

**Untersuchungen extraribosomaler RNA-  
Regionen bei der Biogenese der kleinen  
ribosomalen Untereinheit in *Escherichia coli***

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

vorgelegt von  
Jan Schäferkordt  
aus Essen

Düsseldorf 2001

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

Vorsitz: Prof. Dr. Lippold

I. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Wagner

II. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Heinlein

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2001

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von September 1998 bis Juli 2001 am Institut für Physikalische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner durchgeführt. Ihm gilt auch mein besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit und seiner steten Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. U. Heinlein danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Oliver Zirwes, Herrn Dipl. Biol. Lars Jöres und Herrn Dipl. Biol. Marc Meißner möchte ich für die Unterstützung in einigen Computerfragen danken.

Frau Reinhild Wurm danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Experimenten, in denen man besser vier als zwei Hände gehabt hätte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen übrigen Kollegen der Arbeitsgruppe für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Ich danke auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Riesner für die gute Zusammenarbeit.

Julia Witzel danke ich für die aufgebrachte Geduld und ihr Verständnis während meines Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich stets motiviert und unterstützt haben.

Der Gründerstiftung zur Förderung von Forschung und wissenschaftlichem Nachwuchs an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Zuerkennung eines Stipendiums, das meine Dissertation und den Besuch von nationalen und internationalen Kongressen finanziell ermöglicht hat.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. RNA - vielfältig und essentiell -.....	1
1.2. RNA-Struktur: Stabilitätsbestimmende Faktoren und Analyse der Sekundärstruktur.....	4
1.3. Das ribosomale <i>rrnB</i> -Operon von <i>Escherichia coli</i> und der Leader.....	7
1.4. Das Ribosom - ribosomale Proteine und ihre Assemblierung -.....	9
1.5. Konzeption der Arbeit.....	10
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>12</b>
2.1. Auswirkungen von Punktmutationen im Leader des <i>rrnB</i> -Operons.....	12
2.1.1. Auswirkungen von Basenaustauschen innerhalb der Box C.....	12
2.1.2. Auswirkungen von Basenaustauschen innerhalb der t <sub>L</sub> -Region.....	14
2.2. Strukturanalysen.....	14
2.2.1. <i>In vitro</i> Strukturanalysen durch limitierte enzymatische Hydrolyse und chemische Modifikationen.....	14
2.2.1.1. Strukturanalyse des Leaders.....	15
2.2.1.2. Strukturanalyse des 5'-Bereiches der 16S rRNA.....	18
2.2.1.3. Strukturanalyse des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA... ..	18
2.2.1.4. Vergleichende Strukturanalyse eines verkürzten und eines Vollängentranskriptes.....	19
2.2.2. <i>In vivo</i> Strukturanalysen mit DMS.....	21
2.2.2.1. Strukturanalyse des Leaders.....	21
2.2.2.2. Strukturanalyse des 5'-Bereiches der 16S rRNA.....	23
2.2.2.3. Strukturanalyse des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA..	24
2.3. Funktionsanalyse mutierter Ribosomen mittels Polysomenanalyse.....	25
2.4. rRNA-Stabilität.....	28
2.4.1. Maxizell-Analyse zur Bestimmung der 16S rRNA-Stabilität.....	29
2.4.2. Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der Leader-Halbwertszeit.....	31
2.4.2.1. Halbwertszeiten der Box C-Mutanten im transformierten Wildtyp-Stamm.....	32
2.4.2.2. RNase III <sup>-</sup> -Stamm.....	34
2.5. Produktanalyse über Northern-Blot.....	34
2.5.1. Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus HB101.....	35
2.5.2. Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus RNase III <sup>-</sup> -Stämmen.....	38
2.6. Bestimmung des 3'-Endes des zusätzlich in der Mutante auftauchenden Fragments (Produkt II).....	39
2.7. Verlängerung eines ternären Komplexes mit verschiedenen Proteinextrakten.....	40
2.8. Proteinanalyse von Wildtyp- und mutierten 30S-Untereinheiten.....	43

<b>3. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
3.1. Der Leader - ein kleines Molekül mit vielen Funktionen -.....	48
3.2. Die Box C-Mutationen verursachen keinen letalen Phänotyp. Ribosomen mit mutierter 16S rRNA sind überdies biologisch aktiv.....	50
3.3. Basenaustausche in der Box C führen zu weitreichenden Strukturveränderungen im Leader und der 16S rRNA.....	51
3.3.1. Einfluß der Box C auf den Leader und 5´-Region der 16S rRNA.....	51
3.3.2. Mutationsbedingte Strukturveränderungen im zentralen Pseudoknoten.....	55
3.3.3. Transiente Wechselwirkung des Leaders mit der 5´-Region der 16S rRNA.....	55
3.4. Die <i>in vivo</i> DMS Modifikationen zeigen Strukturveränderungen in der rRNA und geben Aufschluß über den Einfluß der RNase III bei der Prozessierung.....	57
3.5. Mutationen in der Box C wirken sich unterschiedlich auf die Stabilität des Leaders und die 16S rRNA aus.....	60
3.6. Die RNase III spielt bei der Prozessierung und der Maturierung der rRNA eine Schlüsselrolle.....	62
3.7. Die Proteinbesetzung der 30S Untereinheit ist vom Leader abhängig....	63
3.8. Modell zu den Leader-abhängigen Funktionen.....	66
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>5. Material.....</b>	<b>70</b>
5.1. Allgemeines.....	70
5.2. <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	70
5.3. Plasmide.....	71
5.4. Enzyme.....	74
5.5. Nukleinsäuren und Nukleotide.....	75
5.5.1. Oligonukleotide.....	75
5.5.2. Molekulargewichtsmarker.....	75
5.5.3 Nukleotide.....	76
5.6. Standardpuffer.....	76
5.7. Medien.....	77
5.8. Feinchemikalien.....	77
5.9. Verschiedenes.....	78
<b>6. Methoden.....</b>	<b>80</b>
6.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	80
6.1.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten.....	80
6.1.2. Kultivierung von Bakterienstämmen.....	80
6.1.2.1. Anzucht auf Agarplatten.....	80
6.1.2.2. Anzucht einer Vorkultur.....	80
6.1.2.3. Anzucht von Wachstumskulturen.....	80
6.1.2.4. Anlegen von Glycerinkulturen.....	81

6.1.3. Herstellung kompetenter Zellen.....	81
6.1.4. Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	81
6.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	82
6.2.1. UV/VIS-Spektroskopie.....	82
6.2.1.1. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	82
6.2.1.2. Streumessung.....	82
6.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Microassay).....	82
6.2.2. Radioaktivitätsmessung.....	83
6.2.3. Densitometrie.....	83
6.2.4. Isolation von Nukleinsäure.....	83
6.2.4.1. Isolation analytischer Mengen Plasmid-DNA.....	83
6.2.4.2. High Pure Plasmid Isolation-Kit (Roche) .....	84
6.2.4.3. Isolation von präparativen Mengen Plasmid-DNA.....	85
6.2.4.4. Isolation von superspiralierter Plasmid-DNA.....	86
6.2.4.5. Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl.....	86
6.2.4.6. Isolation von Gesamt-RNA.....	87
6.2.5. Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren.....	87
6.2.5.1. Extraktion mit Phenol und Chloroform.....	87
6.2.5.2. Fällung von Nukleinsäuren.....	88
6.2.5.3. Dialyse von DNA und RNA.....	88
6.2.6. Gelelektrophorese.....	88
6.2.6.1. Agarosegelelektrophorese.....	88
6.2.6.2. Denaturierendes Agarosegel.....	89
6.2.6.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	90
6.2.6.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	90
6.2.6.5. Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese ribosomaler Proteine.....	91
6.2.6.6. Kombinierte Agarose-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Mischgel).....	93
6.2.6.7. Denaturierendes Polyacrylamidgel (Midi-Gel).....	94
6.2.7. Nachweismethoden von Nukleinsäuren und Proteinen.....	94
6.2.7.1. Silberfärbung.....	94
6.2.7.2. Toluidinblau-Färbung.....	95
6.2.7.3. Autoradiographie.....	95
6.2.7.4. UV-Shadowing.....	95
6.2.7.5. Coomassie Färbung.....	96
6.2.8. Elution von Nukleinsäuren aus einer Gelmatrix.....	96
6.2.8.1. DNA-Elution aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraktionskit.....	96
6.2.8.2. DNA-Elution aus Agarosegelen mittels Glaswolle.....	96
6.2.8.3. RNA-Elution aus denaturierenden Polyacrylamidgelen.....	97

---

6.2.9. Enzymatische Reaktionen.....	97
6.2.9.1. Restriktionshydrolyse von DNA.....	97
6.2.9.2. Hydrolyse von Transkriptionsansätzen mit DNase I.....	98
6.2.9.3. Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden.....	98
6.2.9.4. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase.....	99
6.2.9.5. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	99
6.2.10. Plasmid-Sequenzierung mit USB Sequenase 2.0 Kit.....	100
6.3. Spezielle Methoden.....	102
6.3.1. Primer-Extension Analyse.....	102
6.3.1.1. Primer-Extension von RNA mit Reverser Transkriptase.....	102
6.3.1.2. Primer-Extension von RNA mit stringentem Abbruch (Spec-Kontrolle).....	103
6.3.1.3. Primer-Extension Sequenzierung von RNA.....	103
6.3.1.4. Primer-Extension zur Analyse von DNA mit Klenow-Polymerase.....	104
6.3.2. <i>In vitro</i> Transkription mit T7 RNA-Polymerase (RiboMAX, Promega).....	104
6.3.3. Maxizellversuch.....	105
6.3.4. Polysomenisolation.....	106
6.3.5. Isolation von Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten.....	108
6.3.6. Rifampicin-Kinetik.....	109
6.3.7. Northern-Analyse.....	109
6.3.8. S1 Nuklease-Protektion zur Bestimmung des 3'-Endes.....	110
6.3.9. Limitierte enzymatische Hydrolyse ribosomaler RNA.....	111
6.3.9.1. <i>In vitro</i> Modifikation mit Nuklease S1.....	111
6.3.9.2. <i>In vitro</i> Modifikation mit Nuklease T1.....	112
6.3.9.3. <i>In vitro</i> Modifikation mit Nuklease Cobra Venom Enzym (CVE)..	112
6.3.10. Chemische Modifikation ribosomaler RNA.....	112
6.3.10.1. <i>In vitro</i> Modifikation mit Kethoxal (KE) .....	113
6.3.10.2. <i>In vitro</i> Modifikation mit DMS.....	113
6.3.10.3. <i>In vitro</i> Modifikation mit Diethylpyrocarbonat (DEPC).....	113
6.3.11. <i>In vivo</i> Modifikationen ribosomaler Untereinheiten mit DMS.....	114
6.3.12. Präparation von FII-Zellextrakten für die <i>in vitro</i> Transkription.....	114
6.3.13. Herstellung und Reinigung eines ternären P2-Komplexes.....	115
6.3.14. Elongation des ternären Komplexes.....	116
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>132</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. RNA - vielfältig und essentiell -

Die Bedeutung von RNA in biologischen Systemen ist in den letzten Jahren durch eine Vielzahl neu entdeckter Funktionen stark gewachsen. Neben der klassischen Rolle als transfer-, messenger- und ribosomale RNA konnten dem RNA-Molekül auch Funktionen zugeordnet werden, die zuvor nur von Proteinen bekannt waren. Damit geriet auch das zentrale Dogma der Biologie von DNA über RNA zum Protein in die Diskussion. Wie sollte dieses Modell die Existenz von RNA-Viren (Sänger, 1972) oder aber die Existenz von Ribozymen (Cech et al., 1986), also katalytisch aktiver RNA, erklären?

Dazu postulierte Walter Gilbert, 1986, die Theorie einer RNA-Welt. Danach soll in einer frühen Phase der Evolution die RNA zunächst selber ihre eigene Replikation sowie wenige enzymatische Aktivitäten besessen haben. Im weiteren Verlauf der Evolution entstand dann die DNA, die eine bessere und stabilere Form der Speicherung der genetischen Information darstellte. Mit der Synthese von Proteinen erwarb der Organismus später ein deutlich besseres Werkzeug enzymatische Prozesse zu katalysieren, da die Seitenketten der 20 Aminosäuren eine größere Variabilität besaßen als die vier Basen der Nukleotide. Dennoch findet man auch heute noch RNA-Funktionen, die möglicherweise aus dieser frühen evolutionären Phase des Lebens erhalten geblieben sind oder aber durch Proteine nie ersetzt werden konnten.

Die Vielzahl der heute bekannten und unterschiedlichen RNA's wie mRNA, tRNA, rRNA, snoRNA, snRNA und sRNA, ihre Funktionen als Ribozym, beim RNA-Editing oder als Antisense-RNA, sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

In einigen Organismen dient RNA als Träger der genetischen Erbinformation. So enthalten Retroviren, wie zum Beispiel das bekannte Humane Immundefizienz-Virus (HIV), als Genträger zwei identische RNA-Moleküle (Gallo et al., 1987). Aber auch im Kartoffel-Mosaik-Virus, einem Vertreter der Viroide, dient RNA der Speicherung der genetischen Information (Sänger, 1972).

Am bekanntesten sind sicherlich die bei der Proteinbiosynthese vorkommenden RNA-Moleküle. Dazu gehört zunächst einmal die für die Proteinbiosynthese erforderliche messenger-RNA (mRNA). Sie stellt eine exakte, einzelsträngige Kopie des DNA-Bereiches dar, der das entsprechende Protein codieren soll.

Diejenige RNA, die das Verbindungsstück zwischen RNA und Proteinen bildet, ist die sogenannte transfer-RNA (tRNA). Sie bindet über ihre Anticodonsequenz an die Codonsequenz der mRNA und hat an ihrem 3'-Ende eine für sie spezifische Aminosäure gebunden. Bei der nachfolgenden Peptidverknüpfung wird dann diese Aminosäure an das naszierende Peptid gebunden. Die Reaktion ist auch mit einer Translokation der tRNA und Strukturveränderungen des Ribosoms (Polacek et al., 2000, Gabashvilli et al., 1999) verbunden.

Die Peptidyltransferase-Aktivität bei der Proteinbiosynthese konnte der 23S ribosomalen RNA (rRNA) zugeordnet werden, nachdem man durch Proteinextraktion die ribosomalen Proteinkomponenten entfernt hatte (Noller et al., 1992). Neben der 23S

rRNA, findet man in Prokaryonten noch die 16S und 5S rRNA. Alle drei rRNAs gehören zu den stabilen RNAs und stellen die Hauptkomponente des Ribosoms dar. Zu den ebenfalls stabilen RNA-Molekülen gehört die in der Zelle abundant vorkommende Gruppe der small RNA (sRNA). Diese Moleküle werden durch ihre Größe charakterisiert und haben überwiegend regulatorische Funktionen. Man findet sie bei der RNA-Prozessierung, der Translation und Sekretion, sowie bei Prozessen, die Einfluß auf mRNA- und Proteinstabilität besitzen. In *Escherichia coli* konnten bereits 27 sRNAs nachgewiesen werden (Wassarmann et al., 1999; Wassarmann, 2001). Zu den bekanntesten sRNAs gehört unter anderem die tmRNA, RNase P, DsrA, RprA, 6S RNA.

Die tmRNA (= 10Sa RNA, = ssrA) ist eine relativ große sRNA von 363 nt Länge, die eine duale Funktion aus tRNA und mRNA besitzt. Sie besitzt eine Aminosäure bindende und übertragende Domäne (Ushida et al., 1994, Komine et al. 1994) und codiert gleichzeitig eine kleine „tag“-Peptidsequenz (Muto et al., 1998). Die tmRNA wurde erstmals von Subbarao et al., 1989, nach Auftrennung einer 10S RNA-Fraktion (Ray et al., 1979) beschrieben. Ihre Funktion besteht in einem translatierenden Mechanismus, bei dem ein C-terminaler „tag“ an ein unvollständiges Proteinprodukt gehängt wird. Der angehängte „tag“ hat den sofortigen Abbau des Proteins zur Folge. Die tmRNA kann an Peptide, die von einer „nonsense“-mRNA codiert werden und kein Stop-Codon mehr besitzen, ein Abbausignal hängen. Auf diese Weise kann das an eine solche mRNA gebundene Ribosom wieder freigesetzt und das funktionslose Protein dem Abbau zugeführt werden (Williams et al., 1998).

Bei der Trennung der 10S RNA-Fraktion (Ray et al., 1979) konnte neben der tmRNA auch eine 10Sb RNA, die sogenannte RNase P isoliert werden. Diese Nuklease stellt ein Schlüsselenzym bei der RNA-Prozessierung dar (Frank et al., 1998). Sie ist über viele Organismen konserviert und die Substraterkennung erfolgt nicht über Basenpaarung sondern über Erkennung von Strukturdomänen. Durch ihre enzymatische Eigenschaft kann die RNase P auch als Ribozym bezeichnet werden.

DsrA soll als Beispiel für eine regulatorische sRNA beschrieben werden. Sie ist nur 87 nt groß und wirkt als „Antisilencer“ von H-NS regulierten Genen durch die Reduktion der H-NS Expression. Dies geschieht durch einfache Bindung an die hns-mRNA (Lease et al., 1998). DsrA wird ebenso eine Funktion bei der Regulation des Sigma-Faktors der stationären Phase RpoS zugesprochen. Dabei bindet DsrA in dem stromaufwärts gelegenen Bereich an die rpoS-mRNA und verändert so die Sekundärstruktur. Dadurch wird eine Erhöhung der Translationsinitiation erreicht, die zusätzlich noch durch eine weitere sRNA, nämlich RprA, unterstützt wird (Majdalani et al., 2001). Es gibt wie oben schon beschrieben eine große Zahl weiterer sRNAs, deren Funktion in der Zelle aber noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

Ebenfalls regulatorischer Natur ist die Funktion der sogenannten Antisense RNA bei der Plasmidreplikation. Ein Beispiel stellt das Col E1-Replikon dar. Während der Plasmidreplikation beginnt stromaufwärts des Ursprungspunktes der DNA-Replikation („ori“) die Synthese einer Primer-RNA, die noch durch die RNase H korrekt prozessiert werden muß, bevor sie als Primer dienen kann. Die Initiationsregion codiert zusätzlich noch für eine zweite RNA, die zur ersten RNA komplementär ist.

Diese sogenannte Antisense-RNA bildet eine tRNA-ähnliche Struktur aus und kann an den komplementären Bereich des ersten Transkriptes binden. Dadurch wird die korrekte Prozessierung der ersten RNA durch die RNase H verhindert. Somit dient die zweite RNA als Repressor der Plasmidreplikation (Itoh et al. 1980; Lacatena et al. 1981).

Eine weitere Funktion von RNA ist die posttranskriptionelle Veränderung der mRNA über den Mechanismus der RNA-Editierung über kleine, sogenannte guide-RNAs (gRNA). Dabei wird eine prä-mRNA durch gezielte Ergänzung oder Verkürzung von einzelnen Nukleotiden so verändert, daß erst durch diese Reaktion die offenen Leseraster der fertigen mRNA entstehen können. Man findet diesen Mechanismus in vielen Organismen (Cattaneo, 1991). Die wohl bekanntesten Untersuchungen stammen aus Mitochondrien von Trypanosomen (Blum et al., 1990).

Neben der Editierung findet man auch den Mechanismus des Spleißens, bei der die zu spleißende RNA entweder selbst das Herausschneiden bestimmter Sequenzbereiche über eine Transester-Reaktion katalysiert oder das Herausschneiden über ein Spleißosom erfolgt. Im Spleißosom liegt die katalytische Aktivität in den Uracilreichen kleinen nuclearen RNAs (snRNA), die im Komplex mit Proteinen vorliegen. Daher unterscheidet man auch zwei Formen des Spleißens, nämlich die Gruppe I-Introns, die das Herausschneiden von Introns des Primärtranskriptes katalysieren (Selbst-Spleißen) und die Gruppe II-Introns, die kein Guanosin als Co-Faktor benötigen (Gibson et al., 1997). Erstmals wurde diese katalytische Eigenschaft von RNA im Ciliaten *Tetrahymena*, später auch in Pflanzen-Viroiden gefunden (Altman et al., 1986; Cech et al., 1986).

Eine immer größer werdende Gruppe von kleinen metabolisch stabilen RNA-Spezies sind im Nukleolus von Eukaryonten lokalisiert. Sie werden entsprechend ihrer Größe und Vorkommen als small nucleolar RNAs (snoRNAs) bezeichnet und liegen in der Zelle mit nukleolaren Proteinen wie Fibrillarin, GAR1, NSR1, SSB1 und NOP3 assoziiert vor (Fournier et al., 1993; Tollervey et al., 1993). snoRNAs stammen sowohl aus prozessierten Introns von Protein codierenden sowie nicht codierenden Sequenzen und können in zwei Gruppen unterteilt werden, die auf ihren konservierten Sequenzen und Strukturmotiven beruhen. Zu der ersten Gruppe gehören die Box C/ D snoRNAs mit den konservierten Sequenzelementen der Box C (UGAUGA) und der Box D (CUGA) und ihrer 5', 3' terminalen Stammstruktur (Maxwell et al., 1995). Die Box C ist jedoch nicht mit der in dieser Arbeit untersuchten Box C des *Escherichia coli* Leaders zu verwechseln. Zur zweiten Gruppe gehören die H/ACA snoRNAs. Diese besitzen ein ACA-Motiv, das 3 Nukleotide vom 3'-Ende entfernt liegt und eine Box H (ANANNA), die als Zwischensequenz zwei ebenfalls konservierte Hairpinstrukturen voneinander trennt (Balakin et al., 1996).

Die Funktionen der snoRNAs betreffen die Prozessierung von rRNA, Faltung und Transport von Vorläufer rRNA, Maturierungseffekte und Assemblierung ribosomaler Untereinheiten bis hin zur Methylierung von rRNA bzw. von nicht rRNA (Sharma et al., 1999; Eliceiri, 1999; Lange et al., 2000; Jády et al., 2000).

Ein besonderes Augenmerk soll hier auf die U3 snoRNA gelegt werden. Die U3 snoRNA spielt eine bedeutende Rolle in der Reifung eukaryontischer Vorläufer-rRNA

(Hughes et al., 1991; Kass et al., 1990). Wie auch bei Prokaryonten werden bei Eukaryonten zunächst lange rRNA Vorläufermoleküle mit zusätzlichen Sequenzelementen synthetisiert. Durch eine Reihe komplexer Prozessierungsschritte, in die auch andere snoRNAs wie z. B. U14, U17 involviert sind, entsteht dann die 28S, 18S und 5,8S rRNA (Enright et al., 1996). U3 snoRNA ist aber auch bei der Ausbildung des zentralen Pseudoknotens der 18S rRNA bei Eukaryonten involviert (Hughes, 1996). Mit ihren unterschiedlichen Funktionen hat die U3 snoRNA somit große Ähnlichkeit zu der in *cis* wirkenden Leader RNA (1.3) von *Escherichia coli* (Dennis et al., 1997).

Die Vielzahl der hier aufgeführten und in ihren Funktionen unterschiedlichen RNAs liegen in der Zelle nicht als einzelne Moleküle vor, sondern sind stets mit Proteinen assoziiert. Diese stabilisieren, schützen und unterstützen die enzymatischen, katalytischen Eigenschaften der entsprechenden RNA. Die Vielzahl der hier beschriebenen Funktionen der RNA beruht auf der großen strukturellen Vielfalt, die das einzelsträngige RNA-Molekül einnehmen kann. Eine bestimmte Funktion kann nur über eine bestimmte Struktur vermittelt werden. Daher sollen im Folgenden die wichtigsten RNA Sekundär- und Tertiärstrukturelemente vorgestellt werden, ebenso wie die Faktoren, die diese Struktur ermöglichen.

## 1.2. RNA-Struktur: Stabilitätsbestimmende Faktoren und Analyse der Sekundärstruktur

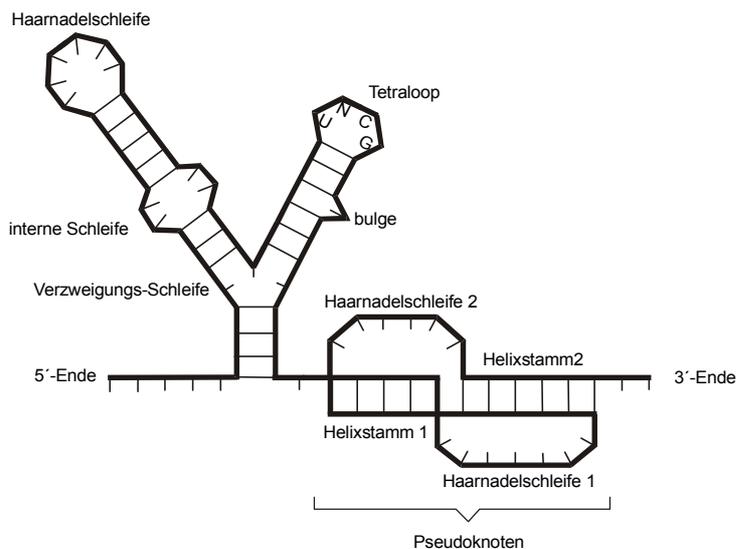
Im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA ist die RNA weitgehend einzelsträngig und besitzt an Stelle eines Thymins ein Uracil. Da innerhalb einer RNA-Sequenz immer wieder komplementäre Bereiche auftreten, können diese über Watson-Crick bzw. nicht-Watson-Crick Basenpaarungen stabile Helices ausbilden, die die Sekundärstruktur einer RNA ausmachen (Leontis et al., 2001; Westhof et al., 2000). Überdies können auch entfernt liegende Bereiche eine Wechselwirkung miteinander eingehen und Strukturen höherer Ordnung sogenannte Tertiärstrukturen ausbilden. Es kann auch zu einer Ausbildung eines Dreierstranges kommen, der in *Tetrahymena* Gruppe I Introns über NMR-Studien nachgewiesen werden konnte (Conn et al., 1998). Beispiele für bekannte Sekundär- und Tertiärstrukturen sind in der folgenden Abbildung 1.1 dargestellt.

Neben der einfachen Sekundärstrukturausbildung einer Haarnadelschleife findet man auch eine sehr viel stabilere terminale Haarnadelschleife in Form eines Tetraloops, die durch vier Nukleotide mit definierter Konsensussequenz charakterisiert ist. Durch Sequenzvergleiche konnte man drei Gruppen von Tetraloops mit den Konsensussequenzen UNCG, GNRA und CUYG (N = beliebig; R = A, G; Y = C, U) beschreiben. Der Tetraloop zeichnet sich durch seine hohe Stabilität aus, die auf seine Architektur zurückzuführen ist und sich innerhalb der drei Gruppen etwas unterscheidet (Moore, 1999).

Die bekannteste Form einer Tertiärstruktur ist der Pseudoknoten, bei dem durch die Wechselwirkung der Nukleotide einer Haarnadelschleife mit einem anderen einzel-

strängigen Bereich ein weiterer Stamm und eine zweite Haarnadelschleife ausgebildet wird (Abbildung 1.1).

Ein sehr wichtiger und über alle Organismen hoch konservierter Pseudoknoten ist der zentrale Pseudoknoten der 16S bzw. 18S rRNA. In der 16S rRNA wird er durch Watson-Crick-Basenpaarung der Helix 1 G9-U13/ G21-C25 und der Helix 2 U17-A19/ U916-A918 relativ zum 5'-Ende der 16S RNA ausgebildet. Dieser zentrale Pseudoknoten arrangiert die drei Domänen der rRNA im dreidimensionalen Raum (Abbildung 3.3) und ist essentiell für die Funktion des Ribosoms (Brink et al., 1993; Poot et al., 1998).

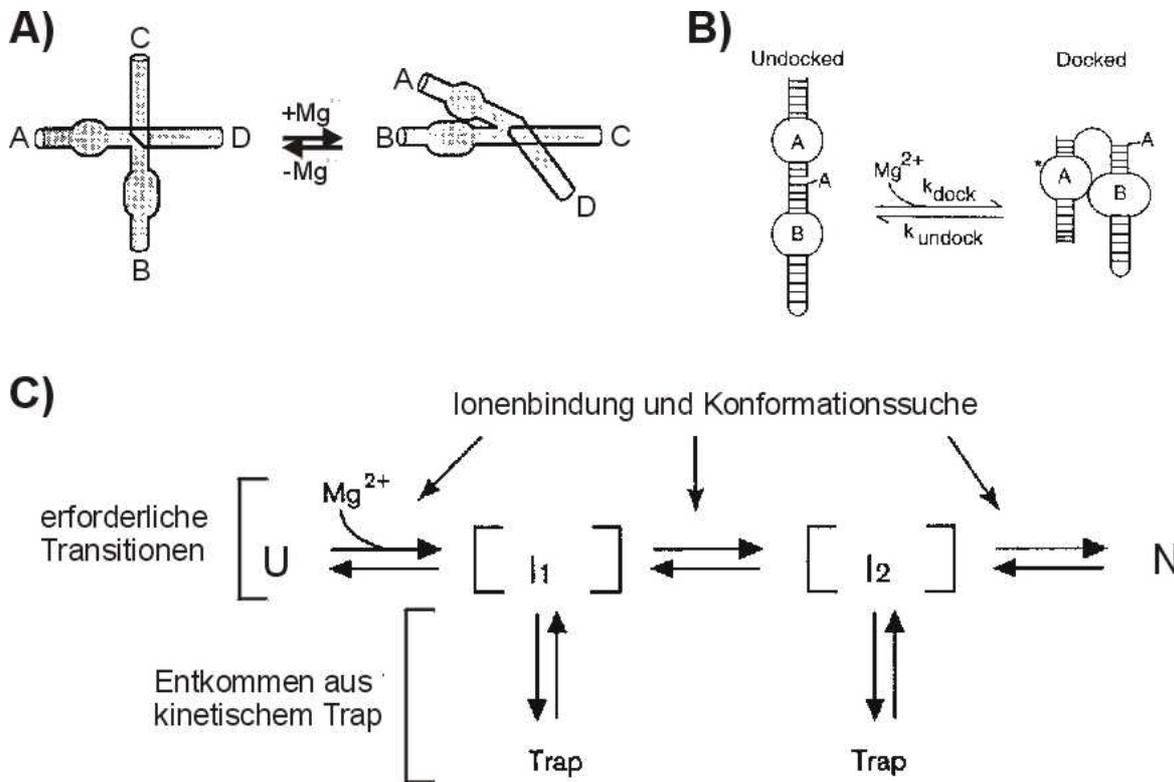


**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung möglicher Sekundär- und Tertiärstrukturen eines RNA-Moleküls. Der Pseudoknoten stellt eine Tertiärstruktur dar. Der Tetraloop besitzt exemplarisch das Sequenzmotiv UNCG (N = beliebige Base).

Die Struktur der RNA wird jedoch auch von anderen Faktoren bestimmt, wie die Länge des RNA-Moleküls, die unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente und der Anwesenheit von Kationen. So ist die Energie, die aufgebracht werden muß, um eine Sekundärstruktur zu öffnen größer, als die einer Tertiärstruktur.

Die Strukturausbildung einer RNA verläuft stets hierarchisch. Dabei stellt die einfache Nukleotidsequenz die Primärstruktur dar, die hochgradig flexibel ist und viele Konformationen besitzt. Dieser Zustand besitzt die größte Entropie. Die Entropie der RNA wird durch Ausbildung erster Sekundärstrukturelemente einzelner komplementärer Sequenzabschnitte erniedrigt, wodurch auch die Flexibilität des RNA-Moleküls weiter eingeschränkt wird. Im letzten Schritt kann sich durch Wechselwirkungen von zwei oder mehr Sekundärstrukturelementen die Tertiärstruktur ausbilden, die mit Umfaltungsprozessen und einem weiteren Energiegewinn des Moleküls verbunden ist (Tinoco et al., 1999). Die Tertiärstrukturausbildung ist jedoch im hohen Maße von der Konzentration divalenter Kationen abhängig, die die negativen und sich abstoßenden Ladungen der Phosphatgruppen gegeneinander abschirmen und so zu einer höheren Stabilität der RNA führen. Der Effekt zweiwertiger Kationen ist daher höher zu bewerten, als der Einfluß der Sekundärstruktur. In Abbildung 1.2 A und B ist der Einfluß von Magnesium schematisch an der „four-way junction“ eines Ribozyms sowie einer minimalen Haarnadel Ribozymstruktur dargestellt. Abbildung 1.2 C zeigt

exemplarisch den vereinfachten Faltungsweg eines „großen“ Ribozyms. Das Schema kann jedoch auch auf andere RNA-Faltungswege übertragen werden (Treiber et al., 1999).



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung möglicher Tertiärstrukturfaltung. A) Darstellung eines Haarnadel Ribozyms an seiner „four-way junction“ (Lilley, 1999). B) Faltung einer minimalen Haarnadel Ribozymstruktur (Treiber et al., 1999). C) Model des Faltungsweges eines großen Ribozyms vom denaturierten Zustand U zum nativen Zustand N über zwei Zwischenstrukturen I1 und I2. Von I1 bzw. I2 kann die Faltung auch in einer kinetischen Falle („Trap“) enden. I1 und I2 sollen ebenfalls verdeutlichen, daß Umfaltungsmechanismen zwischen U und N stattfinden.

Für die Untersuchung und Aufklärung von RNA-Sekundärstrukturen bieten sich verschiedene experimentelle Möglichkeiten durch limitierte enzymatische Hydrolyse und chemische Modifikation an (Ehresmann et al., 1987; Göringer et al., 1984), die auch in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben. Weitere Analysen können über spektroskopische Methoden wie Cirkulardichroismus, Rotationsdispersion, Fluoreszenzspektroskopie, Infrarotspektroskopie, Elektronenspinresonanz und Kernspinresonanz erfolgen. Dabei wird zum Teil die Anregung, Emission oder Resonanz bestimmter Molekülgruppen und Atome ausgenutzt.

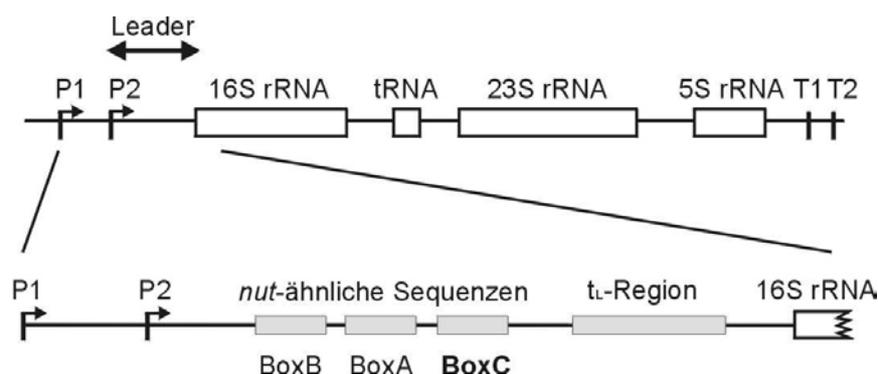
Mit einem weit größeren Aufwand läßt sich durch Röntgenstrukturanalysen die Tertiärstruktur von RNA-Molekülen und Proteinen bestimmen. Bei hoher Qualität des Kristalls kann eine Auflösung im Bereich von 2 Angström erreicht werden. Trotz der hohen Auflösung spektroskopischer Methoden sind auch diese in ihrer Anwendung durch die Molekülgröße des zu untersuchenden Objektes begrenzt. Überdies kann

mittels Röntgenstrukturanalyse nur schwer die Dynamik der RNA-Faltung untersucht werden und es ist auch keine allgemein zugängliche Methode. Daher wurden in dieser Arbeit die Analyse mittels limitierter enzymatischer Hydrolyse und chemischer Modifikation untersucht um die transienten Wechselwirkungen analysieren zu können (6.3.9 ff. und 6.3.10 ff.).

### 1.3. Das ribosomale *rrnB*-Operon von *Escherichia coli* und der Leader

*Escherichia coli* besitzt auf seinem Chromosom sieben ribosomale Operons (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*), die die ribosomale 16S-, 23S- und 5S RNA und einige tRNA(s) codieren (Ellwood und Nomura, 1982). Zusammen mit den ribosomalen Proteinen kann ein funktionsfähiges 70S Ribosom, bestehend aus einer kleinen 30S Untereinheit und einer großen 50S Untereinheit, ausgebildet werden (Held et al., 1974).

Die bakteriellen ribosomalen RNAs werden als langes Vorläufermolekül transkribiert, die von zusätzlichen extraribosomalen Sequenzen flankiert werden (Nomura et al., 1980; Wittmann, 1983). Diese Sequenzen werden als Leader-, Spacer- oder Trailer-Region bezeichnet und sind nach einer Reihe von Prozessierungsschritten (King et al., 1986; Li et al., 1999) im assemblierten 70S Partikel nicht mehr anwesend. Die Funktionen der einzelnen Sequenzbereiche während der Transkription, der Faltung der rRNA, der Prozessierung und Assemblierung sind noch weitestgehend unverstanden und sind Thema der hier vorliegenden Arbeit. Abbildung 1.3 zeigt schematisch das *rrnB*-Operon und den Bereich der Leader-Region mit seinen Sequenzelementen („*nut*“-Boxen und  $t_L$ -Region), dabei ist der Leader mit seinen Sequenzelementen hervorgehoben.



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung des *rrnB*-Operons. Der Bereich des konservierten Leaders ist mit seinen Sequenzelementen hervorgehoben. P1 und P2 kennzeichnet die Tandempromotoren, T1 und T2 die Terminatoren.

Der Leader ist ein kurzer, 173 Nukleotide umfassender Sequenzbereich stromaufwärts des 5'-Endes der 16S rRNA. Er zeichnet sich durch seine hohe Konservierung aus (Abbildung 3.1) und enthält die „*nut*“-ähnlichen Sequenzelemente mit den Boxen B, A und C, die homolog zu der „*nut*“-Region des Bakteriophagen  $\lambda$  sind, bei dem sie eine wichtige Funktion bei der Antitermination besitzen. Für die „*nut*“-ähnlichen Sequenzen in *Escherichia coli* wurde eine vergleichbare Funktion bei der Antitermination angenommen (Aksoy et al., 1984, Holben et al., 1985). Bisher konnte jedoch

kein homologer Faktor zum ebenfalls erforderlichen N-Protein identifiziert werden und auch die Anordnung der „nut“-Boxen unterscheidet sich. Weitere „nut“-Boxen befinden sich stromaufwärts des 5'-Endes der 23S rRNA.

Eine in Eukaryonten vorkommende U3 snoRNA (1.1) zeigte, wie auch die Box C in *Escherichia coli*, erstaunliche Übereinstimmungen bezüglich Sequenzhomologien zu stromabwärts vorhandenen Sequenzbereichen der 16S rRNA bzw. 18S rRNA (Dennis et al., 1997; Hughes, 1996). Dabei wird über eine Zwischenstruktur unter Beteiligung der U3 snoRNA die Ausbildung des zentralen Pseudoknotens ermöglicht.

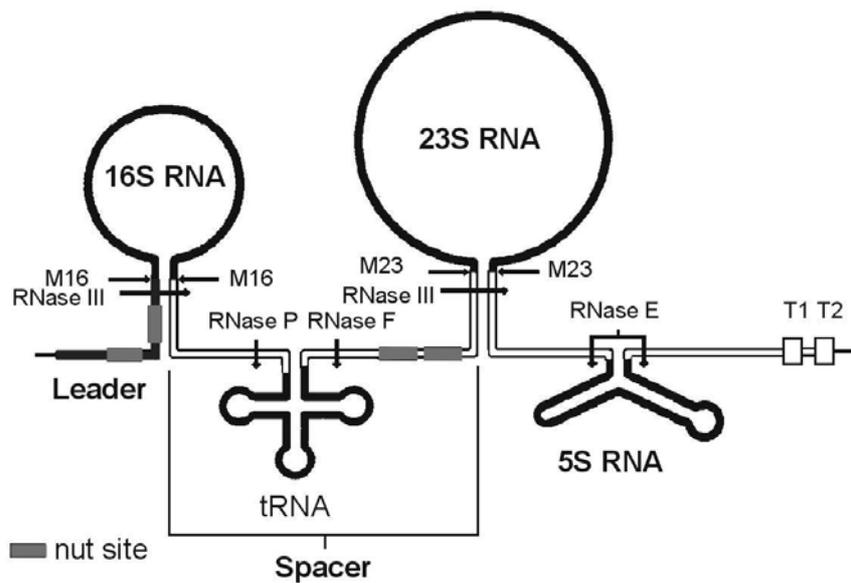
In Prokaryonten, die diese U3 snoRNA nicht besitzen, könnte diese chaperonähnliche Funktion der rRNA-Leader übernehmen. Die potentielle Existenz einer solchen Funktion konnte bereits durch verschiedene vorangegangene Analysen gezeigt werden (Pardon, 1994; Besancon, 1998; Zirwes, 2001).

Ein weiteres Sequenzelement des Leaders liegt 61 Nukleotide stromabwärts der Box C und wird als  $t_L$ -Region bezeichnet. Diese erhielt ihren Namen auf Grund von Sequenzhomologien zu dem Rho- und NusA-abhängigen Terminator „trpt“ (Kingston et al., 1981). Der  $t_L$ -Region werden unter anderem Funktionen bei der Antitermination, der RNA Polymerase-Pausierung und der Biogenese funktionstüchtiger Ribosomen zugesprochen. Alle vorangegangenen Studien wurden mit Leader-Mutanten durchgeführt, die Basenaustausche in dieser  $t_L$ -Region enthielten (Theißen et al., 1993; Pardon et al., 1995), nie aber mit Mutanten, die im Bereich der „nut“-Boxen mutiert waren. Die Box C-Mutanten bieten gegenüber den  $t_L$ -Mutanten die Möglichkeit auch Prozessierungseffekte untersuchen zu können.

Während der Transkription der ribosomalen RNA finden bereits die ersten Prozessierungs- und Faltungsschritte statt. In Abbildung 1.4 sind schematisch die beteiligten Prozessierungsenzyme dargestellt, die die ribosomale rRNA prozessieren.

Die RNase III hat in vielen Organismen eine Schlüsselfunktion und ist über Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere und einigen Viren hoch konserviert (Mian, 1997). In *Escherichia coli* ist die RNase III eines der ersten Prozessierungsenzyme, das den initialen Schnitt für die Prozessierung der 16S und der 23S rRNA setzt (Srivastava et al., 1990). Da sie auch eine große Zahl anderer unabhängiger Gene beeinflusst sowie auch die mRNA Stabilität, wird sie auch als globaler Regulator angesehen (Korai-mann, et al., 1993).

Für die Prozessierung ist eine doppelsträngige Struktur und eine zum Teil nukleotidspezifische RNA-Sequenz erforderlich. Der RNA-Doppelstrang wird bei der Prozessierung der 16S bzw. 23 S rRNA aus den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Bereichen des entsprechenden Strukturgens gebildet. Dabei liegt die Box C genau in dem Bereich, in dem die RNase III schneidet (Zhang et al., 1997; Young et al. 1978). Daher haben Veränderungen innerhalb der Box C möglicherweise auch Auswirkungen auf die korrekte Prozessierung durch die RNase III. Dennoch konnte durch Deletionsmutanten gezeigt werden, daß die RNase III nicht essentiell zur Ausbildung funktionstüchtiger Ribosomen ist (King et al., 1983).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung der Prozessierung ribosomaler RNA. Die „nut“-Boxen sind grau unterlegt und befinden sich stromaufwärts des 5'-Endes der 16S rRNA bzw. der 23S rRNA. Die Strukturgene 16S, tRNA, 23S rRNA und 5S rRNA sind schwarz dargestellt. T1 und T2 markieren die Position der Tandemterminatoren bzw. das Ende des Transkripts.

