., Roberts J. W. 1994. Function of a nontranscribed DNA strand site in transcription elongation. *Cell* **78**:317-24

-
- Ross W., Thompson J. F., Newlands J. T., Gourse R. L. 1990. E.coli Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* **9**:3733-42
- Ross W., Gosink K. K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R. L. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**:1407-13
- Rouet P., Essigmann J. M. 1985. Possible role for thymine glycol in the selective inhibition of DNA synthesis on oxidized DNA templates. *Cancer Res.* **45**:6113-8
- Ryals J., Little R., Bremer H. 1982. Control of rRNA and tRNA syntheses in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **151**:1261-8
- Sarmientos P., Sylvester J. E., Contente S., 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**:1337-46
- Sasse-Dwight S., Gralla J. D. 1989. KMnO₄ as a probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**:8074-81
- Schmitt B., Reiss C. 1995. Kinetic study *in vitro* of *Escherichia coli* promoter closure during transcription initiation. *Biochem. J.* **306** (Pt 1):123-8
- Schroder O., 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**:737-48
- Spassky A. 1986. Visualization of the movement of the *Escherichia coli* RNA polymerase along the *lac* UV5 promoter during the initiation of the transcription. *J. Mol. Biol.* **188**:99-103
- Straney D. C, Crothers DM. 1985. Intermediates in transcription initiation from the E. coli *lac* UV5 promoter. *Cell* **43**:449-59
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Simon M. N., Dunn J. J. 1979. Genetic and physical mapping in the early region of bacteriophage T7 DNA. *J. Mol. Biol.* **135**:917-37

Tao K., Fujita N., Ishihama A. 1993. Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol. Microbiol.* **7**:859-64

Tedin K., Bremer H. 1992. Toxic effects of high levels of ppGpp in *Escherichia coli* are relieved by rpoB mutations. *J. Biol. Chem.* **267**:2337-44

Toulokhonov I. I., Shulgina I., Hernandez V. J. 2001. Binding of the Transcription Effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA Polymerase Is Allosteric, Modular, and Occurs Near the N Terminus of the beta'-Subunit. *J. Biol. Chem.* **276**:1220-5

Travers A. 1980. Why ppGpp? *Nature* **283**:16

Travers A. A. 1980. A tRNA^{Tyr} promoter with an altered *in vitro* response to ppGpp. *J. Mol. Biol.* **141**:91-7

Vieira J., Messing J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-68

Vogel U., Jensen K. F. 1994. Effects of guanosine 3',5'-bisdiphosphate (ppGpp) on rate of transcription elongation in isoleucine-starved *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:16236-41

Vogel U., Jensen K. F. 1995. Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:18335-40

Walstrom K. M., Dozono J. M., von Hippel P. H. 1997. Kinetics of the RNA-DNA helicase activity of *Escherichia coli* transcription termination factor rho. 2. Processivity, ATP consumption, and RNA binding. *Biochemistry* **36**:7993-8004

Walstrom K. M., Dozono J. M., Robic S., von Hippel P. H. 1997. Kinetics of the RNA-DNA helicase activity of *Escherichia coli* transcription termination factor rho. 1. Characterization and analysis of the reaction. *Biochemistry* **36**:7980-92

Wood D. C., Lebowitz J. 1984. Effect of supercoiling on the abortive initiation kinetics of the RNA-I promoter of ColE1 plasmid DNA. *J. Biol. Chem.* **259**:11184-7

Yager T. D., von Hippel P. H. 1991. A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**:1097-118

Yamagishi M., Cole J. R., Nomura M., Studier F. W., Dunn J. J. 1987. Stringent control in *Escherichia coli* applies also to transcription by T7 RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **262**:3940-3

Yang H. L., Heller K., Gellert M., Zubay G. 1979. Differential sensitivity of gene expression *in vitro* to inhibitors of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:3304-8

Zacharias M., Goring 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.* **8**:3357-63

Zhou Y. N., Jin D. J. 1998. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:2908-13

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A260	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
Da	Dalton
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsNS	doppelsträngige Nukleinsäure
DSR	downstream region
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo
KGlu	Kaliumglutamat
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mm	Millimeter
μ	mikro
n	nano
Nt.	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP _c	geschlossener Promotorkomplex

rpm	Rounds per minute
RP _o	offener Promotorkomplex
rProteine	ribosomale Proteine
<i>rrn</i>	ribosomale Transkriptionseinheit
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
s	Sekunde
SDS	Natriumduodecylsulfat
sec	Sekunde
ssNS	einzelsträngige Nukleinsäure
s.u.	Siehe unten
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N',- Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UAS	upstream activation sequence
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volume per Volume
W	Watt
w/v	Weight per Volume
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Name: Lars Jöres

Geburtsdatum: 10.03.1971

Geburtsort: Oberhausen, Rheinland

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Wohnort: Kopernikusstr. 63
40225 Düsseldorf

Schulbildung:

1977-1981 Besuch der Sankt Katharina Grundschule,
Oberhausen

1981-1990 Besuch des Heinrich Heine Gymnasiums in
Oberhausen; Abschluß Abitur

Wehrdienst:

1990-1992 Wehrdienst in Delmenhorst

Hochschulbildung:

1992-1998 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-
Universität, Düsseldorf

Seit 09/1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Wagner am
Institut für Physikalische Biologie der
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 19. Dezember 2001