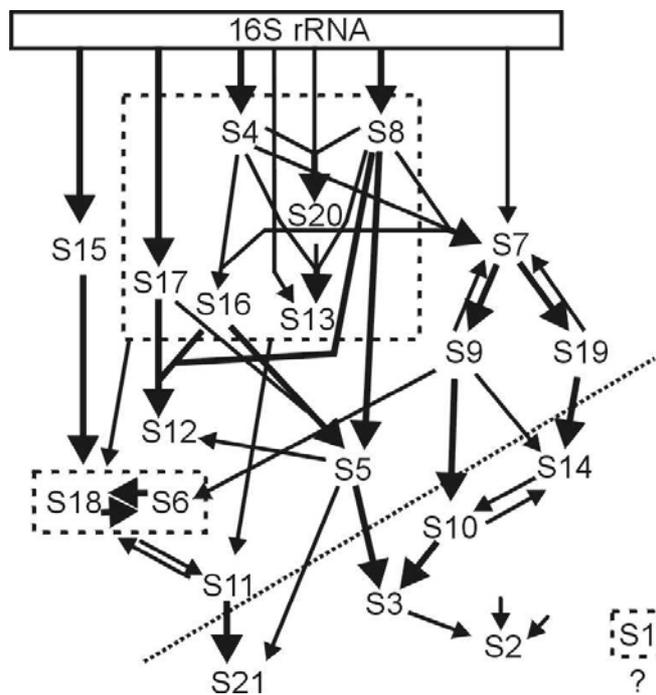
#### 1.4. Das Ribosom - ribosomale Proteine und ihre Assemblierung -

Das bakterielle Ribosom mit einem Durchmesser von etwa 250 Å beinhaltet drei ribosomale RNAs und 52 ribosomale Proteine. Dabei beträgt das Verhältnis von rRNA zu den Proteinen etwa zwei Drittel zu einem Drittel. Die Struktur der meisten Komponenten ist in unterschiedlichen Spezies hoch konserviert. Ebenso wie die sich daraus ergebene Funktion der Proteinbiosynthese.

Über zwei Jahrzehnte wurde das Ribosom über Röntgenkristallographie in seiner Struktur untersucht. Doch erst in den letzten Jahren konnte mit Hilfe von Kristallstrukturen einzelner Komponenten und computergestützten Programmen eine Auflösung von 2,4 Å für den 23S rRNA/ 5S rRNA-Komplex (Ban et al., 2000) und eine Auflösung von 3 Å für die kleine Untereinheit (Wimberly et al., 2000) erreicht werden. Für das Ribosom im Komplex mit einer tRNA konnte eine Auflösung von 5.5 Å (Yusupov et al., 2001) erreicht werden. Doch sind Fragen der Dynamik der Strukturbildung, Prozessierung, Maturierung und Assemblierung zum Teil noch weitestgehend unverstanden, da durch die Röntgenkristallographie lediglich ein statisches Bild des Ribosoms bzw. seiner Untereinheiten dargestellt werden kann.

Bereits 1974 gelang es Held et al. aus isolierter 16S rRNA und ribosomalen Proteinen *in vitro* 30S Untereinheiten zu assemblieren. Dabei konnten sie zeigen, daß es primär bindende Proteine gibt, die strukturabhängig an die 16S rRNA binden. Dazu gehören die Proteine S4, S7, S8, S13, S15, S17 und S20. Somit ist die Bindung für diese Proteine ausschließlich von der vorgegebenen 16S rRNA-Struktur abhängig.

Die Bindung der übrigen Proteine ist von bereits gebundenen Proteinen abhängig. Die Assemblierungskarte ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5:** Assemblierungskarte ribosomaler Proteine an die 16S rRNA nach Held et al., 1974. Die 16S rRNA ist als Balken dargestellt, die Proteine sind mit S1 bis S21 gekennzeichnet. Unterschiede in der Abhängigkeit der Proteine zur rRNA bzw. zueinander sind durch die Stärke der Pfeile angegeben. Proteine oberhalb der gestrichelten Linie sind zur Bildung eines RI-Partikels (Rekonstitutions-Intermediat) nötig. Bei einer Rekonstitutionstemperatur unterhalb von 40°C fehlen den RI-Partikeln die unter der gestrichelten Linie dargestellten ribosomalen Proteine. Gestrichelte Kästchen geben Gruppen von Proteinen an, die gemeinsam Einfluß auf andere Proteine besitzen. S1 konnte nicht in dieses Schema eingeordnet werden.

### 1.5. Konzeption der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen Analysen zur Funktion der extratranskribierten Leader rRNA des *rrnB*-Operons von *Escherichia coli* durchgeführt werden.

Bereits durch frühere Arbeiten an kältesensitiven  $t_L$ -Mutanten konnte der Einfluß des Leaders auf die nachfolgende 16S rRNA gezeigt werden. Allerdings bezogen sich die Studien nur auf den Einfluß der  $t_L$ -Region und nicht auf andere konservierte Leader-Bereiche. Daher werden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Box C-Mutanten untersucht, die Aufschluß über weitere, vielfältige Funktionen des Leaders geben sollen. Die Box C-Mutanten wurden in einer früheren Arbeit (Schäferkordt, 1998) bereits charakterisiert und entsprechende Vektoren für weitere Analysen konstruiert.

Dem Leader wird nach einem von Hughes, 1996, entwickelten Modell eine in *cis* stattfindende Interaktion des Box C-Bereichs mit der 16S RNA zugesprochen. Dabei soll sich eine Zwischenstruktur ausbilden, die die ersten 31 NT der 16S RNA einschließt und zur zentralen Pseudoknotenstruktur führt (Dennis et al., 1997). Daher ist anzunehmen, daß auch ein kurzes 257 nt langes Transkript, das aus Leader und einem Teil der 16S rRNA besteht, die Ausbildung dieser Zwischenstruktur ermöglicht.

In der hier vorliegenden Arbeit sollen die an dem 257 nt langen rRNA-Transkript begonnenen Strukturuntersuchungen um chemische Modifikationen der rRNA erweitert werden. Die chemische Modifikation ermöglicht durch die geringe räumliche Ausdehnung der Chemikalien eine erhöhte Auflösung der Struktur und somit einen Zugewinn an Informationen.

Zusätzlich sollen auch längere Transkripte (Leader plus komplette 16S rRNA) von Wildtyp und Mutante miteinander verglichen werden. Besonderes Interesse kommt dabei dem Bereich des zentralen Pseudoknotens zu.

Ein weiterer Aspekt der Strukturanalysen soll sich mit der transienten Wechselwirkung des Leaders mit dem 5'-Ende der 16S rRNA beschäftigen. Dabei sollen dynamische Strukturunterschiede, die auf Grund des wachsenden Transkriptes und wechselnden Kontakten des Leaders mit der 16S rRNA zustande kommen, analysiert werden.

Sollten sich strukturelle Unterschiede der rRNA von Wildtyp und Mutante detektieren lassen, so können überdies auch Funktionsstudien der entstehenden Ribosomen in Form von Polysomenanalysen durchgeführt werden.

Eine ebenfalls sehr wichtige Frage, die sich aus struktureller Veränderung von RNA ergibt, ist der Einfluß der Struktur auf die Stabilität der betroffenen RNA. Dazu soll der Einfluß der Box C-Mutationen auf die Stabilität des Leaders und der 16S rRNA untersucht werden.

Da die Box C im Bereich der RNase III Prozessierungsstelle liegt, muß auch der Effekt des Leaders auf die Prozessierung untersucht werden. Die Box C-Mutanten bieten dazu ein geeignetes Hilfsmittel. Wenn sich im Prozessierungsmuster oder in den Halbwertszeiten Veränderungen zeigen, soll eine detaillierte Analyse der vom Standard abweichenden Produkte angeschlossen werden.

Zudem soll auch geklärt werden, ob Abbauprodukte stabiler rRNA in den Mutanten detektiert werden können.

Zur Vervollständigung der gesammelten Daten muß ebenfalls auch der Einfluß des mutierten Leaders auf die ribosomalen Proteine und somit auf die Assemblierung des 30S Partikels untersucht werden. Dazu steht die Methode der 2D Gelelektrophorese zur Verfügung. Diese Analyse ist auch deshalb wichtig, da die beiden ribosomalen Proteine S10 (= NusE) und S1 (bindet spezifisch an Box A; Mogridge, et al., 1998) auch im Leader-Bereich binden können. Als Ergebnis der Analysen wird ein besseres Verständnis der Funktion des rRNA-Leaders bei der Bildung funktioneller ribosomaler Untereinheiten erwartet.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Auswirkungen von Punktmutationen im Leader des *rrnB*-Operons

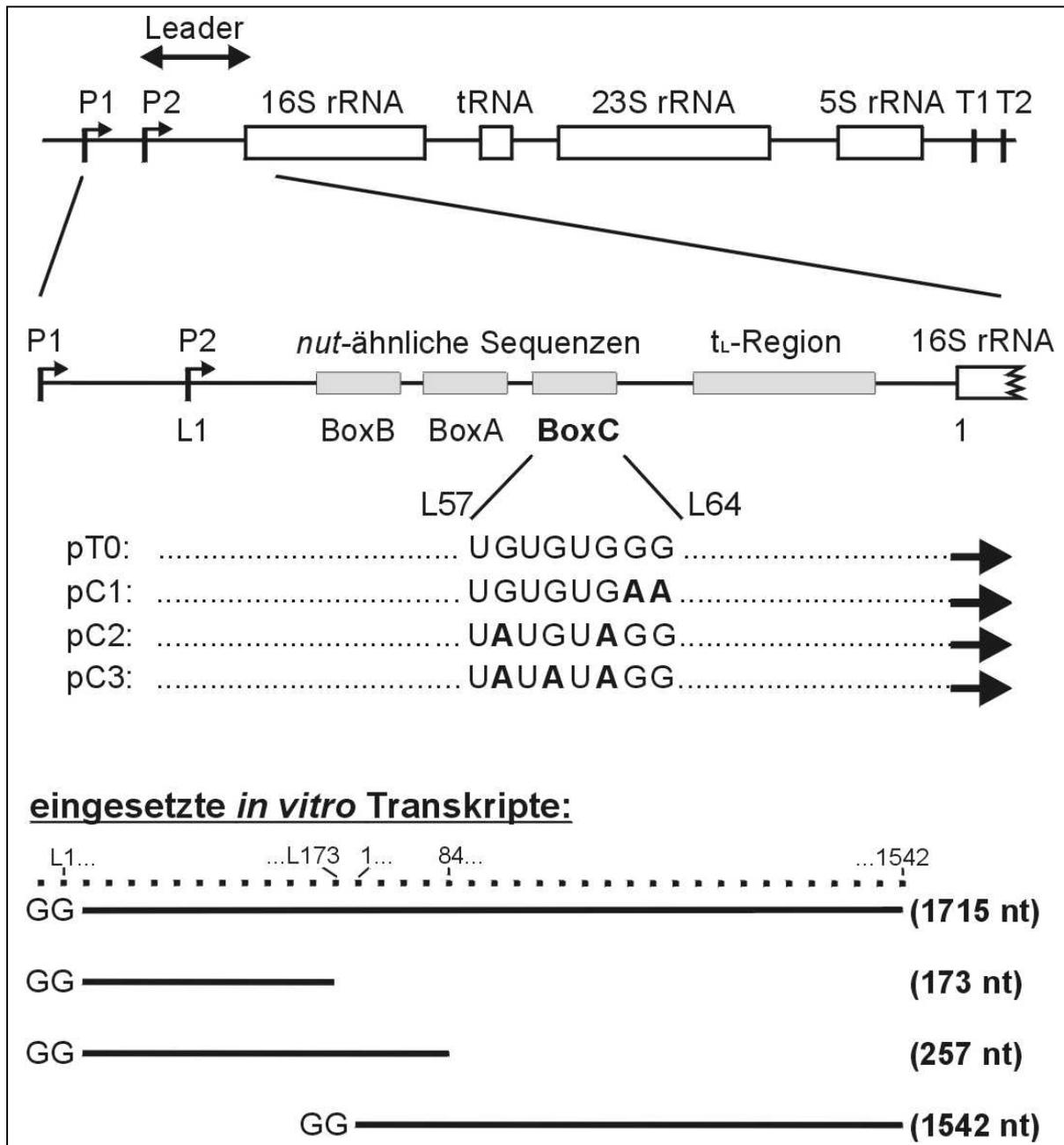
Der Sequenzbereich zwischen dem Promotor 2 und dem 5'-Ende der 16S rRNA ist ein über alle sieben ribosomalen Operons hoch konservierter Bereich und wird als Leader bezeichnet. Innerhalb dieser zusätzlich transkribierten Sequenz befinden sich Sequenzelemente wie die *nut*-Boxen und die  $t_L$ -Region (Abbildung 1.3). Zum Verständnis der Leaderfunktionen bieten diese Sequenzelemente ein ideales Ziel für Manipulationen durch Basenaustausche. In dieser Arbeit wurde eine systematische Charakterisierung von Box C-Mutanten durchgeführt. Die bereits bekannten Befunde aus vorangegangenen Studien der Box C- und  $t_L$ -Mutanten werden nachfolgend kurz zusammengefaßt.

#### 2.1.1. Auswirkungen von Basenaustauschen innerhalb der Box C

Vorangegangene Studien der Box C-Mutanten (Schäferkordt, 1998) haben gezeigt, daß verschiedene *Escherichia coli* Stämme, die mit den Plasmiden pC1, pC2 bzw. pC3 (5.3) transformiert worden waren, einen graduellen, kältesensitiven Phänotyp aufweisen (bei 30°C:  $\mu_{wt} = 0.8$ ,  $\mu_{pC1} = 0.6$ ,  $\mu_{pC2} = 0.5$ ,  $\mu_{pC3} = 0.4$ ). Diese Tendenz zeigte sich auch in Analysen über Temperatur-Gradienten-Gelelektrophoresen (TGGE) (Rosenbaum et al., 1987), in denen das thermodynamische Verhalten von leaderhaltigen Transkripten, die zusätzlich noch die ersten 84 Nukleotide der 16S rRNA enthielten, untersucht wurden. Die TGGE ist ein natives Gelsystem, bei der senkrecht zum angelegten elektrischen Feld ein linearer Temperaturgradient angelegt wird. Die Breite der Auftragstasche umfaßt dabei den vollständigen Bereich des linearen Temperaturgradienten. So erfährt jedes RNA-Molekül während der Elektrophorese eine unterschiedliche Temperatur und nimmt eine der Temperatur entsprechende Sekundärstruktur ein, die eine Retardierung im Gel verursachen kann. Über einen großen Temperaturbereich (40°C) konnte so das Aufschmelzen unterschiedlicher RNA-Sekundärstrukturelemente beobachtet werden. Dabei zeigten die Mutanten eine deutlich geringere Kooperativität im Aufschmelzverhalten der Struktur als das entsprechende Wildtyp-Transkript. Diese Befunde legten den Schluß nahe, daß strukturelle Unterschiede vorliegen müssen. Erste Strukturanalysen mittels limitierter enzymatischer Hydrolyse konnten dies bestätigen.

Die Box C-Sequenz umfaßt einen Bereich von 8 Nukleotiden. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die *rrnB*-Transkriptionseinheit, den Bereich des Leaders mit den Positionen der Mutationen und die nachfolgend verwendete Nomenklatur der Nukleotidpositionen. Eine Zusammenstellung der eingesetzten *in vitro* Transkripte für die in dieser Arbeit durchgeführte Strukturanalyse mittels limitierter enzymatischer Hydroly-

se und chemischer Modifikation sowie für die Northern-Blot Analysen sind ebenfalls dargestellt.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des *rrnB*-Operons und der eingesetzten *in vitro* Transkripte. P und T bezeichnen die Promotoren bzw. Terminatoren. Der Bereich des Leaders ist hervorgehoben und detaillierter dargestellt. L1 entspricht dem Startnucleotid von P2 gestarteten Transkripten. Die Nummerierung der Nucleotidpositionen wird so bis zum Start der 16S rRNA fortgeführt und beginnt am 5'-Ende der 16S rRNA wieder mit 1. Der Bereich der Box C (L57 bis L64) der Plasmide pT0, pC1, pC2, pC3 ist sequenzgenau dargestellt. Dabei sind die Basenaustausche fett gedruckt. Die in dieser Arbeit eingesetzten *in vitro* T7-Transkripte sind im unteren Bereich der Abbildung dargestellt.

### 2.1.2. Auswirkungen von Basenaustauschen innerhalb der $t_L$ -Region

Punktmutationen in einem anderen Bereich des Leaders, der sogenannten  $t_L$ -Region, zeigten zum Teil ähnliche Effekte wie die Box C-Mutanten. Diese Effekte äußerten sich ebenfalls durch einen kältesensitiven Phänotyp (Pardon et al., 1994), strukturelle Veränderungen der Leader-Struktur, Veränderungen in der Proteinbesetzung und der Faltungskinetik (Besancon et al., 1999). Mit Hilfe einer der  $t_L$ -Mutanten konnten auch Veränderungen bei der transienten Wechselwirkungen des Leaders mit dem 5'-Bereich der 16S rRNA gezeigt werden (Zirwes, 2001; Pardon et al., 1995). Trotz der Tatsache, daß beide Typen der Leadermutationen (Box C und  $t_L$ -Region) eine Kältesensitivität zeigen, muß dieser Phänotyp nicht auf einem gemeinsamen Mechanismus beruhen.

## 2.2. Strukturanalysen

Bei der Strukturanalyse von RNA-Transkripten ermöglichen sowohl nukleotidspezifisch schneidende Nukleasen, als auch spezifisch modifizierende Chemikalien die Analyse von RNA-Strukturen. Im Vergleich zu Chemikalien besitzen Nukleasen aufgrund ihrer Molekülgröße in Bereichen komplexer RNA Strukturen eine viel geringere Zugänglichkeit zum RNA-Molekül. Aus diesem Grund und der zuvor beschriebenen Befunde wurden nachfolgend die Strukturanalysen durch limitierte enzymatische Hydrolyse und durch chemische Modifikation ergänzt und auf Bereiche der 16S rRNA erweitert. Auf Grund des Umfangs der Analyse wurde lediglich die C3-Mutante mit dem Wildtyp verglichen.

Überdies konnten erstmals *in vivo* Modifikationen mit Leader-Mutanten in einem Stamm durchgeführt werden, der keine chromosomal codierten Operons mehr besitzt (TA554). Nachfolgend sind die Ergebnisse der Strukturanalysen dargestellt, die die drei Bereiche: Leader, 5'-Region der 16S rRNA und den zentralen Pseudoknoten im Vergleich zum Wildtyp-Transkript umfassen.

### 2.2.1. *In vitro* Strukturanalysen durch limitierte enzymatische Hydrolyse und chemische Modifikationen

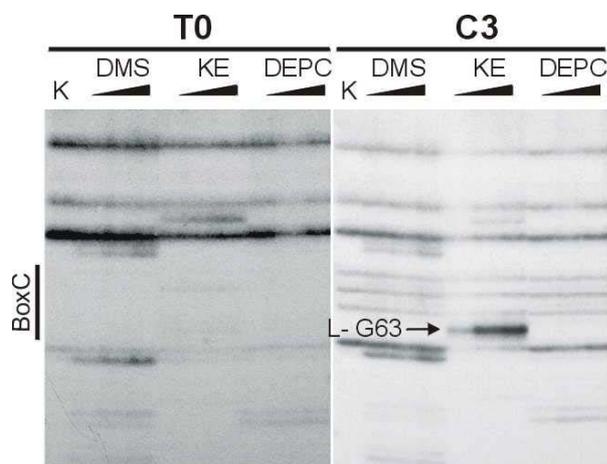
Für die *in vitro* Strukturanalysen wurden T7-„run-off“-Transkripte (6.3.2) eingesetzt, die zuvor über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel (6.2.6.7) aufgereinigt wurden. Alle T7-„run-off“-Transkripte starten mit zwei Guanosinen, da zwei Cytosinnukleotide auf der DNA-Matrize für die Transkriptionseffizienz des T7-Promotors essentiell sind. Da das natürliche *rrnB*-Leader-Transkript ein Cytosin an seinem 5'-Ende besitzt, wurde bei den nachfolgenden Analysen davon ausgegangen, daß das zusätzliche

Guanosin keinen Einfluß auf die Struktur des RNA-Transkriptes besitzt. Bei der limitierten enzymatischen bzw. chemischen Modifikation (6.3.9 bzw. 6.3.10) wurden renaturierte Transkripte eingesetzt, um jeweils die thermodynamisch stabilste Struktur einzustellen. Die eingesetzten Transkripte sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

### 2.2.1.1. Strukturanalyse des Leaders

Die Strukturanalyse des Leaders wurde mit zwei unterschiedlichen Transkripten der mutierten RNA und der Wildtyp-RNA durchgeführt. Sie diente einerseits dem Vergleich der Leaderstruktur von Mutante und Wildtyp und andererseits der Untersuchung der temporären transienten Wechselwirkung des Leaders mit der 5'-Region. Hierbei wurden die Modifikationssignale eines 257 nt langen Transkriptes des Wildtyps mit einem Wildtyp-Vollängentranskript verglichen (2.2.1.4). Das 257 Nukleotid lange Transkript umfaßt den Bereich des Leaders ab Promotor 2 inklusive der ersten 84 Nukleotide der 16S rRNA. Dieses Transkript wurde gewählt, da es theoretisch eine erste Wechselwirkung des Leaders mit der 5'-Region der 16S rRNA ermöglichen sollte.

Die Unterschiede im Modifikationsmuster wurden ausschließlich über Primer-Extension Reaktionen (6.3.1.1) nachgewiesen. Dabei konnte jedoch nicht die direkte 3'-Seite des Transkriptes analysiert werden, da hier das Oligonukleotid für die Primer-Extension Analyse hybridisiert wurde. Die Auswertung der modifizierten Nukleotide erfolgte über Intensitätsvergleich der Abbruchbanden und ist in der Tabelle 2.1 zusammengefaßt. Dabei steht „++“ für ein starkes, „+“ für ein schwaches Signal und „nd“ für ein „nicht detektiertes“ Signal. In der Tabelle 2.1 sind nur Nukleotidpositionen aufgeführt, die einen Unterschied zwischen Wildtyp- und mutiertem Transkript aufwiesen. Der innerhalb des Leaders auffälligste Unterschied an Position L-G63 ist exemplarisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Hierbei ist zu beachten, daß es sich nicht um eine der mutierten Nukleotidpositionen handelt, sondern um ein in unmittelbarer Nähe der Box C befindliches, durch Kethoxal modifiziertes Nukleotid.

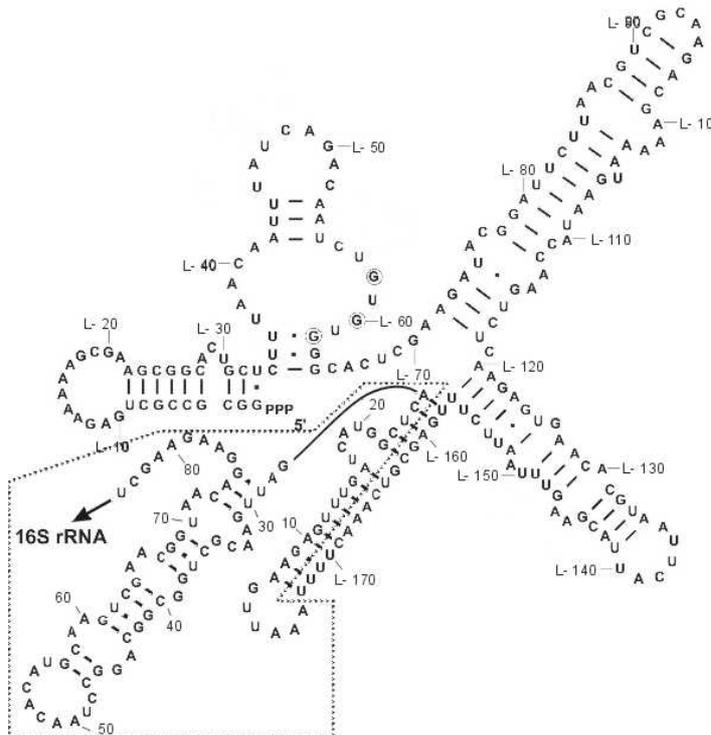


**Abb. 2.2:** Primer-Extension Analyse nach-chemische Modifikation des 257 nt Leaders-Transkriptes des Wildtyps (T0) und der Mutante (C3). K ist die unmodifizierte Kontrollspur. Der Box C-Bereich ist seitlich gekennzeichnet und der Modifikationsunterschied L-G63 ist in der Mutante markiert. Schwache Abbruchbanden oberhalb dieser Position stammen von den drei Basenaustauschen in der Mutante.

A	WT Leader + 84nt 16S rRNA						C3 Leader + 84nt 16S rRNA					
	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1
L-C40				+						++		
L-U43				+						++		
L-U45				+						++		
L-U47				+						++		
L-C48				+						++		
L-G50		++						+				
L-A51				+						++		
L-C52				+						++		
L-U55				+						++		
L-C56				+						++		
L-U57				+						++		
L-A58				nd						+		
L-A59				nd						+		
L-G63		nd						++				
L-A66	++			++			++			+		
L-A71/72	+		+				+		++			
L-U82				+						++		
L-G92					+						nd	
L-C93	+				++		++				+	
L-A94	+				++		++				+	
L-A95	+						++					
L-A100	++		++				++		nd			
L-A102	+		+				++		++			
L-A103	+		nd				++		+			
L-A110	+		++				++		++			
L-A121	+		++				nd		++			
L-A123	+			nd			+			+		
L-A124		++		+				++		++		
L-A127	++		+				+		nd			
L-A128	++						+					
L-A130	++			++			+			++		
L-U140				+						++		
L-C143				++						+		
L-U149				++						+		
L-C155	nd						+					
L-U170				+						++		
A3			nd		++				+		++	
U12				++						+		
A19	+		+		+		++		nd		nd	
U24				++						+		
C43					++	+					nd	nd
G38		++			+	+		++			nd	+
G41		++			+			++			nd	
G42		++			++	++		++			+	+
C47				nd						+		
C48				+						nd		
U49				nd						+		
A51				+						nd		
C52					nd						+	
A53				+						nd		
C54					nd						+	
A55				+						nd		
C58					nd						+	
A59	+			+				++		+		
A60	+							++				
B	WT Leader + komplette 16S rRNA						C3 Leader + komplette 16S rRNA					
	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1
U813				nd						++		
C862				nd						++		
A892				nd						++		
A906				nd						++		
C	WT Leader + 84nt 16S rRNA						WT Leader + komplette 16S rRNA					
	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1	DMS	KE	DEPC	CVE	S1	T1
L-G144					nd	nd					++	+
L-G147					nd	nd					++	+
G15					nd	nd					++	+
G22					nd	nd					++	+
G27					nd	nd					++	+
G31		nd		++	nd	nd		++		nd	++	++
G39		++			+	+		nd			+	+
G41		++			+			nd			nd	
A44				nd						+		
G46		nd						++				
G57		nd			nd			++			++	
G61						nd						++

**Tab. 2.1:** Tabellarische Darstellung der Modifikationsunterschiede der Primer-Extension Analyse. „++“ bedeutet ein starkes, „+“ ein schwaches und „nd“ ein „nicht detektiertes“ Modifikations-signal. A zeigt den Vergleich zweier 257 nt langer Transkripte vom Wildtyp bzw. der C3-Mutante. B zeigt die Modifikationsunterschiede zwischen zwei Vollängen-transkripten aus dem Wildtyp bzw. der Mutante und C stellt die Modifikationsunterschiede zwischen einem 257 nt langen bzw. 1715 nt langen Wildtyptranskript dar.

Neben diesem Unterschied im Modifikationsmuster findet man auch Bereiche unterschiedlicher Zugänglichkeiten in anderen Regionen. So lassen sich innerhalb der Box A in der C3-Mutante keine Zugänglichkeiten für CVE an den Positionen L-C32 und L-U33 detektieren. Hingegen findet man in der Mutante für die Nukleotide L-C40, L-U43, L-U45, L-U47, L-C48, L-A51, L-C52, L-U55, L-C56 und L-U57 eine erhöhte Zugänglichkeit für CVE. Diese Bereiche sind im Sekundärstrukturmodell des Leaders (Abbildung 2.3) mit Ausnahme der Position L-U55 ungepaart, wobei eine Tertiärstrukturausbildung in diesem Modell nicht berücksichtigt wurde. Ebenfalls findet man für die Positionen L-G92, L-C93 und L-A94 in der Mutante eine schwache Zugänglichkeit für die Nuklease S1, wohingegen das L-C93 und L-A94 Signal in der Mutante etwas verstärkt ist. Ebenfalls hervorzuheben sind die Positionen L-A102 und L-A103, die im Strukturmodell ungepaart bzw. im Übergangsbereich zum gepaarten Bereich liegen. In der Mutante sind hier die Zugänglichkeiten für DEPC und DMS erhöht. Ein weiterer Unterschied zwischen den Zugänglichkeiten in der Mutante und dem Wildtyp ist in dem strukturell schwer zu charakterisierenden  $t_L$ -Bereich zu sehen. Hier sind die Positionen L-A127, L-A128 und L-A130 in der Mutante für DMS weniger zugänglich als im Wildtyp. Auffällig sind innerhalb dieser Region des Leaders auch die Positionen L-G124 und L-A130. Beide modifizierte Nukleotide zeigen ein CVE-Signal, gleichzeitig aber auch eine Modifizierung mit Kethoxal bzw. DMS, also einzelstrangspezifischen Struktursonden. Letztlich zeigen auch die Positionen L-C143 und L-U149 in der Mutante für CVE eine geringere Zugänglichkeit als im Wildtyp.



**Abb. 2.3:** Erweitertes Sekundärstrukturmodell des Leaders mit zusätzlichen 84 Nukleotiden der 16S rRNA (gestrichelte Linie). Das Leadermodell wurde um die ersten 84 nt der 16S rRNA erweitert, deren Struktur mit dem Strukturvorhersageprogramm LinAll berechnet wurde. Leadernukleotide sind durch L gekennzeichnet, die Fortführung der Nomenklatur am 5'-Ende der 16S rRNA beginnt mit 1. Die Basenaustausche innerhalb der Box C (L-58, L-60 und L-62) sind ebenfalls gekennzeichnet. Auf Grund der unterschiedlichen Modifikationsanalysen mit unterschiedlich langen Transkripten wurden keine Modifikationspositionen in dieses Modell eingezeichnet. Das Modell dient lediglich der Anschauung der im Text beschriebenen Bereiche.

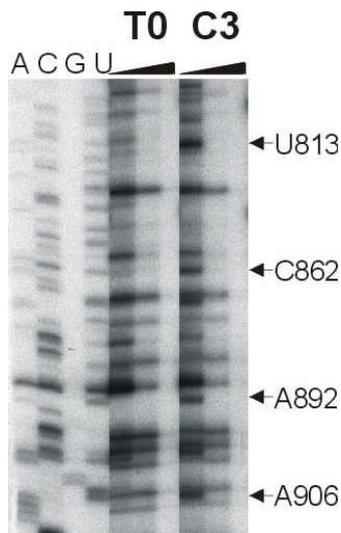
### **2.2.1.2. Strukturanalyse des 5'-Bereiches der 16S rRNA**

Vergleicht man die Unterschiede der Modifikationen im Bereich der 5'-Region der 16S rRNA in den verkürzten 257 nt Transkripten, so soll hier nur der auffälligste Bereich genannt werden. Es sind die Positionen C48, A51, A53, A55 und A59, die im erweiterten Sekundärstrukturmodell (Leader + 84 nt der 16S rRNA) eine Haarnadelschleifenstruktur bilden. Die genannten Positionen zeigen im Wildtyp eine schwache Zugänglichkeit für die doppelstrangspezifische Nuklease CVE, hingegen wurde in der Mutante keine Zugänglichkeit für CVE detektiert. Hier wurden im gleichen Bereich für die Positionen C52, C54 und C58 schwache S1-Signale detektiert, die ihrerseits im Wildtyp-Transkript fehlen.

### **2.2.1.3. Strukturanalyse des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA**

Ein für die Struktur der 16S rRNA sehr wichtiges Sequenzelement ist der zentrale Pseudoknoten. Dieses zentrale Strukturelement bildet über eine „long-range“- Wechselwirkung zwischen den Nukleotiden U17-A19 mit dem weit entfernten Bereich (Pos. U916-A918) einen Teil des zentralen Pseudoknotens aus und bringt so die drei Hauptdomänen der 16S rRNA (5'-Domäne, zentrale Domäne und 3'-Domäne) in räumliche Nähe zueinander. Überdies ist er essentiell für die Initiation der Translation (Brink et al., 1993; Poot et al., 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, daß eine Transition von C→U an der Position 23 dieses zentralen Strukturelementes zu einem kältesensitiven Phänotyp führt. Dieser kältesensitive Phänotyp konnte jedoch durch Einführung von zwei Punktmutationen im Leader wieder revertiert werden (Dammel et al., 1993).

Betrachtet man nun die Strukturanalysen der Vollängentranskripte (Leader + komplette 16S rRNA), so findet man im stromabwärts gelegenen Bereich des zentralen Pseudoknotens vier starke CVE Signale in der Mutante (U813, C862, A892 und A906), die auf eine veränderte Sekundärstruktur bzw. andere Tertiärstruktur hinweisen. Der hier beschriebene Bereich ist in der Abbildung 2.4 dargestellt.

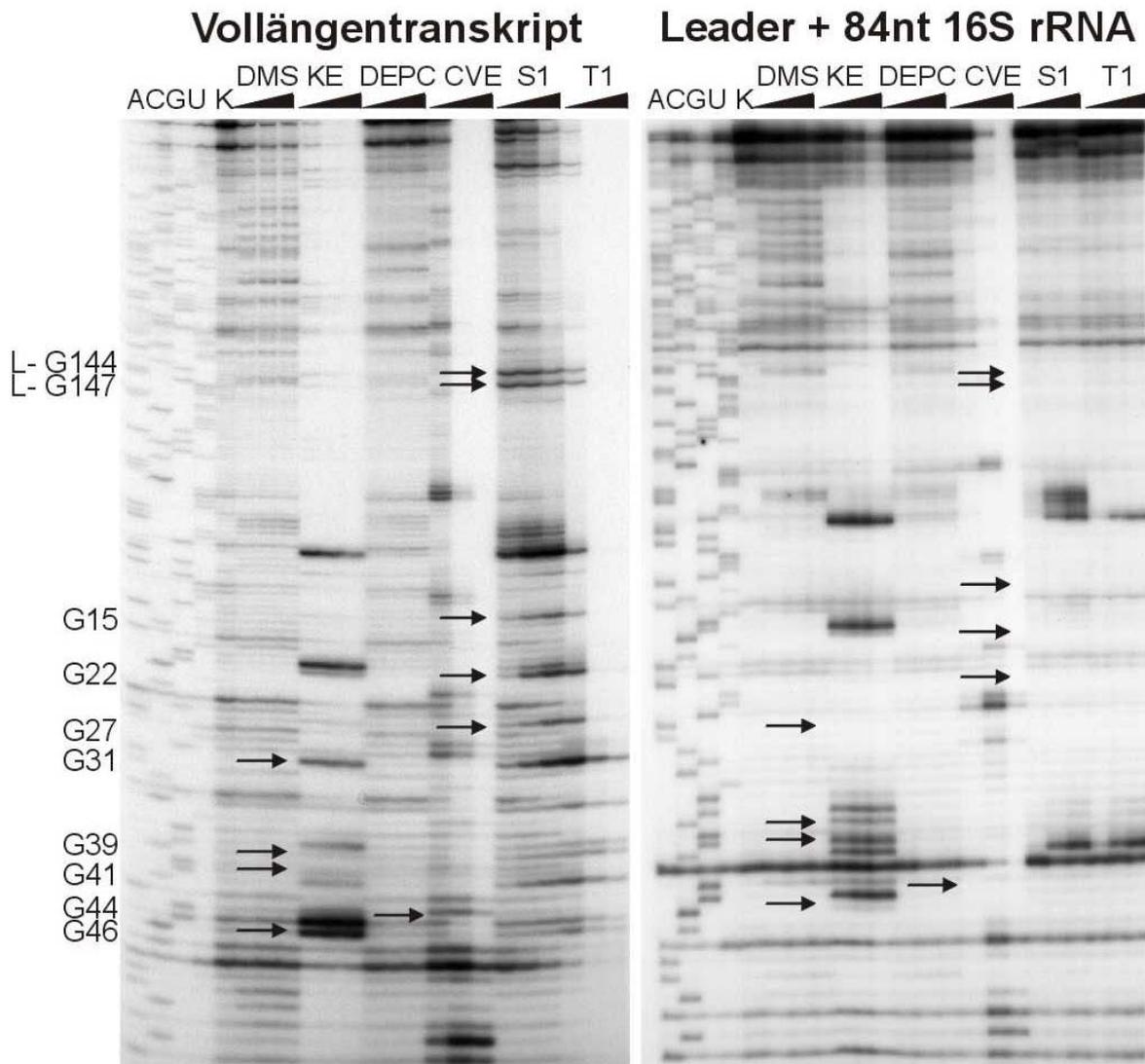


**Abb. 2.4:** Primer-Extension Analyse nach limitierter enzymatischer Hydrolyse mit CVE des Vollängentranskriptes von Wildtyp und Mutante. Die Positionen unterschiedlicher Zugänglichkeiten sind seitlich gekennzeichnet. A, C, G, U zeigt die mit dem gleichen *in vitro* Transkript durchgeführte Primer-Extension Sequenzierung. Die Konzentrationszunahme des eingesetzten Enzyms CVE ist oberhalb der Spuren gekennzeichnet. Dabei wurden Endkonzentrationen von 0.1, 0.4 und 0.7 mU CVE eingestellt.

#### 2.2.1.4. Vergleichende Strukturanalyse eines verkürzten und eines Vollängentranskriptes

Während der Transkription der ribosomalen RNA finden gleichzeitig verschiedene Prozesse im Zellkompartiment statt. Neben der Transkription beginnen parallel dazu die Faltung, Assemblierung von Proteinen aber auch Prozessierungs- und Maturierungsschritte der naszierenden RNA. Die Wechselwirkungen und Faltungsprozesse während der Transkription sind dynamische Prozesse, die sich nur schwer „einfrieren“ lassen. Der Leader bildet zu Beginn der Transkription kurzzeitig zum 5'-Bereich der 16S rRNA einen Kontakt aus. Im weiteren Verlauf der Transkription bildet der Leader zusammen mit dem downstream der 16S rRNA gelegenen Spacer-Bereich das Prozessierungssignal für die RNase III aus. Daher sollte durch die Wahl zweier unterschiedlich langer Transkripte eine strukturelle Veränderung auf Grund von Umfaltungen zu beobachten sein. Diese Strukturdaten stellen jedoch nur einen Bruchteil eines überaus komplexen Faltungsprozesses dar und geben lediglich eine Momentaufnahme der Struktur des jeweiligen RNA-Transkriptes wieder.

In Abbildung 2.5 ist die Modifikationsanalyse zweier unterschiedlich langer, vom Wildtyp stammender Transkripte dargestellt. Es handelt sich dabei um das oben schon beschriebene 257 nt lange Transkript und ein Transkript, das aus Leader und der kompletten 16S rRNA besteht.



**Abb. 2.5:** Primer-Extension Analyse modifizierter Wildtyp-Transkripte unterschiedlicher Länge (1715 nt bzw. 257 nt). Die zur Strukturuntersuchung eingesetzten Enzyme bzw. Chemikalien sind oberhalb der Spuren gekennzeichnet, ebenso wie ihre Konzentration (siehe auch 6.3.9 ff. und 6.3.10 ff.). A, C, G, U zeigt die mit dem gleichen *in vitro* Transkript durchgeführte Primer-Extension Sequenzierung. Modifikationsunterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unterschiedlich zugängliche Nucleotidpositionen sind auf der linken Seite des Gels angegeben.

Es lassen sich hierbei deutliche Unterschiede des Modifikationsmusters im direkten 5'-Bereich der 16S rRNA detektieren, aber auch in der  $t_L$ -Region an den Positionen L-G144 und L-G147. Die S1-Signale im Leader-Vollängentranskript zeigen eine hohe Zugänglichkeit an Einzelstrang RNA, während dieser Bereich im verkürzten Transkript geschützt ist.

Betrachtet man die unterschiedlichen Modifikationssignale in der 16S rRNA, so zeigt das Vollängentranskript für die Positionen G15, G22, G27 und G31 Zugänglichkeit für S1 bzw. Kethoxal, wohingegen diese Positionen im verkürzten Transkript nicht detektierbar sind. Gleiches gilt für die Positionen G44 und G46. Die dazwischen lie-

genden Nukleotide G39 und G41 im Vollängentranskript zeigen eindeutig keine Zugänglichkeit, wohl aber im verkürzten Transkript.

Die Tatsache, daß der größte Teil der Signale im Vollängentranskript und im verkürzten Fragment identisch ist, zeigt, daß eine Umfaltung der Struktur nur ganz definierte Bereiche umfaßt.

Es konnte gezeigt werden, daß mit Zunahme der Transkriptlänge Umfaltungsprozesse innerhalb der RNA-Struktur auftreten. Die Unterschiede einiger, aber nicht aller Sequenzbereiche, geben gute Hinweise auf den transienten Charakter des Leaders.

### **2.2.2. *In vivo* Strukturanalysen mit DMS**

DMS ist eine Chemikalie, die wie Kethoxal und Diethylpyrocarbonat spezifisch Nukleinsäure modifizieren kann (6.3.10). Durch anschließende Primer-Extension Analyse können die modifizierten Positionen analysiert und nachgewiesen werden (6.3.1). Für die Analyse wurden Plasmide, die das *rrnB*-Operon mit mutierter Box C besitzen, in den Stamm TA554 transformiert. Dieser Stamm besitzt keine chromosomal codierten *rrn*-Operons mehr und ermöglicht dadurch erstmals die *in vivo* Modifikation der ribosomalen RNA ohne den Hintergrund der sonst vorhandenen chromosomal codierten rRNA. Die transformierten Zellen sind lebensfähig und zeigen im Vergleich zum transformierten Wildtyp-Plasmid auch einen kältesensitiven Phänotyp. Dieser tritt am stärksten bei der Mutante C1 hervor. Dazu wurden Zellkulturen der C3-Mutante und des Wildtyps bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.5 wurde die jeweilige Zellkultur geteilt, die eine Hälfte mit DMS versetzt und die andere Hälfte als Kontrolle ohne Zugabe von DMS belassen. Anschließend wurde ein Lysat wie unter 6.3.5 beschrieben hergestellt und die 30S ribosomalen Untereinheiten über einen Saccharosegradienten isoliert und aufgereinigt. Aus diesen 30S Untereinheiten wurde dann die modifizierte rRNA gewonnen und in einer Primer-Extension Reaktion strukturell analysiert. Die Ergebnisse, die in der Region des Leaders, in der 5'-Region und im Bereich des Pseudoknotens der 16S rRNA gewonnen wurden, sollen im folgenden betrachtet werden.

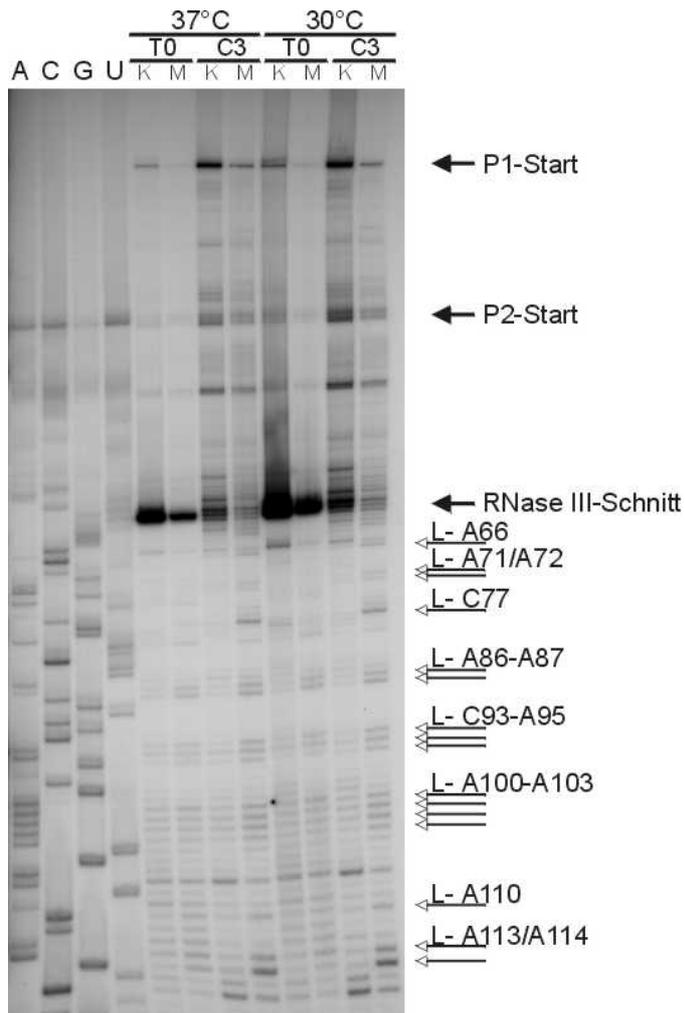
#### **2.2.2.1. Strukturanalyse des Leaders**

Da die Box C zusammen mit dem downstream der 16S rRNA liegenden Spacer das initiale Prozessierungssignal für die RNase III ausbildet, ist es wahrscheinlich, daß durch die eingeführten Mutationen auch die Prozessierung beeinflusst wird. Bei vollständiger Prozessierung sollte sich an der aus 30S Untereinheiten isolierten 16S rRNA kein Leader mehr befinden. Trotzdem wurde in dieser Analyse auch ein Leader-Oligonukleotid eingesetzt, das am direkten 3'-Ende des Leaders gegen die Posi-

tionen L-U173 bis L-U163 (#1682) hybridisiert. Über eine Primer-Extension Reaktion wurde die isolierte Gesamt RNA anschließend analysiert. Sowohl die rRNA-Isolate aus der Wildtyp Zellkultur als auch die der Mutante zeigen, daß ein Teil der rRNA noch unprozessiert bzw. teilprozessiert (bis zum initialen RNase III-Schnitt) vorliegt. Das Modifikationsmuster ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Hierbei kann man jedoch nur die DMS-Signale miteinander vergleichen, die stromabwärts des RNase III-Schnittes liegen. Der stromaufwärts liegende Bereich ist auf Grund exakter Prozessierung im Wildtyp-Transkript nicht oder nur sehr schwach zu detektieren gewesen. Somit ist eine vergleichende Bewertung dieser Position stromaufwärts nur sehr schwer möglich.

Die in Abbildung 2.6 dargestellten Signale repräsentieren spezifisch modifizierte Adenosine oder Cytosine. Dabei ist festzustellen, daß in der Mutante die Modifikationssignale stets stärker sind und bei 30°C sogar noch viel intensiver werden. Folgende Modifikationspositionen sind ausschließlich in der Mutante zu detektieren. Sie verteilen sich auf zwei Bereiche: L-A66, L-A71, L-A72, L-C77 und L-A110, L-A113, L-A114. Überdies findet man noch weitere Signale, die allerdings in abgeschwächter Form auch im Wildtyp zu detektieren sind. Dazu gehören die Signale L-A86, L-A87, L-C93 bis L-A95 und L-A100 bis L-A103.

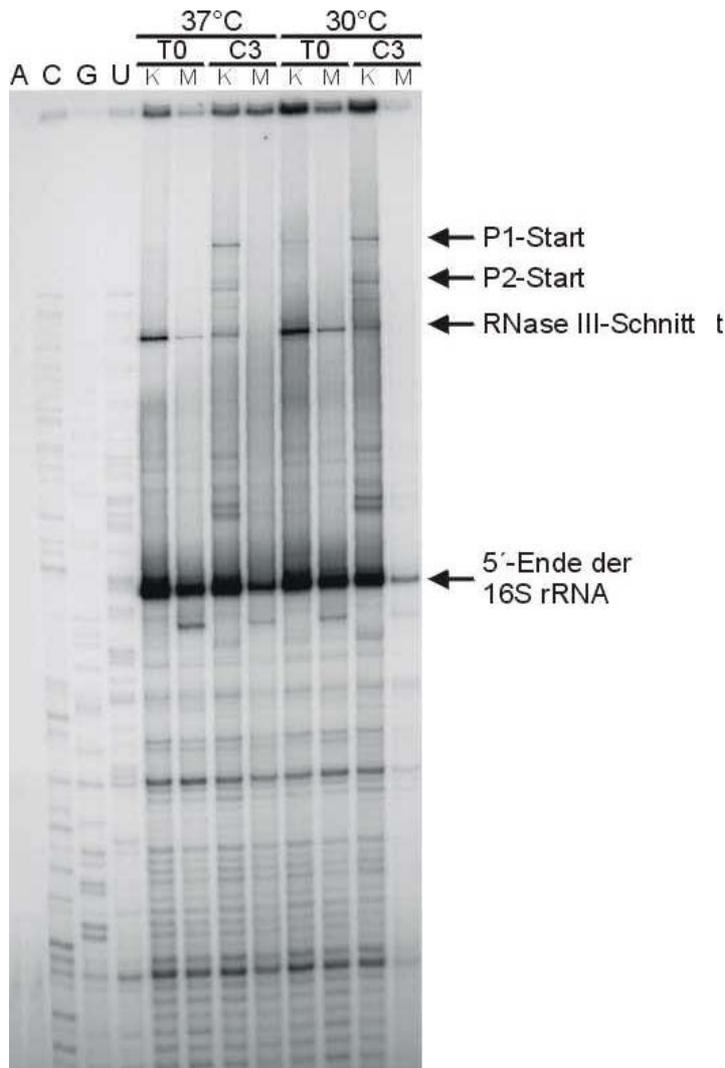
Unabhängig von den genannten Modifikationssignalen lassen sich auch große Unterschiede im Bereich des RNase III-Schnittes finden. Während im Wildtyp eine Hauptbande bei exakt L-U59 zu detektieren ist, findet man in der Mutante mehrere Banden im Bereich von L-A51 bis L-A60. Hierbei muß beachtet werden, daß die Positionen L-G58, L-G60 und L-G62 in der Mutante durch ein Adenosin ersetzt sind, welches durch DMS modifiziert und nachgewiesen werden kann. Es ist jedoch festzustellen, daß in diesem Bereich auch in der C3-Kontrollspur ohne DMS die Banden (L-A51 bis L-G60) zu detektieren sind. Daher kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen Signalen um Prozessierungs- bzw. Maturierungsprozesse handelt, die in diesem Bereich innerhalb der Mutante zu unpräzisen Schnitten führen. Die *in vivo* Analyse gibt ebenfalls Aufschluß über den Anteil ribosomaler Transkripte, die noch nicht prozessiert wurde. Deutlich sind in der Kontroll- und DMS-Spur der Mutante die Abbrüche am Promotor 1 bzw. 2 zu erkennen. Vergleicht man die Intensität der Abbruchbanden der Mutante mit der des Wildtyps, so liegt die Intensität im Wildtyp etwa um den Faktor 5 niedriger. Dies zeigt, daß der Leader in der Mutante viel stabiler ist.



**Abb. 2.6:** Primer-Extension Analyse von *in vivo* modifizierter Gesamt RNA aus TA554 Stämmen im Leader-Bereich. Es wurde Gesamt RNA aus Zellen isoliert, die bei 30 bzw. 37°C inkubiert wurden. Vor der Modifikation mit DMS wurde die entsprechende Zellkultur geteilt und nur eine Hälfte modifiziert (M). Die unmodifizierte Kontrolle ist durch K gekennzeichnet. Der Wildtyp ist mit T0 und die Mutante mit C3 markiert. A, C, G, U zeigt die mit einem *in vitro* Transkript durchgeführte Sequenzierung, die am Promotor 2 endet. Die Positionen der Promotoren (P1 und P2) ebenso wie der RNase III-Schnitt sind durch geschlossene Pfeile gekennzeichnet. Offene Pfeile kennzeichnen die Modifikationsunterschiede und ihre Positionen.

### 2.2.2.2. Strukturanalyse des 5'-Bereiches der 16S rRNA

Für die Untersuchungen des direkten 5'-Bereiches der 16S rRNA wurde ein Oligonukleotid verwendet, das gegen die Positionen U86 bis C67 (#1600) hybridisiert. Bei der Analyse über Primer-Extension ist der Abbruch der cDNA am reifen Ende der 16S rRNA zu erkennen. Die quantitative und qualitative Intensität des Abbruchproduktes ist sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp vergleichbar. Unterschiede im DMS-Modifikationsmuster konnten in dieser Analyse nicht festgestellt werden. Abbildung 2.7 zeigt den direkten 5'-Bereich der prozessierten 16S rRNA. Bei der mit DMS modifizierten Probe der Mutante wurde zu wenig RNA aufgetragen, daher erscheint die Spur sehr schwach.

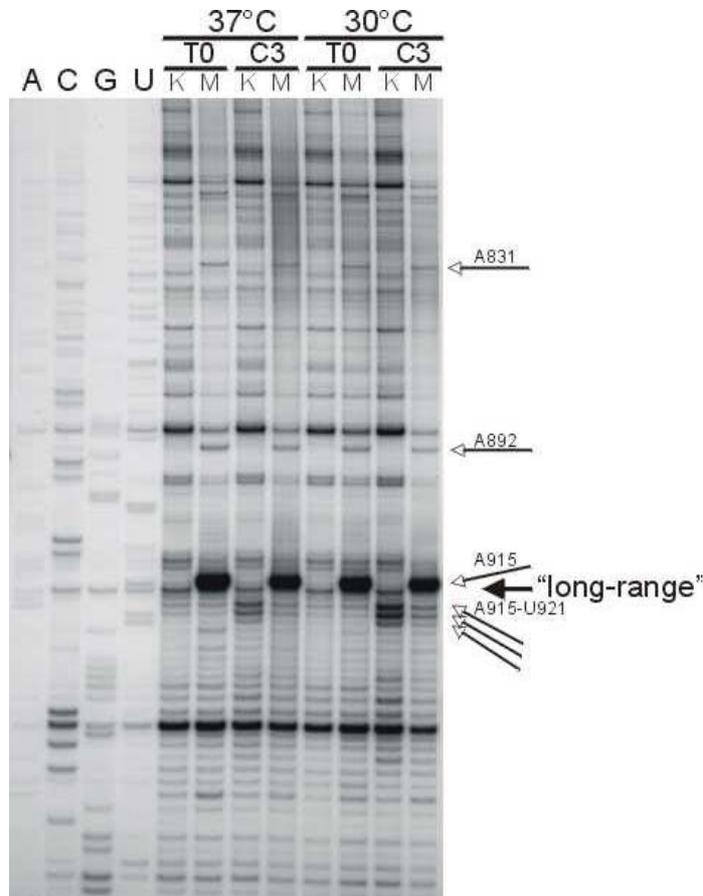


**Abb. 2.7:** Primer-Extension Analyse von *in vivo* modifizierter Gesamt RNA aus TA554 Stämmen im 5'-Bereich der 16S rRNA. Es wurde Gesamt RNA aus Zellen isoliert, die bei 30 bzw. 37°C inkubiert wurden. Vor der Modifikation mit DMS wurde die entsprechende Zellkultur geteilt und nur eine Hälfte modifiziert (M). Die unmodifizierte Kontrolle ist durch K gekennzeichnet. Der Wildtyp ist mit T0 und die Mutante mit C3 markiert. A, C, G, U zeigt die mit einem *in vitro* Transkript durchgeführte Sequenzierung, die am Promotor 2 endet. Die Positionen der Promotoren (P1 und P2) ebenso wie der RNase III-Schnitt sind durch geschlossene Pfeile gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede konnten in diesem Bereich nicht detektiert werden.

### 2.2.2.3. Strukturanalyse des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA

Für die Analyse des Bereichs des zentralen Pseudoknotens wurde ein Oligonukleotid eingesetzt, das gegen die Positionen A978 bis C962 der rRNA hybridisiert. Dieser Primer ermöglicht die Analyse des Bereichs des zentralen Pseudoknotens, der die „long-range“-Wechselwirkung ausbildet. Die in Abbildung 2.8 gekennzeichneten Modifikationssignale für DMS sind spezifisch, zeigen jedoch zwischen Wildtyp und mutiertem Transkript an den Positionen A831, A892 und A915 keine Unterschiede. Dagegen findet man in der Kontrollspur der C3-Mutante zusätzliche modifikationsunabhängige Abbruchbanden. Diese befinden sich an den Positionen A919, U920 und U921 in direkter Nachbarschaft zur „long-range“-Wechselwirkung (U916-A918) des zentralen Pseudoknotens. Bei den 30°C-Proben werden diese Signale noch verstärkt.

Damit konnte gezeigt werden, daß Basenaustausche in einem kleinen, aber hoch konservierten Sequenzbereich der Leader rRNA zu weitreichenden strukturellen Veränderungen im Leader und der nachfolgenden 16S rRNA führen.



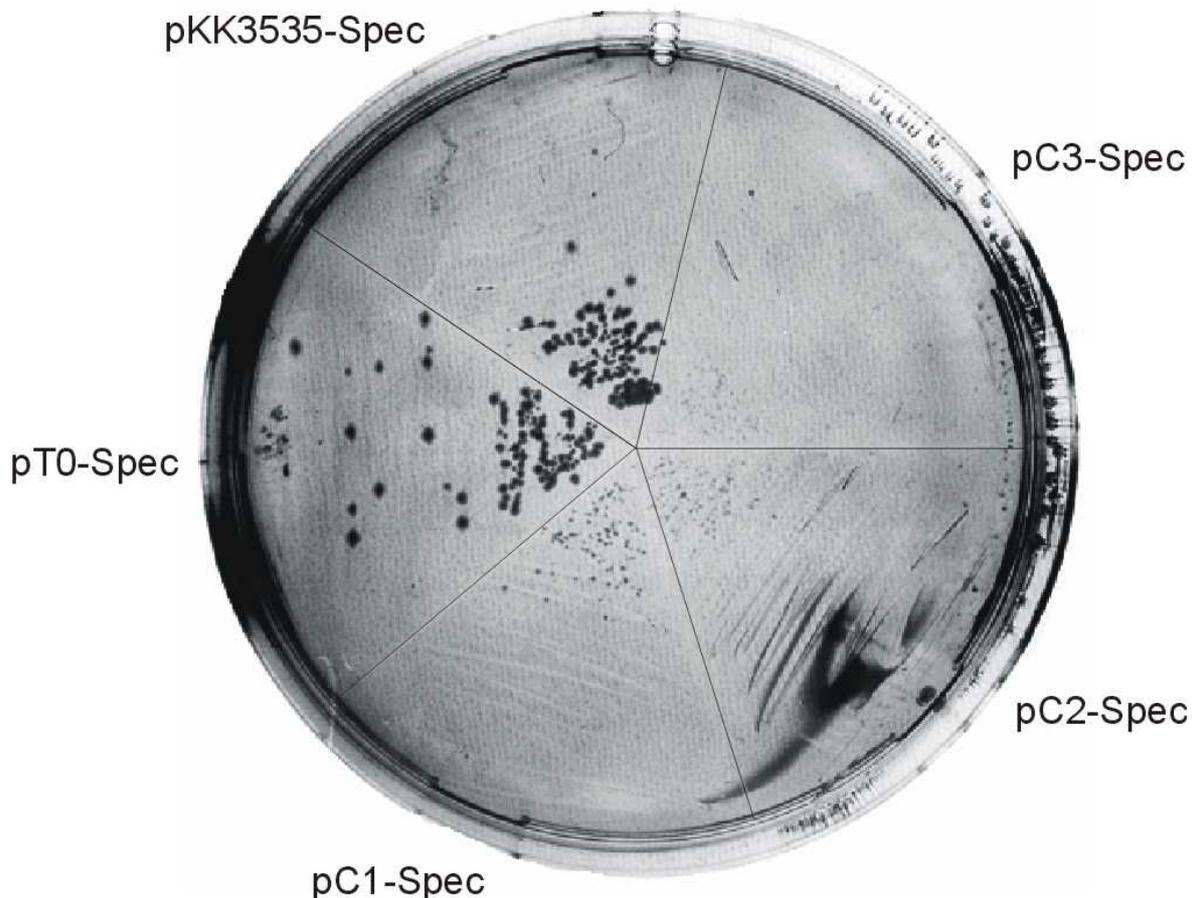
**Abb. 2.8:** Primer-Extension Analyse von *in vivo* modifizierter Gesamt-RNA aus TA554 Stämmen im Bereich des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA. Es wurde Gesamt-RNA aus Zellen isoliert, die bei 30 bzw. 37°C inkubiert wurden. Vor der Modifikation mit DMS wurde die entsprechende Zellkultur geteilt und nur eine Hälfte modifiziert (M). Die unmodifizierte Kontrolle ist durch K gekennzeichnet. Der Wildtyp ist mit T0 und die Mutante mit C3 markiert. A, C, G, U zeigt die mit einem *in vitro* Transkript durchgeführte Sequenzierung. Der Bereich der „long-range“-Wechselwirkung ist durch einen geschlossenen Pfeil gekennzeichnet. Unterschiede sind durch offene Pfeile unter Angabe der Nukleotidposition angegeben.

### 2.3. Funktionsanalyse mutierter Ribosomen mittels Polysomenanalyse

Um Aufschluß über die Funktionsfähigkeit der Ribosomen zu erhalten, die mutierte 16S rRNA beinhalten, wurden Polysomenanalysen durchgeführt. Bei der Polysomenanalyse ist es essentiell, daß sich die Zellen in der exponentiellen Phase befinden, in der die größte Proteinbiosyntheseaktivität stattfindet. Erst bei einer hohen Biosyntheserate der Zellen können Polysomen isoliert werden, da jede mRNA von mehreren Ribosomen gleichzeitig transkribiert werden kann. Für diese Analyse konnte jedoch der Stamm TA554, dessen chromosomal codierten *rrn*-Operons deletiert sind, nicht eingesetzt werden, da dessen Wachstumsrate schon im Wildtyp zu niedrig ist. Dies liegt daran, daß der Stamm TA554 zwei unterschiedliche, aber essentielle Plasmide besitzt. Das eine Plasmid codiert diejenigen essentiellen tRNAs, die durch die Deletion der *rrn*-Operons verloren gegangen sind. Das andere Plasmid codiert das zu analysierende *rrn*-Operon. Durch diesen starken Eingriff in das Ge-

nom wird der Stamm sehr stark im Wachstum beeinflusst. Daher wurde die Polysomenisolation mit dem Stamm HB101 durchgeführt. Dieser Stamm hat aber den Nachteil, daß eine spontane Unterscheidung zwischen plasmid- und chromosomalcodierter rRNA nicht mehr möglich ist. Daher wurde durch eine Klonierung in pT0- und die pC-Plasmide an der Position 1192 der 16S DNA eine C→T-Transition eingeführt, die in transformierten Zellen zu einer Spectinomycinresistenz führt. Durch die Wahl eines spezifischen Oligonukleotids (#Spec), welches gegen die Positionen G1215 bis U1194 der 16S rRNA hybridisiert und einer Abwandlung der Primer-Extension Analyse (6.3.1.2) läßt sich über Quantifizierung der verschiedenen Abbruchbanden der Anteil plasmid- und chromosomalcodierter RNA bestimmen (Spec-Kontrolle).

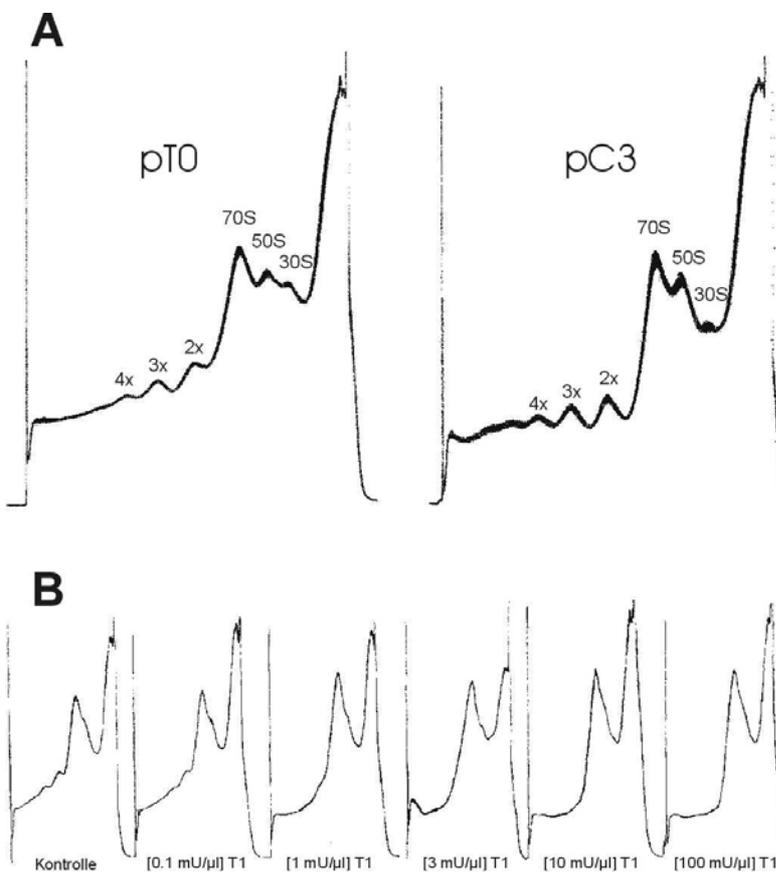
Abbildung 2.9 zeigt, daß auch die Spec-Klone den kältesensitiven Phänotyp zeigen.



**Abb. 2.9:** Kältesensitiver Phänotyp der klonierten Spec-Klone. Für die Analyse wurde in die Plasmide pKK3535, pT0, pC1, pC2 und pC3 durch entsprechende Klonierung an Position 1192 eine C→T-Transition eingeführt. Die erhaltenen Plasmide wurden in den Stamm HB101 transformiert und der kältesensitive Phänotyp durch Inkubation für 48 Stunden bei 30°C überprüft.

Zur Isolation der Polysomen wurde wie unter 6.3.4 beschrieben vorgegangen. Das so erhaltene Lysat wurde über einen 15 - 30%-igen Saccharosegradienten aufgetrennt, die einzelnen Fraktionen (Polysomen, 70S, 30S) isoliert und die rRNA extrahiert. Zur Bestimmung des plasmidären Anteils in den einzelnen Fraktionen wurde nachfolgend die oben beschriebene Spec-Kontrolle durchgeführt.

Alle drei Mutanten zeigen dabei die Fähigkeit Polysomen zu bilden, wobei der 30S-Peak in der C2- und C3-Mutante deutlich kleiner ist. In Abbildung 2.10 A sind exemplarisch zwei Polysomenprofile aus HB101 dargestellt, die das Plasmid pT0 bzw. pC3 enthalten. Für die Analyse mußte sichergestellt werden, daß es sich tatsächlich um Polysomen und nicht um Aggregationen defekter Ribosomen handelte. Daher wurde eine Fraktion T0 bzw. C3 Lysat in jeweils sechs gleich große Aliquots aufgeteilt und mit Nuklease T1 auf unterschiedliche Endkonzentrationen eingestellt (Abbildung 2.10 B). Handelt es sich um Aggregate defekter Ribosomen, die nicht an eine mRNA gebunden vorliegen, hat die moderate Behandlung mit Nuklease T1 keinen Einfluß auf die vermeintlichen Polysomen-Peaks. Im Fall von Polysomen sollten diese schon bei geringen T1-Konzentrationen durch Hydrolyse der mRNA zerfallen. In dieser Analyse konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß es sich tatsächlich um Polysomen handelt (Abbildung 2.10 B). Da die Trennung der 70S, 50S und 30S Untereinheit im Gradienten nicht sehr hoch war, ist die Auflösung der Untereinheiten nur sehr schlecht.



**Abb. 2.10:** Polysomenanalyse vom plasmidhaltigen Stamm HB101. A zeigt exemplarisch das Polysomenprofil des Wildtyps pT0 und der Mutante pC3. Zur Bestimmung des Anteils am plasmidären bzw. chromosomalen Produkt wurden in B die klonierten Spec-Klone eingesetzt, die stets ein etwas schlechteres Polysomenprofil zeigten. Daher wurde in B auch durch schwache Nuklease T1-Hydrolyse getestet, ob es sich tatsächlich um Polysomen oder um Aggregate ribosomaler Untereinheiten handelt. Dazu wurde eine Polysomenisolation im präparativen Maßstab durchgeführt, der Ansatz in 6 Aliquots aufgeteilt und die unter den Profilen aufgeführte Endkonzentration an Nuklease T1 eingestellt.

Die Ergebnisse der Quantifizierung zur Bestimmung des plasmidären- bzw. chromosomalen rRNA-Anteils sind in der Tabelle 2.2 dargestellt. Hierbei liegt der Anteil plasmidcodierter rRNA im Wildtyp im Schnitt bei 83%. In den Mutanten C1, C2 und C3 ist dieser Anteil mit 74-77% etwas niedriger. Zudem läßt sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Fraktionen (70S, 30S, Polysomen) innerhalb der einzelnen Mutanten feststellen. Demnach befindet sich die vom Plasmid stammende 16S rRNA mit vergleichbaren Anteilen in allen drei Fraktionen.

	pT0-Spec			pC1-Spec			pC2-Spec			pC3-Spec		
	30S	70S	P									
<b>Chromosom</b>	17	17	17	26	26	26	21	23	26	23	24	23
<b>Plasmid</b>	83	83	83	74	74	74	79	77	76	77	76	77

**Tab. 2.2:** Bestimmung des plasmidären bzw. chromosomalen Anteils der 16S rRNA mittels Spec-Kontrolle (6.3.1.2) innerhalb der einzelnen Fraktionen 30S-, 70S Untereinheit bzw. Polysomenfraktion. „Chromosom“ bezeichnet den vom Chromosom stammenden Wildtyp-Anteil, „Plasmid“ den Anteil mutierter rRNA, der vom transformierten Plasmid stammt. Die Zahlen stellen Prozentangaben dar.

## 2.4. rRNA-Stabilität

Wie schon in 1.3 beschrieben wird bei der Transkription bakterieller ribosomaler RNA zunächst eine lange Vorläufer-RNA synthetisiert. Noch während der Transkription finden Assemblierung von Proteinen und Prozessierung der naszierenden rRNA statt. Durch Einführung von Basenaustauschen innerhalb der Box C des Leaders ist es nun möglich, daß essentielle Assemblierungs- und Maturierungsschritte fehlgeleitet werden und die Transkription nach Synthese der 16S rRNA möglicherweise einfach abgebrochen wird. Es können aber auch instabile Produkte entstehen, die rasch abgebaut werden. Dies könnte in der Zelle zu einer Unterrepräsentation von 16S und 23S rRNA führen, wodurch sich der schon beschriebene kältesensitive Phänotyp ausprägt. Aus diesem Grund wurden durch die nachfolgend beschriebenen Analysen sowohl die rRNA-Stabilitäten als auch die Fähigkeit der Zellen die komplette Vorläufer-rRNA transkribieren zu können, untersucht.

In bereits vorangegangenen Studien (Liebig B., 1996) konnte gezeigt werden, daß die Halbwertszeit des rRNA Leaders im Sekunden-Bereich ( $t_{1/2}$  (P1)= 28 Sekunden,  $t_{1/2}$  (P2)= 44 Sekunden) liegt, während die Halbwertszeit stabiler 16S rRNA in einem Bereich liegt, der über die Generationszeit der Bakterienzelle liegt.

Zur Bestimmung der Auswirkungen der mutierten Box C auf die Stabilität des Leaders und der nachfolgenden 16S rRNA, wurden sowohl Maxizell-Analysen (6.3.3) als auch Rifampicin-Kinetiken (6.3.6) durchgeführt. Die Maxizell-Analyse ermöglicht da-

bei über einen Zeitraum von etwa 12 Stunden die Stabilität der 16S rRNA zu untersuchen, ohne den chromosomalen Hintergrund berücksichtigen zu müssen. Für die Analyse des Leaders mußte eine Methode gewählt werden, die eine Untersuchung des Leaders im Sekundenbereich ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden Rifampicin-Kinetiken durchgeführt.

#### 2.4.1. Maxizell-Analyse zur Bestimmung der 16S rRNA-Stabilität

Die Maxizell-Analyse ermöglicht auf elegante Weise die Untersuchung von plasmid codierter RNA ohne den störenden Hintergrund der chromosomal codierten RNA. Dazu verwendet man den *Escherichia coli* Stamm CSR603, der durch UV-Licht verursachte DNA-Schäden nicht mehr reparieren kann. Das energiereiche UV-Licht trifft statistisch häufiger das sehr viel größere Bakteriengenom als die Plasmid-DNA, die überdies noch in mehreren Kopien pro Zelle vorliegt. Zelleigene Nukleasen degradieren dann die geschädigte chromosomale DNA, während an der intakten Plasmid-DNA noch Transkription stattfinden kann. Für die Analyse wurden die Plasmide pBR322, pT0, pC1, pC2, pC3, pSTL-T0, pSTL-C1, pSTL-C2 und pSTL-C3 in den Stamm CSR603 transformiert, Zellen wie unter 6.3.3 beschrieben herangezogen und mit einer UV-Energiedosis von etwa 50-100 J/m<sup>2</sup> bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde dem phosphatarmen Inkubationsmedium radioaktives Orthophosphat hinzugegeben und die Zellen über Nacht weiter inkubiert. Das radioaktive Phosphat wird nur noch bei der Transkription des Plasmids eingebaut. Die aus den Zellen isolierte rRNA wurde anschließend über ein Mischgel (6.2.6.6) analysiert und sowohl Toluidinblau gefärbt als auch autoradiographiert. Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung wurde die chromosomale und die plasmidäre rRNA der Zelle erfaßt. Hingegen ermöglichte die Autoradiographie ausschließlich die Untersuchung des vom Plasmid stammenden 23S/16S rRNA-Verhältnisses. Um eine genaue Zuordnung der ribosomalen Untereinheiten und Produkte zu haben, wurde zusätzlich ein 16S-Standard bzw. 23S/16S-Standard auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der vollständigen Zerstörung des *Escherichia coli* Genoms wurde das Plasmid pBR322 transformiert, das keine ribosomale RNA auf seinem Plasmid codiert.

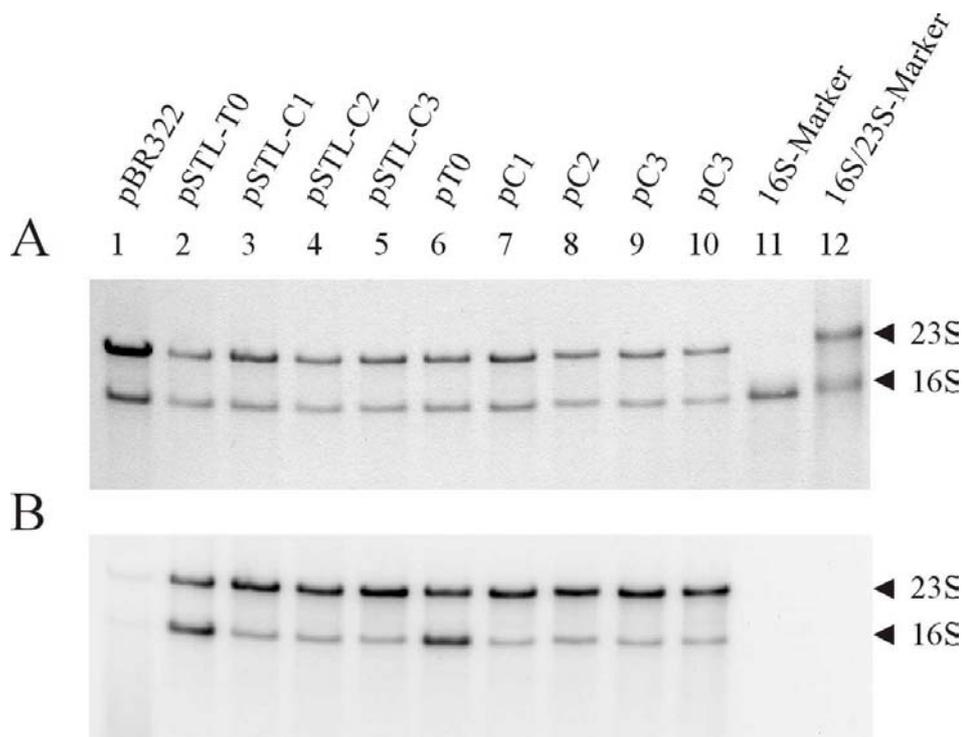
Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 2.11 dargestellt. Die Toluidinfärbung ist unter A dargestellt, die Autoradiographie des gleichen Gels unter B. Tabelle 2.3 zeigt das 23S/16S rRNA Verhältnis, welches durch Quantifizierung der Bandenintensitäten ermittelt werden konnte.

Betrachtet man diese Ergebnisse, so zeigt sich in allen drei Box C-Mutanten mit jeweils unterschiedlichem Plasmid-Hintergrund (pSTLT0- bzw. pT0-Derivate) eine deutliche Reduzierung der 16S rRNA nach etwa 12 Stunden. Die Toluidinblau-Färbung und das Autoradiogramm ermöglichen eine quantitative Erfassung der Nu-

kleinsäuremenge. Da die 23S rRNA mit 2904 Nukleotiden nahezu doppelt so lang ist wie die 16S rRNA (1542 Nukleotide), sollte sich bei gleicher Transkriptionsmenge der rRNA ein rechnerisches Verhältnis von 2 ergeben (Quotient aus 23S zu 16S rRNA). In den Maxizellen ist das natürliche Verhältnis von 23S/16S rRNA etwa 1.4 (Toluidinblaufärbung) bzw. ca. 1 wenn nur die Produkte vom Plasmid betrachtet werden (Autoradiogramm). Dieses Verhältnis von 1 soll nachfolgend als „natürliches Verhältnis“ betrachtet werden.

Somit ist das Verhältnis in den Mutanten deutlich sichtbar zu Ungunsten der 16S rRNA verschoben und erreicht sogar in der pC3-Mutante einen Wert von 3.74. Das bedeutet, daß von der plasmidcodierten 16S rRNA gegenüber der 23S rRNA nach etwa 12 Stunden nur noch etwa 27% in der Zelle nachweisbar ist. In den übrigen Mutanten liegt der verbleibende 16S rRNA-Anteil bei etwa 35%.

Die Maxizell-Analyse zeigt aber auch, daß zunächst ein Vollängentranskript entstehen muß, da sonst der Anteil der 23S rRNA deutlich geringer ausfallen müßte. Ferner ist festzustellen, daß die nach etwa 12 Stunden detektierten ribosomalen RNA-Produkte keine auffälligen Fehlprozessierungen zeigen, die in einem Mischgel erkennbar sind.



**Abb. 2.11:** Analyse von rRNA aus Maxizellen. Für dieses Experiment wurden Maxizellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, UV bestrahlt und mit  $^{32}\text{P}$  Orthophosphat inkubiert. Nach der Bestrahlung erfolgte die Transkription nur noch vom Plasmid, so daß auch nur diese Transkripte mit  $^{32}\text{P}$  markiert sind. A zeigt die über ein Mischgel aufgetrennte und mit Toluidinblau gefärbte ribosomale RNA. In Spur 1 wurde die isolierte rRNA aus einem mit dem Kontrollplasmid (pBR322) transformierten UV sensitiven Stamm aufgetrennt. Spur 11 und Spur 12 zeigen einen Standard aus 16S rRNA bzw. 23S rRNA. B zeigt die Autoradiographie des selben Mischgels. Die 16S bzw. 23S rRNA ist seitlich gekennzeichnet.

Plasmid	Plasmid + Chromosom codiert	Plasmid codiert
pSTL-T0	1.36 (+/- 0.06)	0.97 (+/- 0.09)
pSTL-C1	1.74 (+/- 0.15)	2.95 (+/- 0.16)
pSTL-C2	1.70 (+/- 0.05)	2.80 (+/- 0.15)
pSTL-C3	1.83 (+/- 0.02)	3.55 (+/- 0.31)
pT0	1.46 (+/- 0.02)	0.93 (+/- 0.05)
pC1	1.61 (+/- 0.03)	3.66 (+/- 0.07)
pC2	1.52 (+/- 0.03)	2.73 (+/- 0.44)
pC3	1.52 (+/- 0.13)	3.74 (+/- 0.21)

**Tab. 2.3:** Bestimmung der Verhältnisses von 23S zur 16S rRNA. Der Wert in Klammern (+/- X) gibt den Fehler an. „Plasmid + Chromosom codiert“ bezeichnet die Summe aus der vom Chromosom und dem Plasmid codierten rRNA-Produkte. „Plasmid codiert“ entspricht den bestimmten Werten der Autoradiographie und beinhaltet ausschließlich die vom Plasmid synthetisierten rRNA-Produkte. Die berechneten und dargestellten Verhältnisse entsprechen den Bandenintensitäten und nicht den rRNA Mengen, da sowohl in der Toluidinblaufärbung als auch in der Autoradiographie die Länge der rRNA einget.

#### 2.4.2. Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der Leader-Halbwertszeit

Um Aufschluß über die Stabilität des Leaders zu erhalten, wurden Rifampicin-Kinetiken im Wildtyp-Stamm (HB101), in RNase III defizienten Stämmen (ABL1 und BL107), sowie im Stamm TA554 (ohne chromosomal codierte Operons) durchgeführt. Überdies wurden die Stämme sowohl bei 30°C als auch bei 37°C angezogen und deren Produkte analysiert, da sich der kältesensitive Phänotyp am stärksten bei niedrigen Temperaturen ausprägt. Zu diesem Zweck wurden transformierte und untransformierte Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 inkubiert und schnell mit Rifampicin auf eine Endkonzentration von 500 µg/ml eingestellt (6.3.6). Das Antibiotikum verhindert dabei die weitere Initiation der Transkription, indem es an die β-Untereinheit der RNA-Polymerase bindet. Nach der Zugabe des Rifampicins wurden dann in kurzen Abständen 3 ml Aliquots der Zellkultur abgenommen und umgehend in BSCE-Phenol lysiert bzw. extrahiert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde anschließend durch Primer-Extension analysiert. Dafür wurde ein Oligonukleotid (#1400) verwendet, das gegen die Leader-Positionen L-C56 bis L-A38 hybridisiert und in Richtung der beiden Tandem-Promotoren verlängert wird. Dabei werden alle Leadertranskripte erfaßt, die vom Chromosom und vom Plasmid stammen. Durch Unterschiede in der Länge der einzelnen *rrn*-Leader-Transkripte, den Auflösungsverhältnissen im Gel und alternativen Start-Positionen am 3. oder 4. Cytosin des Promotors 2 des *rrnA*, *B*, und *C*-Operons, findet man mehrere Abbruchbanden am Promotor 2 aber auch am Promotor 1. Ein Schema der Primer-Extension mit ihren Produkten ist in Abbildung 2.12 und der Tabelle 2.4 dargestellt.



**Abb. 2.12:** Schema der Primer-Extension Analyse zur Bestimmung der Leader-Halbwertszeiten bei der Rifampicin-Kinetik. Das an den Leader im Bereich L-C56 bis L-A38 hybridisierende Oligonukleotid #1400 ist am 5'-Ende radioaktiv markiert und wird durch das Enzym AMV reverse Transkriptase bis zum 5'-Ende des Leaders verlängert. Die so entstehende radioaktive cDNA wird durch das Ende der Matrizen-RNA entweder am Promotor 2 oder dem Promotor 1 terminiert. Da sich die Produkte der chromosomal codierten sieben ribosomalen Operons um wenige Nukleotide unterscheiden, entstehen unterschiedlich lange cDNAs, die in Tabelle 2.4 dargestellt sind.

Transkription vom P1 gestartet		Transkription vom P2 gestartet	
Operon	Primer-Extension Produkt	Operon	Primer-Extension Produkt
<i>rrnA, B, C</i>	174 nt	<i>rrnA, B, C</i>	56 nt
<i>rrnG</i>	171 nt	<i>rrnG, E</i>	57 nt
<i>rrnD, E</i>	162 nt	<i>rrnD, H</i>	59 nt
<i>rrnH</i>	161 nt		

**Tab. 2.4:** Fragmentlängen der am Promotor 1 bzw. 2 terminierten cDNA-Produkte der Primer-Extension Analyse. Auf einem 10%-igen denaturierenden PAA-Gel lassen sich die Produkte der Länge 174 nt und 171 nt, sowie 162 nt und 161 nt nicht mehr voneinander trennen.

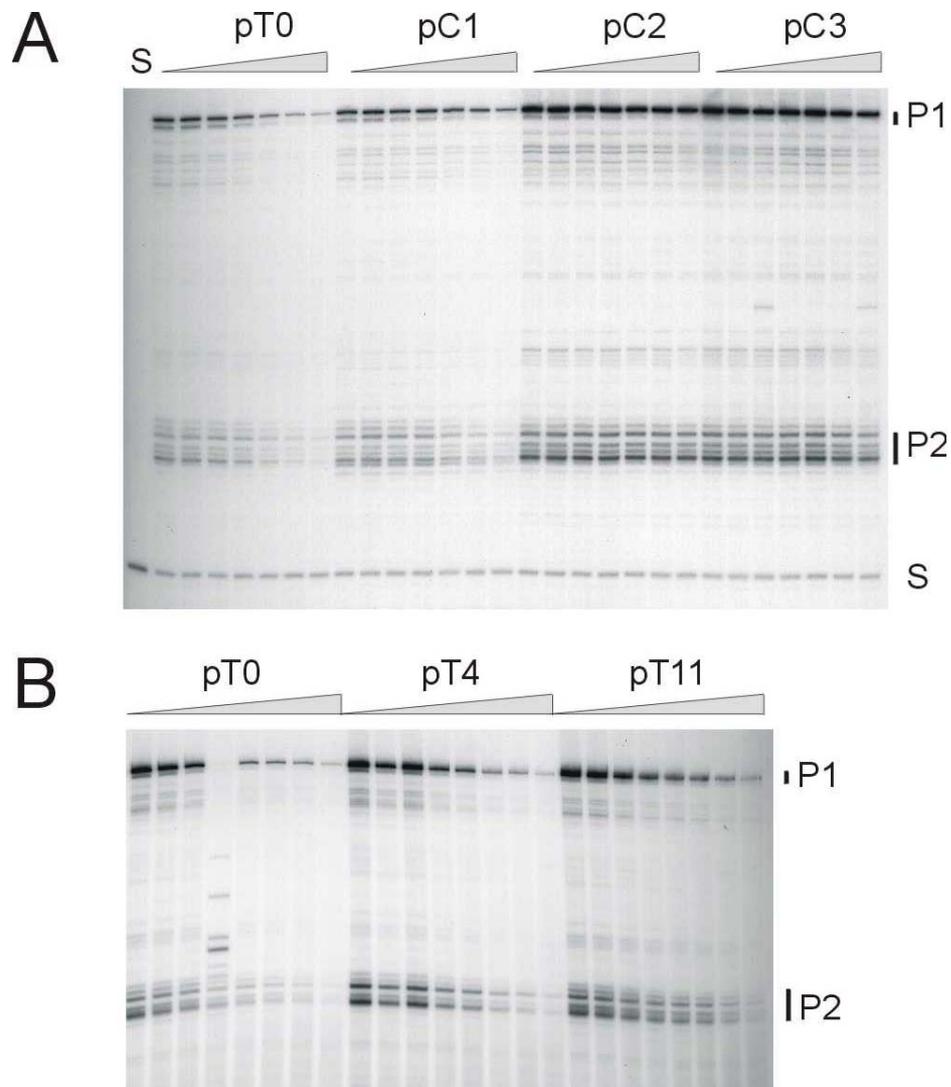
#### 2.4.2.1. Halbwertszeiten der Box C-Mutanten im transformierten Wildtyp-Stamm

Neben der Analyse der Box C-Mutanten wurden auch zwei  $t_L$ -Mutanten (pT4 und pT11) untersucht. Diese sollten zeigen, ob sich die Halbwertszeit des Leaders auch durch Mutationen in anderen essentiellen Leader-Bereichen verändert.

Die Untersuchung der mutierten Box C Leaderprodukte wurde zunächst im Wildtyp-Stamm HB101 durchgeführt. Abbildung 2.13 A zeigt exemplarisch die Produkte der Primer-Extension Analyse aus pT0, pC1, pC2 und pC3 transformierten und bei 30°C inkubierten Zellen. Hierbei ist reduzierte zeitliche Abnahme der Leaderprodukte deutlich in den Mutanten C1, C2 und C3 zu erkennen. Dabei nimmt die Stabilität des Leaders mit Abnahme der Temperatur (Reduzierung von 37°C auf 30°C, Daten nicht gezeigt) sogar noch zu. Die Quantifizierung der Abbruchbanden und die daraus errechneten Halbwertszeiten betragen für den Promotor 2 im Wildtyp (T0) bei 37°C  $t_{1/2} = 69$  bzw. 144 Sekunden bei 30°C. In der C1-Mutante betragen sie unter den gleichen Bedingungen  $t_{1/2} = 85$  bzw. 201 Sekunden und bei den beiden Mutanten C2 und C3 liegt die Halbwertszeit deutlich über 5 Minuten.

Betrachtet man dagegen die bei 37°C kultivierten  $t_L$ -Mutanten, so findet man für den P2 Promotor im Wildtyp eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 63$  Sekunden, für die T4-

Mutante  $t_{1/2} = 94$  Sekunden und für die T11-Mutante  $t_{1/2} = 95$  Sekunden. Damit scheint die Erhöhung der Halbwertszeit des Leaders im hohen Maße von der Sequenz der Box C abhängig zu sein.



**Abb. 2.13:** Rifampicin-Kinetik und Primer-Extension Analyse der isolierten Gesamt RNA aus HB101. A) Analyse der Gesamt RNA aus mit pT0, pC1, pC2 und pC3 transformierten und bei 30°C inkubierten Zellen. S ist ein externer Standard. Der Bereich der Promotoren P2 bzw. P1 ist seitlich durch P1 bzw. P2 gekennzeichnet. B) Analyse der Gesamt RNA aus mit pT0, pT4 und pT11 transformierten und bei 37°C inkubierten Zellen. Spur 4 wurde bei der Bestimmung der Halbwertszeiten nicht berücksichtigt. Der zunehmende Meßzeitraum ist durch einen Balken gekennzeichnet. Die untersuchten Proben wurden nach 0, 20, 40, 60, 80, 150, 300, 900 (nur in B) Sekunden entnommen.

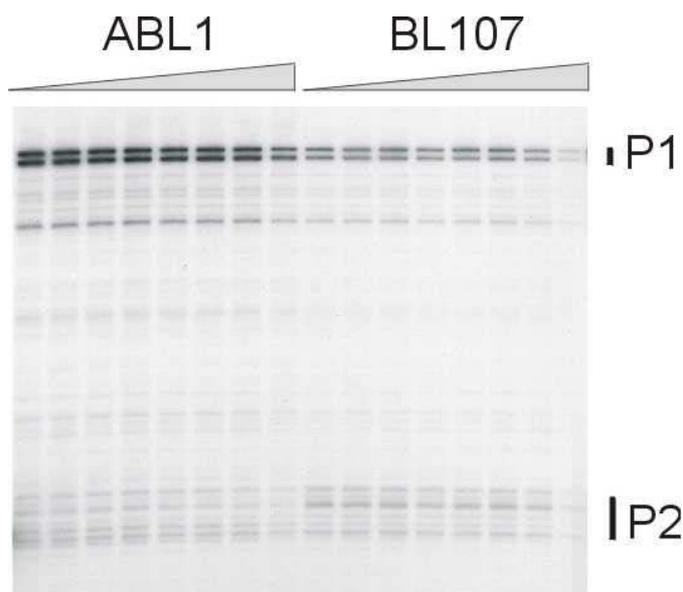
Mit den Analysen zur Stabilität des Leaders und der 16S rRNA konnte gezeigt werden, daß die Mutationen in der Box C die Stabilität des Leaders und der 16S rRNA unterschiedlich beeinflussen. Die Halbwertszeit des Leaders wird in der Mutante verlängert, während die Stabilität der 16S rRNA herabgesetzt wird.

### 2.4.2.2. RNase III<sup>-</sup>-Stamm

Um zu zeigen, ob die Halbwertszeit des Leaders von der Anwesenheit der RNase III abhängt, wurde Gesamt RNA aus RNase III defiziente Stämmen isoliert und analysiert.

Da die Box C zusammen mit dem stromabwärts der 16S rRNA gelegenen Spacer das initiale Prozessierungssignal für die RNase III ausbildet, wurden untransformierte RNase III<sup>-</sup>-Stämme (ABL1 und BL107) eingesetzt. Diese zeichnen sich nicht nur durch das Fehlen einer RNase aus, sondern ABL1 hat zusätzlich noch eine RNase P-Defizienz (Tab. 2.5) und im Stamm BL107 fehlt neben der RNase III noch die RNase I. Daher kann ein Einfluß dieser RNasen nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.14 gezeigt.

In beiden RNase III<sup>-</sup>-Stämmen wurden dabei Halbwertszeiten des Leaders erreicht, die deutlich über dem Meßzeitraum von 15 Minuten lagen.



**Abb. 2.14:** Rifampicin-Kinetik und Primer-Extension Analyse isolierter Gesamt RNA aus RNase III<sup>-</sup>-Stämmen. Der Bereich der Promotoren 2 bzw. 1 ist seitlich durch P1 bzw. P2 gekennzeichnet. Der zunehmende Meßzeitraum ist durch einen Balken gekennzeichnet. Die untersuchten Proben wurden nach 0, 20, 40, 60, 80, 150, 300, 900 Sekunden entnommen.

## 2.5. Produktanalyse über Northern-Blot

Die bei der Rifampicin-Kinetik isolierte Gesamt-RNA diente gleichzeitig auch der Produktanalyse über Northern-Blot. Es wurde untersucht ob auf Grund der Box C-Mutation in der Mutante zusätzliche oder andere Maturierungsprodukte als im Wildtyp detektierbar sind. Diese könnten Aufschluß über eine mögliche Funktion des Leaders geben und Hinweise auf die bisher wenig verstandenen rRNA-Abbau Mechanismen liefern. Aus diesem Grund wurde die Methode der Northern-Blot Analyse gewählt, da auf diese Weise die gleiche rRNA systematisch mit unterschiedlichen

radioaktiv markierten Sonden analysiert werden konnte. Um die Spezifität der Oligonukleotid-Sonden überprüfen zu können und um entsprechende Längenstandards zur Verfügung zu haben, wurden neben der zu untersuchenden Gesamt-RNA zusätzlich noch vier *in vitro* Transkripte des Leaders eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Leader-Transkript ab dem Promotor 2 (172 nt), den Leader ab Promotor 2 mit 84 nt der 16S rRNA (257 nt), den Leader ab dem Promotor 2 mit der kompletten 16S rRNA (1715 nt) und die 16S rRNA ohne Leader (1542 nt), die als Standard eingesetzt wurden.

Für die Analysen wurden wie unter 6.3.7 beschrieben 10 µg der isolierten Gesamt-RNA über ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebロットet, an diese mit UV-Licht fixiert und anschließend mit entsprechend gewählten Sonden analysiert. Die Analyse teilt sich in Produktanalysen aus dem mit den pC-Plasmiden transformierten Stamm HB101 und in Untersuchungen der Produkte aus RNase III defizienten Stämmen auf.

### 2.5.1. Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus HB101

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus dem Wildtyp-Stamm HB101 mit dem mutierten (C3) und unmutierten (T0) Plasmid untersucht. Dabei wurden RNA-Proben aufgetragen, die 20, 60, 150 und 300 Sekunden nach Rifampicin-Zugabe aus den Zellen isoliert worden waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.15 A-D dargestellt.

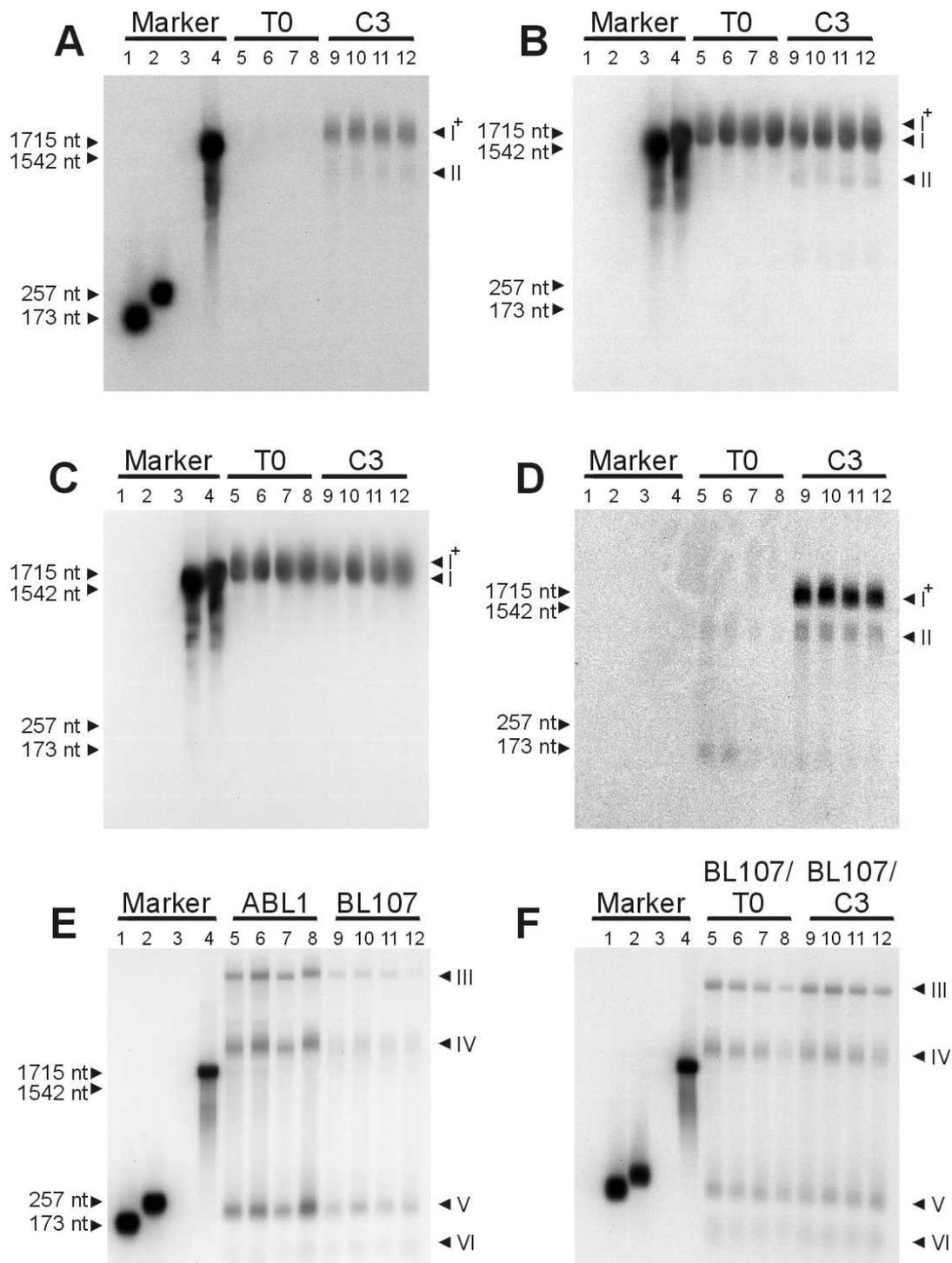
Betrachtet man zunächst die Hybridisierung Abbildung 2.15 A mit dem Leader Oligonukleotid #1400 (hybridisiert gegen L-C56 bis L-A38), so zeigt sich, daß im Wildtyp schon nach wenigen Sekunden kein Leader mehr nachweisbar ist. Dies liegt daran, daß die Auflösung des Northern-Blots unter der einer Primer-Extension Analyse liegt. Im Gegensatz dazu findet man in der C3-Mutante zwei Signale, die in der Abbildung mit I<sup>+</sup> und II gekennzeichnet sind. Bei dem mit I<sup>+</sup> gekennzeichneten Signal handelt es sich um unprozessierte 16S rRNA, da das Produkt noch leicht oberhalb der Markerbande (1715 nt) in Spur 4 läuft. Es muß sich dabei um ein 16S rRNA-Produkt handeln, das sowohl vom Promotor 1, als auch vom Promotor 2 gestartet sein könnte, auf jeden Fall noch den unprozessierten Leader besitzt. Über das 3'-Ende dieses Produktes gibt diese Analyse jedoch keinen weiteren Aufschluß. Das detektierte Produkt II ist deutlich schwächer (etwa Faktor 5) verglichen zum Produkt I<sup>+</sup> und läuft unterhalb der reinen 16S rRNA Markerbande (1542 nt) in Spur 3. Mittels eines Dot Plots konnte die Länge dieses zusätzlich auftretenden Produktes auf etwa 1220 nt bestimmt werden. Da die Transkription der ribosomalen rRNA nur an den beiden Tandempromotoren P1 oder P2 starten kann, sollte der Längenverlust auf Grund einer Verkürzung am 3'-Ende zu suchen sein. Daher wurde in Abbildung 2.15 B eine Oligonukleotid-Sonde (#5a) eingesetzt, die komplementär zu den Positionen C883

bis C866 der 16S rRNA ist. Die Sonde hybridisiert also etwa 1050 Nukleotide stromabwärts des Promotors 2 und sollte ebenfalls das Hybridisierungssignal des Produktes II zeigen. Zudem sollte auch die prozessierte 16S rRNA des Wildtyps detektierbar sein. Wie schon in Abbildung 2.15 A zu sehen war, findet man dieselben Produktbanden. Zusätzlich ist nun aber die prozessierte 16S rRNA im Wildtyp (Produkt I) sichtbar. Betrachtet man nun die Intensitäten und Bandenbreite zwischen Wildtyp und Mutante, so ist festzustellen, daß sich die Produkte I und I<sup>+</sup> nicht auflösen lassen. Ferner sind die Signalintensitäten dieser Produkte zwischen Wildtyp und Mutante vergleichbar, ebenso die Intensität des Produktes II in Abbildung 2.15 A und B. Dies zeigt, daß auch in den Spuren 9-12 der Mutante prozessierte 16S rRNA vorliegen muß.

Wählt man im Folgenden eine Oligonukleotid-Sonde, die weiter stromabwärts zum Promotor 2 hybridisiert (C912 bis C893, Oligonukleotid 5b), so ergibt sich das in Abbildung 2.15 C dargestellte Hybridisierungsmuster. Dabei ist das zusätzliche Produkt II nicht mehr detektierbar, hingegen aber die Produkte I und I<sup>+</sup> wie in Abbildung 2.15 B. Damit liegt das 3'-Ende des in der Mutante auftretenden Produktes II zwischen den Positionen C866 und C893 der 16S rRNA.

Um neben dem 3'-Ende des Produktes II auch Aufschluß über das 5'-Ende zu erhalten, wurde auch mit einer Oligonukleotid-Sonde (#3.2-P1) hybridisiert, die direkt stromabwärts des Promotors 1 hybridisiert (Abbildung 2.15 D). Hierbei kann die Sonde zwar nicht mehr an die Marker-RNA hybridisieren, jedoch noch an leaderhaltige Produkte, die vom Promotor 1 gestartet wurden. Nach der Hybridisierung konnte erneut das Produkt I<sup>+</sup> sowie das zusätzliche Produkt II detektiert werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß das Produkt II vom Promotor 1 gestartet wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß in der gleichen Bande auch Produkte vorliegen, die vom Promotor 2 gestartet wurden.

Eine weitere Hybridisierung mit einer Oligonukleotid-Sonde (#3.0-P1), die stromaufwärts des +1-Starts des Promotors 1 hybridisiert, ergab erwartungsgemäß keine Hybridisierungssignale mehr.



**Abb. 2.15:** Northern-Blot Analyse der bei der Rifampicin-Kinetik isolierten Gesamt RNA. A-D) Gesamt RNA aus transformiertem HB101. Spur 1-4 zeigt unterschiedliche Marker RNA, die schon in Abbildung 2.1 eingeführt wurde. Die Zeit nach Rifampicin Zugabe entsprach 20 Sekunden (Spur 5, 9), 60 Sekunden (Spur 6, 10), 150 Sekunden (Spur 7, 11) und 300 Sekunden (Spur 8, 12). Für die Hybridisierung wurde in A) das Oligonukleotid #1400 (L-C56 bis L-A38), in B) das Oligonukleotid #5a (C883 bis C866), in C) das Oligonukleotid #5b (C912 bis C893) und in D) das Oligonukleotid 3.2-P1 eingesetzt. Das Oligonukleotid #1400 wurde überdies auch noch in E) und F) eingesetzt, hier wurden Produkte aus nicht transformierten bzw. transformierten RNase III<sup>-</sup> Stämmen analysiert. Die detektierten Produkte sind durch römische Zahlen (I-VI) markiert und im Text beschrieben.

### 2.5.2. Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus RNase III-Stämmen

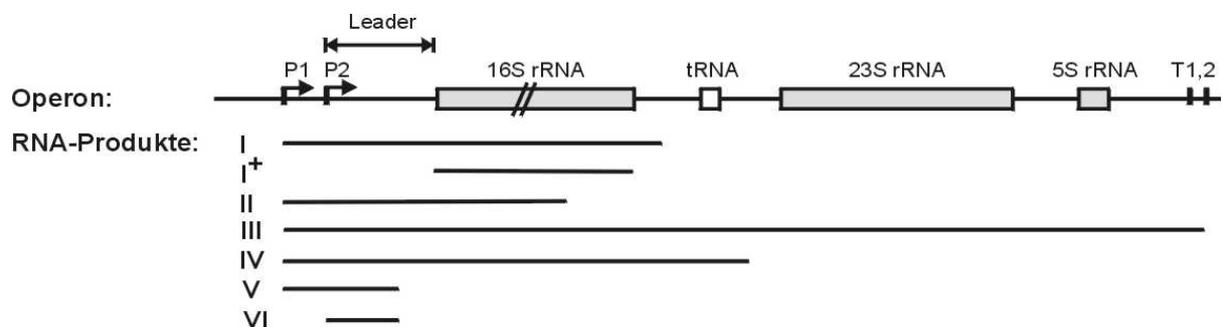
Wie schon bei der Rifampicin-Kinetik unter 6.4.2.2 beschrieben, ist die RNase III an der Prozessierung des ribosomalen Vorläufertranskripts beteiligt.

Aus diesem Grund wurden auch die Produkte aus pC3 bzw. pT0 transformierten und untransformierten RNase III-Stämmen mit einer dem Leader bzw. der 16S rRNA komplementären Sonde untersucht. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der Leader-Sonde #1400 sind in Abbildung 2.15 E und F dargestellt. Dabei handelt es sich um zwei unterschiedliche Blots mit unterschiedlicher Herkunft der Gesamt-RNA (transformiert und untransformiert).

Zunächst ist allgemein festzustellen, daß kein Unterschied zwischen transformierten und untransformierten Stämmen hinsichtlich der Produktlängen existiert. Lediglich die Intensitäten der Produktbanden aus den unterschiedlichen RNase III-Stämmen unterscheidet sich voneinander. Jedoch tauchen in diesen Analysen vier völlig andere Produkte (III - VI) als im Wildtyp-Stamm HB101 auf. Die hier nicht gezeigten Hybridisierungen mit einer zur 16S rRNA komplementären Oligonukleotid-Sonde zeigen, daß die Produkte V und VI reine Leaderprodukte sind. Es ist jedoch festzustellen, daß die Intensität der beiden Produktbanden nicht über die Zeit abnimmt.

Die Produktbanden III und IV hingegen scheinen rRNA Vorläufertranskripte zu sein. Dabei repräsentiert das Produkt III sehr wahrscheinlich das 30S Vollängenvorläufertranskript, welches das vollständig transkribierte *rrn*-Operon repräsentiert. Das Produkt IV hingegen ist ein Produkt, das deutlich über der Markerbande 1715 nt der Spur 4 läuft und sich somit auch von dem Produkt I<sup>+</sup> deutlich unterscheidet. Daher muß es sich ebenfalls um ein Vorläufertranskript handeln, das von der Enzymaktivität der RNase III unmittelbar betroffen ist. Das zusätzliche Produkt II konnte nicht detektiert werden.

Abbildung 2.16 stellt eine schematische Skizze der durch Northern-Blot Analyse detektierten Produkte I-VI dar.



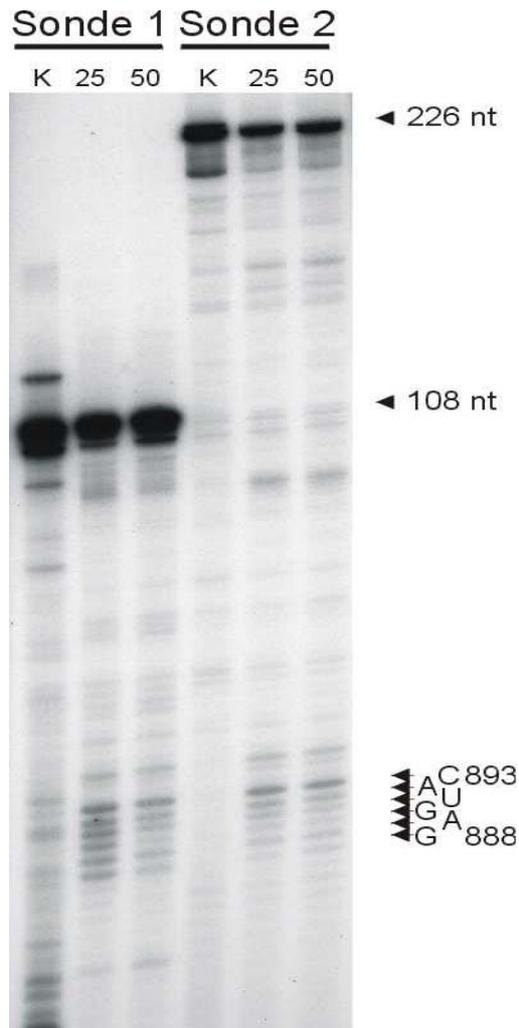
**Abb. 2.16:** Schematische Darstellung der über Northern-Blot Analyse detektierten Fragmente. Es kann jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob die Produkte vom Promotor P1 oder P2 gestartet wurden. Im Schema ist das 5'-Ende daher stets der P1-Start. Das 3'-Ende des Produktes IV wurde ebenfalls nicht genau bestimmt. Die einzelnen Sequenzabschnitte des *rrnB*-Operons sind nicht proportional dargestellt, was durch den Doppelstrich im 16S rRNA Strukturgen angedeutet ist.

### **2.6. Bestimmung des 3'-Endes des zusätzlich in der Mutante auftauchenden Fragments (Produkt II)**

Durch die Northern-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß das zusätzliche Produkt der C3-Mutante nur auftaucht, wenn mit einer Oligonukleotid-Sonde hybridisiert wird, die stromabwärts der Position C912 der 16S rRNA liegt. Zur Bestimmung des exakten 3'-Endes des Produktes II wurde eine S1 Nuklease-Protektions Analyse durchgeführt. Dazu wurden über Polymerasekettenreaktion (6.2.9.5) zwei unterschiedliche DNA-Sonden hergestellt, die komplementär zu den Sequenzbereichen G838 bis G945 (Sonde 1) bzw. G838 bis G1053 (Sonde 2) der 16S rRNA waren. Die unmarkierte Sonde wurde unter Verwendung eines Natrium-Trichloressigsäure-Puffers, wie in 6.3.8 beschrieben, mit hoher Effizienz an die Gesamt-RNA aus Wildtyp und Mutante hybridisiert. In einer nachfolgenden Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Mung Bean Nuklease das überhängende Stück der DNA-Sonde degradiert. Über eine Primer-Extension Analyse mit Klenow-Polymerase konnte dann das 3'-Ende des Produktes II exakt bestimmt werden.

Bei der Hybridisierung der Sonde mit der Gesamt-RNA sind folgende Hybride zu erwarten. Zum einen hybridisieren die beiden DNA-Stränge der jeweiligen Sonde miteinander und zum anderen entstehen DNA/ RNA-Hybride. Bei diesen DNA/ RNA-Hybriden unterscheidet sich die Länge der hybridisierten RNA. Es kann eine komplette 16S rRNA hybridisieren oder aber die verkürzte 16S rRNA des Produktes II. Nach der Hydrolyse der überhängenden Einzelstränge findet man in der anschließenden Primer-Extension Analyse im Idealfall zwei Abbruchbanden (Volllänge der Sonde bzw. Verkürzung auf die Sequenz des Produktes II).

In Abbildung 2.17 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Das 3'-Ende des Produktes II konnte mit Hilfe einer Sequenzierung exakt bestimmt werden. Dabei findet man ein Cluster von Abbruchbanden zwischen den Positionen G888 bis C893, die nicht in der mit K gekennzeichneten Kontrollspur ohne Nuklease auftreten. Das Hauptabbruchprodukt dieser Analyse wird durch eine nicht hydrolysierte Sonde repräsentiert (Abbruch bei 108 nt bzw. 226 nt).



**Abb. 2.17:** S1 Nuklease Protektions-Analyse des 3'-Endes des Produktes II. Dazu wurden über PCR zwei DNA-Sonden unterschiedlicher Länge hergestellt (Sonde 1: 838-945; Sonde 2: 838-1053). Diese wurden an die Gesamt RNA hybridisiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen Mung Bean Nuklease inkubiert (25 U bzw. 50 U). K ist die Kontrollspur in der keine Mung Bean Nuklease eingesetzt wurde. Das 3'-Ende ist durch Pfeile gekennzeichnet .

## 2.7. Verlängerung eines ternären Komplexes mit verschiedenen Protein-extrakten

Die vorangegangenen Analysen legen nahe, daß es sich bei dem unvollständigen Produkt II um ein Abbauprodukt der mutierten ribosomalen 16S rRNA handelt. Bisher konnte der Abbauweg stabiler ribosomaler RNA nur schlecht gezeigt werden. Es konnte auch kein Abbauprodukt detektiert werden. Durch die Box C-Mutanten bietet sich nun die Möglichkeit detaillierte Studien zum rRNA Abbau durchführen zu können. Daher wurde ein *in vitro* System gewählt, welches die Analyse von Prozessierungseffekten während der Transkription ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde auf die natürlichen ribosomalen Tandempromotoren zurückgegriffen. An ihnen wird die Transkription durch die *Escherichia coli* RNA-Polymerase initiiert. Allerdings ergeben sich damit zwei Probleme. Zum einen initiiert die RNA-Polymerase an beiden Promotoren, wodurch gleichzeitig zwei unterschiedliche Produkte transkribiert werden, deren Analyse damit deutlich erschwert wird. Zum anderen kommt hinzu, daß die

Polymerase im Gegensatz zur viralen T7-RNA-Polymerase stark topologieabhängig transkribiert. Dadurch kann nicht mit restringierter Matrizen-DNA gearbeitet werden, die zu „run-off“-Transkripten führt, sondern für eine effektive Transkription muß superspiralisierte DNA eingesetzt werden.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Markierung der Transkripte, da nicht alle Prozessierungsprodukte detektiert werden sollen, sondern nur diejenigen, die noch den Leader besitzen. Daher wurde wie folgt vorgegangen: der spezifische Start am Promotor 2 der Matrizen-DNA wurde durch Inkubation mit dem Dinukleotid CpC und Limitierung auf Adenosin gewährleistet. Die spezifische radioaktive Markierung des direkten 5'-Endes des Transkriptes wurde durch Einbau radioaktiver Nukleotide in einen sogenannten ternären Komplex ermöglicht, der nach seiner Aufreinigung mit nicht Nukleotiden radioaktiv verlängert wurde. Auf diese Weise wurden nur das 5'-Ende des Transkriptes spezifisch radioaktiv markiert.

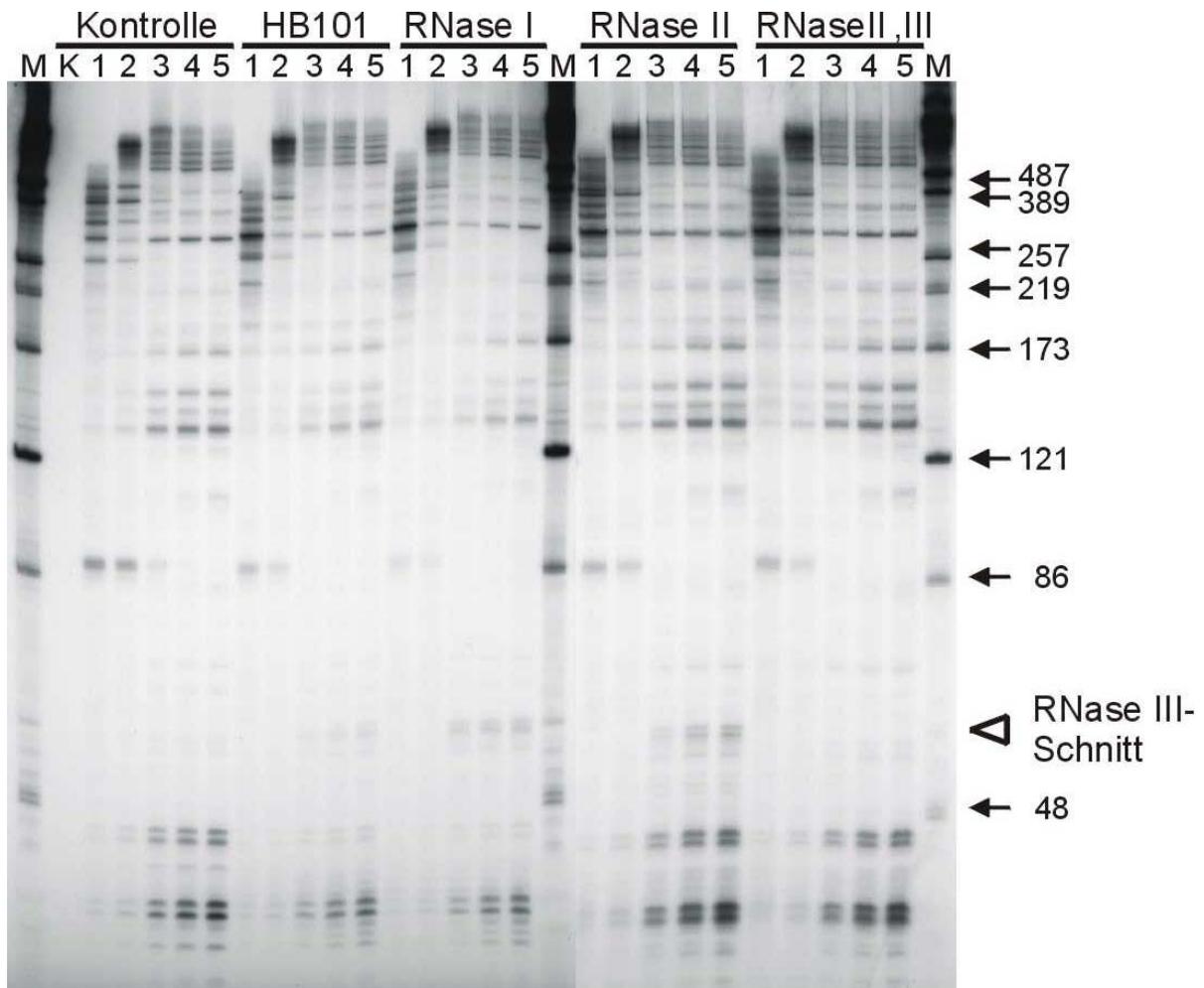
Der ternäre Komplex besteht aus der an die DNA-Matrize gebundenen RNA-Polymerase und einem kurzen, 12 Nukleotide langen RNA-Transkript. Dieser Komplex zeichnet sich durch hohe Stabilität aus, die man sich bei der Aufreinigung über eine Gelfiltration mit Sepharose 6B zu Nutze macht. Die Aufreinigung über die Gelfiltration ist nötig, um freie Polymerasen, freie DNA-Matrize und vor allem radioaktive Nukleotide zu entfernen. Überdies ermöglicht die anschließende Verlängerung des ternären Komplexes eine Synchronisation der Transkription und damit eine bessere Analyse der Prozessierungsschritte.

Mit der zuvor beschriebenen Methode wurden ternäre Komplexe von Wildtyp- und C3-Mutante hergestellt. Diese wurden anschließend wie unter 6.3.14 beschrieben unter Zugabe nicht-radioaktiver Nukleotide und unterschiedlichen Proteinextrakten verlängert, zeitabhängig Proben entnommen und diese auf einem 8%-igen Sequenzgel analysiert.

Die dazu eingesetzten Proteinextrakte wurden aus unterschiedlichen RNase defizienten Stämmen isoliert, die in Tabelle 2.5 aufgeführt sind. Während der Transkription wurde in einem Ansatz zusätzlich aufgereinigte RNase III eingesetzt. Exemplarisch für diese Analyse ist die Autoradiographie der Wildtyp-Produkte in Abbildung 2.18 gezeigt.

Stamm	RNase Defizienz
ABL1	III, P
Bummer $\lambda$ dfus4	M16
CA265 I <sup>-</sup>	I
CA265 II <sup>-</sup>	II
CA265 II <sup>-</sup> , III <sup>-</sup>	II, III
CA244 ams-tet <sup>S</sup>	E
CA244 cafA	G
CA244 T <sup>-</sup>	T
CA244 PNP <sup>-</sup>	PNPase
MRE 600	I

**Tab. 2.5:** Liste der eingesetzten RNase defizienten Stämme, die bei der Isolation der Proteinextrakte eingesetzt wurden. Die aus diesen Stämmen isolierten Gesamt-Proteinextrakte wurden bei der Verlängerung des ternären Komplexes eingesetzt.



**Abb. 2.18:** Verlängerung des ternären Komplexes in Anwesenheit von Gesamtprotein der in Tab. 2.4 aufgeführten Stämme zur Identifikation von Prozessierungseffekten *in vitro*. M zeigt einen RNA-Standard, dessen Fragmentlängen seitlich des Gels dargestellt sind. Der offene Pfeil zeigt die RNase III Prozessierungsstelle. „Kontrolle“ zeigt die Verlängerung des ternären Komplexes ohne Zusatz von Gesamtprotein. K zeigt den ternären Komplex vor der Verlängerung (Bande außerhalb des dargestellten Bereiches). Spur 1 bis 5 zeigt die verlängerte rRNA nach 20, 60, 300, 1000 und 1800 Sekunden.

Die Analyse zeigt, daß in den Kinetiken, in denen RNase III-freie Proteinextrakte benutzt wurden (Kontrolle und RNase II, III), wie erwartet kein Prozessierungsprodukt an der mit RNase III-Schnitt gekennzeichneten Position erfolgt. Die Suche nach weiteren Nukleasen, die an Maturierungs- bzw. Degradationsschritten des Leaders beteiligt sind, erfolgte rein statistisch. Da bisher keine Nukleasen diesbezüglich beschrieben worden sind, wurden die oben beschriebenen Proteinextrakte gewählt, in der Hoffnung weitere Kandidaten bestimmen zu können. Leider konnte in allen Kinetiken bis auf den RNase III-Schnitt kein weiterer Unterschied detektiert werden. Die beiden Banden, die unter der 48-er Standardbande laufen und deren Intensität über die Zeit zunimmt, scheinen Abbauprodukte zu sein, die nicht auf die eingesetzten Proteinextrakte zurückzuführen sind, da diese Banden auch in der Kontrolle ohne Extrakt auftreten. Vergleichbares gilt für die zeitlich zunehmende Bandenintensität oberhalb der 121-er Standardbande. Hingegen handelt es sich bei der abnehmenden Bandenintensität auf Höhe der 86-er Standardbande um eine Pausierungsstelle der RNA-Polymerase. Bei der Verlängerung des ternären Komplexes erhält man ab dem 5 Minutenwert bereits das RNase III-Prozessierungssignal. Die 16S rRNA dagegen wird schon nach weniger als einer Minute in dieser *in vitro* Analyse vollständig transkribiert.

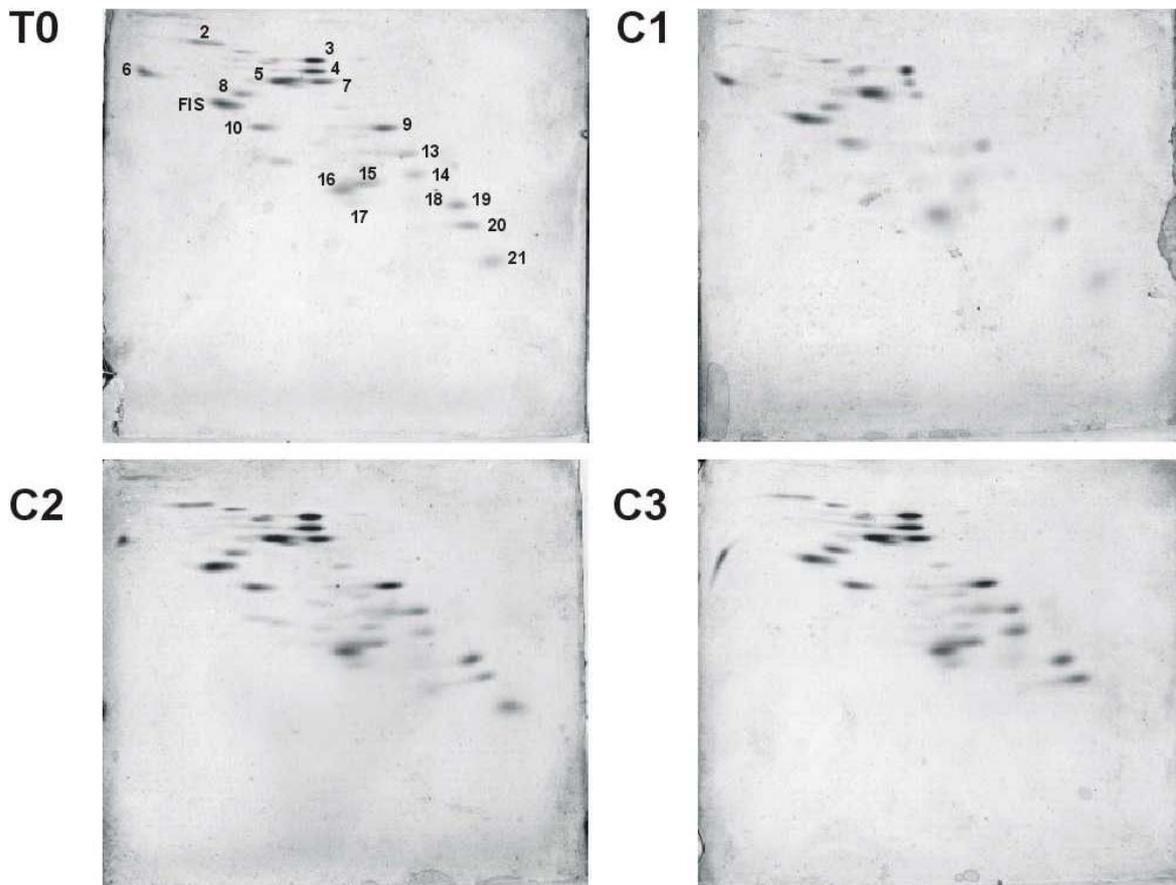
In den hier nicht dargestellten Analysen der Mutante ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen. Im Bereich des RNase III-Schnittes zeigt sich jedoch ein kleiner nukleaseunabhängiger Unterschied. Hier tauchen in der Kontrolle ohne Proteinextrakt mehrere Banden auf, die eine weitere Analyse zusätzlich erschwerten und möglicherweise auf strukturelle Abbrüche zurückzuführen sind.

Daher ergab die Analyse über einen verlängerbaren ternären Komplex zunächst keine weiteren Aufschlüsse über Beteiligung anderer Nukleasen an der Maturierung der ribosomalen RNA.

## 2.8. Proteinanalyse von Wildtyp- und mutierten 30S-Untereinheiten

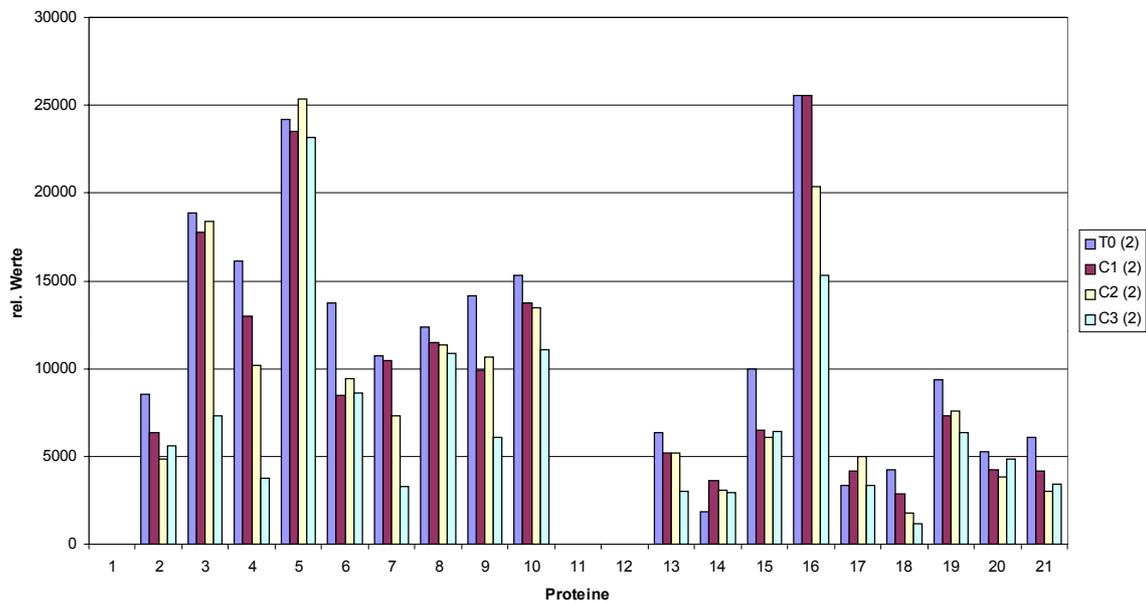
Um neben strukturellen-, funktionellen-, stabilitätsbestimmenden und kinetischen Informationen auch Aufschluß über Veränderungen im Proteinmuster der ribosomalen 30S Untereinheit zu erhalten, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen der verschiedenen Box C-Mutante durchgeführt. Dazu wurden aus dem mit den Box C-Mutanten transformierten Stamm TA554, der keine chromosomal codierten *rrn*-Operons mehr besitzt, die ribosomalen Untereinheiten isoliert. Dies wurde wie schon für die *in vivo* Modifikation beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen ebenfalls bei 37°C bzw. 30°C herangezogen wurden. Die isolierten 30S Untereinheiten besitzen also ausschließlich 16S rRNA, die vom Plasmid codiert wurde. Nach Bestimmung der Konzentration eines Aliquots aufgereinigter 30S Untereinheiten wurde eine defi-

nierte Menge von 0,75 bzw. 1 OD 30S Untereinheiten in einem Volumen von 95  $\mu$ l mit 5  $\mu$ l RNase T1 [100 U/ $\mu$ l] gemischt und wie unter 6.2.6.5 beschrieben für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet. Bevor die Proben mit dem Fuchsinpuffer versetzt wurden, versetzte man diesem zuvor das Protein FIS als Standard, um bei der Auswertung die Pipettier- und Färbeungenauigkeiten so gut wie möglich ausgleichen zu können. Die Probe wurde dann in der ersten Dimension nach ihrer Ladung aufgetrennt und anschließend auf die zweite Dimension aufpolymerisiert und nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Abbildung 2.19 zeigt exemplarisch die 2D-Gele der 2. Analyse aus isolierten Proteinen der 30S Untereinheiten, die bei 30°C angezogen wurden. Die Abbildung 2.20 zeigt die graphische Auswertung der quantifizierten und auf FIS normierten Protein-Spots der 30S Untereinheiten, die bei 37°C angezogen wurden (2. Analyse). Ergebnisse weiterer Analysen finden sich im Anhang der Arbeit.

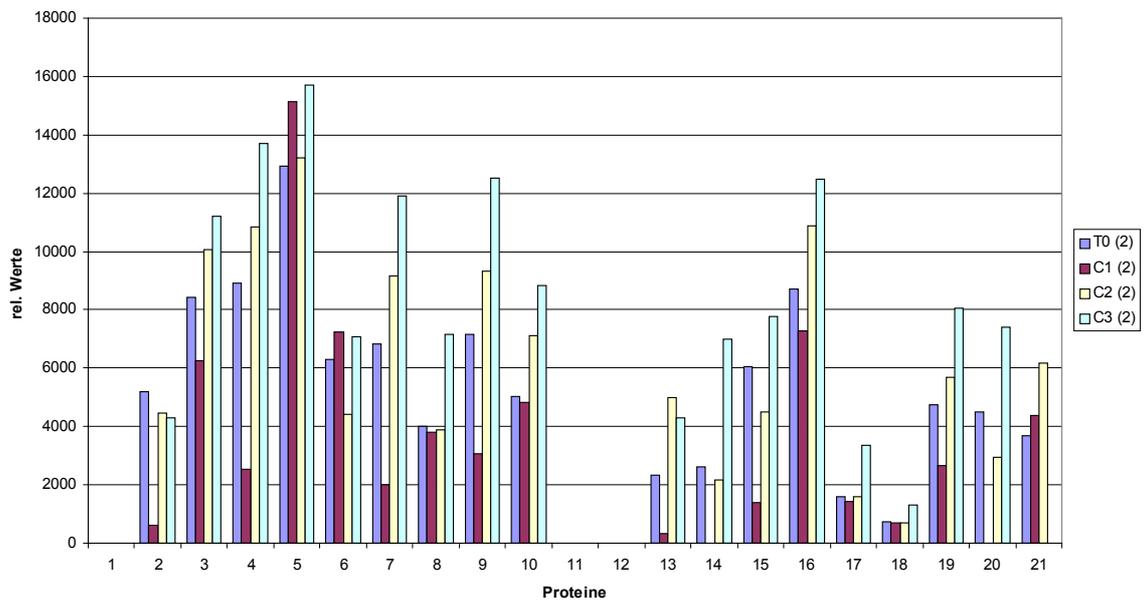


**Abb. 2.19:** 2D Gelelektrophorese isolierter 30S Untereinheiten aus dem Stamm TA554. Die Zellen wurden zuvor bei 30°C inkubiert. Die ribosomalen Proteine der isolierten 30S Untereinheit aus dem Wildtyp sind exemplarisch beschriftet. Als interner Standard zur Normierung von Auftragsungenauigkeit und Färbeunterschieden wurde das Protein FIS verwendet. Es wurden jeweils 1 OD<sub>600</sub> aufgetragen.

### A) 30S Untereinheit aus 37°C gewachsenen Zellen (2. Analyse)



### B) 30S Untereinheit aus 30°C gewachsenen Zellen (2. Analyse)



**Abb. 2.20:** Graphische Darstellung der quantifizierten und auf den FIS-Standard normierten Protein-Spots. S1, S11 und S12 konnten nie detektiert werden. Dargestellt sind die Ergebnisse der 2. Analyse von 30S Untereinheiten aus 37°C bzw. 30°C inkubierten Zellen. Die übrigen Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

Die 2D Gel-Analyse wurde bei beiden Temperaturen für alle drei Mutanten und den Wildtyp jeweils zwei mal durchgeführt. Da in der ersten Meßreihe von den isolierten Untereinheiten nur wenig Material eingesetzt werden konnte, ist es teilweise nicht möglich alle Protein-Spots genau zu quantifizieren, da diese sich bezüglich ihrer Intensität an der Nachweisgrenze befinden und der Quantifizierungsfehler dadurch sehr groß werden kann. Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung ein stärkeres Gewicht auf die zweite Meßreihe gelegt, die auch in Abbildung 2.19 exemplarisch gezeigt ist. Die übrigen Gele sind im Anhang A1 abgebildet.

Es muß zunächst erwähnt werden, daß sich der kältesensitive Phänotyp in dem Stamm TA554 nicht in derselben Form ausgeprägt hat wie im Wildtyp-Stamm HB101. Alle drei Mutanten zeigen einen kältesensitiven Phänotyp, jedoch besaß die mit dem Plasmid C1 transformierte Mutante die kleinste Wachstumsrate.

Die Analyse wurde mit 30S Untereinheiten durchgeführt, die aus Zellen isoliert wurden, die bei 30°C- bzw. 37°C inkubiert wurden. In keiner der Analysen konnten die Proteine S1, S11 und S12 nachgewiesen werden.

Bei 37°C zeigt sich das Proteinmuster der Mutanten verglichen zum Wildtyp relativ identisch. Die am stärksten vertretenen Protein-Spots sind S3, S5 und S16, gefolgt von S4, S6, S7, S8, S9 und S10. Die schwächsten Protein-Spots wurden für S14, S17, S18, S20 und S21 bestimmt, dazwischen liegen S2, S13, S15 und S19. Unterschiede im Proteinmuster bzw. den Proteinintensitäten konnten für die Proteine S3, S4, S7, S9 und S16 gefunden werden. Vor allem in der C3-Mutante macht sich bei diesen Proteinen der Unterschied zum Wildtyp bemerkbar. Dabei ist stets eine Abnahme der Proteinbindung zu beobachten. Eine etwas schwächere Tendenz dieser Abnahme deutet sich auch für einige andere Proteine an, jedoch bewegen sich hier die Abweichungen im Rahmen des Fehlers und werden deshalb nicht in die Bewertung einbezogen.

Etwas schwieriger ist die Beschreibung der Ergebnisse der 30S Untereinheiten aus 30°C-Zellkulturen. Hier wird wie oben schon beschrieben der zweiten Meßreihe ein stärkeres Gewicht gegeben.

Die Intensität der Protein-Spots zueinander ist vergleichbar zu der 37°C-Analyse. Dabei sind die Proteine S3, S4, S5, S7, S9 und S16 am stärksten, gefolgt von S2, S6, S8, S10, S14, S15, S19, S20, S21. Am schwächsten sind die Protein-Spots von S13, S17 und S18. Ein völliges Fehlen von Protein-Spots konnte in der C1-Mutante für S14 und S20 bzw. in der C3-Mutante für S21 festgestellt werden.

Überdies läßt sich für die C1-Mutante eine „über-alles“-Abnahme der meisten Protein-Spots feststellen. Dies bestätigen teilweise auch die Ergebnisse der ersten Meßreihe. Vor allem die Proteine S2, S4, S7, S13, S14, S20 und S21 scheinen davon betroffen zu sein. Die Proteine S3, S9, S15, S19 wurden auf Grund der ersten Meßreihe nicht als unterrepräsentiert eingestuft.

Das gegenteilige Bild zeigt sich dagegen in der C2- und C3-Mutante (C2<C3). Tendenziell scheint hier die mutierte rRNA eine bessere Besetzung durch die ribosomalen Proteine zu erfahren. Dazu gehören die Proteine S4, S7, S13, S14. Wie auch für die C1-Mutante gilt, daß auf Grund der Ergebnisse der ersten Meßreihe die Proteine S3, S8, S9, S10, S16, S17, S19 und S20 nicht als überrepräsentiert mit einbezogen werden können. Daher bezieht sich die Diskussion diesbezüglich nur auf die sicher festgestellten Unterschiede. Die Daten der 2D-Gele der 1. Analyse sind in Abbildung A2 (Anhang) angefügt.

Durch die 2D-Gele konnte gezeigt werden, daß Mutationen in der Box C des Leaders auch Einfluß auf Veränderung im ribosomalen Proteinmuster zeigen. Dabei sind vor allem zwei primär bindende Proteine (S4 und S7) betroffen. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich auf strukturelle Veränderungen der 16S rRNA auf Grund der Mutation zurückzuführen.

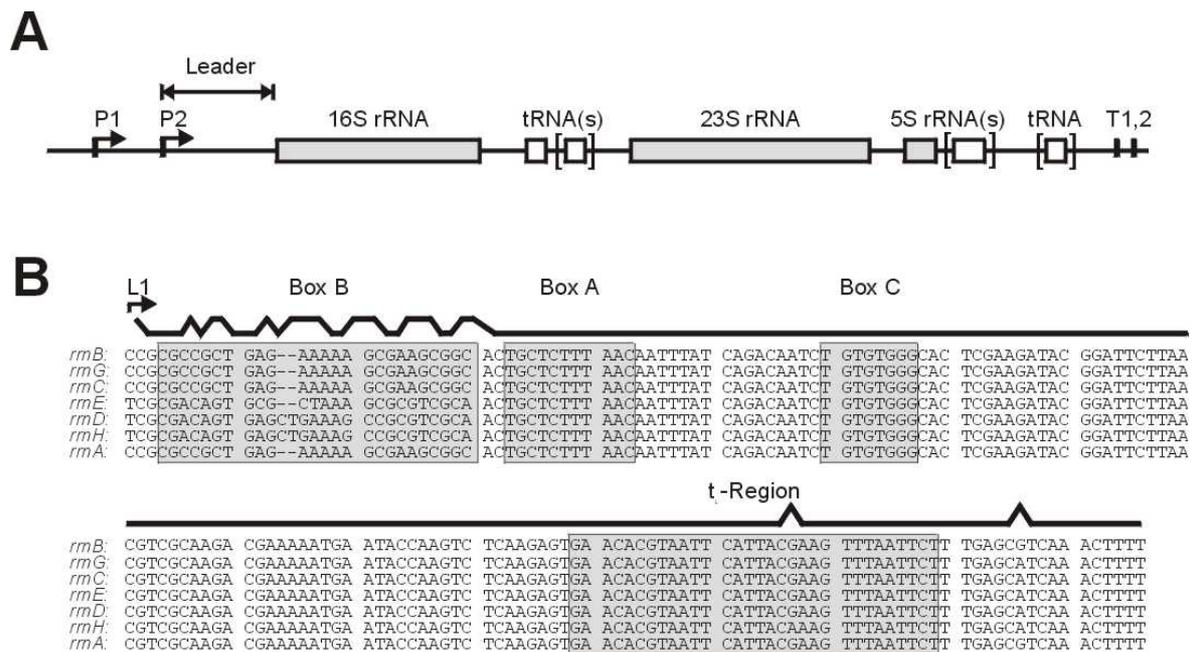
### 3. Diskussion

#### 3.1. Der Leader - ein kleines Molekül mit vielen Funktionen -

Das Genom von *Escherichia coli* besitzt sieben ribosomale Operons mit nahezu gleicher Organisation (Ellwood et al., 1982). Jedes dieser Operons codiert für die 16S, 23S und 5S rRNA. Zwischen der 16S und der 23S rRNA, dem sogenannten Spacer-Bereich, werden operonspezifisch, zum Teil essentielle tRNAs codiert. Stromabwärts der 5S rRNA liegt ein weiterer Bereich, der je nach Operon für eine weitere 5S rRNA (nur *rrnD*) bzw. weitere tRNAs codieren kann (Abbildung 3.1 A). Alle bakteriellen ribosomalen RNA-Gene werden als lange Vorläufertranskripte co-transkribiert. Dabei werden auch die zusätzlichen RNA-Bereiche wie der Leader, Spacer-Sequenzen und eine abschließende Trailer-Sequenz transkribiert. Diese extraribosomalen Sequenzen werden zum Teil während der Transkription durch komplexe Prozessierungsschritte entfernt und sind normalerweise im assemblierten Ribosom nicht mehr nachweisbar.

Bemerkenswert ist die hohe Konservierung der Leadersequenz stromabwärts des Promotors 2 bis zum 5'-Ende der 16S rRNA. Die Sequenzen zwischen den beiden Tandempromotoren hingegen sind nicht konserviert. Das Alignment der Leadersequenzen aller ribosomalen Operons stromabwärts des Promotors 2 ist in Abbildung 3.1 B dargestellt. Die Linie über der Sequenz zeigt den Grad der Konservierung an. Die grauen Kästchen innerhalb des Leaders kennzeichnen Strukturelemente, die Sequenzhomologien zum Antiterminationselement des Bakteriophagen  $\lambda$  (*nut*-Boxen) bzw. zum Rho- und NusA abhängigen Terminator „trpt“ ( $t_L$ -Region) besitzen (Kington et al., 1981). Innerhalb dieser Sequenzelemente wurden Mutationen eingeführt, wobei in früheren Arbeiten nur die  $t_L$ -Mutanten untersucht wurden (Pardon, 1994; Balzer, 1998; Besancon, 1999; Zirwes, 2001). Diese Untersuchungen zeigten transiente Wechselwirkungen des Leaders mit der 5'-Seite der 16S rRNA, die eine chaperonähnliche Funktion bei der Faltung und Assemblierung zu 30S Partikeln vermittelt. Auf welche Weise dies geschieht und welche Funktionen dem Leader bei anderen Prozessen innerhalb der Zelle noch zukommen, konnte mit Hilfe der  $t_L$ -Mutanten jedoch nur in Teilaspekten beschrieben werden.

Daher soll in dieser Arbeit ein weiteres Strukturelement des Leaders (Box C) und dessen Einfluß auf nachfolgende Sequenzen sowie Maturierungsprozesse analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden in der „*nut*“-ähnlichen Box C Sequenz Mutationen gewählt (Eberle J., 1987), die mittels Basenaustausch durch Natriumbisulfit-Mutagenese (Schortle et al., 1983) hergestellt wurden. Die Mutationen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung einer rRNA-Transkriptionseinheit und das Alignment aller sieben chromosomal codierten Operons. A ist eine nach Zacharias et al., 1991, veränderte Darstellung einer ribosomalen Transkriptionseinheit. P1, P2 bzw. T1, 2 stellen die beiden Tandempromotoren bzw. Terminatoren dar. Der Leader-Bereich ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, die Strukturgene sind grau unterlegt. Die in einigen Operons zusätzlich auftretenden Strukturgene oder tRNAs sind eingeklammert. B zeigt das Alignment zwischen L-1 und L-174 aller sieben ribosomalen Operons. Der Balken oberhalb des Alignments gibt die Konservierung der Sequenzen an. Die grau unterlegten Bereiche entsprechen den „*nur*“-ähnlichen Elementen Box B, A und C bzw. der  $t_L$ -Region.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aspekte des Leaders im Vergleich zu den Box C-Mutanten untersucht:

- 1) Ist die Box C-Mutation im Leader für Zellen, die ausschließlich diese Mutation besitzen, letal?
  - Wenn ja, auf welcher Ebene führen diese Faktoren zur Letalität (strukturelle Ursache, Prozessierungsdefekte, Assemblierungsdefekte)?
- 2) Wenn die Box C-Mutation auch ohne chromosomalen Hintergrund durch intakte Wildtyp 16S rRNA „nur“ zu einem kältesensitiven Phänotyp führt, auf welcher Ebene manifestieren sich dann die Auswirkungen der Box C-Mutationen?
  - Geschieht dies auf Ebene der Struktur und somit der Wechselwirkung des Leaders mit der 16S rRNA?
  - Kann sich der Phänotyp auch aus der Unfähigkeit primär bindende ribosomale Proteine zu assemblieren ergeben?
- 3) Verändert die Box C-Mutation die Prozessierung der rRNA durch die RNase III?

Wenn ja, welche Bedeutung kommt der exakten Prozessierung zu und welche bekannten alternativen Prozessierungswege könnten die RNase III ersetzen? Lassen sich dann in den Mutanten neue Prozessierungsintermediate detektieren?

- 4) Wenn die Struktur des Leaders oder der 16S rRNA beeinflußt sein sollte, ist dann auch die Stabilität der RNA signifikant betroffen?

Wenn ja, lassen sich dann Abbauprodukte stabiler ribosomaler RNA detektieren?

### **3.2. Die Box C-Mutationen verursachen keinen letalen Phänotyp. Ribosomen mit mutierter 16S rRNA sind überdies biologisch aktiv.**

Die Transformation der Plasmide pT0, pC1, pC2 und pC3 erfolgte auch in den Stamm TA554, der kein funktionelles chromosomales rRNA-Operon mehr besitzt. Dieser Stamm enthält wie bereits zuvor beschrieben (2.2.2 und 2.3) zwei Plasmide. Ein Plasmid codiert für die essentiellen tRNAs, die durch Deletion der chromosomalen *rrn*-Operons entfernt wurden (siehe auch Abbildung 3.1), auf dem anderen Plasmid befindet sich ein *rrn*-Operon aus *Salmonella*. Da das neu eingebrachte Plasmid einen anderen Antibiotikamarker besitzt als das „*Salmonella*-Plasmid“, wurde nach der Transformation ein Selektionsdruck zu Gunsten des neu eingebrachten Plasmids ausgeübt, so daß das „*Salmonella*-Plasmid“ ersetzt werden konnte. Alle Box C-Transformanden zeigten, wie auch im Wildtyp-Stamm HB101, einen kältesensitiven Phänotyp (Abbildung 2.9; Schäferkordt, 1998). Jedoch war die Ausprägung dieses Phänotyps für die C1-Mutationen am stärksten. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Mutation im Leader für die Zelle auch bei niedrigen Temperaturen nicht letal ist. Dieser Befund ist essentiell für die Beurteilung der in dieser Arbeit gesammelten Daten und deren Interpretation. Mit dieser Beobachtung können Modelle ausgeschlossen werden, die den kältesensitiven Phänotyp durch eine irreversible Blockade der mRNA durch funktionslose Ribosomen zu erklären versuchen. Im Wildtyp-Stamm, der neben der plasmidcodierten rRNA zusätzlich noch die chromosomal codierten Operons besitzt, würde sich ein solcher Effekt möglicherweise nur in dem zu beobachteten kältesensitiven Phänotyp äußern. Im Stamm TA554 hätte ein solcher Effekt in jedem Fall eine Teilungsunfähigkeit der Zelle zur Folge.

Diese Ergebnisse werden darüber hinaus durch den Befund unterstützt, daß Ribosomen aus den Mutanten auch in Polysomen zu finden sind. Dies zeigten die Ergebnisse der Polysomenanalyse und der Spec-Kontrolle aus den unterschiedlichen Fraktionen ribosomaler Untereinheiten (Tabelle 2.1). Dort konnte ein plasmidärer Anteil von etwa 80% bestimmt werden.

### **3.3. Basenaustausche in der Box C führen zu weitreichenden Strukturveränderungen im Leader und der 16S rRNA**

Frühere Arbeiten an den  $t_L$ -Mutanten (Pardon et al., 1995, Besancon et al., 1999) konnten bereits zeigen, daß der Leader mit der 5'-Region der 16S rRNA eine Wechselwirkung eingeht. Dabei scheint der Leader eine Platzhalterfunktion im Bereich der 5'-Region einzunehmen (U17-A19), der im weiteren Verlauf der Transkription die „long-range“-Wechselwirkung zu den entfernt liegenden Nukleotiden U916-A918 ausbildet. Dadurch wird der sogenannte zentrale Pseudoknoten gebildet, der die drei Hauptdomänen der 16S rRNA räumlich ausrichtet (1.2). Die Box C ist ein nur 8 Nukleotide umfassendes Sequenzelement, das aber großen Einfluß auf die Ausbildung dieser zentralen Struktur hat (Dennis et al., 1997). Bei vollständiger Transkription der 16S rRNA und beim Übergang der Transkription in den Spacer-Bereich, bildet der Leader zusammen mit dem Spacer das initiale Prozessierungssignal für die RNase III aus (Abbildung 1.4). Dieser Schnitt initiiert aber gleichzeitig auch den Abbau des Leaders. Daher übernimmt der Leader vom Transkriptionsbeginn an bis zur Transkription des Spacers unterschiedliche Funktionen. Die Funktion einer RNA ist aber in hohem Maße von der eingenommenen Struktur des Moleküls abhängig. Aus diesem Grund wurden RNA-Strukturanalysen der Box C-Mutante (C3) durchgeführt, die Aufschluß über die transiente Wechselwirkung des Leaders ermöglichen sollten. Dabei wurde auf die drei Bereiche Leader, 5'-Region der 16S rRNA und den zentralen Pseudoknoten besonderes Augenmerk gerichtet, die im folgenden zunächst einzeln diskutiert werden sollen.

#### **3.3.1. Einfluß der Box C auf den Leader und 5'-Region der 16S rRNA**

Die Strukturanalyse der 257 nt langen Wildtyp- bzw. mutierten Transkripte (2.2.1.1) konnte große strukturelle Übereinstimmung der Daten mit dem Leader-Modell von Pardon et al., 1995, zeigen. Zur Vereinfachung der vielen Modifikationspositionen wurden in der Tabelle A1 nur diejenigen Signale aufgeführt, in denen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante detektiert wurden. Insgesamt konnten in dem 257 Nukleotid langen Transkript 126 verschiedene Positionen modifiziert werden, wobei 18 Nukleotide der 3'-Seite auf Grund der Oligonukleotidbindung bei der Primer-Extension nicht bestimmbar waren. Bereiche, in denen strukturbedingt die Primer-Extension Reaktion abbrach, wurden ebenfalls nicht mit berücksichtigt.

Die deutlichsten Unterschiede sind in dem erweiterten Leader-Modell in Abbildung 3.2 gekennzeichnet worden. Das Modell bezieht jedoch mögliche Tertiärstrukturen nicht ein. Es ist zu berücksichtigen, daß die eingezeichneten Modifikationspositionen nicht ausschließlich in der Mutante oder dem Wildtyp zu detektieren sind. Hier kenn-

zeichnet die gewählte Farbe, ob das Signal im Wildtyp oder der Mutante stärker war. Lediglich das Kethoxal-Signal L-G63 konnte ausschließlich in der Mutante detektiert werden. Das Symbol „\*“ kennzeichnet Positionen, in denen sowohl einzelstrang- als auch doppelstrangspezifische Signale detektiert wurden. Offensichtlich können drei veränderte Bereiche beschrieben werden. Der erste Bereich betrifft die Sequenzen zwischen der Box A und der Box C (L-C32 bis L-U57). Hier kann für eine Reihe von Nukleotidpositionen eine Verstärkung des CVE-Signals in der Mutante beobachtet werden. Eine Verstärkung des CVE-Signals bedeutet eine bessere Sekundär- bzw. Tertiärstrukturausbildung. Im Strukturmodell ist dieser Bereich überwiegend einzelsträngig und zeigt somit eine deutliche Strukturveränderung in der Mutante auf. Auf Grund der Signale ist anzunehmen, daß dieser Bereich in der Mutante viel kompakter gestaltet ist als im Wildtyp. Dies könnte auch Einfluß auf die Ausbildung des Leader/ Spacer-Kontaktes und somit auf die Prozessierung durch die RNase III haben (King et al., 1986).

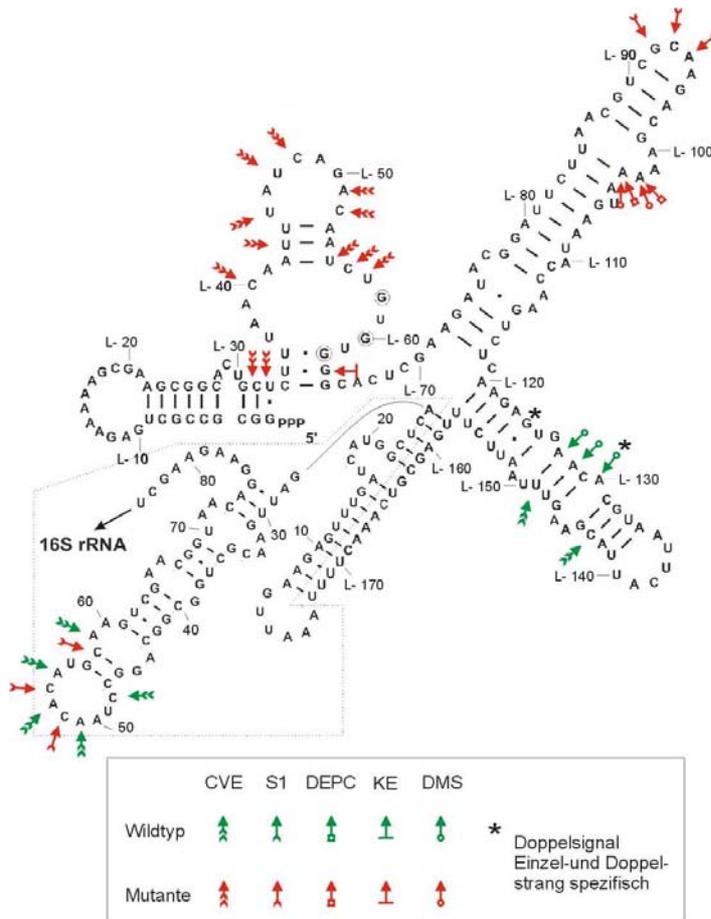
Der zweite Bereich, der sich in der Mutante strukturell vom Wildtyp unterscheidet, ist der Loop L-G92 bis L-A94 und der sich anschließende „bulch“-Loop L-A100 bis L-A103. Hier zeigen die Modifikationssignale in der Mutante eine Verstärkung der Einzelsträngigkeit.

Die dritte Region im Leader, die sich in der Mutante strukturell unterscheidet, ist die  $t_L$ -Region (L-G126 bis L-U156). Dieser Bereich ließ sich in den vorangegangenen Strukturanalysen bezüglich der Modifikationssignale nur schlecht definieren. Auch in dieser Studie sind die detektierten Unterschiede nicht mit dem in der  $t_L$ -Region vorgegebenen Strukturmodell zu erklären. Das liegt daran, daß für einige Nukleotide in diesem Bereich gleichzeitig Signale für Einzelstrang als auch für Doppelstrang detektiert werden konnten. So fallen die im Leader Modell als Einzelstrang detektierten und gekennzeichneten Signale L-A127 und L-A128 in einen Doppelstrangbereich. Das auf dem Gegenstrang liegende L-U149 bestätigt die Doppelsträngigkeit durch ein CVE-Signal. Das weist für diesen Bereich auf eine hochgradig flexible Strukturregion hin und bestärkt die Untersuchungen an den  $t_L$ -Mutanten, daß dieser Bereich den potentiellen Wechselwirkungspartner zur 16S rRNA darstellt (Zirwes, 2001; Besancon et al., 1999; Pardon et al., 1995).

Betrachtet man das erweiterte Sekundärstrukturmodell (257 nt Molekül) in Abbildung 3.2, so wurde der Bereich, der über den Leader hinausgeht, mit Hilfe des Computerprogramms LinAll berechnet. Auffällig ist dabei die nahezu perfekte Stammausbildung zwischen dem direkten 3'-Ende des Leaders und dem direkten 5'-Ende der 16S rRNA, auch wenn ein 75%-iger Anteil von A/U-Basenpaaren bzw. „nicht-Watson-Crick“-Basenpaaren vorliegt. Dies steht jedoch im Einklang mit der Feststellung, daß es sich bei der Wechselwirkung des Leaders mit der 5'-Seite um eine zeit-

lich auf eine bestimmte Transkriptionsphase beschränkte Wechselwirkung handeln muß.

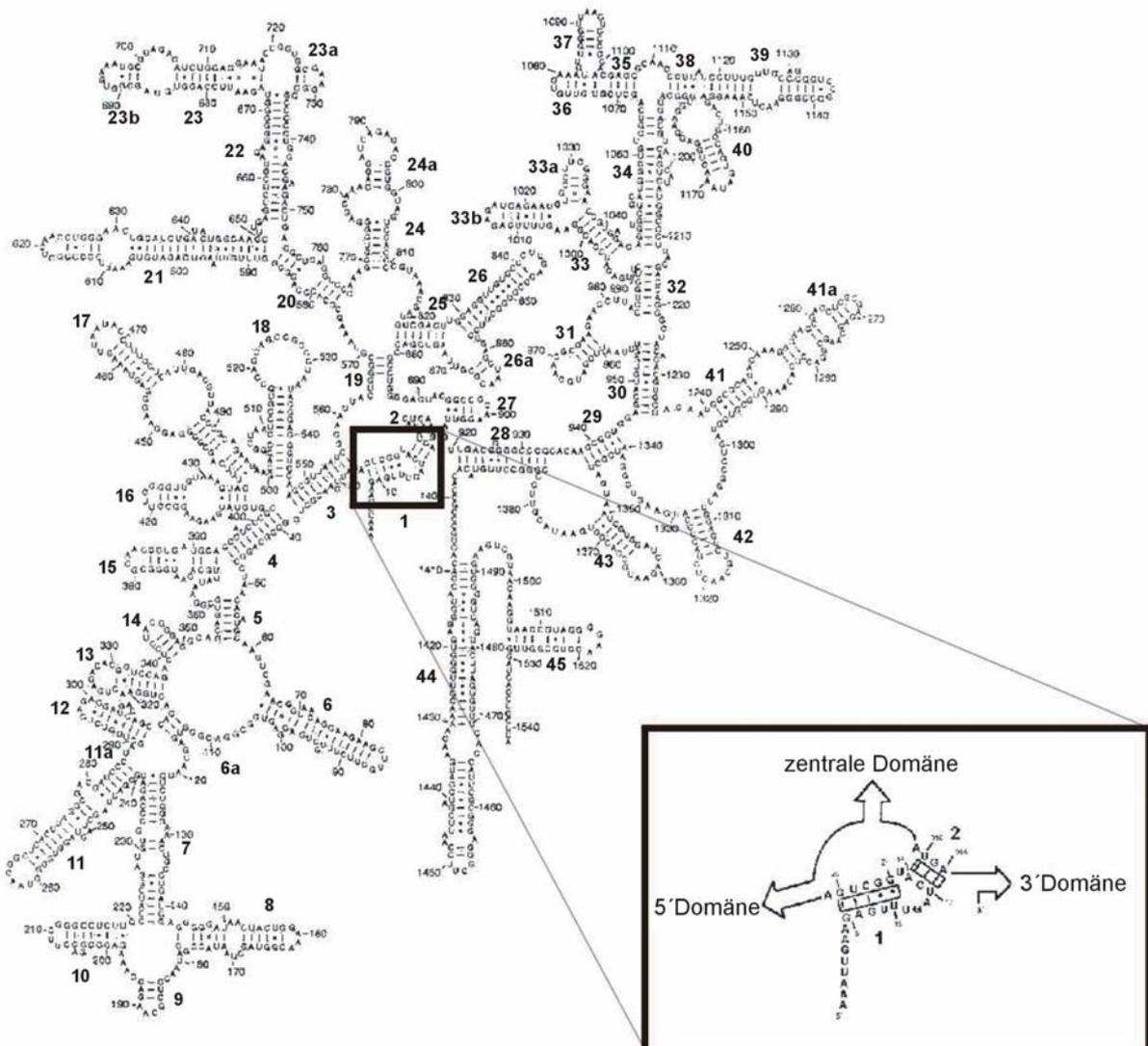
Im 5'-Bereich der 16S rRNA findet man zwischen Mutante und Wildtyp einen weiteren interessanten Unterschied. Während die Nukleotide C48, A51, A53, A55 und A59 des Wildtyps eine schwache Zugänglichkeit für CVE (Doppelstrang) zeigen, detektiert man in der Mutante an den dazwischen liegenden Positionen C52, C54 und C58 ein S1-Signal (Einzelstrang). Demnach ist in der Mutante die Wechselwirkung dieser Region mit einem anderen Bereich des Leaders oder der 16S rRNA gestört.



**Abb. 3.2:** Modifikationsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante der verkürzten (257 nt) Transkripte. Die Farbe gibt an, ob das entsprechende Modifikationssignal im Wildtyp oder in der Mutante stärker war. Lediglich L-G63 trat ausschließlich in der Mutante auf.

Zusammengefaßt läßt sich also feststellen, daß die Mutationen in der Box C weitreichende Strukturveränderungen sowohl des Leaders, als auch der nachfolgenden 16S rRNA bewirken. Dabei wird in der Mutante der Bereich zwischen der Box A und der Box C stärker kompaktiert und strukturiert, was die starke Konzentration von CVE-Signalen zeigt. Andere Bereiche der Mutante (L-G92 bis L-A103) zeigen hingegen einen gegenteiligen Effekt. Dieser Teil scheint deutlich stärker exponiert zu sein. Ein Einfluß der  $t_L$ -Region durch Mutationen in der Box C konnte ebenfalls gezeigt werden, was in weiterer Konsequenz zu ähnlichen Effekten, wie für die  $t_L$ -Mutanten beschrieben, führen kann.

Die Tatsache, daß innerhalb der 16S rRNA der Sequenzbereich A51 bis A59 eine andere Struktur im Wildtyp als in der Mutante zeigt, legt ferner den Schluß nahe, daß der Leader während der Transkription nicht nur eine Wechselwirkung zum direkten 5'-Ende der 16S rRNA ausübt. Im Zuge der Transkription scheint der Leader auch für andere Bereiche der 16S rRNA eine Platzhalterfunktion einzunehmen. Am Beispiel des Bereiches A51-A59 betrifft dies die Helix 5 der 16S rRNA, in der zwei 300 Nukleotide auseinander liegende Bereiche in räumliche Nähe zueinander gebracht werden müssen (C52<sub>G354</sub> bis C58<sub>G359</sub>). Hier schließt sich in unmittelbarer Nähe die Stammregion der Helix 6 an, die mit der Sequenz des Leaders zum Teil identisch ist und eine mögliche Interaktionsregion darstellen könnte. Daher kann angenommen werden, daß der Leader zunächst eine Grundstruktur der 16S rRNA etablieren muß, die im weiteren Verlauf der Transkription selber in der Lage ist nachfolgende Bereiche strukturieren zu können. Abbildung 3.3 zeigt die Sekundärstruktur der 16S rRNA. Der Bereich des zentralen Pseudoknotens ist dabei hervorgehoben.



**Abb. 3.3:** Sekundärstruktur der 16S rRNA. Der Bereich des zentralen Pseudoknotens ist vergrößert dargestellt. Die Helices sind nummeriert (Wimberly et al., 2000).

### 3.3.2. Mutationsbedingte Strukturveränderungen im zentralen Pseudoknoten

Die Funktion und Bedeutung des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden. Dabei ist die Tertiärstruktur nicht nur für die 16S rRNA essentiell, sondern ist auch in eukaryontischer 18S rRNA konserviert. Verändert man die Nukleotide C18 bzw. G917, so führt dies zu einer Reduktion der Translationsaktivität *in vivo* (Brink, 1993). Auch die Einführung einer C→U Transition an der Position 23 führt zu einer Reduktion der Wachstumsrate bei niedrigen Temperaturen. Dabei konnte zusätzlich eine Akkumulation freier 30S und 50S Untereinheiten gefunden werden. Dies läßt auf einen Defekt bei der Assoziation der beiden Untereinheiten zum funktionsfähigen 70S Partikel schließen. Durch Einführung zweier Punktmutationen im Leader konnte dieser Phänotyp jedoch wieder revertiert werden (Dammel et al., 1993).

In Eukaryonten und Archaea findet man sogenannte snoRNAs (small nucleolar RNAs), die im Komplex mit Proteinen snoRNPs (1.1) bilden (Fournier et al., 1993; Tollervey et al., 1993; Omer et al., 2000). Diesen snoRNAs wird eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der zentralen Pseudoknotenstruktur der kleinen ribosomalen rRNA zugesprochen (Hughes, 1996; Dennis et al., 1997). Auf Grund der Ähnlichkeiten zwischen der *Escherichia coli* Leader RNA und der U3 snoRNA ist anzunehmen, daß der Leader auch die Struktur des zentralen Pseudoknotens beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der „long-range“-Bereich des zentralen Pseudoknotens analysiert. Dazu wurden Vollängentranskripte eingesetzt, die diese Analyse erst ermöglichten. In der Mutante konnte im stromaufwärts gelegenen Teil der „long-range“-Wechselwirkung eine verstärkte CVE-Zugänglichkeit festgestellt werden. Die erhöhte Zugänglichkeit für das Enzym CVE für die Positionen U813, C862, A892 und A906 legt den Schluß nahe, daß sich wie im Leader auch eine komplexe Struktur in diesem Bereich ausgebildet hat. Diese läßt möglicherweise keine Umfaltung der rRNA an dieser Stelle mehr zu. Die detektierten Signale liegen zwar scheinbar nicht in räumlicher Nähe zueinander, jedoch handelt es sich bei der Darstellung in Abbildung 3.3 auch nur um die Sekundärstruktur der 16S rRNA. Tertiärstruktur Wechselwirkungen werden dabei jedoch nicht berücksichtigt.

### 3.3.3. Transiente Wechselwirkung des Leaders mit der 5'-Region der 16S rRNA

In einem weiteren Ansatz der Analysen sollten Strukturveränderungen analysiert werden, die sich während der Transkription innerhalb ein und desselben Transkriptes ergeben. Ein möglicher experimenteller Ansatz könnte wie folgt aussehen:

Es könnten IVT-Transkripte synthetisiert werden, die sukzessive um jeweils ca. 10 Nukleotide verlängert werden. Sollte sich während der Transkription der Kontakt des

Leaders zum 5'-Ende verändern, so müßte diese Veränderung über die Strukturanalysen sichtbar gemacht werden können. Interessant sind in diesem Zusammenhang diejenigen Transkripte, die den kompletten Leader plus  $x$  Nukleotide ( $x =$  Vielfaches von 10) besitzen. Bei einer Länge der 16S rRNA von 1542 Nukleotiden würde dies die Herstellung von ca. 150 verschiedenen IVT-RNAs bedeuten, die nach der DMS Modifikation mit dem entsprechenden 3'-seitigen Oligonukleotid über eine Primer-Extension Analyse untersucht werden müßten. Das ist für die Betrachtung eines Teilaspektes dieser Arbeit jedoch nicht zu leisten gewesen. Selbst eine Computergestützte Berechnung der theoretisch eingenommenen Struktur ist auf Grund der Größe der 16S rRNA zu aufwendig. Daher wurden nur zwei Wildtyp-Transkripte unterschiedlicher Länge (257 nt bzw. 1715 nt) in ihrem Leader und 5'-Bereich der 16S rRNA untersucht und miteinander verglichen.

Das Vollängentranskript ist dabei jedoch nicht in der Lage, ohne den Spacer das Prozessierungssignal für die RNase III auszubilden. Möglicherweise ist diese Wechselwirkung aber erforderlich, um die transiente Wechselwirkung des Leaders zur 5'-Region der 16S rRNA aufheben zu können. Andererseits ist es aber auch möglich, daß lediglich der Bereich stromabwärts der „long-range“-Wechselwirkung transkribiert werden muß, damit sich der zentrale Pseudoknoten ausbilden kann und sich detektierbare Unterschiede in der 5'-Region und dem Leader ergeben.

Die in 2.1.4 beschriebenen Modifikationsunterschiede zeigen eine veränderte Struktur im Bereich L-G144 und L-G147. Diese Region zeigte bereits bei der Analyse der verkürzten Transkripte zwischen Wildtyp und Mutante Unterschiede. Im Vollängentranskript sind diese Positionen einzelsträngig, im verkürzten Transkript konnten diese Positionen nicht detektiert werden.

Weitere Unterschiede in der 5'-Region der 16S rRNA bestätigen im Vollängentranskript das Sekundärstrukturmodell der 16S rRNA (Abbildung 3.3). Dabei konnte für die Positionen G15 und G31 Einzelsträngigkeit nachgewiesen werden und für die Positionen G39 und G41 wurde zumindest kein Einzelstrangsignal detektiert. Die anderen Modifikationsunterschiede beziehen sich zum Teil auf Randbereiche, in denen die Modifikation direkt an einem Doppelstrang- oder Einzelstrang-Bereich angrenzt. Da diese Sequenzbereiche in der Lage sind zu „atmen“, das heißt im zeitlichen Mittel sowohl einzel- oder doppelsträngig vorliegen können, wurden hier unter Umständen Signale detektiert, die nicht exakt dem statischen Sekundärstrukturmodell entsprechen (z.B. G27, A44, G46).

Durch diese Analyse konnte gezeigt werden, daß Umfaltungen des Leaders in hohem Maße von dem bereits transkribierten Bereich der 16S rRNA abhängig sind. Zudem scheint der Kontakt zur 5'-Region bereits aufgelöst zu sein, bevor der Spacer transkribiert worden ist. Auch wenn dieses Experiment nur einen kleinen Teil der Komplexität der Faltungsprozesse darstellt, so zeigt es doch, daß der Faltungsvor-

gang eng an die Transkriptlänge gebunden ist und ganz offensichtlich transiente Zwischenstrukturen gebildet werden.

### **3.4. Die *in vivo* DMS Modifikationen zeigen Strukturveränderungen in der rRNA und geben Aufschluß über den Einfluß der RNase III bei der Prozessierung**

Bestärkt durch die Analysen der *in vitro* Modifikationen und der Möglichkeit, diese Analyse erstmals auch in einem Stamm durchführen zu können, der keinen chromosomalen Hintergrund von rRNA mehr besitzt (TA554), wurden von der Box C-Mutante C3 und dem Wildtyp *in vivo* DMS-Modifikationen bei 30° bzw. 37°C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in 2.2.2 ff. dargestellt. Dabei muß zwischen Veränderungen im Modifikationsmuster und Veränderungen in den Prozessierungsprodukten unterschieden werden.

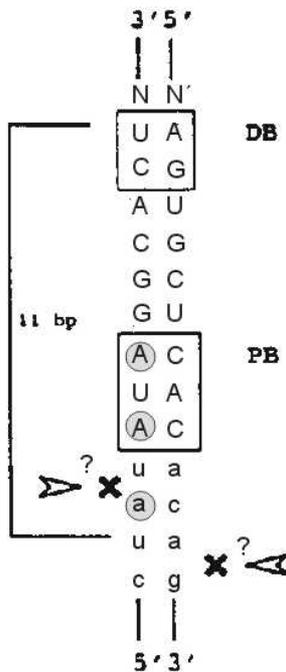
Überraschenderweise konnte bei der Analyse der rRNA aus isolierten 30S Untereinheiten sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante noch Leader RNA nachgewiesen werden. Der Anteil der Leader RNA war in der Mutante jedoch deutlich höher. Hier konnte auch festgestellt und gezeigt werden, daß der sonst sehr exakte, initiale Prozessierungsschnitt (L-U59) durch die RNase III nicht oder nur sehr unpräzise stattfindet (L-A51 bis L-A60). Dennoch konnte in verschiedenen Analysen (Maxizell-Analyse; Primer-Extension-Analysen isolierter Gesamt RNA) gezeigt werden, daß auch in der Mutante das korrekt prozessierte 5'-Ende der 16S rRNA zu finden ist. Dies konnte sogar in RNase III defizienten Stämmen gezeigt werden. Auf Grund dieser Tatsache kann man annehmen, daß es einen alternativen Prozessierungsweg zur RNase III gibt. Dieser scheint in seiner Prozessierungsgeschwindigkeit aber langsamer zu sein und könnte über die RNasen E und G laufen, deren Prozessierungsaktivitäten in großer Abhängigkeit zueinander stehen (Li et al., 1999, King et al., 1986).

Sollte also durch die Box C-Mutation die Erkennungsregion der Prozessierungsstelle durch die RNase III gestört sein, stammen die Abbruchbanden (L-A51 bis L-A60) möglicherweise von der RNase III selbst, die allerdings nun unpräzise schneidet, oder aber von einem alternativen Enzym.

In Abbildung 3.4 ist die postulierte Sekundärstruktur der RNase III Prozessierungsstelle von Young et al., 1978, dargestellt, in der die Schnittpositionen L-U55, L-U57 und L-U59 angegeben wurden. Die von Zhang et al., 1997, bestimmte Konsensussequenz für die RNase III von *Escherichia coli* ergibt L-U57 als spezifische Schnittposition. Diese Position konnte für den Wildtyp bestätigt werden.

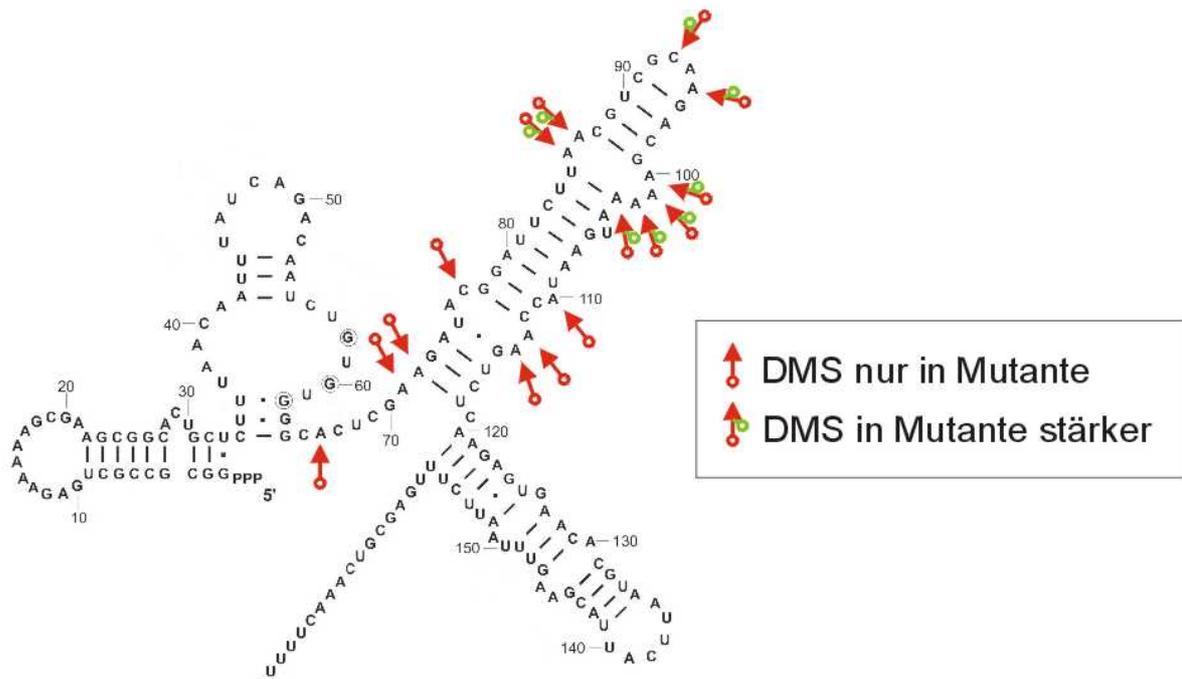


rung der RNase III-Erkennungsregion zustande kommen. Um dies jedoch ohne Zweifel ausschließen zu können, müßte man über eine gezielte Mutation die Konsensussequenz der proximalen Box wieder herstellen.



**Abb. 3.5:** Veränderung der postulierten Konsensussequenz nach Zhang et al., 1997. Kleine Buchstaben kennzeichnen wenig strikte Komplementarität, große Buchstaben kennzeichnen große Komplementarität. Der RNase III-Schnitt ist durch offene Pfeile gekennzeichnet, PB bzw. DB steht für proximale- bzw. distale Box. Die Basenaustausche in der Box C sind grau dargestellt.

Betrachtet man nun die Modifizierungsunterschiede im Leader, so ist zunächst überraschend, daß trotz Isolation der 30S Untereinheiten über einen Saccharosegradienten in den Partikeln des Wildtyps und der Mutante noch Leader-Sequenzen mit der 16S rRNA assoziiert sind. Im Wildtyp läßt sich allerdings, ausgehend vom 5'-Ende der 16S rRNA, nur der Bereich bis zur RNase III-Prozessierungsposition detektieren. Die detektierten Signale decken sich mit dem Sekundärstrukturmodell des Leaders. Dafür sprechen die in das Strukturmodell eingezeichneten Einzelstrang spezifischen Signale (Abbildung 3.6). Allerdings zeigt der mutierte Leader deutlich größere Einzelsträngigkeit innerhalb des Bereiches L-A66 bis L-A114. Daher bestätigt sich, was auch schon die *in vitro* Modifikations-Analyse zeigte, daß der mutierte Leader in seiner Struktur in einigen Bereichen verändert ist und deshalb Wechselwirkungen zur 5'-Region der 16S rRNA möglicherweise nicht mehr ausgebildet werden können. Dies steht auch im Einklang mit den TGGE-Analysen (Schäferkordt, 1998), die bei dem 257 Nukleotid langen Transkript eine geringere Kooperativität des Aufschmelzverhaltens der mutierten rRNA zeigten.



**Abb. 3.6:** Modifikationssignale der *in vivo* Modifikation mit DMS. Zweifarbigere Pfeilenden zeigen verstärkte DMS-Signale in der Mutante. Rote Pfeile zeigen DMS Modifikationen, die ausschließlich in der Mutante gefunden wurden.

### 3.5. Mutationen in der Box C wirken sich unterschiedlich auf die Stabilität des Leaders und die 16S rRNA aus

Strukturveränderungen innerhalb des Leaders oder der 16S rRNA können auch zu Veränderungen in der Stabilität des entsprechenden RNA-Moleküls führen. Mit Hilfe eines UV sensitiven *Escherichia coli* Stammes (CSR603) kann zum einen der chromosomale Hintergrund der ribosomalen RNA ausgeschaltet werden. Zum anderen ermöglicht der Einsatz sogenannter Maxizellen die Stabilität der 16S rRNA *in vivo* zu analysieren (6.3.3).

Durch die UV-Bestrahlung wird die sehr viel größere chromosomale DNA statistisch häufiger getroffen als das viel kleinere Plasmid. Da der Stamm CSR603 ein Defekt in wichtigen UV-Reparatursystemen mehr besitzt, wird die geschädigte DNA von zell-eigenen Nukleasen abgebaut. In diesem Zustand ist die Zelle nicht mehr teilungsfähig, besitzt aber noch alle für die Transkription wichtigen Enzyme und Co-Faktoren. So kann die Stabilität der synthetisierten rRNA *in vivo* über mehrere Stunden beobachtet werden und somit die Halbwertszeit ermittelt werden.

Die in 2.4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich nach etwa 12 Stunden der Anteil der 16S rRNA gegenüber der Wildtyp RNA auf 27-35% (abhängig von der Mutante) reduziert hat. Allerdings scheinen die detektierten 16S und 23S rRNA-Produkte korrekt prozessiert worden zu sein. Dieses Ergebnis läßt vor dem Hintergrund

der Strukturanalysen den Schluß zu, daß der kältesensitive Phänotyp möglicherweise auf Grund einer deutlich verringerten Halbwertszeit der 16S rRNA verursacht wird. Die Zelle muß dabei in der Mutante eine viel größere Syntheseleistung ribosomaler 16S RNA erbringen als der Wildtyp. Diese erhöhte Syntheseleistung führt in ihrer Konsequenz zu dem beobachteten kältesensitiven Phänotyp. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch die Tatsache, daß mit den Box C-Mutanten transformierte TA554-Stämme lebensfähig sind. Die Polysomenanalyse konnte zudem eindeutig zeigen, daß Ribosomen der Mutanten translationsaktiv sind.

Für die Bestimmung der Lebensdauer des Leaders hingegen mußte eine Methode gewählt werden, die ein viel kürzeres Zeitintervall erfassen kann. Dazu wurden Rifampicin-Kinetiken mit unterschiedlichen Stämmen durchgeführt (2.4.2). Rifampicin ist ein Antibiotikum, das die Initiation der Transkription durch Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase verhindert. Dabei blockiert es die Ausbildung der Phosphodiester-Bindung zwischen den ersten Nukleotiden. Auf Transkripte, die bereits 2-3 Nukleotide lang sind, hat Rifampicin keinen Einfluß. Minimale Endkonzentrationen von 0.01  $\mu\text{g/ml}$  Rifampicin reichen aus, um diesen Effekt in Prokaryonten zu erzielen (Campbell et al., 2001; Naryshkina et al., 2001; Ingham et al., 2000).

Die Analyse zeigt, daß der Leader im Wildtyp eine kurze Halbwertszeit von etwa einer Minute für die vom Promotor 2 gestarteten Transkripte besitzt. In den Box C-Mutanten konnte jedoch eine deutlich höhere Halbwertszeit von weit über 5 Minuten ermittelt werden. Eine ähnliche Erhöhung der Halbwertszeit von Leader-Mutanten wurde auch in RNase III-Stämmen detektiert, obwohl diese keine Leadermutationen aufwiesen. Eine nur geringfügige Erhöhung der Halbwertszeit auf etwa 90 Sekunden konnte in den  $t_L$ -Mutanten pT4 und pT11 gefunden werden. Jedoch ist der kältesensitive Phänotyp der  $t_L$ -Mutanten in seiner Ausprägung vergleichbar mit dem der C3-Mutante.

Die Befunde legen den Schluß nahe, daß in den Box C-Mutanten auch die RNase III einen Einfluß auf die Halbwertszeit des Leaders hat. Erst wenn der Schnitt durch die RNase III erfolgt ist, kann der Leader abgebaut werden. Existiert aber, wie bereits oben vermutet, ein nur schwach aktiver, alternativer Prozessierungsweg, so wäre die erhöhte Halbwertszeit sehr gut erklärt.

Die Strukturanalysen des Leaders haben überdies gezeigt, daß im Bereich zwischen L-G32 und L-U57 eine erhöhte Zugänglichkeit für CVE (Doppelsträngigkeit) herrscht. Wie bereits in 3.3.1 diskutiert, kann man daher auf der einen Seite auf eine viel kompaktere Struktur in diesem Bereich schließen, die in ihrer Konsequenz zu einer stabilisierten Leader RNA führt oder eben die Effizienz des RNase III-Schnittes beeinflusst. Auf der anderen Seite kann der nicht prozessierte Leader aber auch als eine Art Abbausignal für die 16S rRNA wirken.

### 3.6. Die RNase III spielt bei der Prozessierung und der Maturierung der rRNA eine Schlüsselrolle

Ausgehend von der bei der Rifampicin-Kinetik isolierten Gesamt-RNA konnten auch Studien zur Produktanalyse gemacht werden (2.5 ff.). Ziel dieser Analyse war es, mögliche mutationsbedingte Veränderungen in den Prozessierungs- bzw. Maturierungsprodukten ausfindig zu machen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Detektion von 16S rRNA-Abbauprodukten. Tatsächlich konnte ein zusätzliches Produkt II (Abbildung 2.15) nachgewiesen werden. Dieses Produkt wurde vom Promotor 1 gestartet, möglicherweise auch vom Promotor 2. Auf Grund der geringen Auflösung des denaturierenden Agarosegels sowie dem anschließenden Nukleinsäuretransfer auf die Nylonmembran kann nicht zwischen einem ca. 1.2 und 1.3 kB großen Produkt II unterschieden werden. Beide Transkripte enthalten jedoch den Leader und somit den mutierten Box C-Bereich. Hier scheint der nicht prozessierte Leader für den in der Maxizell-Analyse detektierten Abbau der 16S rRNA verantwortlich zu sein. Das 3'-Ende des Produktes II konnte ebenfalls exakt bestimmt werden. Die Analyse zeigte, daß das zusätzlich in der Mutante auftretende Produkt im Bereich von G888 bis C893 sein 3'-Ende besitzt. Es besteht jedoch eine Präferenz zur Position C893. Quervernetzungs-Studien (Noah et al., 1999; Pioletti et al., 2001) konnten ebenfalls zeigen, daß eine Wechselwirkung zwischen der Position G894 mit U244 besteht und diese durch Tetracyclin inhibiert werden kann. Somit scheint dieser Bereich wichtig für die Funktion des Ribosoms zu sein, da sie nicht nur in der Nähe des zentralen Pseudoknotens lokalisiert ist, sondern auch einen Kontakt zur 5'-Region der 16S rRNA eingeht. Es ist daher anzunehmen, daß die durch den mutierten Leader veränderte Struktur der 16S rRNA bzw. der Leader selbst (der sich ebenfalls noch am Abbauprodukt befindet) für den Abbau der 16S rRNA verantwortlich ist. Das 3'-Ende des Abbauproduktes zeigte überdies, daß sich der Schnitt durch eine noch unidentifizierte RNase an einer Stelle befindet, die im Sekundärstrukturmodell (Abbildung 3.3) der 16S rRNA einzelsträngig ist. Durch den Schnitt wird die komplette 3'-Domäne der 16S rRNA entfernt, die auch nicht im Pool der Gesamt RNA detektiert werden konnte, was auf eine schnelle Degradation hinweist.

Diese Annahme wird durch die Tatsache bestärkt, daß in *Escherichia coli* bisher keine 5'-3'-Exonuklease gefunden werden konnte. Der Abbau von RNA wird in der Zelle zunächst durch eine Endonuklease initiiert. Das 3'-seitig resultierende Subfragment kann anschließend durch eine 3'-5'-Exonuklease schnell degradiert werden. So auch bei der Prozessierung des Leaders bei der die RNase III den initialen Prozessierungsschnitt durchführt. Es gibt gute Hinweise darauf, daß die RNase III selber keine Exonukleaseaktivität hat, allerdings könnten gebundene Co-Faktoren im Komplex den Leader umgehend exonukleolytisch abbauen. Ähnlich könnte es auch

bei der nicht detektierten 3'-Domäne der 16S rRNA sein. Hier kann möglicherweise die RNase III noch 3'-seitig das Vorläufertranskript schneiden, bleibt dann allerdings gebunden und degradiert die 16S rRNA bis zur Position 888-893 exonukleolytisch. Vergleichsweise Komplexe kennt man auch vom Degradosom, das für den Abbau von mRNA verantwortlich ist (Ow et al., 2000; Liou, et al., 2001). Dieser Abbauweg ist im Fall der Mutante vielleicht nur möglich, weil auf Grund von Fehlfaltungen die 3'-Domäne ebenfalls in ihrer Struktur verändert wurde. Die *in vitro* Modifikationen zeigten jedoch an den Positionen U813, C862, A892 und A906 verstärkte CVE-Signale, also eine größere Kompaktierung der 16S rRNA in diesem Bereich. Möglicherweise ist hier aus diesem Grund der weitere exonukleolytische Abbau erst einmal beendet worden.

Mit Hilfe der Maxizellen konnte zudem gezeigt werden, daß das zusätzliche Produkt II nicht auf Grund eines Transkriptionsabbruchs zustande kam. Bei einem Transkriptionsabbruch hätte auch das nachfolgende Strukturgen der 23S rRNA betroffen sein müssen. Dies war nicht der Fall, es konnte ausschließlich eine Veränderung der 16S rRNA beobachtet werden. Ebenso konnte kein freier, prozessierter Leader detektiert werden. Der Abbau des Leaders scheint jedoch eng mit der Anwesenheit der RNase III verbunden zu sein, da ein prozessierter Leader in RNase III-Stämmen detektiert werden konnte. Dieser stammt aber folglich nicht durch einen RNase III-Schnitt. Das bestärkt die Vermutung eines langsamen, alternativen Prozessierungsweges auf der 5'-Seite der 16S rRNA (siehe auch 3.4).

Zur Identifikation von zusätzlich an der Prozessierung oder der Degradation beteiligter RNasen wurden ternäre Komplexe von Wildtyp und Mutante mit und ohne Proteinextrakt verlängert (2.7). Diese Analyse zeigte jedoch nur den RNase III-Schnitt, nicht aber zusätzliche oder andere Produkte. Allerdings konnte im Bereich des RNase III-Schnittes ein Unterschied in der Box C-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp gefunden werden. Da aber in der Kontrollspur ohne Proteinextrakt im Bereich dieser Schnittstelle auch ein Abbruch zu detektieren war, dessen Intensität über die Zeit gesehen zunahm, wurde dieses Ergebnis nicht weiter verfolgt.

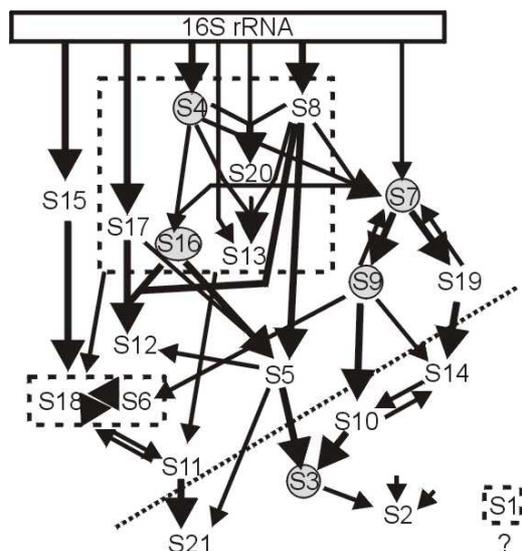
### **3.7. Die Proteinbesetzung der 30S Untereinheit ist vom Leader abhängig**

Um auch einen Eindruck von Unterschieden in der Proteinbesetzung der kleinen ribosomalen Untereinheit zu erhalten, wurden wie schon unter 2.8 beschrieben, die jeweiligen 30S Untereinheiten isoliert, die ribosomalen Proteine durch RNase T1 aus ihrem Verband gelöst und über eine 2D Gelelektrophorese aufgetrennt.

Nach der von Held et al., 1974, erstellten Assemblierungskarte unterscheidet man primär und sekundär bindende Proteine. Bei den primär bindenden Proteine wird das Erkennungsmotiv für die Proteine S4, S7, S8, S13, S15, S17 und S20 direkt von der

rRNA ausgebildet, wobei S7, S13 und S20 zusätzlich noch von der Bindung anderer Proteine abhängig sind. Die übrigen ribosomalen Proteine binden nachfolgend an das Partikel und stehen in mehr oder weniger großer Abhängigkeit zueinander. Überdies haben sie auch einen Einfluß auf die native Konformation des ribosomalen Partikels, auch wenn sie nach aktuellen Studien nur als Gerüst bzw. Stabilisatoren der Ribosomstruktur angesehen werden (Ban et al., 2000, Nissen et al., 2000). Dies liegt nicht zuletzt daran, daß das Ribosom als Ribozym angesehen wird, dessen enzymatische Aktivität auf die Konformation der rRNA zurückzuführen ist (Cech, T., 2000; Lilley, D. M. J., 2001). In Abbildung 1.5 bzw. 3.7 ist die Assemblierungskarte dargestellt, die die Abhängigkeit der Proteine zur rRNA und zueinander zeigt.

Betrachtet man zunächst die deutlich geringeren Effekte der 30S Untereinheiten aus 37°C inkubierten Zellkulturen, so sind hier die Proteine S3, S4, S7, S9 und S16 betroffen. S4 und S7 sind primär bindende Proteine, wobei S7 zusätzlich noch durch die Bindung von S4 direkt beeinflusst wird. Zur Veranschaulichung ist die Assemblierungskarte von Held et al., 1974, noch einmal in Abbildung 3.7 dargestellt, wobei die betroffenen Proteine grau hinterlegt sind.



**Abb. 3.7:** Assemblierungskarte ribosomaler Proteine an die 16S rRNA nach Held et al., 1974. Die 16S rRNA ist als Balken dargestellt, die Proteine sind mit S gekennzeichnet. Unterschiede in der Abhängigkeit der Proteine zur rRNA bzw. zueinander sind durch die Stärke der Pfeile angegeben. Proteine oberhalb der gestrichelten Linie sind zur Bildung eines RI-Partikels (siehe auch Abb. 1.4) nötig. Gestrichelte Kästchen geben Gruppen von Proteinen an, die gemeinsam Einfluß auf andere Proteine besitzen. S1 konnte nicht in dieses Schema eingeordnet werden. Proteine die sich in ihrer Assemblierung vom Wildtyp unterscheiden, sind grau unterlegt.

Deutlich ist die Abhängigkeit der Proteine S16 und S7 von dem Protein S4 zu erkennen, welches eines der ersten Proteine ist, das an die rRNA bindet. S16 wird zudem nicht nur von dem Protein S4 beeinflusst, sondern in gleichem Maße auch von S7. Auch zu den weiter auffälligen Proteinen S9 und S3 läßt sich ein direkter Bezug zu den veränderten, primär bindenden Proteinen S4 und S7 herstellen. So ist die Bindung von S9 ausschließlich von S7 abhängig. Da eine Reduzierung der S7 Proteine im mutierten 30S-Partikel der Mutante gefunden werden konnte, läßt sich also auch die Reduzierung des S9 Proteinanteils erklären. Eine Interpretation der Reduzierung von S3 ist sehr viel schwieriger. Man kann die Veränderung von S3 möglicherweise

über einen additiven Effekt erklären. Dabei wird S3 nur schwach über den Weg S4→S16→S5 beeinflusst. Viel stärker sind die Effekte durch den Pfad S8→S5 auf S3. Da jedoch S5 unbeeinflusst zu sein scheint, erfolgt die Veränderung von S3 wohl über den Pfad S7→S9→S10 auf S3. S10 zeigte ebenfalls eine reduzierte Proteinbesetzung in der C3-Mutante, die allerdings im Rahmen des Fehlers liegt und deshalb nicht mit einbezogen wurde.

Insgesamt legt dies den Schluß nahe, daß vor allem die 16S rRNA-Konformation für die veränderte Proteinbindung von S4 und S7 verantwortlich ist. S4 ist ein Protein, das schon sehr früh (nach Transkription der 5'-Domäne der 16S rRNA) an die RNA bindet und Kontakte zu den Helices 1, 3, 4, 16, 17, 18 und 21 (Wimberly et al., 2000) der 16S rRNA besitzt. Protein S7 hingegen hat zu den Helices 23b, 28, 29, 41 und 43 überwiegend Kontakte zur 16S rRNA im Bereich des zentralen Pseudoknotens. Damit sind zwei Proteine durch die Box C-Mutation betroffen, die genau in den Bereichen Veränderungen zeigen, die sich auch bei den 16S rRNA Strukturuntersuchungen als auffällig erwiesen. Überdies konnte in vorangegangenen Studien (Nowotny et al., 1988; Garrett et al., 1977) gezeigt werden, daß S4 und S7 die ersten Nukleationszentren ausbilden. Eine weitere Studie, in der die Bindung von Tetracyclin an die 30S Untereinheit untersucht wurde (Pioletti et al., 2001), konnte ebenfalls eine Schlüsselrolle von S4 und S7 zeigen.

Studien von Zirwes, 2001 bezüglich *in vitro* 30S Assemblierungen zwischen 16S rRNA Vollängentranskript mit und ohne Leader zeigen, daß der Leader die Assemblierung ribosomaler Proteine im Vollängentranskript sogar inhibieren kann.

Da in den Untersuchungen zur Stabilität der Leader RNA in den Mutanten eindeutig eine Verlängerung der Halbwertszeit des Leaders gezeigt werden konnte, kann hier die Anwesenheit des Leaders ebenfalls zu einer schlechteren Bindung der ribosomalen Proteine führen. Das zeigen auch die Befunde der 2D-Analyse. Am Beispiel der  $t_L$ -Mutante pT11 wurde gezeigt, daß die Proteinbindung durch die Mutation etwas verbessert werden konnte. Dennoch blieb auch hier ein inhibitorischer Effekt des Leaders erhalten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Assemblierung der ribosomalen Proteine in hohem Maße von der An- bzw. Abwesenheit des Leaders abhängt. Da in den *in vitro* Assemblierungsstudien keine Prozessierungsenzyme anwesend waren, konnte erst durch die Box C-Mutanten in den TA554-Stämmen gezeigt werden, wie die Prozessierungs- und Assemblierungseffekte zusammenhängen.

Zusätzlich zu den bei 37°C inkubierten Zellen wurden auch Studien mit 30S Untereinheiten aus 30°C wachsenden Zellkulturen durchgeführt. Hier liegt der Fehler nach Normierung auf den FIS-Standard jedoch deutlich höher als in den 37°C-Proben. Ebenfalls muß bei dieser Analyse darauf hingewiesen werden, daß die C1-Mutante die stärkste Ausprägung des kältesensitiven Phänotyps zeigte. Zu den in der C1-Mutante unterrepräsentierten Proteinen gehören S2, S4, S7, S13, S14, S20 und S21.

Erstaunlicherweise zeigten die C2- und C3-Mutanten (C2<C3) für die Proteine S4, S7, S13 und S14 eine deutlich bessere Proteinbindung. Damit sind bis auf S2, S20 und S21 jeweils die gleichen Proteine durch die Box C-Mutation betroffen. Ihnen gilt im Folgenden auch die Aufmerksamkeit. Auch hier scheinen die Proteine S4 und S7 wieder eine Art Schlüsselrolle zu übernehmen, die im direkten Zusammenhang mit der durch die Box C-Mutation eingenommenen rRNA-Struktur steht. Jedoch ist auch das Protein S13 auffällig, dessen Bindung sowohl von der rRNA-Struktur abhängig ist, als auch direkt von dem Protein S4. Da die Auswertung der 30°C-Proben einen deutlich höheren Fehler aufwiesen als die der 37°C-Analysen, sollen die schwachen Effekte der anderen Proteine nicht überbewertet werden.

### 3.8. Modell zu den Leader-abhängigen Funktionen

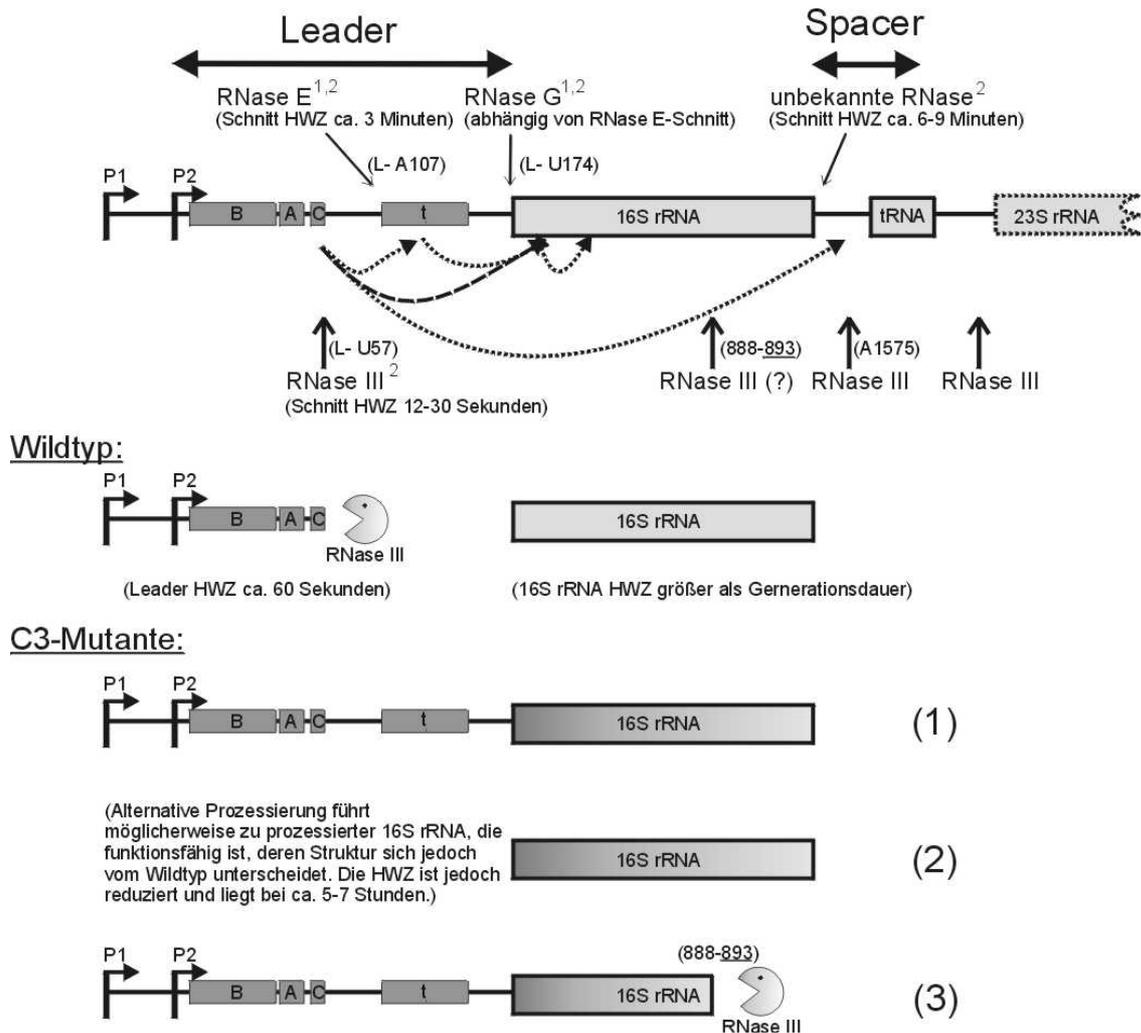
Die in dieser Arbeit auf Grund sehr unterschiedlicher Studien mit Hilfe der Box C-Mutanten gesammelten Befunde sollen im Folgenden noch einmal kurz zusammengefaßt und in dem Modell in Abbildung 3.8 dargestellt werden.

Der hoch konservierte Box C-Bereich des Leaders kann direkt oder indirekt über die  $t_L$ -Region einen RNA/RNA-Kontakt mit dem 5'-Bereich der 16S rRNA eingehen. Durch Veränderungen der Box C-Sequenz wird die Struktur des Leaders und nachfolgender Strukturelemente bis hin zum hoch konservierten zentralen Pseudoknoten der 16S rRNA verändert. Dies führt weiter zu einer Veränderung der RNA-Stabilität. Dabei wird die Halbwertszeit des Leaders verlängert, während die Stabilität der 16S rRNA in der Zelle deutlich verringert wird.

Obwohl die Box C-Sequenz einen Teil des Prozessierungsbereiches der 16S rRNA ausbildet, kann auch von den Mutanten korrekt prozessierte 16S rRNA isoliert werden. Die Prozessierung scheint jedoch langsamer zu erfolgen als die Prozessierung des Wildtyps durch die RNase III. Möglicherweise sind dafür Co-Faktoren anderer, an die RNase III gebundene, Nukleasen wie beispielsweise RNase E bzw. RNase G beteiligt.

Die eingeführten Box C -Mutationen ermöglichen auch die Detektion eines verkürzten Maturierungsproduktes, welches im Wildtyp mit den eingesetzten Methoden nicht detektiert werden konnte.

Möglicherweise dient der Leader bei zu langsamer Prozessierung der 16S rRNA auch als Abbausignal. Dabei scheint die RNase III mit Co-Faktoren offenbar ebenfalls involviert zu sein.



**Abb. 3.8:** Modell zu den Leader-abhängigen Zusammenhänge zwischen Faltungs-, Prozessierungs- und Degradationseffekten in *Escherichia coli*. Im oberen Schema ist ein Teil des Vorläufertranskripts des *rrnB*-Operons bis zur 23S rRNA dargestellt. Die Sequenz-Bereiche sind nicht proportional zueinander dargestellt. Die Pfeile an den Positionen P1 und P2 markieren den möglichen Transkriptstart. Der Leader- und Spacer-Bereich ist durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Die Indexziffern beziehen sich auf einbezogene Literaturinformationen (<sup>1</sup>: King et al., 1986; <sup>2</sup>: Li et al., 1999). Schnittpositionen sind der in dieser Arbeit eingeführten Nomenklatur angepaßt worden. Strukturgene, die korrekt falten können sind hellgrau unterlegt, Strukturveränderungen der 16S rRNA aus der Mutante ist durch Grauverlauf markiert. Die „*nut*“-Boxen und die *t<sub>L</sub>*-Region sind dunkelgrau unterlegt. Die gestrichelten Pfeile von der Box C zur *t<sub>L</sub>*-Region bzw. zur 16S rRNA, sowie von der *t<sub>L</sub>*-Region direkt zur 16S rRNA markieren den Einfluß der Box C auf die stromaufwärts gelegenen Bereiche. Durch den Unterschied der Linie soll angedeutet werden, daß nicht sicher geklärt werden konnte, ob die Box C direkt oder über die Veränderung der *t<sub>L</sub>*-Region auf die 16S rRNA wirkt. Überdies ist noch ein gestrichelter Pfeil innerhalb der 5'-Region der 16S rRNA dargestellt, der zeigen soll, daß auch die 16S rRNA selber mit nachfolgenden Sequenzen Kontakte eingehen kann. Unterhalb des Modells sind die Produkte des Wildtyps und der Mutante skizziert. Beim Wildtyp ist dies der Leader, der schnell durch die RNase III degradiert wird und die korrekt prozessierte 16S rRNA mit langer Halbwertszeit. Bei der Mutante entstehen verschiedene Produkte, deren 16S rRNA sich jedoch strukturell von der Wildtyp 16S rRNA unterscheidet: (1) 16S rRNA plus mutiertem Leader, die auch aus assemblierten Partikeln isoliert werden konnte. (2) Prozessierte 16S rRNA, (3) zusätzliches Produkt II, möglicherweise durch RNase III gebundene Co-Faktoren weiter degradiert (endo- oder exonukleolytisch).

Die Analysen zeigen auch eine Veränderung in der Proteinstöchiometrie der 30S Untereinheit, die jedoch als Folge der veränderten rRNA-Struktur anzusehen ist, da die primär bindenden Proteine S4 und S7 davon betroffen sind. Überdies stehen weitere Veränderungen im Proteinmuster im direkten Zusammenhang zu S4 und S7. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Box C-Mutanten konnten umfangreiche Studien zur Funktion des Leaders unternommen werden. Diese zeigen, daß die hohe Konservierung bestimmter Leader-Bereiche notwendig ist, damit die nachfolgende 16S rRNA korrekt falten, prozessiert und assembliert werden kann. Andernfalls wird die Stabilität und damit auch die Halbwertszeit der 16S rRNA empfindlich beeinflußt. Dadurch muß die Zelle eine deutlich höhere Biosyntheseleistung erbringen, die sich im kältesensitiven Phänotyp widerspiegelt.

## 4. Zusammenfassung

Bakterielle ribosomale *rrn*-Operons werden als lange Vorläufermoleküle transkribiert, die zwischen ihren Strukturgenen durch zusätzliche Sequenzen flankiert werden.

Eine der zusätzlichen Sequenzen, die stromaufwärts der 16S rRNA liegt, wird als Leader bezeichnet. Innerhalb dieser kurzen, hoch konservierten Region gibt es ein Sequenzelement, die sogenannte Box C, die homolog zu der „nut“-Antiterminationssequenz im Bakteriophagen Lambda ist. Mit Hilfe von drei Basenaustauschen in dieser Region ließen sich unterschiedliche Funktionen des Leaders charakterisieren.

Mutationen in der Box C führen zu einem kältesensitiven Phänotyp, der sich innerhalb der drei Mutanten graduell in seiner Ausprägung unterscheidet. Zur Bestimmung der molekularen Details, die zur Ausprägung dieses Phänotyps führen, wurden folgende Analysen der Leader-Funktionen unternommen:

Zunächst wurde die Struktur der Wildtyp und der mutierten rRNA mittels limitierter enzymatischer Hydrolyse und chemischer Modifikation analysiert. Der Vergleich von Transkripten unterschiedlicher Länge gab weiteren Aufschluß über die transienten Wechselwirkungen des Leaders mit der 16S rRNA. Aus den Modifikationsstudien geht hervor, daß diese Wechselwirkungen Auswirkung auf die 5'-Region und den strukturell hoch konservierten Bereich des zentralen Pseudoknoten der 16S rRNA haben.

Durch kinetische Analysen zur Stabilität des Leaders und der 16S rRNA konnte gezeigt werden, daß die veränderte Struktur der rRNA die Halbwertszeit des Leaders verlängert, während die Stabilität der 16S rRNA deutlich reduziert wird.

Über Northern-Blot Analysen von Gesamt-RNA Isolaten konnte eine Beteiligung der RNase III, einem zentralen Prozessierungsenzym der 16S rRNA, bei der korrekten Prozessierung und Degradation ribosomaler RNA gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde ein Maturierungsprodukt charakterisiert, das nur in der Box C-Mutante nachgewiesen werden konnte und erste Hinweise auf einen möglichen Abbauweg rRNA gibt.

Durch Analyse isolierter 30S Untereinheiten, deren 16S rRNA ausschließlich von Operons mit einer Leader Box C-Mutation stammte, konnte gezeigt werden, daß auch die Stöchiometrie der Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit vom Leader beeinflusst wird.

Die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse erweitern unser Verständnis über den Mechanismus der Beteiligung des rRNA Leaders an der Ribosomenbiogenese und generell am Metabolismus der rRNA. Überdies zeigen sie auch, welche Auswirkungen geringe Sequenzveränderungen in einem hoch konservierten zusätzlichen rRNA-Bereich auf die Struktur und Funktion des maturierten Partikels haben können.

## 5. Material

### 5.1. Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders im Text vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“. Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wurde ausschließlich hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Est. 41237-MA-1“, Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet, das nachfolgend als „Aqua. dest.“ bezeichnet wird.

### 5.2. *Escherichia coli* Stämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Herkunft</u>
<u>ABL1</u>	RNase III <sup>-</sup> , RNase P <sup>-</sup>	Robertson et al., 1980
<u>BL107</u>	RNase III <sup>-</sup> , RNase I <sup>-</sup>	Studier, F. W., 1975
<u>Bummer <math>\lambda</math>dfus4</u>	RNase M16 <sup>-</sup>	Dahlberg et al., 1977
<u>CA265 I<sup>-</sup></u>	RNase I <sup>-</sup>	freundliche Gabe von M. Deutscher, USA
<u>CA265 II<sup>-</sup></u>	RNase II <sup>-</sup>	freundliche Gabe von M. Deutscher, USA
<u>CA265 III<sup>-</sup>II<sup>-</sup></u>	RNase III <sup>-</sup> , RNase II <sup>-</sup>	freundliche Gabe von M. Deutscher, USA
<u>CA244 ams-tet<sup>s</sup></u>	RNase E <sup>-</sup>	freundliche Gabe von M. Deutscher, USA
<u>CA244 cafA</u>	RNase G <sup>-</sup>	Li et al., 1999
<u>CA244 T<sup>-</sup></u>	RNase T <sup>-</sup>	Li et al., 1995
<u>CA244 PNP<sup>-</sup></u>	PNPase <sup>-</sup>	Li et al., 1995

<u>CSR603</u>	phr-1, rec A1, uvr A6, thr-1, leu B6, arg E3, thi-1, ara-14, lac Y1, gal K2, xyl-5, mtl-1, sup E44, tsx-33, gyr A96, rps L31	Sancar et al., 1979
<u>DG156</u>	RNase I <sup>-</sup>	Gesteland, R. F., 1966
<u>DH1</u>	F <sup>-</sup> , rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R13, (rK-mK <sup>+</sup> ), sup e44, rel A1, λ <sup>-</sup>	Hanahan, D., 1983
<u>GM2199</u>	<i>ara-14, dam-13, ::Tn9, gal K2, gal T22, his G4, lac Y1, leu B6, mtl-1, rsp L136, sup E44, thi-1, ton A31, tsx-78, xyl-5</i>	Marinus et al., 1983
<u>HB101</u>	F <sup>-</sup> , <i>pro A2, rec A13, ara-14, lac Y1, gal K2, xyl-5, mtl-1, rps L20 (Str<sup>r</sup>), sup E44, hsd S20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), λ<sup>-</sup></i>	Boyer et al., 1969
<u>TA554</u>	Δ7 (ΔEBHGcADcCc recA56/ pTRNA66, pSt1-Km)	Asai et al., 1998
<u>MRE600</u>	RNase I <sup>-</sup>	Cammack et al., 1965

### 5.3. Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Kurzbeschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
<u>pKK3535</u>	pBR322-Derivat mit komplettem <i>rrnB</i> -Operon, kloniert in die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	Brosius et al., 1981
<u>pT0</u>	pKK3535-Derivat mit einer Transition A→G (239) relativ zum P1-Start;	Zacharias, M., 1986
<u>pT4</u>	pT0-Derivat mit einer Transition C→T (262) relativ zum P1-Start;	Theißen et al., 1990

<u>pT11</u>	pT0-Derivat mit zwei Transitionen C→T (262, 274) relativ zum P1-Start;	Theißen et al., 1990
<u>pC1</u>	pT0-Derivat mit Box C-Transitionen G→A (182, 183) relativ zum P1-Start und zusätzliche Pos. 98, 102 und 103	Eberle, J., 1987
<u>pC2</u>	pT0-Derivat mit Box C-Transitionen G→A (177, 181) relativ zum P1-Start	Eberle, J., 1987
<u>pC3</u>	pT0-Derivat mit Box C-Transitionen G→A(177, 179, 181) relativ zum P1-Start	Eberle, J., 1987
<u>p7P2-0</u>	pUC18-T7-Derivat mit Bst U I/ Hind III- Fragment aus pT0	Pardon, B., 1994
<u>p7C1</u>	Derivat von pUC18-T7 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC1-Plasmids hinter den T7-Promotor bis zur Hind III-Schnittstelle der 16S rRNA	Schäferkordt, J., 1998
<u>p7C2</u>	Derivat von pUC18-T7 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC2-Plasmids hinter den T7-Promotor bis zur Hind III-Schnittstelle der 16S rRNA	Schäferkordt, J., 1998
<u>p7C3</u>	Derivat von pUC18-T7 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC3-Plasmids hinter den T7-Promotor bis zur Hind III-Schnittstelle der 16S rRNA	Schäferkordt, J., 1998
<u>pSTL-T0</u>	pKK3535-Derivat, Amp <sup>R</sup> , Spec <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> und mit Transition A→G (239) relativ zum P1-Start	Pardon, B., 1994
<u>pSTL-C1</u>	Derivat von pSTL-T0 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC1-Plasmids	Schäferkordt, J., 1998

---

<u>pSTL-C2</u>	Derivat von pSTL-T0 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC2-Plasmids	Schäferkordt, J., 1998
<u>pSTL-C3</u>	Derivat von pSTL-T0 mit Insertion der mutierten Leader-Region des pC3-Plasmids	Schäferkordt, J., 1998
<u>pKK3535-Spec</u>	pKK3535-Derivat mit Basenaustausch an Pos. 1192 (relat. zum 5'-Ende der 16S rRNA). Spec <sup>R</sup>	diese Arbeit
<u>pT0-Spec</u>	pT0-Derivat mit Basenaustausch an Pos. 1192 (relat. zum 5'-Ende der 16S rRNA). Spec <sup>R</sup>	diese Arbeit
<u>pC1-Spec</u>	pC1-Derivat mit Basenaustausch an Pos. 1192 (relat. zum 5'-Ende der 16S rRNA). Spec <sup>R</sup>	diese Arbeit
<u>pC2-Spec</u>	pC2-Derivat mit Basenaustausch an Pos. 1192 (relat. zum 5'-Ende der 16S rRNA). Spec <sup>R</sup>	diese Arbeit
<u>pC3-Spec</u>	pC3-Derivat mit Basenaustausch an Pos. 1192 (relat. zum 5'-Ende der 16S rRNA), Spec <sup>R</sup>	diese Arbeit
<u>pIK</u>	pWB-Derivat, dessen singuläre Xba I Schnittstelle (downstream des 16S rRNA-Strukturgens) direkt an die 3'-Seite der 16S rRNA herangerückt wurde	Zirwes O., 2001
<u>pIKC3</u>	pIK-Derivat, mit Box C-Transitionen analog der pC3-Mutante	diese Arbeit
<u>pIKT0</u>	pIK-Derivat, mit A→G (239) Transition analog zu pT0	diese Arbeit

pBR322

Kontrollplasmid für Maxizell-Versuch

Bolivar et al., 1977

**5.4. Enzyme**

AMV Reverse Transkriptase	Promega, USA
Cobra Venom Nuklease (CVE)	Calbiochem, USA
DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>E. coli</i> RNA-Polymerase	freundliche Gabe von R. Wurm nach Burgress et al., 1975
Klenow DNA-Polymerase	Promega, USA
Lysozymchlorid	Sigma, USA
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, USA
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pyrophosphatase, alkalische	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ribonuklease A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ribonuklease T1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ribonuklease T1	Sankyo, Japan
Rinderserumalbumin, acetyliert	Roth, Karlsruhe
RNase-Inhibitor RNasin, rekombinant	Promega, USA
Sequenase 2.0	Amersham Life Science, USA
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, USA
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs, USA
T7 RNA-Polymerase	freundliche Gabe von B. Esters, nach Hecker, 1989
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega, USA
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Bam</i> H I	New England Biolabs, USA
<i>Bgl</i> II	New England Biolabs, USA
<i>Dra</i> I	MBI Fermentas, Litauen
<i>Fsp</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, Litauen
<i>Hinf</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Nae</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Ssp</i> I	MBI Fermentas, Litauen
<i>Stu</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas, Litauen
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas, Litauen

## 5.5. Nukleinsäuren und Nukleotide

### 5.5.1. Oligonukleotide

Name	5'-3'-Sequenz	Herkunft
# 3.0-P1	GGT GGC GCA TTA TAG GGA G	Interactiva, Ulm
# 3.2-P1	GCC GTT GTT CCG TGT CAG T	Interactiva, Ulm
# Spec	CGT AAG GGC CAT GAT GAC TTG A	Interactiva, Ulm
# USB	GTT TTC CCA GTC ACG AC	USB
# 1	CGG TAT TAG CTA CCG T	Interactiva, Ulm
# 3.1	CCG TTG TTC CGT GTC AGT GG	Interactiva, Ulm
# 5	AGC CAC GCC TCA AGG GC	Interactiva, Ulm
# 5X	GCC CTT GAG GCG TGG CT	Interactiva, Ulm
# 5a	GGC GGT CGA CTT AAC GCG	Interactiva, Ulm
# 5b	GAG TTT TAA CCT TGC GGC CG	Interactiva, Ulm
# 5c	TCA ATT CAT TTG AGT TTT AAC C	Interactiva, Ulm
# 6	CCG TCA ATT CAT TTG AG	Interactiva, Ulm
# 6X	CTC AAA TGA ATT GAC GG	Interactiva, Ulm
# 6b	CCA CCG CTT GTG CGG GCC	Interactiva, Ulm
# 7	GAC AGC CAT GCA GCA CC	Interactiva, Ulm
# 7X	GGT GCT GCA TGG CTG TC	Interactiva, Ulm
# 13	CAG CGT TCA ATC TG	Interactiva, Ulm
# 16	TTC TTC GCG TTG CAT CG	Interactiva, Ulm
# 17	CGC CTG CGT GCG CTT TA	Interactiva, Ulm
# 1400	GAT TGT CTG ATA AAT TGT T	Interactiva, Ulm
# 1440	GCG ACG TTA AGA ATC CG	Interactiva, Ulm
# 1540	CAG CGT TCA ATC TGA GCC	Interactiva, Ulm
# 1600	AGC TTC TTC CTG TTA CCG	Interactiva, Ulm
# 1682	AAA AGT TTG ACG CTC AA	Interactiva, Ulm

### 5.5.2. Molekulargewichtsmarker

1 Kb-Leiter, Gibco BRL, kB: 12.2, 11.2, 10.2, 9.2, 8.1, 7.1, 6.1, 5.1, 4.1, 3.1, 2.0, 1.6, 1.0, 0.5, 0.4, 0.34, 0.3, 0.22, 0.2, 0.16, 0.13, 0.08

Smart-Ladder, Eurogentec, kB: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2

### 5.5.3 Nukleotide

Adenosin-5'-( $\gamma$ $^{32}$ P)triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-triphosphat „ultra pure“	Pharmacia, München
Adenosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cytidin-5'-( $\alpha$ $^{32}$ P)triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-triphosphat „ultra pure“	Pharmacia, München
Cytidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat „ultra pure“	Pharmacia, München
Guanosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Uridin-5'-( $\alpha$ $^{32}$ P)triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Uridin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Uridin-5'-triphosphat „ultra pure“	Pharmacia, München
$^{32}$ P-Orthophosphat	Hartmann, Braunschweig
2',3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2',3'-Dideoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2',3'-Dideoxythymidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5'-( $\alpha$ $^{32}$ P)triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 5.6. Standardpuffer

Formamid-Probenpuffer:	80% (v/v) deionisiertes Formamid 0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol in 2x TBE-Puffer
TABE-Probenpuffer:	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin in 1x TBE-Puffer

TAE-Probenpuffer:	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin in 2x TAE-Puffer
TBE-Probenpuffer (denaturierend):	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 7 M Harnstoff in 1x TBE-Puffer
1x TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
10x TBE-Puffer:	0.89 M Tris-Borat, pH 8.3 25 mM EDTA
50x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat, pH 7.5 50 mM EDTA

### 5.7. Medien

YT-Medium:	8 g/l Trypton 5 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt in Aqua dest., auf pH 7.4 mit NaOH
YT-Festmedium:	YT-Medium mit 15 g/l Agar

### 5.8. Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose, hoch gereinigt	Seakam, Hamburg
Amberlite MB-1	ICN Biomedicals, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
Brij 58	Aldrich, Steinheim

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
D-Cycloserin	ICN Biomedicals, USA
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, USA
Dimethylsulfat	Aldrich-Chemie, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Belgien
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fuchsin, basisch	Janssen Chimica, Brüggen
Glycerin	J. T. Baker, Holland
Glykogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Harnstoff	Sigma, USA
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Kethoxal	ICN Biomedicals, USA
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	DuPont, Bad Homburg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Paraffinöl für IR-Spektroskopie	Fluka Chemie AG, Schweiz
Polyethylenglycol (PEG <sub>6000</sub> )	Sigma, USA
Rifampicin	Sigma, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Spectinomycin	Sigma, USA
Tetenal Roentogen Liquid	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetenal Roentogen Superfix	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetracyclin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

### 5.9. Verschiedenes

DE-52 Papier	Whatman, England
Röntgenfilme RX	Fuji Photo film Co. Ltd., Japan
Röntgenfilme X-Omat R	Kodak, USA

Verstärkerfolie DuPont Cronex

Gelbondfolie PAG

Sterilfilter FB 030/3 (0.2  $\mu\text{m}$ )

Dialysemembran VS 0.025  $\mu\text{m}$

Nylonmembran Hybond

DuPont, Bad Homburg

FMC Bioproducts

Schleicher und Schuell, Dassel

Millipore, Neu Isenburg

Amersham

## **6. Methoden**

### **6.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden**

#### **6.1.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten**

Geräte, sowie autoklavierbare Lösungen und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 Minuten, 134°C, 2-3 bar) autoklaviert. Nicht zu autoklavierende Lösungen wurden mittels einer 0.2 µm Membran (FB 030/3, Schleicher und Schuell) sterilfiltriert.

#### **6.1.2. Kultivierung von Bakterienstämmen**

##### **6.1.2.1. Anzucht auf Agarplatten**

Die Bakterienstämme wurden aus tiefgefrorenen Glycerin-Stockkulturen (6.1.4) mittels einer Impföse auf YT-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und bis zum Wachsen von Einzelkolonien bei 37°C kultiviert. Anschließend konnten die Agarplatten bei 4°C gelagert oder einzelne Kolonien in Flüssigkultur übernommen werden (6.1.2.2).

##### **6.1.2.2. Anzucht einer Vorkultur**

3 ml YT-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) wurden mit einer Kolonie von einer YT-Agarplatte angeimpft und im Reagenzglas bei 37°C (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) über Nacht schüttelnd inkubiert.

##### **6.1.2.3. Anzucht von Wachstumskulturen**

Zur Anzucht von Bakterienzellen in größeren Volumina (25 ml bis 800 ml) wurde das Medium jeweils mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit 1/100 Volumen einer Vorkultur angeimpft. Der Wachstumsverlauf wurde durch Streumessung (6.2.1.2) bei 600 nm im Spektralphotometer (Beckmann Modell 34) verfolgt.

#### 6.1.2.4. Anlegen von Glycerinkulturen

1 ml einer *Escherichia coli* Kultur wurde in einem Stockgläschen mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt, 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit mehrfach invertiert. Anschließend konnte die Kultur bei -70°C gelagert werden.

#### 6.1.3. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Methode nach Dagert et al., 1979, verwendet. Dazu wurden 100 ml YT-Medium mit 1/100 Volumen einer Vorkultur (6.1.2.2) des entsprechenden *Escherichia coli* Stammes angeimpft und auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 inkubiert.

Anschließend wurde die in 50 ml Corex Zentrifugengläser umgefüllte Kultur für 20 Minuten auf Eis abgekühlt, 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R), der Überstand dekantiert und das Pellet vorsichtig in 0.5 Volumen eiskühlem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation von 60 Minuten auf Eis wurde, wie zuvor beschrieben, erneut zentrifugiert und dekantiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 1/25 Volumen eiskaltem 0.085 M CaCl<sub>2</sub> mit 15% (v/v) Glycerin aufgenommen, zu 200 µl aliquotiert und mindestens 1 Stunde (max. 24 Stunden) bei 4°C weiterinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation (6.1.4) bei -70°C gelagert.

#### 6.1.4. Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen (6.1.3) wurde die Methode nach Hanahan, 1985, verwendet. Dazu wurden 200 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 5-10 ng Plasmid-DNA oder 0.1-7.5 µl eines Ligationsansatzes in einem Volumen von 20 µl vorsichtig hinzu pipettiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation auf Eis, gefolgt von einem 3-minütigen Hitzeschock bei 42°C, wurde der Transformationsansatz mit 800 µl vorgewärmtem YT-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden Aliquots des Ansatzes auf YT-Platten ausgestrichen und bis zum Wachsen von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert.

Die Transformationsrate der kompetenten Zellen pro µg DNA wurde durch Auszählung der Kolonien unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge und des ausplattierten Volumens bestimmt. Sie ist abhängig vom transformierten Plasmid und lag bei den durchgeführten Präparationen zwischen  $5 \times 10^4$  bis  $6 \times 10^5$  Transformanden pro µg DNA.

## 6.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 6.2.1. UV/VIS-Spektroskopie

#### 6.2.1.1. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure erfolgte in einer Suprasil-Quarzküvette durch Absorptionsmessung der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Beckmann Spektralphotometer Modell DU 64). Damit die zu messenden Absorptionswerte im linearen Bereich liegen, wurde die Nukleinsäurelösung bis zu einer  $OD_{260}$  zwischen 0.1 und 1.0 verdünnt.

Für die Berechnung der Konzentration gilt unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die vereinfachte Beziehung:

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

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

#### 6.2.1.2. Streumessung

Das Bakterienwachstum wurde im Beckmann Spektralphotometer (Modell DU 64) durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

#### 6.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Microassay)

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des "Bradford-Microassays" der Firma Bio Rad. Zunächst wurden Eichlösungen verschiedener Proteinkonzentrationen eines BSA-Standards hergestellt. Dazu wurden je 0.8 ml jeder Eichlösung und Probelösung sowie eines Leerwertes in Form von Aqua dest. mit jeweils 0.2 ml "Dye Reagent Concentrate" versetzt, gut gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption aller Lösungen im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Für die Eichgerade wurden die Proteinkonzentrationen der Eichlösung gegen ihre Absorption aufgetragen und die Regressionsgerade ermittelt. Die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proben ließ sich anschließend durch Umformen der Geradengleichung und Einsetzen der Absorptionswerte der Probelösungen berechnen.

### 6.2.2. Radioaktivitätsmessung

Proben, die mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$ Phosphor markiert wurden, konnten im Tritiumkanal eines Beckmann LS 5000 TD Szintillationszählers durch Bestimmung der Cerenkov-Strahlung gemessen werden.

### 6.2.3. Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung der Bandenintensitäten von Autoradiographien wurden diese mittels eines HP-Scanners ScanJet 4C/T aufgenommen und die digitalisierte Aufnahme über das Programm "Scion Image" quantifiziert und ausgewertet.

### 6.2.4. Isolation von Nukleinsäure

#### 6.2.4.1. Isolation analytischer Mengen Plasmid-DNA

Zur schnellen, analytischen Isolation von Plasmid-DNA wurde die Methode von Ish-Horowitz et al., 1981, verwendet. Dazu wurden 3 ml einer Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen für 5 Minuten bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Hereaus Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  Lyselösung I resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lyselösung II und erneuter 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 150  $\mu\text{l}$  KOAc, pH 4.8 zur Fällung hinzu pipettiert und die Lösung weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend konnten chromosomale DNA und Zelltrümmer durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA getrennt werden. Der klare Überstand wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Phenol/ Chloroform (6.2.5.1) extrahiert. Nach der Lyophilisation wurde dann das Pellet in 25  $\mu\text{l}$  Aqua dest. gelöst. Die Plasmid-Konzentration wurde anschließend entweder über Abschätzung auf einem Agarosegel oder über Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer bestimmt (6.2.1.1).

Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur analytischen Restriktionsanalyse (6.2.9.1) eingesetzt.

Lyselösung I:	50 mM Glucose
	10 mM EDTA, pH 8.0
	25 mM Tris-Hcl, pH 8.0
	4 mg/ml Lysozymchlorid
	10 $\mu\text{g/ml}$ RNase A



Zur Isolation präparativer Mengen Plasmid-DNA wurde die Methode von Hillen et al., 1981, eingesetzt. Dazu wurde eine 800 ml Bakterienkultur (6.1.2.3.) auf zwei JA 10-Becher aufgeteilt und für 5 Minuten bei 8000 rpm, 4°C (Beckmann Zentrifuge J2-21, JA 10-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 8 ml Saccharoselösung bei 4°C resuspendiert und in Polycarbonröhrchen (Ti55.2) überführt. Anschließend wurden je 3 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 und 3 ml Lysozymlösung hinzugegeben und der Ansatz auf Eis inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation wurde 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben, weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert und die Röhrchen gegeneinander austariert. Es folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 44000 rpm, 4°C (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der klare Überstand wurde mit RNase A versetzt (Endkonzentration 50 µg/ml) und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Proteinase K (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt, weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert und in einen JA 17-Becher überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 0.5 Volumen PEG-Lösung für 30 Minuten auf Eis und nachfolgender 30-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm, 4°C (Beckmann Zentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 10 ml Aqua dest. aufgenommen und wie unter 6.2.5.1 beschrieben extrahiert. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt (6.2.5.2) und die DNA in Aqua dest. oder TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration wurde bestimmt (6.2.1.1) und die Qualität der DNA auf einem Agarosegel (6.2.6.1) kontrolliert.

Saccharose-Lösung:	25% (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10% (w/v) Brij 35 1 Volumen 10% (w/v) Na-Deoxycholat, pH 8.0
RNase A:	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 von DNase-Aktivität befreit (Maniatis, 1982)
Proteinase K:	20 mg/ml in Aqua dest.
PEG-Lösung:	30% (w/v) PEG <sub>6000</sub> in 1.5 M NaCl

#### **6.2.4.4. Isolation von superspiralisierter Plasmid-DNA**





Nach einer Phenol/ Chloroform-Extraktion (6.2.5.1) wurde die Nukleinsäure aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2.5 bis 3 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert. Die Fällung erfolgte stets durch 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert, der ethanolische Überstand abgenommen und das Pellet einmal mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophilisiert und in einem geeigneten Volumen Aqua dest. oder TE-Puffer aufgenommen.

### **6.2.5.3. Dialyse von DNA und RNA**

Dialysen von Nukleinsäure wurden stets bei 4°C durchgeführt. Dabei wurden kleine Volumina (bis 100 µl) mittels VS Millipore Membranfilter (Porenweite 0.025 µm) dialysiert. Der Filter wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf den Dialysepuffer (TE-Puffer oder Aqua dest.) gelegt und für einige Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die zu dialysierende Nukleinsäurelösung auf die Mitte des Filters aufgebracht. Nach 30 bis 60 Minuten wurde die Lösung vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Dialyse von RNA erfolgte analog.

Große Volumina Nukleinsäurelösungen wurden im Dialyseschlauch (Spektrum Companies, MWCO: 6-8000) 2 mal für mindestens 3 Stunden gegen 1 Liter Dialysepuffer (TE-Puffer oder Aqua dest.) dialysiert. Zur Vorbereitung der Schläuche wurden diese für 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen, 10 Minuten in 1 mM EDTA gekocht und anschließend in absolutem Ethanol bei 4°C aufbewahrt (Maniatis et al., 1982). Vor der Dialyse wurde der Dialyseschlauch für einige Minuten in dem entsprechenden Dialysepuffer gewaschen und äquilibriert.

### **6.2.6. Gelelektrophorese**

#### **6.2.6.1. Agarosegelelektrophorese**

Zur analytischen und präparativen Analyse von Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und RNA wurden 0.5% bis 2.5% (w/v) Agarosegele (Maniatis et al., 1982) verwendet. Hierzu wurde 100 ml Gellösung hergestellt, die nach dem Abkühlen auf etwa 60°C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt wurde und als Flachbettgel (14 x 11 cm) in 1x TAE-Puffer (mit 0.5 µg/ml EtBr) gegossen wurde.

Die aufzutrennenden Proben wurden im gleichen Volumen 2x TAE-Probenpuffer (2.6) aufgenommen. Gelkammern, die für RNA-Proben benutzt wurden, mußten zuvor für mehrere Stunden mit 0.1% (v/v) DEPC-Wasser behandelt werden, um vorhandene Nukleasen zu inaktivieren.

Die Proben wurden anschließend für 1-1.5 Stunden bei 100 bis 120 Volt elektrophoretisiert und konnten durch Fluoreszenz des in doppelsträngige Bereiche der Nukleinsäure interkalierenden Ethidiumbromids auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) bei 302 nm sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurden die Gele über eine CCD-Videokamera (Sanyo) mit UV-Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters dokumentiert.

Bei präparativen Agarosegelen wurde "ultrapure" Agarose verwendet. Die Banden mit der gesuchten DNA-Fragmentgröße wurden anschließend durch Ausschneiden aus dem Agarosegel und durch Aufreinigung über den QIAquick Gel Extraktionskit (6.2.8.1) extrahiert.

### 6.2.6.2. Denaturierendes Agarosegel

Um RNA strukturunabhängig nach dem Molekulargewicht auftrennen zu können, wurde ein 1.2% (w/v) denaturierendes Agarosegel mit 6% (v/v) Formaldehyd verwendet (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA mit 1 Volumen Denaturierungspuffer versetzt und 15 Minuten auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung schnell auf Eis abgekühlt, mit 1/3 Volumen Auftragspuffer vermischt und direkt auf das Agarosegel aufgetragen. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zu den Proben konnte nachfolgend die Elektrophorese und der Transfer der RNA auf die Nylonmembran kontrolliert werden.

Denaturierungspuffer:	24% (v/v) Formaldehyd 3.5x MOPS-Puffer 40 µg/ml Ethidiumbromid
Gellösung:	1.2% (w/v) Agarose 6% (v/v) Formaldehyd 1x MOPS-Puffer
Auftragspuffer:	50% (v/v) Glycerin 5 mM EDTA 0.01% (w/v) Bromphenolblau bzw. Xylencyanol
10x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA

### 6.2.6.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende PAGE wurde zur analytischen Auftrennung von Plasmidsequenzierungen (6.2.10) und Primer-Extension-Reaktionen (6.3.1) verwendet. Als denaturierendes Agens wurde der Gellösung 7 M Harnstoff zugesetzt.

Standardmäßig wurde eine 10% (w/v) Gellösung mit einer Vernetzung von (20:1, Acrylamid : Bisacrylamid) hergestellt, wobei die Geldimension 390 x 335 x 0.4 mm betrug. Vor Gebrauch wurden die Glasplatten mit Aqua dest., Aceton und Ethanol gewaschen und mit Repelcote (0.04% (v/v) Dimethyldichlorsilan in Chloroform) silikonisiert. Der Gellösung wurde nach Entgasung TEMED und APS (6.2.6.2) zugefügt und diese zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Die Nukleinsäureproben wurden in 1x TBE/ Harnstoff-Probenpuffer oder 1x Formamid-Probenpuffer (5.6) aufgenommen, für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und auf dem vorgeheizten Gel (10' 25 W, 10' 50 W und 10' 75 W) bei 75-90 W aufgetrennt.

Um bei radioaktiven Nukleinsäureproben die Kontamination des Anodenpuffers möglichst niedrig zu halten, wurde das untere Gelende (Anodenseite) mit DE-81 Papier (Whatman) umwickelt.

#### 6.2.6.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das Gelsystem (32 cm x 24 cm x 1 mm) besteht aus einem ca. 4 cm langen Sammelgel, in welchem die Proteinproben nach dem Auftrag auf das Gel fokussiert werden, und einem ca. 20 cm langen Sammelgel, in welchem die Proteine nach Ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Sammelgellösung:	6% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1) 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 0.1% (w/v) SDS 0.1% (v/v) TEMED 0.1% (w/v) APS
Trenngellösung:	15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 375 mM Tris-HCl, pH 8.8 0.1% (w/v) SDS 0.1% (v/v) TEMED 0.1% (w/v) APS
Laemmli-Laufpuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8.8 380 mM Glycerin



	1.19 g Bis-Tris 0.19 g EDTA ad 100 ml mit Aqua dest., pH 5 mit CH <sub>3</sub> COOH
10x O-Laufpuffer I:	10 mM Bis-Tris 79 mM Essigsäure ad 1 Liter mit Aqua dest.
10x U-Laufpuffer I:	180 mM Kaliumacetat 86 mM Essigsäure ad 1 Liter mit Aqua dest.
2D Probenpuffer:	6 M Harnstoff 10 mM DTT 10 mM Bis-Tris 79 mM Essigsäure 0.5 µg/ml Fuchsin

Auftrennung in der zweiten Dimension:

Die Gelkammer ermöglichte die parallele Elektrophorese von 5 vertikalen Flachgelen in der Dimension 100 mm x 95 mm x 1.5 mm. Vor dem Aufpolymerisieren der 1. Dimension wurde die Kammer in einen flachen Kunststoffuntersatz gestellt, um ein Sockelgel zu gießen. Dazu wurden 150 ml Gellösung II mit 400 µl TEMED und 4 ml APS versetzt und in den Untersatz gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurden die vorsichtig aus den Glasröhrchen gedrückten Rundgele auf die Oberkante der Elektrophoresekammer gelegt und mit weiteren angesetzten 200 ml Gellösung II direkt auf das Flachgel einpolymerisiert. Die Elektrophorese der 2. Dimension erfolgte mit Laufpuffer 2. Dim. bei 4°C, 80 Volt für 19 Stunden. Anschließend wurden die Gele wie unter 6.2.7.5 mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt.

Gellösung II:	372 g/l Harnstoff 186 g/l Acrylamid 4.8 g/l Bisacrylamid 54 ml/l Essigsäure 10 ml/l 5 N KOH pH 4.5
Laufpuffer 2. Dimwnsion:	14g/l Glycin 3 ml/l Eisessig pH 4.0





ad 1 l mit Aqua dest.

Fixierlösung II: 0.75% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### **6.2.7.2. Toluidinblau-Färbung**

Der Nachweis von RNA auf Mischgelen erfolgte durch Färbung mit Toluidinblau. Dazu wurde das entsprechende Gel eine Stunde in einer 0.1% (w/v) Toluidinblau-Lösung mit 7.5% (v/v) Essigsäure vorsichtig geschüttelt und anschließend über Nacht in 1% (v/v) Essigsäure so lange entfärbt, bis der Hintergrund fast vollständig entfärbt war. Zur Dokumentation wurden die Mischgele im Anschluß an die Färbung auf Whatman-Papier übertragen und im Geltrockner für 2 Stunden getrocknet.

### **6.2.7.3. Autoradiographie**

Der Nachweis radioaktiv markierter Nukleinsäure in Gelen erfolgte über die Belichtung eines Röntgenfilmes. Nach der Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig auf einen alten Röntgenfilm (oder Whatman 3MM Papier) aufgezogen und durch eine dünne Folie abgedeckt. Die Belichtung erfolgte in einer Expositionskassette (Siemens) je nach Probe für 30 Minuten bis zu 5 Tagen. Um Diffusion der Proben innerhalb des Gels zu verhindern, wurden die Expositionskassetten bei -20°C gelagert. Bei Benutzung einer Verstärkerfolie erfolgte die Exposition bei -70°C. Der Film wurde für 5 Minuten in Tetenal Röntgen-Rapid-Entwickler entwickelt, für 10 Sekunden in 3% (v/v) Essigsäure abgestoppt und für 2-5 Minuten im Tetenal Röntgenfixierbad fixiert.

### **6.2.7.4. UV-Shadowing**

Bei Aufreinigung präparativer Mengen Nukleinsäure wurde das Polyacrylamidgel auf eine mit Fluoreszenzindikator beschichtete Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Alufolie Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) gelegt und von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Durch Absorption des UV-Lichtes durch die Nukleinsäure wurde der darunter liegende Fluoreszenzindikator nicht angeregt und die Bande erschien dunkel vor dem übrigen, hell fluoreszierenden Hintergrund.

### **6.2.7.5. Coomassie Färbung**

Für den Nachweis von Proteinen im SDS-Gel oder nach 2D Auftrennung wurde Coomassie Brilliant Blue R250 verwendet. Dazu wurde das Gel für 2 Stunden in einer

Färbelösung aus 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Gel so lange in Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert, bis die Banden bzw. Proteinspots deutlich erkennbar waren und der Hintergrund nahezu entfärbt war.

## **6.2.8. Elution von Nukleinsäuren aus einer Gelmatrix**

### **6.2.8.1. DNA-Elution aus Agarosegelen mittels QIAquick Gel Extraktionskit**

Diese Methode eignet sich zur Elution von 70 bp bis 10 kbp großen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Nach einer Elektrophorese wurde im ersten Schritt das gewünschte Gelstück herausgeschnitten und unter leichtem Schwenken für 10 Minuten in 3 Volumen Lösungspuffer bei 50°C inkubiert. Ein Indikator im Lösungspuffer zeigte den pH-Wert an. Bei zu alkalischem pH-Wert wurden 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5.0 hinzugefügt. Diese DNA-Lösung wurde auf die Silicasäule pipettiert und für 1 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde mit 750 µl Waschpuffer erneut für eine Minute zentrifugiert und nach Entfernen des Waschpuffers noch einmal für 1 Minute nachzentrifugiert.

Zur Elution der DNA von der Silicamatrix wurden 30-50 µl Aqua dest. verwendet, die auf die Säule pipettiert wurden. Nach einer Minute Inkubation wurde erneut eine Minute zentrifugiert und die eluierte DNA in einem sauberen Eppendorfgefäß aufgefangen. Zur Entfernung chaotroper Salze wurde die eluierte DNA wie unter 6.2.5.2 beschrieben erneut gefällt.

### **6.2.8.2. DNA-Elution aus Agarosegelen mittels Glaswolle**

Die DNA wurde über ein 0.5-1.2%iges (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande aus dem Gel herausgeschnitten. Das Agaroseblöckchen wurde anschließend in ein kleines 0.5 ml PCR-Eppendorfgefäß überführt, welches auf dem Gefäßboden ein kleines Loch besaß, das durch silikonisierte Glaswolle bedeckt war. Das PCR-Eppendorfgefäß wurde in ein größeres Eppendorfgefäß gestellt, welches als Auffanggefäß diente. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 rpm. Das erhaltene Eluat enthielt die DNA, die anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (6.2.5.1) weiter aufgearbeitet wurde.

### **6.2.8.3. RNA-Elution aus denaturierenden Polyacrylamidgelen**

Radioaktiv markierte *in vitro* Transkriptionsprodukte wurden über die Trennung auf 5% denaturierenden Polyacrylamidgelen (6.2.6.3) aufgereinigt. Zur Identifizierung der Transkriptbanden wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 Minuten autoradiographiert (6.2.7.3) und die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Nicht radioaktive Transkripte wurden über UV-Shadowing (6.2.7.4) sichtbar gemacht. Um die RNA aus dem Gel eluieren zu können, wurde das Gelstück in 400 µl Elutionspuffer (0.5 M NaOAc in 1x TBE) bei 4°C über Nacht passiv eluiert. Anschließend wurde der Puffer vorsichtig abgenommen und wie unter 6.2.5.2 beschrieben gefällt und in entsprechendem Volumen Aqua dest. aufgenommen.

## 6.2.9. Enzymatische Reaktionen

### 6.2.9.1. Restriktionshydrolyse von DNA

Mit Hilfe der Restriktionshydrolyse ist es möglich, ein DNA-Molekül an spezifischer Stelle zu zerschneiden und durch die Analyse der so erhaltenen DNA-Fragmente Auskunft über die spezifischen Schnittpositionen des Restriktionsenzym zu erhalten. Die Restriktion kann aber auch zur Herstellung geeigneter Klonierungsvektoren verwendet werden.

Zur Hydrolyse von Plasmid-DNA wurden ausschließlich Restriktionsenzyme vom Typ II Endonukleasen (Zabeau et al., 1979) eingesetzt. Beim Typ II ist die sequenzspezifische Erkennungsstelle zugleich auch die Spaltungsstelle, an der die DNA vom Enzym restringiert wird. Abhängig vom ausgewählten Enzym können dabei doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen, die entweder ein 5' bzw. 3' überhängendes Ende ("sticky end") besitzen oder aber ein glattes Ende ("blunt end") aufweisen.

Bei der Hydrolyse wurde hinsichtlich Inkubations-Temperatur und Pufferbedingungen nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Nach der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes zur Überprüfung auf einem Agarosegel analysiert (6.2.6.1). Bei unvollständiger Restriktion wurde das Reaktionsvolumen erhöht, mit frischem Enzym versetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert.

Nach der Restriktion wurde die DNA mit Phenol/ Chloroform extrahiert (6.2.5.1).

### 6.2.9.2. Hydrolyse von Transkriptionsansätzen mit DNase I

Zur Beseitigung der im *in vitro* Transkriptionsansatz (6.3.2) verbliebenen Template-DNA wurde nach einer *in vitro* Transkription eine Hydrolyse mit DNase I (RNase frei) angeschlossen. Zusätzlich wurde das Transkript noch über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (6.2.6.7) aufgereinigt.





$$T_m = 69.3 + 0.41 (G + C)\% - 650 / L$$

L = Länge des Oligonukleotids

Nach Beendigung wurde der PCR-Ansatz ohne Paraffin in ein neues Eppendorfgefäß überführt, Phenol/Chloroform extrahiert (6.2.5.1), Ethanol gefällt (6.2.5.2) und das PCR-Produkt auf einem Agarosegel (6.2.6.1) auf seine Qualität hin analysiert. Je nach Menge der Nebenprodukte wurde das gewünschte Fragment wie unter 6.2.8 beschrieben aufgereinigt.

dNTP-Lösung: 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
in 10 mM Tris-HCl, pH 7.8

10x *Pfu*-Puffer: 100 mM KCl  
200 mM Tris-HCl, pH 8.8  
100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 mM MgSO<sub>4</sub>  
1000 µg/ml BSA  
1% (v/v) Triton X-100

### 6.2.10. Plasmid-Sequenzierung mit USB Sequenase 2.0 Kit

Die Sequenzierung wurde mit dem USB Sequenase 2.0 Kit durchgeführt und lehnt sich an die Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. ,1977, an. Das Prinzip beruht auf der statistisch verteilten Unterbrechung der Synthese des Komplementärstranges durch den Einbau eines Didesoxynukleotids. Durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe an diesem Nukleotid wird die DNA-Synthese unterbrochen. Für jedes Nukleotid wird bei der Sequenzierung ein eigener 4 dNTP-Mix eingesetzt, der neben den vier dNTP's zusätzlich im geringeren Verhältnis noch eines der vier ddNTPs besitzt. Bei der im Kit bezeichneten Sequenase handelt es sich um eine T7 Polymerase ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Für die Sequenzierung gelten die Angaben des Herstellers.

Vor der eigentlichen Sequenzierungsreaktion wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl in 0.2 M NaOH und 0.2 M EDTA für 40 Minuten bei 37°C denaturiert, Ethanol gefällt (6.2.4.2) und lyophilisiert. Das DNA-Pellet wurde dann zur Hybridisierung in 7 µl Aqua dest. gelöst, mit 2 µl 5x Sequenase-Puffer und entweder 1 µl Oligonukleotid (0.2 pmol/µl) oder mit 1 µl 5' [<sup>32</sup>P]-markiertem Oligonukleotid (5x 10<sup>5</sup> bis 1 x 10<sup>6</sup> cpm) versetzt und für 2 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungsansatz langsam (1°C pro Minuten) auf Raumtemperatur abgekühlt. Hybridisierungsansätze mit unmarkiertem Oligonukleotid wurden mit dem Markierungsansatz I gemischt; bei Benutzung endmarkierter Oligonukleotide wurde

der Markierungsansatz II verwendet. Der Ansatz wurde in beiden Fällen 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 3.5 µl dieses Ansatzes zu 2.5 µl bei 37°C vorinkubierter ddA-, ddC-, ddG-, ddT-Lösung pipettiert und für 5 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. Durch die Zugabe von 4 µl Stop-Lösung und 3-minütiger Denaturierung bei 96°C wurde die Reaktion gestoppt und die Proben wurden auf einem 10% PAA-Gel (6.2.6.3) analysiert.

5x Sequenase-Puffer:	200 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 250 mM NaCl
5x dG-Labeling-Mix:	7.5 µl dCTP 7.5 µl dGTP 7.5 µl dTTP
Markierungsansatz I:	1 µl 0.1 M DTT 2 µl dG-Labeling-Mix (1:5 in Aqua dest.) 2 µl Sequenase (1:8 in E.-Verdünnungspuffer) 0.5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP
Markierungsansatz II:	Markierungsansatz I ohne 0.5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP
8x Enzym-Verdünnungspuffer:	10 mM Tris-HCl 5 mM DTT 0.5 mg/ml BSA
ddA-, ddC-, ddG-, ddT-Lösung:	50 mM NaCl je 80 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP mit dem jeweils 8 µM des entsprechenden ddNTP
Stop-Lösung:	95% (v/v) Formamid 20 mM EDTA 0.05% (w/v) Bromphenolblau 0.05% (w/v) Xylencyanol
Sequenase Version 2.0:	13 U/µl in 20 mM K-Phosphat, pH 7.4 1 mM DTT

0.1 M EDTA  
50% (v/v) Glycerin

### 6.3. Spezielle Methoden

#### 6.3.1. Primer-Extension Analyse

##### 6.3.1.1. Primer-Extension von RNA mit Reverser Transkriptase

Die Primer-Extension wurde an die von Stern et al., 1988, beschriebene Methode zur Identifizierung von spezifischen RNA-Hydrolyseansätzen (6.3.9) bzw. chemischen Modifikationen (6.3.10) angelehnt. Sie diente aber auch der Untersuchung von isolierter Gesamt-RNA. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der indirekten Betrachtung von RNA-Fragmentlängen über die *in vitro* Synthese einer cDNA. Bei der Primer-Extension wird eine virale Polymerase verwendet, welche RNA statt DNA als Template erkennt und als Reverse Transkriptase (RT) bezeichnet wird.

Der erste Schritt der Primer-Extension ähnelt der Hybridisierung bei der DNA-Sequenzierung (6.2.10), wobei ausschließlich endmarkiertes Oligonukleotid benutzt wurde. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA bzw. 50 ng modifizierte RNA mit 0.5 µl markiertem Primer ( $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  cpm) in einem Volumen von 4.5 µl mit 100 mM KCl und 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 Endkonzentration gemischt. Dieser Ansatz wurde für 3 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (1°C pro Minute). 2 µl dieses Hybridisierungsansatzes wurden dann mit 1 µl 5x Primer-Extension-Puffer und 2 µl einer 4 dNTP-Lösung mit 1 U AMV-RT für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Formamid-Probenpuffer (5.6) und 3-minütiger Denaturierung bei 96°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf einem 10% denaturierenden PAA-Gel (6.2.6.3) analysiert.

5x Primer-Extension-Puffer:	125 mM Tris-HCl, pH 8.3 125 mM KCl 125 mM MgCl <sub>2</sub> 125 mM DTT
4 dNTP-Lösung:	je 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und eine Einheit AMV-RT/ Ansatz in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

##### 6.3.1.2. Primer-Extension von RNA mit stringentem Abbruch (Spec-Kontrolle)

Mit dieser Analyse ist es möglich, die plasmidären ribosomalen 16S rRNA-Produkte von chromosomalen Produkten zu unterscheiden. Dies geschieht durch eine Punktmutation C->U an Position 1192 der 16S rRNA, die der Zelle eine strukturvermittelte Spectinomycin-Resistenz verleiht. Die Primer-Extension Analyse erfolgte mit folgenden Abwandlungen: ein Oligonukleotid, das zwei Nukleotide upstream der Position 1192 hybridisiert, wurde durch einen Nukleotidmix, der kein dCTP, aber dafür ddCTP enthielt, auf chromosomaler 16S RNA um zwei Nukleotide verlängert. Die cDNA der plasmidären rRNA Produkte wurde um 22 Nukleotide verlängert, bevor ein ddCTP eingebaut werden konnte. Durch Quantifizierung der Abbruchbanden konnte die Menge plasmidärer Produkte gegenüber chromosomalen Produkten ermittelt werden.

### 6.3.1.3. Primer-Extension Sequenzierung von RNA

Die Primer-Extension Sequenzierung erfolgte analog zu der in 6.3.1.1 beschriebenen Methode, wobei das Reaktionsvolumen der Hybridisierung 8.5 µl betrug.

Nach der Hybridisierung wurden in einem Volumen von 6 µl jeweils 2 µl des Ansatzes mit 2 µl der jeweiligen ddNTP-Lösung und einer Einheit AMV-Reverse Transkriptase in 1x Primer-Extension Puffer für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Die weitere Behandlung und Analyse der Proben erfolgte wie unter 6.3.1.1 beschrieben.

ddNTP-Lösung: je 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
zusätzlich enthielten der  
A-Mix: 50 µM ddTTP  
C-Mix: 50 µM ddGTP  
G-Mix: 50 µM ddCTP  
T-Mix: 62.5 µM ddATP  
in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

### 6.3.1.4. Primer-Extension zur Analyse von DNA mit Klenow-Polymerase

Das lyophilisierte Pellet wurde in 35 µl Aqua dest. rückgelöst. Nach Zugabe von 1 µl ( $1 \times 10^6$  cpm) radioaktiv markiertem Oligonukleotid und 4 µl 10 mM NaOH wurde der Ansatz für 2 Minuten bei 80°C und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation wurden 5 µl 10x TMD-Puffer hinzu pipettiert, für 3 Minuten bei dem



### 6.3.3. Maxizellversuch

Zur Unterscheidung plasmidärer und chromosomaler rRNA-Produkte kann man den UV sensitiven *Escherichia coli* Stamm CSR 603 nach einer für rRNA-Transkripte modifizierten Arbeitsvorschrift (Stark et al., 1982) verwenden. Statistisch gesehen trifft das harte UV Licht die sehr viel größere chromosomale DNA häufiger als die Plasmid-DNA, die überdies noch in mehreren Kopien pro Zelle vorliegt. Durch das Ausbleiben der UV-Reparatur im Stamm CSR603 wird die geschädigte DNA von zellulären Nukleasen abgebaut und es ist keine Transkription ribosomaler RNA mehr möglich. Hingegen bleibt die Transkription von Plasmid-DNA relativ unbeeinflusst. Fügt man dem Inkubationsmedium für die Zellen nach der Bestrahlung radioaktives Orthophosphat zu, sieht man nach Isolation der ribosomalen RNA ausschließlich die Produkte, die vom Plasmid stammen.

Nach Transformation der aus DH1 Stämmen isolierten pKK- und pSTL-Plasmide in den Stamm CSR603 wurden die erhaltenen Kolonien replikaplattiert und die Replikaplatte mit UV-Licht bestrahlt (5 Minuten, 10 cm Abstand, 3 Sylvania Germicidal-Lampen) und bei 37°C inkubiert. Für den weiteren Versuch wurden solche Kolonien benutzt, die auf der UV bestrahlten Platte nicht gewachsen sind.

Aus einer Ueber-Nacht-Kultur wurden 100 ml YT-Medium angeimpft und die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 herangezogen. Von diesem Ansatz wurden 1/8 Volumen für 10 Sekunden mit UV-Licht bestrahlt und 10 ml Zellkultur in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 2 Stunden weiterinkubiert. Anschließend wurden 100 µl D-Cycloserin (20 mg/ml) hinzugegeben und für weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 5 ml ZPM<sup>0</sup>-Medium mit 5 µl Thiamin (1 mg/ml) und 10 µl Ampicillin (25 mg/ml) überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml ZPM<sup>0</sup>-Medium mit 4 µl Thiamin und 8 µl Ampicillin resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µCi <sup>32</sup>P-Orthophosphat (mit NaOH neutralisiert) wurden die Zellen für 12 Stunden bei 37°C in Zinsergläsern weiterinkubiert.

Die Isolation der rRNA erfolgte in Eppendorf-Gefäßen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Lysepuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 25 µl Lysepuffer resuspendiert, die Proben dreimal in N<sub>2</sub> eingefroren und im 40°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden 164 µl Lösung M hinzu pipettiert und für 15 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 200 µl Phenol und 20 µl 10% (w/v) SDS extrahiert. Nach Wiederholung des letzten Extraktionsschritts und Chloroformextraktion wurden 10 µl 1 M NaOAc und 3 Volumen EtOH zugesetzt und die RNA gefällt, gewaschen und lyophilisiert. Nach Bestimmung der Gesamt-Aktivität wurde die RNA in 10 – 20 µl TKM-Puffer gelöst.

Lysepuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 7.6 60 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 20% (w/v) Saccharose 150 µg/ml Lysozym
TKM-Puffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8.0 60 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Lösung M:	1 ml TKM-Puffer 340 µl 1% (w/v) Natrium-Deoxycholatlösung 200 µl 5% (w/v) Brij 58-Lösung 15 µl RNase-freie DNase I 85 ml 100 mM MgSO <sub>4</sub>
ZPM <sup>0</sup> -Medium	50 mM Tris 1.7 mM Natriumcitrat 2 mM Kaliumchlorid 0.41 mM MgSO <sub>4</sub> 2 µM FeCl <sub>3</sub> 2 g Glucose 2 g phosphatfreies Casaminoacid 1 µg Thiamin mit HCl auf pH 7.4 einstellen, Endvolumen 1 l

#### 6.3.4. Polysomenisolation

Für die Isolation von Polysomen wurde die Methode nach Godson et al., 1967, verwendet. Dazu wurde eine 100 ml Bakterienkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur schnell in ein Becherglas überführt, das in einem EtOH/ Trockeneis Gemisch vorgekühlt und zügig auf 0°C abgekühlt wurde (Kontrolle über elektronisches Stabthermometer). Danach wurde die Kultur in ein ebenfalls vorgekühltes Corex-Röhrchen überführt und für 3 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und restliches Medium vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Das Zellpellet wurde in 400 µl 25% (w/v) Saccharoselösung in 0.01M Tris-HCl, pH 8.1 resuspendiert und anschließend mit 100 µ Lysozymlösung II gemischt. Nach 45 Sekunden Inkubation wurde die Lösung



	0.1 M MgSO <sub>4</sub> 1% (w/v) Desoxycholat in 100 mM Tris-HCl, pH 8.1
10x Gradientenpuffer:	500 mM Tris-HCl pH 7.8 500 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub>
15% bzw. 30% (w/v) Saccharose:	19.5 g bzw. 39 g Saccharose 13 ml 10x Gradientenpuffer 390 µl DTT 1M ad 130 ml mit Aqua dest.
BSCE-Puffer:	50 mM Tris-Borat, pH 7.2 150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA, pH 8.0 1% (w/v) SDS
Lagerungs-Puffer:	50mM Natriumcacodylat, pH 7.2 10 mM MgCl <sub>2</sub> 150 mM KCl 1.5 mM DTT

### 6.3.5. Isolation von Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten

Zur Isolation von Ribosomen für die Proteinanalyse über 2D Gelelektrophorese (6.2.6.5) wurde eine 200 ml Bakterienkultur bei der entsprechenden Temperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gestellt und in einem JA-14-Becher für 10 Minuten bei 8000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 525 µl 25% (w/v) Saccharoselösung in 0.01 M Tris-HCl pH 8.1 resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte wie unter 6.3.4 beschrieben mit jeweils doppelten Volumina der Lösungen. Abweichend wurden zur Isolation von ribosomalen Partikeln 10-30% Saccharosegradienten verwendet, die auf "tight couple" Bedingungen eingestellt wurden. "Tight couple" Saccharosegradienten ermöglichen durch die auf 6 mM eingestellte Mg<sup>2+</sup>-Konzentration die Isolation der Gesamt-Ribosomen nach ihrer Funktionalität. Bei dieser Ionenkonzentration zerfallen funktionslose Ribosomen in Ihre Untereinheiten, während intakte Ribosomen nicht in ihre Untereinheiten zerfallen. Der Gradientenlauf

erfolgte für 13 Stunden bei 21000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge. Die Gradienten wurden wie unter 6.3.4 beschrieben abgepumpt, fraktioniert und gefällt. Nach Aufnahme der gefällten Fraktionen in 100-200 µl Lagerungs-Puffer wurden sie in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 6.3.6. Rifampicin-Kinetik

Zur Bestimmung von Syntheseraten und Halbwertszeiten ribosomaler RNA Transkripte kann man das Antibiotikum Rifampicin, das die Initiation der Transkription blockiert, verwenden. Dadurch werden nur noch bereits initiierte Transkripte elongiert. Für die Kinetik wurde eine 100 ml YT-Kultur mit 1/100 Volumen einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 inkubiert. Als Kontrolle wurden vor der Zugabe von Rifampicin 3 ml Zellkultur entnommen. Nach Zugabe von Rifampicin (Endkonzentration 500 µg/ml) wurden nach 20, 40, 60, 80, 150 und 300 Sekunden jeweils 3 ml entnommen und direkt in 60°C heißem BSCE-Phenol extrahiert. Nach Wiederholung der BSCE-Phenol Extraktion wurde noch eine BSCE-Phenol/ Chloroform Extraktion und eine Chloroform Extraktion durchgeführt. Die wässrige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc versetzt und mit 2.5 Volumen absolutem EtOH gefällt. Nach dem Waschen des Pellets mit 80% (v/v) EtOH wurde das Pellet lyophilisiert und in Aqua dest. rückgelöst. Die Qualität wurde über ein 1% (w/v) Agarosegel bestimmt und die Konzentration im Spektralphotometer (6.2.1.1) bestimmt. Aliquots der RNA wurden über Primer-Extension Analyse (6.3.1.1) analysiert.

### 6.3.7. Northern-Analyse

Für die Northern-Analyse wurde die Methode nach Sambrook et al., 1989, verwendet. Dazu wurden 10 µg der bei der Rifampicin-Kinetik isolierten und aufgereinigten Gesamt-RNA über ein 1.2% (w/v) denaturierendes Agarosegel elektrophoretisiert. Das Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese in Gegenwart von 5x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond N, Amersham). Der Transfer dauerte 14 Stunden und erfolgte passiv durch Kapillartransfer. Nach dem Transfer auf die Nylonmembran wurde die RNA mittels UV-Licht (120 mJ) in einem UV-Crosslinker (Stratalinker, Stratagene) kovalent fixiert. Anschließend konnte die Membran für die Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotid-Sonden eingesetzt werden. Dazu wurde sie in eine Glasflasche eingebracht, wobei die RNA-haltige Membranseite nach Innen gerichtet war. Nach Zugabe von 20 ml Hybridisierungslösung erfolgte eine Vorinkubation im Hybridisierungsofen (Biometra) für 2 Stunden bei der gleichen Temperatur, bei der auch die Hybridisierung

durchgeführt wird. Diese begann nach Zugabe von  $5 \times 10^6$  cpm  $^{32}\text{P}$ -markiertem Oligonukleotid und dauerte 14-16 Stunden. Danach wurde die Hybridisierungslösung abgekippt und die verbleibenden, nicht hybridisierten Sondenmoleküle durch dreimaliges 30-minütiges Waschen mit jeweils 50 ml Waschlösung entfernt. Die Hybridisierungstemperatur ergab sich aus dem ermittelten  $T_m$ -Wert minus  $8^\circ\text{C}$ . Um nacheinander verschiedene Sonden gegen die gleiche RNA hybridisieren zu können, wurde die Sonde durch dreimaliges einstündiges Waschen mit 50 ml Aqua dest. bei  $80^\circ\text{C}$  entfernt. Danach mußte erneut vorhybridisiert werden, bevor das neue Oligonukleotid hybridisiert werden konnte.

Hybridisierungslösung:                    5x SSC- Puffer  
    7.5% (w/v) SDS  
    50 µg/ml Heringssperm-DNA

Waschlösung:                                5x SSC-Puffer  
    0.1% (w/v) SDS

20x SSC:                                      300 mM Natriumcitrat  
    3 M NaCl, pH 7.0

### 6.3.8. S1 Nuklease-Protektion zur Bestimmung des 3'-Endes

Diese Methode wurde in Anlehnung an die von Murray, 1986, beschriebene Methode mit Mung Bean Nuklease durchgeführt. Mung Bean Nuklease erkennt spezifisch einzelsträngige Nukleinsäure und baut sie ab. Durch die Verwendung eines 3 M Natrium-Trichloressigsäure (NaTCA)-Puffers kann die Hybridbildung zwischen der DNA-Sonde und der RNA deutlich erhöht werden, so daß unspezifischer Abbau durch die Nuklease stark eingeschränkt werden kann.

Für die Bestimmung des 3'-Endes wurde eine nicht radioaktive PCR-Sonde verwendet. 15 µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit 30 ng Sonde gemischt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 µl NaTCA-Puffer rückgelöst und mit einem Tropfen Paraffin überschichtet. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei  $60^\circ\text{C}$  wurden die Proben in ein  $45^\circ\text{C}$  Wasserbad überführt und über Nacht inkubiert. Das Paraffin wurde abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 150 µl kaltem Reassoziations-Stop-Puffer terminiert. Die Proben wurden dann auf Eis gehalten und der Ansatz auf 3 Eppis verteilt. Ein Aliquot diente der Kontrolle und wurde im weiteren Verlauf nicht mit S1 Nuklease inkubiert. Die übrigen Proben wurden mit 25 U bzw. 50 U Mung Bean für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl 0.2% (w/v) SDS, 20 mM EDTA gestoppt und mit Phenol/ Chloroform



100 mM NaCl  
0.5 mM EDTA  
1 mM DTT  
(der universelle RHM-Puffer enthält zusätzlich  
noch 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub>)

#### **6.3.9.2. *In vitro* Modifikation mit Nuklease T1**

Nuklease T1 schneidet spezifisch einzelsträngige Guanosinnukleotide unter Bildung von 3'-Phosphatenden.

Der Reaktionsansatz wurde analog zu dem S1-Hydrolyseansatz (6.3.9.1) zusammen pipettiert, jedoch wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0.1-1 mU gestartet und die Proben für exakt 10 Minuten bei 20 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde wie bei der S1-Hydrolyse beschrieben aufgearbeitet.

#### **6.3.9.3. *In vitro* Modifikation mit Nuklease Cobra Venom Enzym (CVE)**

CVE ist ein Enzym aus dem Gift der Kobra Naja Naja Oxiana und ist eine doppelstrangspezifische Nuklease.

Der Reaktionsansatz erfolgte wie bei der S1-Hydrolyse (6.3.9.1); die Hydrolyse wird durch Zugabe von 0.1-0.7 mU CVE gestartet. Die Proben wurden für exakt 30 Minuten bei 20 °C im Wasserbad inkubiert. Die weitere Behandlung und Aufarbeitung erfolgte wie bei der S1-Hydrolyse.

#### **6.3.10. Chemische Modifikation ribosomaler RNA**

Die Modifikation von RNA mit spezifischen Chemikalien ermöglicht auch Strukturdaten in Regionen der RNA-Struktur zu erhalten, die durch limitierte enzymatische Hydrolyse nicht zu analysieren sind. Dabei modifizieren die Chemikalien spezifische RNA-Nukleotide.

##### **6.3.10.1. *In vitro* Modifikation mit Kethoxal (KE)**

KE modifiziert einzelsträngige Guanosine (Ehresmann et al., 1987). Die zwei reaktiven C-Atome des KE bilden mit der N1- und N3-Position des Guanosins einen basenlabilen Fünfring, an dessen 3'-Seite es bei der Primer-Extension-Reaktion zur Termination der reversen Transkription kommt.

In einem Reaktionsvolumen von 200 µl wurden 20 µg RNA in 1x uRHM\*-Puffer (6.3.9.1) denaturiert und renaturiert. Anschließend wurde das Volumen des Ansatzes auf 1050 µl erhöht und auf 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnCl<sub>2</sub> eingestellt. Danach wurde der Ansatz in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Durch die Zugabe von 20 µl gesättigter KE-Lösung wurde die Reaktion gestartet und die Proben für 15, 30 und 45 Minuten bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M NaOAc, 10 µl 0.5 M Natriumborhydrid und 3 Volumen absolutem Ethanol gestoppt und die RNA wie unter 6.3.9.1 beschrieben aufgearbeitet und eingesetzt.

### 6.3.10.2. *In vitro* Modifikation mit DMS

DMS methyliert die zugängliche N1-Position von Adenosinen, die N3-Position zugänglicher Cytidinen und die N7-Positionen von Guanosinen (Ehresmann et al., 1987). Die Methylierung an Adenosinen und Cytidinen führt bei der PE-Reaktion zur Termination der reversen Transkription. Die Vorbereitung der RNA erfolgte wie unter 6.3.10.1 beschrieben.

Durch die Zugabe von 1 µl DMS-Lösung (1:2 in abs. EtOH) wurde die Reaktion gestartet und die Proben für 3, 5 und 10 Minuten bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung und 3 Volumen absolutem Ethanol gestoppt und die RNA für 15 Minuten auf Eis gefällt. Anschließend wurde die RNA wie unter 6.3.10.1 weiter aufgearbeitet.

Stop-Lösung:	0.1 mM EDTA
	1.5 M NaOAc
	1 M β-Mercaptoethanol
	1 M Tris-Acetat

### 6.3.10.3. *In vitro* Modifikation mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)

DEPC methyliert zugängliche Adenosine. Dabei kommt es an der N7-Position zur Carboxylierung des Adenosins, was seinerseits zu einer Destabilisierung des Imidazolringes führt (Ehresmann et al., 1987).

Die RNA wurde wie unter 6.3.10.1 beschrieben vorbereitet. Durch Zugabe von 5 µl DEPC-Lösung wurde die Reaktion gestartet und die Proben für 15, 30 und 45 Minuten bei 20°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M NaOAc und 3 Volumen absolutem Ethanol gestoppt und die RNA für 15 Minuten auf Eis gefällt. Anschließend wurde die RNA wie unter 6.3.10.1 beschrieben aufgearbeitet und eingesetzt.

### 6.3.11. *In vivo* Modifikationen ribosomaler Untereinheiten mit DMS

Die *in vivo* Modifikation ribosomaler RNA-Moleküle erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Laughrea et al., 1992. Dabei wurde eine 250 ml Bakterienkultur bei 30°C bzw. 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur schnell und möglichst ohne große Temperaturschwankungen in 2 Aliquots zu 100 ml aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 100 µl unverdünnter DMS Lösung versetzt und für 10 Minuten bei entsprechender Temperatur weiter inkubiert. Das zweite Aliquot diente als unmodifizierte Kontrolle. Die Kulturen wurden anschließend für 10 Minuten bei 8000 rpm und 4°C (Beckmann J2-21-Zentrifuge, JA-14-Rotor) pelletiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von einem Volumen 10 M NaOH und anschließender Neutralisation mit konzentrierter Salzsäure entsorgt. Das Zellpellet wurde wie unter 6.3.5 beschrieben behandelt und das Lysat über einen 10-30% (w/v) Saccharosegradienten aufgetrennt. Die rRNA aus den Fraktionen wurde nach Aufnahme in Lagerungs-Puffer wie unter 6.3.4 beschrieben isoliert. Der Nachweis der DMS modifizierten Positionen erfolgte über Primer Extension Analyse (6.3.1.1).

### 6.3.12. Präparation von FII-Zellextrakten für die *in vitro* Transkription

Zur Analyse von Prozessierungseffekten bei der *in vitro* Transkription mit *Escherichia coli* RNA-Polymerase wurden zuvor alle löslichen Proteine aus RNase defizienten Stämmen isoliert. Die Isolation dieser FII-Extrakte erfolgte nach der von Szymkowiak et al., 1988, beschriebenen Methode. Dazu wurden jeweils 800 ml YT mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bei 37°C kultiviert. Nach Überführung der Zellen in einen vorgekühlten JA-10 Zentrifugenbecher und einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 8000 rpm in einer Beckman J2-21 Kühlzentrifuge wurden die sedimentierten Zellen vom Überstand getrennt und in 50 ml eiskühlem Puffer A resuspendiert. Nachdem die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 0.8 ml Puffer A gelöst und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach langsamen Auftauen der Zellen in einem 8°C Wasserbad wurde die Suspension auf Eis überführt und auf 80 mM KCl und 2 mM DTT eingestellt und mit 0.01 Volumen Lysozym (25 mg/ml in Puffer A) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und erneutem Einfrieren in Stickstoff wurde das Lysat im 8°C Wasserbad aufgetaut und bei 61000 rpm für 4 Stunden bei 4°C in einer Beckmann TL-Ultrazentrifuge im TLA-100.3 Rotor zentrifugiert. Der klare Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde sogleich abgenommen, auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt und zu je 50 µl aliquottiert. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert, die Konzentrationsbestimmung



Initiations-NTP-Stammlösung: 400  $\mu$ M CTP, GTP, UTP (Pharmacia)  
10 mM Tris-HCl, pH 7.4

Zur Ausbildung des ternären Komplexes wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 30°C inkubiert und nach Vermischen mit 40  $\mu$ l 98%igem Glycerin durch Gelfiltration mit Sepharose 6B von freien Nukleotiden, freier Polymerase und Plasmid-DNA getrennt. Für präparative Ansätze wurde der oben aufgeführte Ansatz um das 4-fache aufskaliert, die Plasmid-DNA auf 60  $\mu$ g und die Radioaktivität auf 5  $\mu$ l erhöht. Der ternäre Komplex konnte bei der Gelfiltration durch Detektion der enthaltenen Radioaktivität mit dem Punktzähler detektiert werden.

### 6.3.14. Elongation des ternären Komplexes

Die Elongation wurde stets mit einem frisch isolierten ternären Komplex durchgeführt, obwohl ein Test keine Auswirkung der Elongationsfähigkeit nach mehrtägiger Lagerung im Kühlschrank gezeigt hat.

Zur Verlängerung wurden 250  $\mu$ l des Komplexes eingesetzt, der mit oder ohne Zugabe von isoliertem Gesamt-Protein verlängert wurde. Der Standardelongationsansatz ist nachfolgend aufgeführt:

250 $\mu$ l P2-ternärer Komplex
112 $\mu$ l 5x Transkriptionspuffer
53.8 $\mu$ l NTP-Stammlösung (4 mM)
x $\mu$ l Protein-Extrakt (140 $\mu$ g)
<hr/>
ad 562 $\mu$ l mit Aqua dest.

NTP-Stammlösung: 4 mM ATP, CTP, GTP, UTP  
10 mM Tris-HCl, pH 7.4

Stöplösung: 1.5 M NH<sub>4</sub>OAc  
37.5 mM EDTA  
50  $\mu$ g/ml tRNA

Für die Elongation wurde zunächst der Transkriptionspuffer mit der nötigen Menge Aqua dest. gemischt und dann der ternäre P2-Komplex hinzu pipettiert. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 30°C für 10 Minuten vorinkubiert, ebenso wie die NTP-

Stammlösung und die Proteinextrakte. Dem Ansatz ohne Protein wurde vor Zugabe der NTP-Stammlösung ein Aliquot von 50 µl entnommen und dieses wurde direkt mit dem gleichen Volumen Stopplösung gemischt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gehalten. Bei den Ansätzen, die zusätzlich noch Proteinextrakt (oder gereinigte RNase III) enthielten, wurde erst direkt vor Zugabe der NTP-Stammlösung das entsprechende Volumen Proteinextrakt bzw. RNase III hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 Sekunden wurde das erste Aliquot von 100 µl entnommen und in gleichem Volumen Stopplösung aufgenommen. Nachdem alle Proben genommen und gestoppt worden sind, erfolgte eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/ Chloroform. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten wurde der wässrige Überstand abgenommen und wie unter 6.2.5.2 beschrieben aufgearbeitet. Das Pellet wurde direkt in 10 µl 1x Harnstoff-Probenpuffer rückgelöst. Nach 3 Minuten Denaturierung bei 96°C und Überführung der Proben auf Eis wurde ein Aliquot von 5 µl auf ein 8% (6.2.6.3) Polyacrylamid aufgetragen und aufgetrennt.

## 7. Literaturverzeichnis

Aksoy, S., Squires, C.L. und Squires (1984). Evidence for antitermination in *E. coli* rRNA transcription. *J. Bacteriol.* **159**: 260-264.

Altman, S., Baer, M., Guerrier-Takada, C. und Viogue, A. (1986). Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 515-518.

Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C. und Squires, C. L. (1998). An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1971-1976.

Balakin A. G., Smith L. und Fournier M. J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* **88**: 823-834.

Balzer, M. und Wagner, R. (1998). Mutations in the leader region of ribosomal RNA operons cause structurally defective 30S ribosomes as revealed by *in vivo* structural probing. *J. Mol. Biol.* **276**: 547-557.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* Vol. **289**: 905-920.

Beidler, J. H., Hillard, P.R. und Rill, R.L. (1982). Ultrasensitive straining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* **126**: 374-380.

Besancon, W. (1998). Untersuchungen zur Funktion der ribosomalen Leader-RNA von *Escherichia coli* bei der Strukturbildung der 16S rRNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Besancon, W. and Wagner, R. (1999). Characterization of transient RNA-RNA interaction important for the facilitated structure formation of bacterial ribosomal 16S RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4353-4362.

Blum, B., Bakalara, N. und Simpson, L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: „guide“ RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* **60**: 189-198.

Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Green, P., J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. und Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.

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

Brínk, F.M., Verbeet, M.P. und de Boer, H.A. (1993). Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation. *EMBO J.* **12**: 3987-3996.

Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. und Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**: 107-124.

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

Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. und Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, Vol. **104**: 901-912.

Cammack, K. A. und Wade, H. E. (1965). The sedimentation behaviour of ribonuclease-active and -inactive ribosomes from bacteria. *Biochem. J.* **96**: 671-680.

Cattaneo, R. (1991). Different types of messenger RNA editing. *Ann. Rev. Genet* **25**: 71-78.

Cech, T. und Bass, B.L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 599.

Cech, T. R. (2000). The ribosome is a ribozyme. *Science* Vol. **289**: 878-879.

Conn, G. L., Gutell, R. R., Draper, D. E. (1998). A functional ribosomal RNA tertiary structure involves a base triple interaction. *Biochemistry*, **37**: 11980-11988.

Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-26.

Dahlberg, A. E., Tokimatsu, H., Zahalak, M., Reynolds, F., Calvert, P., Rabson, A. B. und Dahlberg, J. E. (1977). Processing of the 17S precursor ribosomal RNA. in: Vogel, H. J. (Hrsg.). Columbia University Symposium on Protein Nucleic Acid Interaction. Academic Press, New York: 509-518.

Dammel, C.S. und Noller, H.F. (1993). A cold-sensitive mutation in the 16S rRNA provides evidence for helical switching in ribosome assembly. *Genes and Development* **7**: 660-670.

Dennis, P.P., Russell, A.G. und Moniz de Sá, M. (1997). Formation of the 5' end pseudoknot in the small subunit ribosomal RNA: Involvement of U3-like sequences. *RNA Society* **3**: 337-343.

Eberle, J. (1987). Effekte von Punktmutationen zwischen Promotoren und 16S RNA-Strukturgenen im ribosomalen RNA-Operon B von *Escherichia coli*. Diplomarbeit Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J.-P. und Ehresmann, B. (1987). Probing the structure of RNAs in solution. *Nucl. Acids Res.* **15**: 9109-9128.

Eliceiri, G. L. (1999). Small nucleolar RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol. **56**: 22-31.

Ellwood, M. und Nomura, M. (1982). Chromosomal location of genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **149**: 458-468.

Enright, C.A., Maxwell, E.S. und Sollner-Webb, B. (1996). 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17 and U3. *RNA* **2**: 1094-1099.

Fournier, M.J. und Maxwell, E.S. (1993). The nucleolar snRNAs - catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 131-135.

Frank, D. N. und Pace, N. R. (1998). Ribonuclease P: Unity and Diversity in a tRNA Processing Ribozyme. *Annual Rev. Biochem.* **67**: 153-180.

Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Grassucci, R., Squires, C. L., Dahlberg, A. E., Frank, J. (1999). Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure cause by conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**: 6501-6507.

Gallo, R.C. und Montagnier, L. (1987). The chronology of AIDS research. *Nature* **326**: 435-436.

- Garrett, R. A., Ungewickell, E., Newberry, V., Hunter, J. und Wagner, R. (1977). An RNA core in the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli* and its structural and functional significance. *Cell. Biol. Int. Rep.* **1**: 487-502.
- Gesteland, R. F. (1966). Isolation and characterization of Ribonuklease I mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **16**: 67-84.
- Geyl, D., Böck, A. und Isono, K. (1981). An improved method for two-dimensional gel-electrophoresis: analysis of mutationally altered ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **181**: 309-312.
- Gibson, S. und Shillitoe, E. (1997). Ribozymes. *Mol. Biotechnology* **7**: 125-137.
- Gilbert, W. The RNA World. (1986). *Nature* **319**: 618.
- Godson, G. N. und Sinsheimer, R. (1967). Use of brij lysis as a general method to prepare polysomes from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **149**: 489-495.
- Göringer, H.U., Szymkowiak, C. und Wagner, R. (1984). 5S RNA A- and B-conformers: Characterisation by enzymatic and chemical methods. *Eur. J. Biochem.* **114**: 25-34.
- Gourse, R. L., Stark, M. J. R. und DAhlberg, A. E. (1982). Site-directed mutagenesis of ribosomal RNA. Construction and characterization of deletion mutants. *J. Mol. Biol.* **159**, 397-416.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. in: DNA cloning. D.M. Glover (ed.) **1**: 121-124.
- Hecker, R. (1989). Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Held, W.A., Ballou, B., Mizushima, S. und Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J. Biol. Chem.* **249**: 3109-3111.

Hillen, W., Klein, R.D. und Wells, R.D. (1981). Preparation of milligram amounts of 21 DNA restriction fragments. *Biochemistry* **29**: 2007-2012.

Holben, W.E., Prasad, S.M. und Morgan, E.A. (1985). Antitermination of both the promoter and the leader region of an *E. coli* ribosomal RNA operon. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 5073-5077.

Hughes, J.M.X. und Ares, M. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5'external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA processing. *Cell* **60**: 897-908.

Hughes, J.M.X. (1996). Functional base-pairing interaction between highly conserved elements of U3 small nucleolar RNA and the small ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Biol.* **259**: 645-654.

Ingham, C. J. and Furneaux, P. A. (2000). Mutations in the  $\beta$ -subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both rifampicin resistance and hypersensitivity to NusG. *Microbiology*, **146**: 3041-3049.

Ish-Horowitz, A. und Burk, M. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.

Itoh, T. und Tomizawa, J. (1980). Formation of an RNA-primer for initiation of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**: 2450-2454.

Jády, B. E., Kiss, T. (2000). Characterisation of the U83 and U84 small nucleolar RNAs: two novel 2'-O-ribose methylation guide RNAs that lack complementarities to ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. **6**: 1348-1354.

Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A und Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* **60**: 897-908.

King, T. C., and Schlessinger, D. (1982). S1 nuclease mapping analysis of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**: 12034-12042.

King, T. C., Sirdeskmukh, R., Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in procaryotes. *Microbiological Reviews*, Vol. 50, No. **4**: 428-451.

- Kingston, R.E. und Chamberlin, M.J. (1981). Pausing and attenuation of *in vitro* transcription in the *rrnB* operon of *E. coli*. *Cell* **27**: 523-531.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **91**: 9223-9227.
- Koraimann, G., Schroller, C., Graus, H., Angerer, D., Teferle, K. und Hogenauer, G. (1993). Expression of gene 19 of a conjugative plasmid R1 is controlled by RNase III. *Mol. Microbiol.*, **9**: 717-727.
- Lacatena, R.M. und Cesarini, G. (1981). Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor ColE1 replication. *Nature* **294**: 623-626.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, T. S., Gerbi, S. A. (2000). Transient nucleolar localization of U6 small nuclear RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. **11**: 2419-2428.
- Laughrea, M. und Tam, J. (1992). *In vivo* chemical footprinting of *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry* **31**: 12035-12042.
- Lease, R. A., Cusick, M. und Belfort, M. (1998). Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA modulates function by forming alternative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 12456-12461.
- Leontis, N. B., Westhof, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* **7**: 499-512.
- Li, Z., Deutscher M. P. (1995). The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**: 6883-6886.
- Li, Z., Pandit, S., Deutscher M. P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *The EMBO Journal* Vol. **18**, No. 10: 2878-2885.
- Liebig, B. (1996). Quantitative Analyse der ribosomalen RNA-Expressionsmuster des Bakteriums *Escherichia coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

- Lilley, D. M. J. (1999). RNA folding and catalysis. *Genetica* **106**: 95-102.
- Lilley, D. M. J. (2001). The ribosome functions as a ribozyme. *ChemBiochem* **2**: 31-35.
- Liou, G., Jane, W., Cohen, S. N., Lin, N., Lin-Chao, S. (2001). RNA degradosomes exist in vivo in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *PNAS*, Vol. **98**, No. 1: 63-68.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. und Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**: 1-6.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K., Gottesman, S. (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Molecular Microbiology*, **39**: 1382-1394.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marinus, M. G. (1983). Insertion mutations in the dam gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 55-66.
- Maxwell E. S. und Fournier M. J. (1995). The small nucleolar RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, **35**: 897-934.
- Mian, I. S. (1997). Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, PH and D. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3187-3195.
- Mogridge, J. und Greenblatt, J. (1998). Specific binding of *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 to boxA Transcriptional Antiterminator RNA. *J. Bacteriol.* **180**: 2248-2252.
- Moore, P. B. (1999). Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 287-300.
- Mullis, K.B. und Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.

Murray, M. G. (1986). Use of sodium trichloracetat and mung bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping. *Analytical Biochemistry* **158**: 165-170.

Muto, A., Ushida, C. und Himeno, H. (1998). A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 25-29.

Naryshkina, T., Mustaev, A., Darst, S. A., Severinov, K. (2001). The  $\beta'$  subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase is not required for interaction with initiating nucleotide but is necessary for interaction with rifampicin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. **16**: 13308-13313.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* Vol. **289**: 920-930.

Noah, J. W., Dolan, M. A., Babin, P., Wollenzien, P. (1999). Effects of tetracycline and spectinomycin on the tertiary structure of ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, No. **23**: 16576-16581.

Noller, H. F., Hoffarth, V. und Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyltransferase to protein extraction procedures. *Science* **256**: 1416-1419.

Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D. und Post, L.E. (1980). Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *E. coli*: structural homology between ribosomal protein mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**: 7084-7088.

Nowotny, V. und Nierhaus, K. H. (1988). Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry* **27**: 7051-7055.

Omer, A. D., Lowe, T. M., Russell, A. G., Ebhardt, H., Eddy, S. R., Dennis, P. P. (2000). Homologs of small nucleolar RNAs in archaea. *Science* Vol. **288**: 517-522.

Ow, M. C., Liu, Q., Kushner, S. R. (2000). Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Molecular Microbiology* **38**: 854-866.

Pardon, B. (1994). Untersuchungen zur Struktur und Funktion ribosomaler Vorläufer-RNA: Die zusätzlich transkribierte „leader“-RNA der *rrnB*-Transkriptionseinheit von *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

- Pardon, B. und Wagner, R. (1995). The *Escherichia coli* ribosomal RNA leader *nut* region interacts specifically with mature 16S RNA. Nucl. Acids Res. **23**: 932-941.
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsch, T., Yonath A. und Franceschi, F. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. The EMBO Journal, Vol. 20, No. **8**: 1829-1839.
- Polacek, N., Patzke, S., Nierhaus, K. H. und Barta, A. (2000). Periodic conformational changes in rRNA: Monitoring the dynamics of translating ribosomes. Molecular cell, Vol. **6**: 159-171.
- Poot, R. A., van den Worm, S. H. E., Pleij, C. W. A. and van Duin, J. (1998). Base complementarity in helix 2 of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for ribosome functioning. Nucleic Acids Research Vol. **26**, No. 2: 549-553.
- Ray, B. K., and Apirion, D. (1979). Characterization of 10S RNA: a new stable RNA molecule from *Escherichia coli*. Mol Gen Genet **174**: 25-32.
- Robertson, H. D., Pelle, E. G. und McLain (1980). RNA processing in an *Escherichia coli* strain deficient in both RNase P and RNase III. in: Transfer RNA, Biological Aspects, Söll, D., Abelson, J. und Schimmel, P. (Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 107-122.
- Rosenbaum, V. und Riesner, D. (1987). Temperature-gradient gel electrophoresis: Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. Biophys. Chem. **26**: 235-246.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sancar, A., Hack, A. M. und Rupp, D. (1979). Simple method for identification of plasmid-coded proteins. J. Bacteriology **137**: 692-693.
- Sanger, F., Nicklen, A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci., **74**: 5463-5467.
- Sänger, H. L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: the agent of the exocortis disease of citrus. Adv. Biosci., **8**: 103-116.

Schäferkordt, J. (1998). Die Rolle der ribosomalen *E. coli* Leader-RNA auf die Strukturbildung der kleinen ribosomalen Untereinheit. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

Schollmeier, K. (1985). Molekulare Struktur Transposon Tn10 kodierter Tetracyclin-resistenzgene und die Regulation ihrer Transkription. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Schortle, D. und Botstein D. (1983). Directed mutagenesis with sodium bisulfite. *Methods in Enzymology* **100**: 457-469.

Sharma, K., Tollervey, D. (1999). Base pairing between U3 small nucleolar RNA and the 5' end of 18S rRNA is required for pre-rRNA Processing. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 19, No. **9**: 6012-6019.

Srivastava, A. K. und Schlessinger, D. (1990). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annual Rev. Microbiol.*, **44**: 105-129.

Stark, M. J. R., Gourse, R. L. und Dahlberg, A. E. (1982). Site-directed mutagenesis of ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **159**: 417-439.

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

Studier, F. W. (1975). Genetic mapping of a mutation that causes ribonuclease III deficiency in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology* **124**: 307-316.

Subbarao, M. N., and Apirion, D. (1989). A precursor for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 499-504.

Szymkowiak, C., Reynolds, R. L., Chamberlin, M. J. und Wagner, R. (1988). The tRNA<sup>Glu</sup><sub>2</sub> gene in the *rrnB* operon of *E. coli* is a prerequisite for correct RNase III processing in vitro. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7885-7899.

Theißen, G. Eberle, J., Zacharias M., Tobias, L. und Wagner, R. (1990). The t<sub>L</sub> structure within the leader region of *Escherichia coli* ribosomal RNA operons has post-transcriptional functions. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3893-3901.

- Theißen, G., Thelen, L., Wagner, R. (1993). Some base substitutions in the leader of an *Escherichia coli* ribosomal RNA operon affect the structure and function of ribosomes. *J. Mol. Biol.*, **233**: 203-218.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H. und Hurt, E. C. (1993). Temperature sensitive mutations demonstrate role for yeast fibrillarin in pre-rRNA Processing, Pre-rRNA methylation, and Ribosome. *Cell*. **72**: 443-457.
- Tinoco I., Jr und Bustamante C., (1999). How RNA folds. *J. Mol. Biol.* **293**: 271-281.
- Treiber, D. K. and Williamson, J. R. (1999). Exposing the kinetic traps in RNA folding. *Current Opinion in Structural Biol.* **9**: 339-345.
- Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T. und Muto, A. (1994). tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **22**: 3392-3396.
- Wassarman, K. M., Zhang A. und Storz G. (1999). Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, Vol. 7, No. 1: 37-45.
- Wassarman, K. M., Repoila F., Rosenow, C., Gottesman, S., Storz, G. (2001). Genome-wide search identifies 17 novel small RNAs in *E. coli*. Abstract-book of the sixth annual meeting of the RNA society, May 29<sup>th</sup> – June 3<sup>rd</sup>, 2001.
- Westhof, E., Fritsch, V. (2000). RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure*, Vol. **8**: 55-65.
- Williams, K. P., Bartel, D. P. (1998). The tmRNA website. *Nucleic Acids Res.* **26**: 163-165.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* Vol. **407**: 327-339.
- Wittmann, H.G. (1983). Architecture of prokaryotic ribosomes. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 35-65.
- Young, R.A. und Steitz, J.A. (1978). Complementary sequence 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 3593-3597.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate J. H. D., Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**: 883.

Zabeau, M. und Roberts, R. (1979). The role of restriction endonucleases in molecular genetics. In *Molecular genetics, Part III*, J. H. Taylor, Hrsg., Academic Press, New York: 1-63.

Zacharias, M. (1986). *In vivo* Effekte von Punkt- und Deletionsmutationen im Promotorbereich des *rrnB*-Operons. Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

Zacharias, M., Theißen, G., Bradaczek, C. und Wagner, R. (1991). Analysis of sequence elements important for the synthesis and control of ribosomal RNA in *E. coli*. *Biochimie* **73**: 699-712.

Zacharias, M., Wagner, R. (1987). Deletion in the  $t_L$  structure upstream to the rRNA genes in the *E. coli* *rrnB* operon causes transcription polarity. *Nucleic Acid Res.* **15**: 8235-8248.

Zhang K., Nicholson, A. W. (1997). Regulation of ribonuclease III processing by double-helical sequence antiterminants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 13437-13441.

Zirwes, O. (2001). Einfluß von Mutationen in der Leader-Region eines ribosomalen RNA-Operons auf die Faltungskinetik und Assemblierung der kleinen ribosomalen Untereinheit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

## Abkürzungsverzeichnis

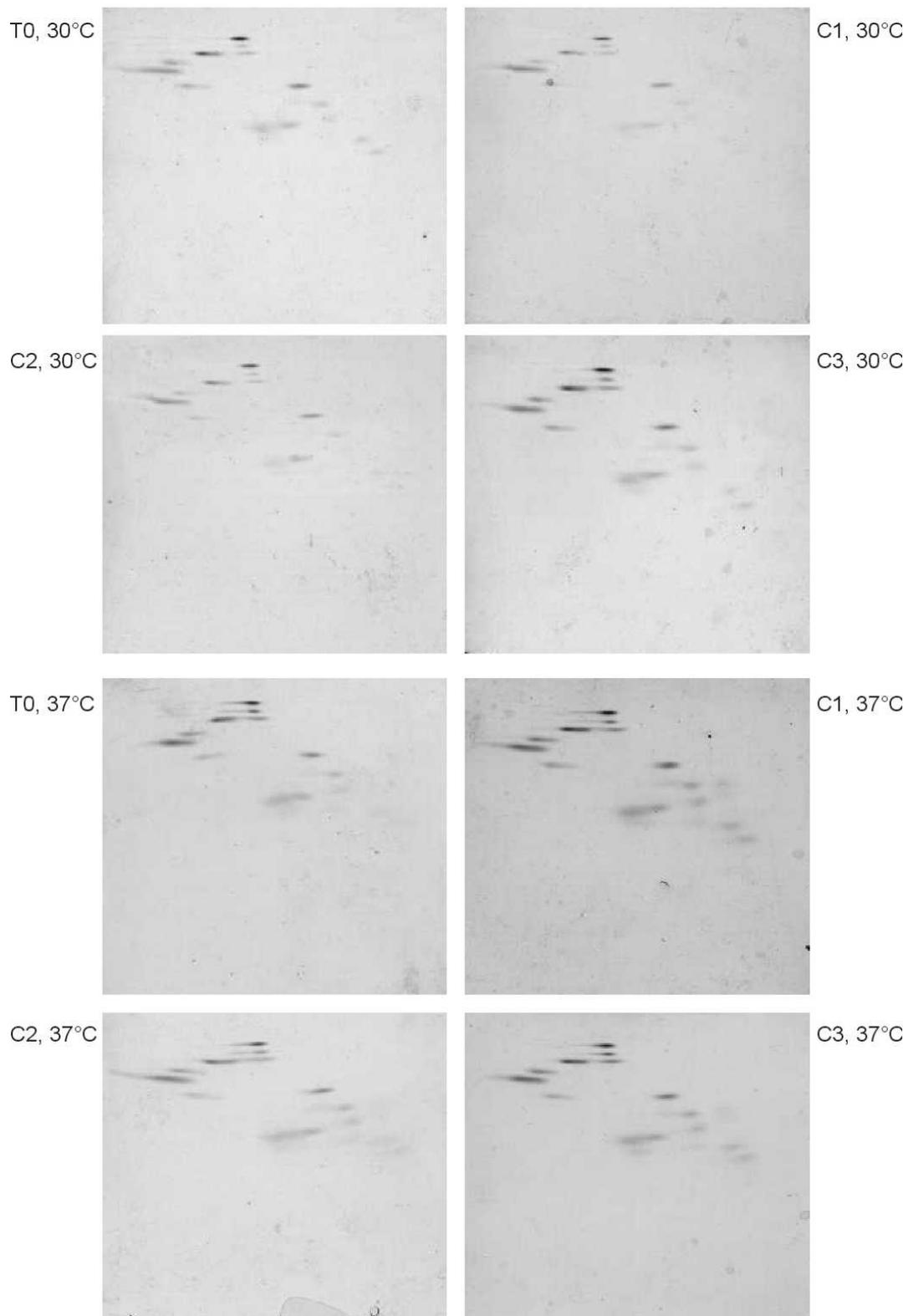
A <sub>260/600</sub>	Absorption bei 260 bzw. 600nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxysulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (2.22 x 10 <sup>12</sup> dpm)
cm	Zentimeter
cpm	Zähleinheiten pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
CVE	cobra venom enzyme
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
GTP	Guanidintriphosphat
g	Gramm
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KE	Kethoxal
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mU	Millieinheit
nm	Nanometer
NS	Nukleinsäure
NT	Nukleotide
OD	optische Dichte
[ <sup>32</sup> P]	Phosphorisotop (Massenzahl 32)
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion

---

PEG	Polyethylenglykoll
pmol	Picomol
Pos.	Position
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
<i>rrn</i>	ribosomale Transkriptionseinheit
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
snoRNA	small nucleolar Ribonukleinsäure
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Tyrosintriphosphat
UAS	stromaufwärts aktivierende Region
U	Unit (Aktivitätseinheit)
ün	über Nacht
uRHM-Puffer	universeller Renaturierungs-Hydrolyse-Modifikations-Puffer
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
μ	Wachstumsrate
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

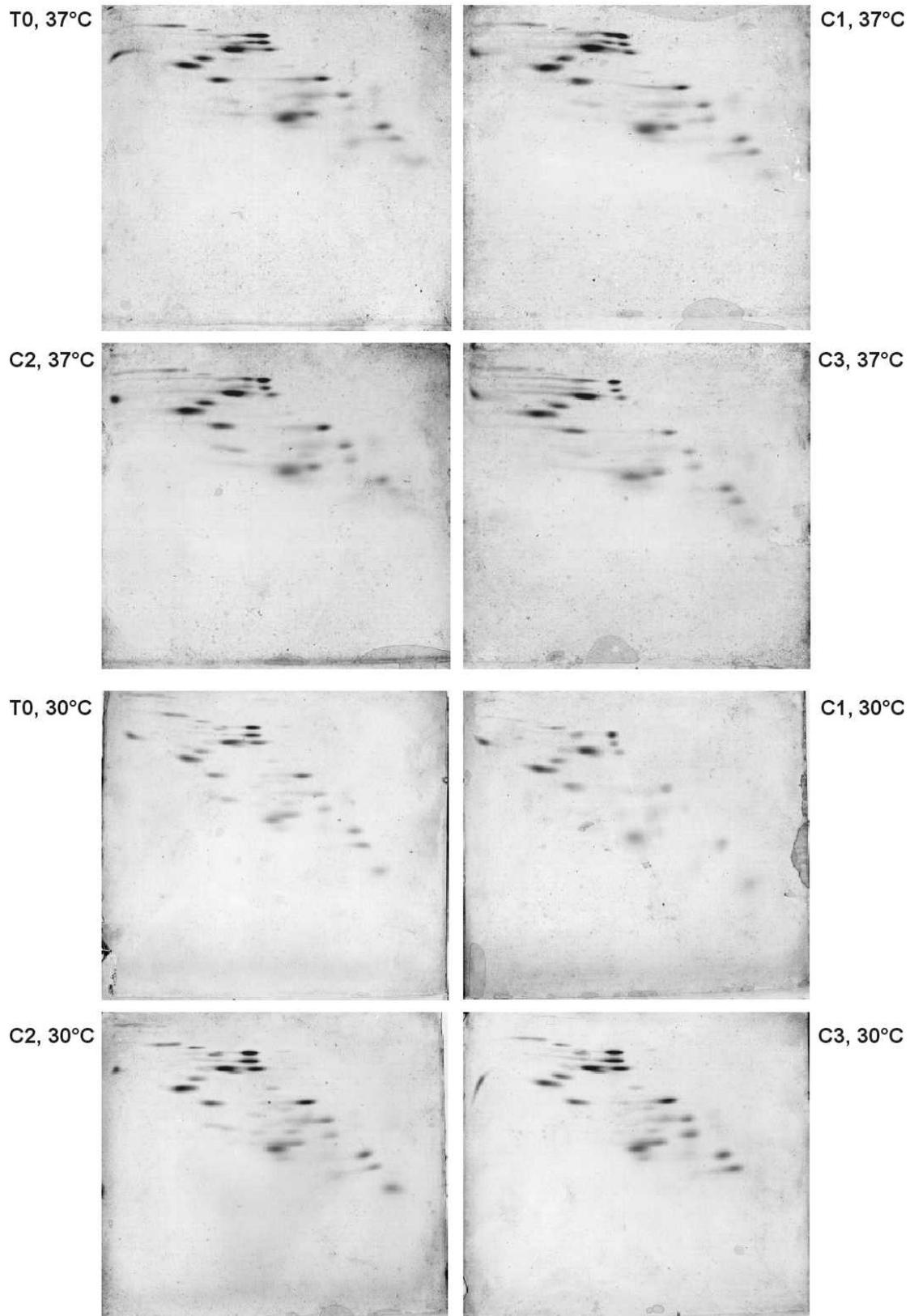
## 9. Anhang

### 1. Analyse



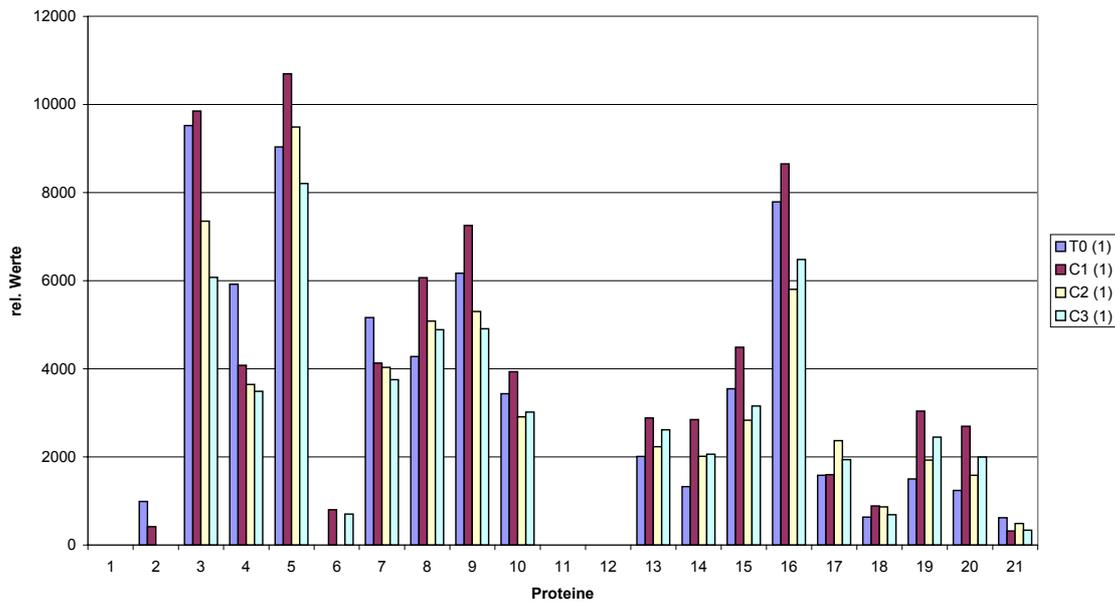
**Abb. A1a:** 2D Gel-Analyse der ersten Reihe (1. Analyse). Auf die Gele C1, 30°C und C2, 30°C wurden nur 0,5 OD<sub>600</sub> 30S Untereinheiten aufgetragen. In der übrigen Gelen wurde 0,75 OD<sub>600</sub> eingesetzt. Alle Gele enthalten jedoch die gleiche Menge des FIS-Standard.

## 2.Analyse

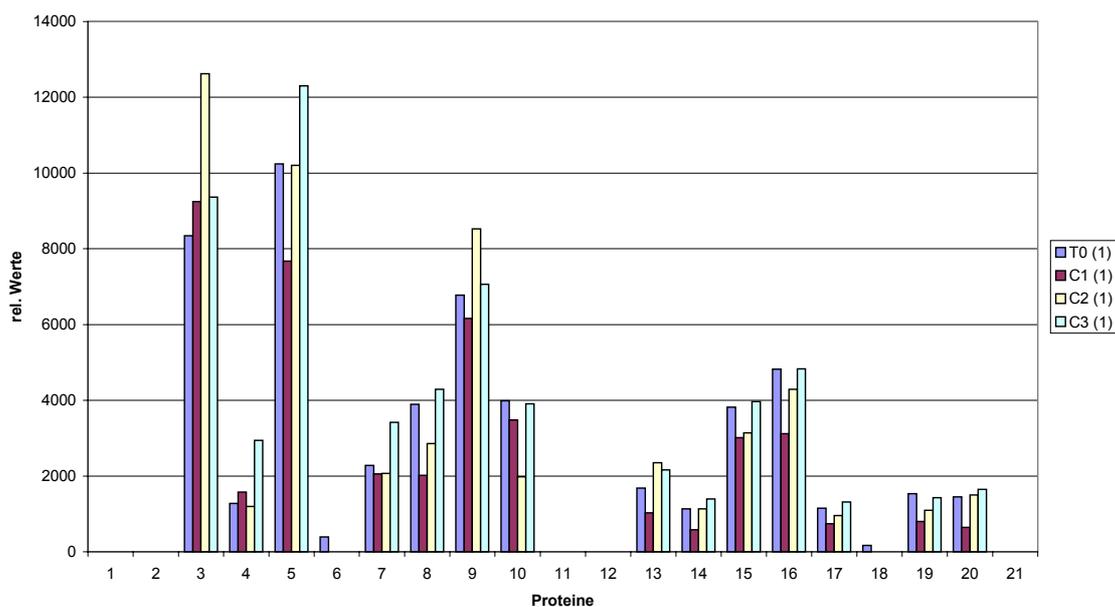


**Abb. A1b:** 2D Gel-Analyse der zweiten Reihe (2. Analyse). In allen Gelen wurden 1,0 OD<sub>600</sub> 30S Untereinheiten eingesetzt. Alle Gele enthalten zudem die gleiche Menge des FIS-Standard. Die 30°C-Gele sind zum besseren Vergleich hier noch einmal abgebildet. Sie entsprechen den Gelen der Abbildung 2.19.

A) 30S Untereinheit aus 37°C gewachsenen Zellen (1. Analyse)



B) 30S Untereinheit aus 30°C gewachsenen Zellen (1. Analyse)



**Abb. A2:** Graphische Darstellung der quantifizierten und auf den FIS-Standard normierten Protein-Spots. S1, S11 und S12 konnten nie detektiert werden. Dargestellt sind die Ergebnisse der 1. Analyse von 30S Untereinheiten aus 37°C bzw. 30°C inkubierten Zellen. Die übrigen Ergebnisse sind im Abb. 2.20 abgebildet.

### Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, September 2001